

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Estudos físico-químicos de O-carboximetilação de quitosana

Daniella de Souza e Silva

SÃO CARLOS
2011

DANIELLA DE SOUZA E SILVA

Estudos físico-químicos de O-carboximetilação de quitosana

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Físico-Química.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana Filho.

SÃO CARLOS

2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE
TRABALHO. POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, sob a exclusiva responsabilidade do autor.

São Carlos, ____/____/____

Nome e Assinatura do Autor

Dedico este trabalho à Deus, a minha família em especial meus pais Daniel e Rute e meu irmão Luiz, pelo apoio e por acreditarem e me ensinarem o valor dos estudos e da dedicação. Dedico também as minhas amigas e amigos que sempre estiveram ao meu lado nessa jornada em busca do conhecimento.

Agradecimentos

- Ao Professor Sérgio Paulo Campana Filho, por sua inestimável contribuição para meu ingresso e desenvolvimento no mundo da pesquisa científica, e acima de tudo por seu apoio, confiança e amizade.
- À minha família pelo amor, paciência e incentivo em todos os momentos.
- Aos técnicos Carlos Bento, Silvana e Márcio, Luis, Thiago e Vinícius que contribuíram pelas prestações de serviços com competência.
- Aos amigos Toni, Anderson, Willian e Jorge pela amizade e por estarem sempre dispostos a ajudar no que for preciso.
- Às grandes amigas Fabyana, Carla, Sara, Virgínia, Kariny, Fran, Amanda, Lukeze, Emanuella, e Eliene por compartilhar as alegrias e dificuldades durante todo esse período.
- Aos queridos amigos de prosa Leandro, Ricardo, Isac, Tiaum, Gued e André por compartilharem bons momentos e grandes experiências.
- A todos os amigos do laboratório de físico-química orgânica: Fernando, Bruno, Bianca, Rachel, Cris, Thalita, Daniele, Erika, Bruna e Mário.
- Às secretárias do IQSC Silvia e Andreia pela simpatia e ajuda.
- Às bibliotecárias do IQSC pela ajuda quanto ao material bibliográfico.
- À CAPES e as demais agências de fomento pelo suporte financeiro para a realização deste projeto.

“O mestre disse a um dos seus alunos: tu queres saber em que consiste o conhecimento? Consiste em ter consciência tanto de conhecer uma coisa quanto de não a conhecer. Este é o conhecimento.” Confúcio.

Resumo

Modificações químicas são executadas com o objetivo de preparar derivados de quitosana com melhores propriedades, inclusive a solubilidade, ampliando as suas possibilidades de aplicação. Neste projeto, gládios de lulas foram utilizados para a extração de beta-quitina, a qual foi submetida ao processo de desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade visando à produção de quitosana extensivamente desacetilada. A quitosana extensivamente desacetilada foi então submetida à reação de carboximetilação, visando à preparação de O-carboximetilquitosana. Foram estudados os efeitos da razão molar quitosana/ácido monocloroacético e do tempo sobre a reação de carboximetilação de quitosana e as características do produto obtido. As características estruturais e morfológicas das amostras geradas neste projeto, a saber, beta-quitina, quitosana e os produtos de carboximetilação de quitosana, foram determinadas pelo emprego de espectroscopias de ressonância magnética nuclear e no infravermelho, análise elementar, difração de raios X e microscopia eletrônica de varredura. Medidas de viscosidade foram empregadas para a determinação de massas molares médias viscosimétricas de quitina, quitosana e O-carboximetilquitosana. A solubilidade de O-carboximetilquitosana em meios aquosos em função do pH e do grau médio de carboximetilação foi investigada por espectroscopia UV/visível e a estabilidade térmica foi estudada por análise termogravimétrica. A partir dos espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio das amostras de carboximetilquitosana foi constatado que a carboximetilação da quitosana ocorreu em extensões diferentes em função das condições reacionais. Também foi constatada a ocorrência de N-carboximetilação, evidenciada pelos sinais observados no intervalo de 3,0-3,4 ppm, atribuídos à mono e diss substituição dos grupos amino. Porém, dada a baixa intensidade dos sinais, foi concluído que a carboximetilação dos grupos aminos ocorreu em baixa extensão. No intervalo 4,05-4,55 ppm foram observados os sinais correspondentes à ressonância dos hidrogênios dos grupos carboximetil (-CH₂-COOD) introduzidos nas posições 3 e 6 das unidades de carboximetilquitosana. A espectroscopia no infravermelho também permitiu a distinção das características estruturais de beta-quitina, quitosana, carboximetilquitosana e a determinação dos graus médios de substituição das amostras carboximetiladas, que variaram no intervalo 0,21<GS<0,43. As análises de difração de

raios X e as análises termogravimétricas mostraram que a carboximetilação de quitosana gerou derivados menos cristalinos, mais hidrofílicos e termicamente menos estáveis do que o polímero de partida. As amostras de carboximetilquitosana apresentaram solubilidade em meios ácido ($\text{pH} < 3,0$), neutro ($\text{pH} \approx 7,5$) e alcalino ($\text{pH} > 8,0$) devido à ocorrência de cargas ao longo de suas cadeias nesses meios, mas foram insolúveis no intervalo $3,5 < \text{pH} < 7,5$. Foi observada a ocorrência de despolimerização simultaneamente à carboximetilação, visto que as amostras de carboximetilquitosana apresentaram valores de massas molares viscosimétricas médias inferiores ao da quitosana de partida. Os resultados deste estudo mostram que o grau médio de substituição das amostras de carboximetilquitosana é fortemente afetado pelo excesso de ácido monocloroacético empregado na reação de derivatização de quitosana, porém o prolongamento da reação não gera derivados mais substituídos.

Palavras-Chave: quitina, quitosana, O-carboximetilquitosana.

Abstract

Chemical modifications are carried out to prepare chitosan derivatives with improved properties, including solubility, extending their application possibilities. In this project, beta-chitin extracted from squid pens was subjected to the ultrasound assisted deacetylation process (USAD Process) aiming the production of extensively deacetylated chitosan. The extensively deacetylated chitosan was submitted to the carboxymethylation reaction to result in O-carboxymethylchitosan (O-CMC). The effects of the molar ratio of chitosan / monochloroacetic acid and of the reaction time on the carboxymethylation reaction and on the characteristics of the O-CMC samples were studied. The structural and morphological characteristics of the samples generated in this project, beta-chitin, chitosan and carboximethylchitosan, were determined by nuclear magnetic resonance and infrared spectroscopy, elemental analysis, X-rays diffraction and scanning electron microscopy. Viscosity measurements were employed to determine the viscosity average molecular weight of chitin, chitosan and O-CMC. The solubility of O-CMC samples in aqueous solution of different pHs was investigated by UV / visible spectroscopy while the thermal stability was studied by thermogravimetric analysis. The $^1\text{H-NMR}$ spectra of the O-CMC samples revealed that the carboxymethylation of chitosan occurred in different extents depending on the reaction conditions. It was also revealed the occurrence of N-carboxymethylation, evidenced by the signals observed in the range of 3.0 ppm - 3.4 ppm, assigned to the mono and disubstitution of amino groups. However, as the signal intensity was low, it was concluded that the N-carboxymethylation occurred in low extension. In the interval 4.05 ppm - 4.55 ppm it were observed the signals corresponding to the resonance of the hydrogens of the carboxymethyl groups (-CH₂-COOD) introduced in positions 3 and 6 of the repeating units of O-CMC. The infrared spectroscopy also allowed the distinction of the structural features of beta-chitin, chitosan, carboxymethylchitosan and the determination of the average degree of substitution of carboxymethylated samples, which varied in the range 0,21 <GS <0,43. The X-ray diffraction and thermogravimetric analysis showed that the carboximethylation of chitosan produced derivatives less crystalline, more hydrophilic and thermally less stable than the parent polymer. The O-CMC samples showed solubility in acid (pH <3.0), neutral (pH \approx 7.5) and alkaline (pH > 8.0) media due to the occurrence of charges along its chains, but the polymer was insoluble in the range 3.5 <pH <7.5. The occurrence of depolymerization

simultaneously to the carboxymethylation reaction was observed since the O-CMC samples showed lower viscosity average molecular weight values as compared to the parent chitosan. The results of this study show that the average degree of substitution of the O-CMC samples is strongly affected by the excess of monochloroacetic acid used in the derivatization reaction of chitosan, but the extension of the reaction for longer times doesn't generate more substituted derivatives.

Keywords: chitin, chitosan and O-carboxymethylchitosan.

Lista de Figuras

Figura 1- Representação esquemática da estrutura primária idealizada da quitina.....	19
Figura 2- Representação das estruturas das polimorfãs da quitina, onde as setas representam as cadeias poliméricas no sentido do terminal não-redutor para o redutor.....	20
Figura 3- Estruturas moleculares e ligações de hidrogênio em: a) α -quitina e b) β -quitina ⁽¹⁶⁾	21
Figura 4- Representação idealizada da estrutura da quitosana, onde n é o grau de polimerização.	23
Figura 5- Modificações estruturais de quitina e quitosana ⁽⁴⁴⁾	27
Figura 6- Representação da N,O-carboximetilquitosana.....	28
Figura 7- Representação esquemática da reação de O-carboximetilquitosana ⁽¹⁰⁾	29
Figura 8- Lula da espécie <i>Loligo</i> , com destaque para o gládio inserido na parte interna do molusco ⁽²³⁾	35
Figura 9- Esquema experimental empregado nas reações de desacetilação com: 1) sonotrodo e 2) reator de vidro encamisado ⁽²³⁾	36
Figura 10- Espectro de RMN-1H característico de quitosana ⁽²⁴⁾	42
Figura 11- Espectro de RMN 1H (500 MHz) da amostra de quitina (DCI 35%, 40°C).	51
Figura 12- Espectro de RMN 1H (500 MHz) da amostra quitosana (DCI/D2O 1% (v/v), 90°C).	51
Figura 13- Espectro de RMN1H (500 MHz) da amostra de carboximetilquitosana (CMQ-10) com GS de 0,43 (DCI/D2O) 1% (v/v), 90 °C.....	53
Figura 14- Espectro da região do infravermelho das amostras de β -quitina (GA) = 81%) e quitosana (GA) = 4,5%)......	55
Figura 15- Bandas características na região de 1800-900 cm-1 dos espectros no infravermelho das amostras de quitina(GA =81%) e quitosana (GA = 4,5%).	56
Figura 16- Espectro da região do infravermelho das amostras de CMQ-10 (GS=0,43) na forma sódica e quitosana.....	57
Figura 17- Bandas características na região de 2000-800 cm-1 dos espectros no infravermelho das amostras de quitosana e carboximetilquitosana (GS =0,43).....	58
Figura 18- Espectro da região do infravermelho da amostra CMQ-10 (GS=0,43) na forma ácida.....	59
Figura 19- Espectro da região do infravermelho das amostras de quitosana, CMQ-10 sódica e CMQ-10 ácida.....	60
Figura 20- Espectro no infravermelho na região de 1500-1250 cm ⁻¹ de CMQ, na forma ácida, mostrando a linha base e as bandas usadas no cálculo de (GS).....	61
Figura 21- Difratoograma das amostras de β -quitina, quitosana e CMQ-10 (GS= 0,43).....	66
Figura 22- Difratoograma das amostras CMQ-2,5 e CMQ-4h (GS= 0,33), CMQ-5 (GS= 0,36), CMQ-10 (GS=0,43), CMQ-8h (GS=0,26) e CMQ-17h (GS= 0,21).....	68
Figura 23- Micrografia da amostra de beta-quitina, ampliação de 75x.....	69
Figura 24- Micrografia da amostra de beta-quitina, ampliação de 500x.....	70
Figura 25- Micrografia da amostra de quitosana, ampliação de 75x.....	71
Figura 26- Micrografia da amostra de quitosana, ampliação de 500x.....	71
Figura 27- Micrografia da amostra de CMQ-5, ampliação de 75x.....	72
Figura 28- Micrografia da amostra de CMQ-5, ampliação de 500x.....	72
Figura 29- Curvas TG/DTG da amostra de β -quitina sob atmosfera dinâmica de ar sintético (vazão de gás 20 mL/min), massa da amostra 8mg, suporte de amostra de platina.....	74
Figura 30- Curvas TG/DTG da amostra de quitosana sob atmosfera dinâmica de ar sintético (vazão de gás 20 mL/min), massa da amostra 8mg, suporte de amostra de platina.....	75
Figura 31- Curvas DTG das amostras de carboximetilquitosana sob atmosfera dinâmica de ar sintético (vazão de gás 20 ml/min), massa da amostra 8mg, suporte de amostra de platina.....	80
Figura 32- Curvas TG das amostras de carboximetilquitosana sob atmosfera dinâmica de ar sintético (vazão de gás 20 mL/min), massa da amostra 8mg, suporte de amostra de platina.....	81

<i>Figura 33- Gráfico de comprimento de onda versus transmitância para quitosana obtida através de U.V-visível.....</i>	<i>83</i>
<i>Figura 34- Gráfico do pH versus transmitância (comprimento de onda de 500 cm⁻¹) da amostra de quitosana.....</i>	<i>84</i>
<i>Figura 35- Gráfico de comprimento de onda versus transmitância para carboximetilquitosana (CMQ-10) obtida através de U.V-visível.....</i>	<i>85</i>
<i>Figura 36- Gráfico do pH versus transmitância (comprimento de onda de 500 cm⁻¹) da amostra de carboximetilquitosana.....</i>	<i>86</i>
<i>Figura 37- Curva da viscosidade reduzida em função da concentração da amostra quitosana.....</i>	<i>88</i>
<i>Figura 38- Curva da viscosidade reduzida em função da concentração da amostra CMQ-10.....</i>	<i>89</i>

Lista de Tabelas

<i>Tabela 1- Reagentes utilizados na realização dos experimentos</i>	<i>34</i>
<i>Tabela 2- Massas de CMQ obtidas através da reação de carboximetilação e purificação das mesmas... 49</i>	<i>49</i>
<i>Tabela 3- Valores de (GA) das amostras de beta-quitina e quitosana, obtidos por espectroscopia de RMN¹H.....</i>	<i>50</i>
<i>Tabela 4- Bandas de absorção e números de onda (cm⁻¹) característicos de quitina, quitosana⁽⁶⁴⁾ e carboximetilquitosana⁽²⁾.....</i>	<i>54</i>
<i>Tabela 5- Valores de GS das amostras de carboximetilquitosanas determinados por espectroscopia na região do infravermelho.....</i>	<i>62</i>
<i>Tabela 6- Composição elementar e grau de substituição de quitosana e seus derivados carboximetilados.</i>	<i>64</i>
<i>Tabela 7- Valores da área média (μm²) das partículas de quitina, quitosana e carboximetilquitosana....</i>	<i>73</i>
<i>Tabela 8- Valores de temperatura de desidratação relacionada ao primeiro evento das amostras de quitina e quitosana.....</i>	<i>76</i>
<i>Tabela 9- Valores de temperatura de decomposição relacionada ao segundo evento das amostras de quitina e quitosana.....</i>	<i>76</i>
<i>Tabela 10- Valores de temperatura de desidratação térmica curva DTG e perda de massa curva TG das amostras de carboximetilquitosana</i>	<i>78</i>
<i>Tabela 11- Valores de temperatura de decomposição térmica curva DTG e perda de massa curva TG das amostras de carboximetilquitosana</i>	<i>79</i>
<i>Tabela 12- Solubilidade de quitosana e carboximetilquitosana em soluções aquosas de vários pH</i>	<i>87</i>
<i>Tabela 13- Valores de viscosidade intrínseca e massa molar média viscosimétrica das amostras de quitina, quitosana e carboximetilquitosana</i>	<i>91</i>

Lista de Siglas

GlcNAc- 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranoose;

GlcN- 2-amido-2-desoxi-D-glicopiranoose;

CMQ- carboximetilquitosana;

O-CMQ- O-carboximetilquitosana;

N-CMQ- N-carboximetilquitosana;

N,O-CMQ- N,O-carboximetilquitosana;

\overline{GA} - grau médio de acetilação;

\overline{GS} - grau médio de substituição;

\overline{Mv} - massa molar viscosimétrica média;

$[n]$ - viscosidade intrínseca;

\overline{GPv} - grau médio viscosimétrico de polimerização;

DAIUS- desacetilação da quitina assitida por irradiação de ultrassom de alta intensidade;

IV- espectroscopia no infravermelho;

TG- análise termogravimétrica;

DTG- análise termogravimétrica derivada;

MEV- microscopia eletrônica de varredura;

RMN¹H- espectroscopia de ressonância nuclear magnética de hidrogênio.

Sumário

Resumo	6
Abstract.....	7
Lista de Figuras.....	10
Lista de Tabelas	12
Sumário	14
Introdução	16
1 Quitina e Quitosana	18
1.1 Estrutura e Propriedades	18
1.2 Fontes e processos de obtenção	24
2 Derivatização de quitina e quitosana	26
2.1 Síntese de Carboximetilquitosana	28
2.2 Aplicações de Carboximetilquitosana	30
3 Objetivos	33
4 Parte Experimental.....	34
4.1 Reagentes	34
4.2 Procedimento Experimental	35
4.2.1 Extração da beta-quitina	35
4.3 Preparação da Quitosana	36
4.4 Preparação da Carboximetilquitosana	37
4.5 Purificação de Carboximetilquitosana	38
5 Caracterização das Amostras.....	39
5.1.1 Análise Termogravimétrica	39
5.1.2 Difração de raios X.....	39
5.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	40
5.1.4 Espectroscopia de RMN ¹ H.....	40
5.1.5 Massa molar viscosimétrica média	43
5.1.6 Espectroscopia no infravermelho	45
5.1.7 Solubilidade	46
5.1.8 Análise elementar	47
6 Resultados e Discussões	48
6.1 Preparação e purificação das amostras	48

6.2	Caracterização das amostras.....	50
6.2.1	Caracterização Estrutural	50
6.2.2	Análise Elementar	64
6.2.3	Características Morfológicas	65
6.2.4	Propriedades no estado sólido e em solução.....	73
6.2.5	Solubilidade em diferentes pHs	82
6.2.6	Massa Molar Viscosimétrica Média	88
7	Conclusões	92
8	Referências Bibliográficas	93

Introdução

A quitosana é obtida, geralmente, pela desacetilação da quitina, em meio alcalino. Nessa reação, os grupos acetamido das unidades acetil-glicosamino (GlcNAc) da quitina são convertidos em grupos amino, dando origem à quitosana⁽¹⁾, considerada atóxica, biodegradável e biocompatível, que exibe inúmeras e interessantes propriedades físico-químicas e biológicas. A quitosana, porém, apresenta solubilidade apenas em soluções moderadamente ácidas, o que limita suas aplicações.

Modificações químicas da quitosana são executadas para melhorar a processibilidade do polímero e modificar algumas propriedades, tais como: a atividade antimicrobiana, a solubilidade e a habilidade de interação com outras substâncias⁽²⁾. Visando melhorar a solubilidade da quitosana, diferentes derivados têm sido preparados e estudados: quitosanas quartenizadas, aciladas, alquiladas, tosiladas, entre outros⁽³⁻⁵⁾.

A reação de carboximetilação é utilizada para preparar derivados solúveis de quitosana, em uma ampla faixa de pH^(6, 7). De acordo com os reagentes e condições reacionais, a carboximetilação da quitosana leva à produção dos derivados O-carboximetilquitosana (O-CMQ), N-carboximetilquitosana (N-CMQ) ou N,O-carboximetilquitosana (N,O-CMQ), podendo também ocorrer a dissustituição nos grupos amino (N,N-CMQ). Assim, se a carboximetilação for realizada pela reação da quitosana com o ácido monocloroacético, em 2-propanol/hidróxido de sódio aquoso, à temperatura ambiente, a reação de O-substituição será favorecida. O aumento da temperatura favorecerá a N-substituição⁽⁷⁻¹⁰⁾. Entretanto, Abreu⁽²⁾ realizou a reação de carboximetilação, em condições reacionais propícias para a produção de O-CMQ, como descrito na literatura, mas o produto final da reação foi N,O-CMQ.

Devido à dificuldade encontrada na preparação do derivado carboximetilado de quitosana, com características estruturais desejáveis, este trabalho foi desenvolvido no sentido de definir melhores condições para obter tal produto. A proposta deste trabalho é a utilização de quitosana extensivamente desacetilada (GA=4,5%) e de elevada massa molar viscosimétrica ($\overline{M}_v \approx 200000$ g/mol), cujas características estruturais podem ser consideradas uniformes, para executar a reação de carboximetilação. Sabendo que as reações de carboximetilação podem introduzir o substituinte nos grupos hidroxila e/ou amino das cadeias de quitosana, gerando derivados com estruturas complexas, o foco do projeto é estudar as melhores condições reacionais para a produção do derivado O-CMQ, um polieletrólito de caráter anfótero que apresenta cargas negativas e positivas devido à dissociação dos grupos carboximetila e à protonação dos grupos amino, respectivamente.

As reações de carboximetilação da quitosana devem ser realizadas em condições que favoreçam a formação do derivado O-CMQ, sendo importante que a temperatura seja suficientemente baixa, para não favorecer a ocorrência de N-carboximetilação e de despolimerização. Tais reações devem proceder em meio de isopropanol/água, na presença de hidróxido de sódio, sendo a razão molar quitosana/ácido monocloroacético e o tempo de reação as variáveis a serem estudadas. A completa caracterização dos derivados O-CMQ, obtidos pelo desenvolvimento deste estudo, é contribuição importante para o estabelecimento das relações estruturas/propriedades de derivados carboximetilados de quitosana.

1 Quitina e Quitosana

1.1 Estrutura e Propriedades

A quitina, um polissacarídeo que foi isolado pela primeira vez por Braconnot, em 1811, quando trabalhava com fungos⁽¹¹⁾, tem função estrutural em crustáceos, moluscos, insetos e fungos, nos quais ela pode ocorrer combinada com sais inorgânicos, pigmentos e proteínas. A quitina é obtida na forma pura somente após rigorosos processos de extração, tais como a desproteínização, a desmineralização e a despigmentação da biomassa⁽¹⁰⁾.

A escolha das condições empregadas nas etapas de desproteínização e desmineralização é de extrema importância. Na primeira, geralmente realizada por tratamento com soluções alcalinas, pode ocorrer a desacetilação parcial da quitina; na segunda, usualmente realizada por tratamento com soluções ácidas, pode ocorrer a quebra das ligações glicosídicas, resultando em despolimerização. Os procedimentos empregados na extração da quitina devem ser brandos para evitar a ocorrência de alterações na estrutura nativa do polissacarídeo⁽¹²⁾.

A quitina é um polímero linear e sua estrutura primária é formada por unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcNAc), unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4) (Figura 1)⁽¹³⁾. Nas cadeias de quitina podem ser definidos os terminais redutor e não-redutor, referentes aos grupos hidroxila, ligados aos carbonos 1 e 4 do anel de glicopiranosose que não participam de ligações glicosídicas. A quitina tem como unidade predominante GlcNAc, mas os produtos usualmente comercializados possuem aproximadamente 5-10% de unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcN), originárias do processo de extração da biomassa⁽¹⁴⁾.

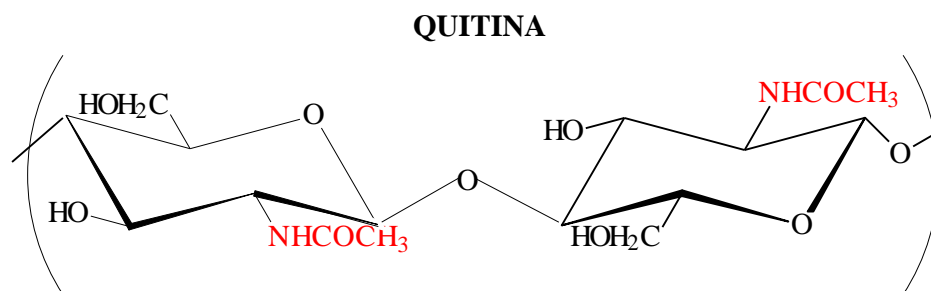


Figura 1- Representação esquemática da estrutura primária idealizada da quitina.

Segundo estudos de difração de raios X, a quitina apresenta três diferentes estruturas no estado sólido, denominadas α , β e γ , as quais diferem no arranjo de suas cadeias nas regiões cristalinas (Figura 2). As duas primeiras polimorfias são as mais estudadas, sendo a terceira considerada um arranjo intermediário aos outros dois^(15, 16).

As três estruturas polimorfias estão possivelmente relacionadas a diferentes funções no organismo. Assim, a polimorfa α -quitina é encontrada onde é necessária uma extrema dureza (resistência), como em cutículas de artrópodes e, frequentemente, é associada com proteínas ou com materiais inorgânicos ou com ambos. As polimorfias β e γ -quitina são encontradas onde são necessárias flexibilidade e dureza. A polimorfa mais abundante é a α -quitina, que é mais estável que as polimorfias β e γ -quitina, que podem ser convertidas à primeira forma por tratamentos adequados⁽¹⁷⁾

A diferença entre a α - e β -quitina está no arranjo de suas cadeias nas regiões cristalinas, decorrentes de disposições distintas das cadeias do polímero nas lamelas ou folhas que constituem os domínios cristalinos⁽¹⁴⁾. As cadeias que têm o mesmo sentido, da extremidade redutora para a não-redutora, são ditas paralelas e as que têm sentido oposto são ditas antiparalelas. Segundo a disposição assumida, o estabelecimento de ligações hidrogênio inter-cadeias e intra-cadeias, envolvendo os grupos amida (N-

H···O=C) das unidades GlcNAc, é mais ou menos favorecido, resultando em empacotamentos mais ou menos densos⁽¹²⁾.



Figura 2- Representação das estruturas das polimorfias da quitina, onde as setas representam as cadeias poliméricas no sentido do terminal não-redutor para o redutor.

Na α -quitina, as cadeias poliméricas estão dispostas de forma antiparalela, o que favorece o estabelecimento de numerosas ligações hidrogênio inter e intra-cadeias da mesma lamela e de lamelas vizinhas, resultando em um empacotamento denso (Figura 3a). Todos os grupos hidroxila nos domínios cristalinos estabelecem ligações hidrogênio e as formadas entre cadeias de diferentes folhas são as responsáveis pela insolubilidade da α -quitina na maioria dos solventes⁽¹⁸⁾.

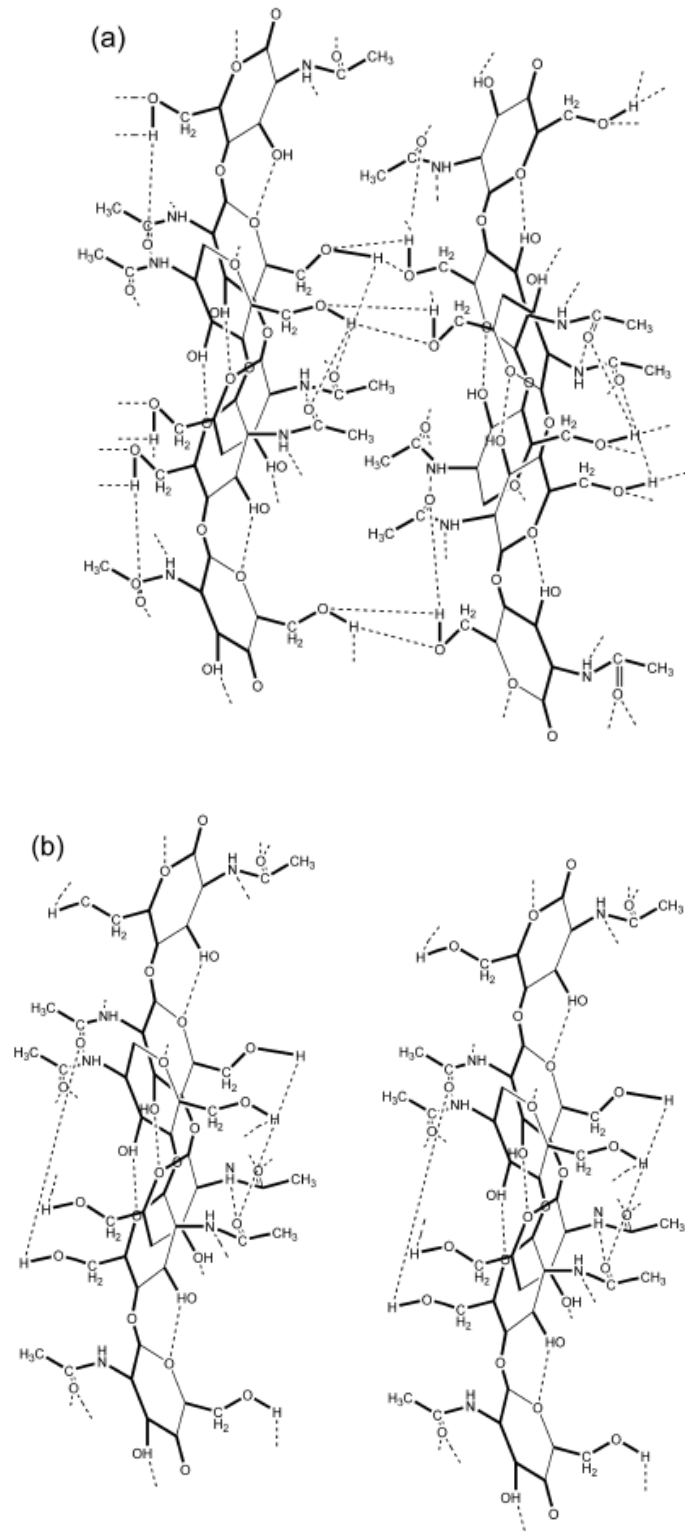


Figura 3- Estruturas moleculares e ligações de hidrogênio em: a) α -quitina e b) β -quitina⁽¹⁶⁾.

Na β -quitina, as cadeias estão dispostas paralelamente, prejudicando o estabelecimento de ligações hidrogênio intermoleculares e inter-folhas (Figura 3b), o que resulta em empacotamento menos denso que o observado na α -quitina. O fato da β -quitina apresentar empacotamento menos denso, comparado à α -quitina, resulta em que a primeira polimorfa apresenta maior solubilidade, capacidade de intumescimento e reatividade⁽¹⁹⁾. Devido a essas características da β -quitina, esta será utilizada neste trabalho, para a produção de quitosana extensivamente desacetilada.

A quitina é insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos comuns⁽²⁰⁾. A principal reação de derivatização da quitina é a desacetilação, hidrólise dos grupos acetamida das unidades GlcNAc, que leva à obtenção de quitosana^(21, 22) (Figura 4). A insolubilidade da quitina é parcialmente contornada pela sua desacetilação.

A reação de desacetilação da quitina pode ocorrer tanto pela via enzimática como pela química, sendo que a última é a mais comum e o tratamento alcalino o mais empregado. Durante a reação de desacetilação, os grupamentos acetamido das unidades GlcNAc da quitina são convertidos em graus variados a grupos amino, gerando unidades GlcN. O produto da reação é denominado quitosana, somente se o conteúdo médio de unidades GlcNAc, definido como grau médio de acetilação (\overline{GA}), for igual ou inferior a 60% e se o polímero for solúvel em soluções aquosas diluídas com os ácidos clorídrico e acético^(23, 24).

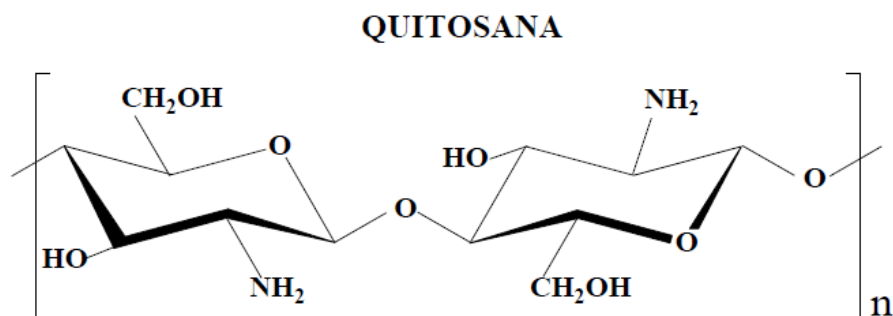


Figura 4-Representação idealizada da estrutura da quitosana, onde n é o grau de polimerização.

O que diferencia a quitina da quitosana é o valor do parâmetro (\overline{GA}) e o grau de solubilidade. Na quitosana, a solubilidade em soluções aquosas de ácidos diluídos (HCl, HBr, HI, HNO₃) relaciona-se com a protonação dos grupos aminos (NH₃—NH₄⁺), efeito característico do polieletrólito catiônico. Dependendo do solvente utilizado, a quitosana apresenta cargas positivas distribuídas ao longo da cadeia polimérica. Já a quitina é solúvel em ácidos concentrados (HCl, H₂SO₄ e H₃PO₄) que degradam/derivatizam a cadeia polimérica, através da hidrólise ácida. Para contornar esse problema, são utilizados solventes orgânicos como os sistemas N,N-dimetilacetamida/LiCl e N- metilpirrolidona/LiCl⁽¹²⁾.

A solubilidade da quitosana está relacionada com a quantidade e a distribuição dos grupos GlcNAc e GlcN ao longo das cadeias poliméricas. Aiba⁽²⁵⁾ relatou que os produtos da N-acetilação homogênea de quitosana que apresentaram $\overline{GA} < 50\%$ foram solúveis em meio neutro e em soluções alcalinas, mas as quitosanas preparadas por N-acetilação heterogênea foram solúveis apenas em meios ácidos. Estudos^(18, 26) mostram que a desacetilação da quitina, realizada em condições homogêneas, resulta em quitosanas com distribuição randômica das unidades GlcNAc e GlcN e solúveis em meio neutro, quando $\overline{GA}=50\%$. Por outro lado, a desacetilação heterogênea de quitina

acontece preferencialmente nas regiões amorfas, que são mais acessíveis, e nas regiões cristalinas, gerando quitosanas solúveis em meios moderadamente ácidos e que apresentam distribuição das unidades GlcN e GlcNAc em blocos. Além do \overline{GA} , a distribuição das unidades GlcNAc e GlcN nas cadeias de quitosana tem grande influência na solubilidade do polímero.

A massa molecular do polímero também afeta a sua solubilidade e, em geral, quanto maior a massa molecular, menor sua solubilidade, pois há o favorecimento de interações entre os segmentos das cadeias poliméricas⁽²⁷⁾.

1.2 Fontes e processos de obtenção

A quitina pode ser encontrada em algas diatomáceas, estruturas esqueléticas de invertebrados e nas paredes celulares de alguns fungos⁽²⁸⁾. A maior parte da quitina produzida comercialmente é extraída das carapaças de caranguejos e cascas de camarões, provenientes dos rejeitos de indústrias pesqueiras. Para promover a separação da quitina de outros componentes presentes nestes rejeitos, é necessário executar processos químicos, visando a desmineralização, a desproteínação e a despigmentação da biomassa⁽²⁹⁾. Assim, por exemplo, os exoesqueletos de crustáceos podem apresentar entre 15-20% de quitina, 25-40% de proteínas e 40-55% de carbonatos de cálcio e magnésio, dependendo da espécie considerada, e devem ser submetidos aos processamentos acima citados para a extração de quitina⁽³⁰⁾. No caso de β -quitina, extraída de gládios de lulas, o teor de sais minerais e pigmentos são considerados baixos, sendo que apenas o procedimento visando a desproteínação dessa biomassa é executado^(14, 17, 31).

A quitosana ocorre em paredes celulares de fungos^(14, 17), mas é comumente obtida pela desacetilação de quitina, em meio alcalino, sob condições heterogêneas, temperaturas elevadas e longos tempos de reação, o que resulta em amostras despolimerizadas, principalmente quando condições reacionais mais severas são empregadas e se a reação é sequencialmente repetida, visando a preparação de quitosanas extensivamente desacetiladas. Tratamentos não-convencionais têm sido explorados para obtenção de quitosana, tais como irradiação de ultrassom⁽³²⁾ e microondas⁽³³⁾. Assim, muitos esforços têm sido direcionados para o desenvolvimento de processos que promovam a desacetilação eficiente de quitina, de maneira a permitir a obtenção de quitosanas de baixo grau médio de acetilação e elevada massa molecular média^(23, 34-36).

Um novo processo para a obtenção de quitosana com baixo \overline{GA} e elevada massa molar foi desenvolvido por Lamarque et al⁽³⁷⁾. Neste processo, conhecido como “freeze-pump out-thaw” (“FTP”), a quitina é suspensa em solução aquosa concentrada de hidróxido de sódio e então é submetida a 6 - 7 sucessivos ciclos de congelamento, à temperatura do nitrogênio líquido, sucção com bomba de vácuo e aquecimento, até atingir a temperatura ambiente. Após realizar tais ciclos, é executada a desacetilação, à temperatura de 90-120°C por 40-60 minutos. O método “FTP” promove a destruição das regiões cristalinas de quitina, aumentando a acessibilidade aos sítios reativos, renova a concentração das espécies mais reativas de hidróxido de sódio no interior das partículas de quitina e exclui o oxigênio molecular do meio reacional, minimizando a despolimerização, via hidrólise alcalina oxidativa. Apesar de ser um procedimento eficiente, que permite a preparação de quitosana extensivamente desacetilada ($GA \approx 0\%$) e elevada massa molar ($M_v \approx 500000$ g/mol), após a execução de 3-4 procedimentos

consecutivos, este não é aplicado em escala industrial devido ao elevado custo de produção.

Sagheer e colaboradores⁽³⁵⁾ estudaram o tratamento de suspensões de quitina em solução aquosa de hidróxido de sódio com microondas e observaram que quitosanas de mesmo grau de desacetilação e massa molecular mais elevada foram obtidas nesse caso em comparação com o tratamento térmico convencional.

Foi desenvolvido por Delezuk e co-autores⁽³⁸⁾ um novo processo para a obtenção de quitosana extensivamente desacetilada, denominado Processo DAIUS, desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade. Os resultados deste trabalho mostram que o processo DAIUS é mais eficiente que a maioria dos processos de desacetilação de quitina descritos na literatura, pois permite a preparação de quitosana extensivamente desacetilada, massa molecular elevada e baixa polidispersividade, pela execução de reação em tempos mais curtos e temperaturas mais baixas que as empregadas nos outros processos.

2 Derivatização de quitina e quitosana

A quitina é um polímero natural e abundante, considerado biocompatível, biodegradável e atóxico. Sua limitada solubilidade, porém, é restrita a meios ácidos e a alguns solventes orgânicos. Tal limitação impede seu uso em diversas aplicações. É por isso que novos derivados de quitina e quitosana têm sido estudados^(3, 4, 39).

Segundo Peter⁽⁴⁰⁾, diversos derivados podem ser obtidos a partir de quitina e quitosana, como apresentado na Figura 5. As mudanças estruturais propostas visam melhorar propriedades tais como solubilidade, capacidade de intumescimento, complexação de cátions metálicos, interação com outros polímeros, enzimas, proteínas e

substâncias orgânicas. As reações de derivatização de quitina e quitosana são usualmente realizadas sob condições brandas, evitando assim a ruptura de ligações glicosídicas e a hidrólise dos grupos acetamido.

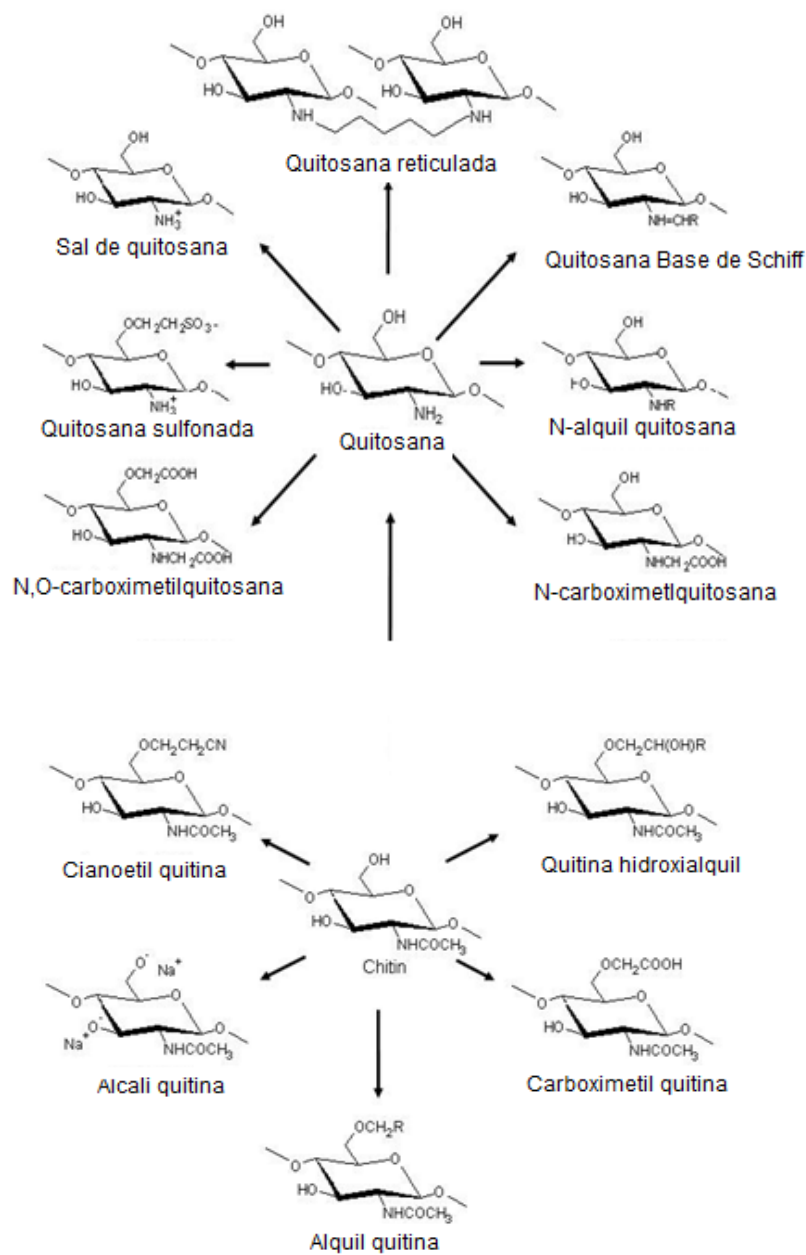


Figura 5- Modificações estruturais de quitina e quitosana ⁽⁴⁴⁾.

2.1 Síntese de Carboximetilquitosana

Os polissacarídeos são biopolímeros que podem ser extraídos de plantas, animais invertebrados e fungos. Suas cadeias podem ser neutras ou conter cargas. Quando há a presença de cargas nas cadeias, estes são denominados polieletrólitos, termo que se refere a polímeros que, em solvente polar adequado, apresentam cargas positivas como a quitosana, negativas como a carboximetilcelulose, ou cargas positivas e negativas como a carboximetilquitosana⁽⁴¹⁾.

A conversão de quitosana em um produto mais solúvel, em meios aquosos, pode ser alcançada por meio da reação de carboximetilação, resultando no derivado carboximetilquitosana (CMQ), polieletrólito que possui propriedades físicas, químicas e biológicas: alta viscosidade, baixa toxicidade, biocompatibilidade, capacidade de formar géis e solubilidade em amplo intervalo de acidez, que ampliam as possibilidades de aplicação⁽⁷⁾. A carboximetilquitosana é um β -(1 \rightarrow 4)-glucano, que pode ser gerado por reações de grupos aminos e/ou grupos de hidroxilas de quitosana com agentes carboxilantes (Figura 6)^(8, 10, 42).

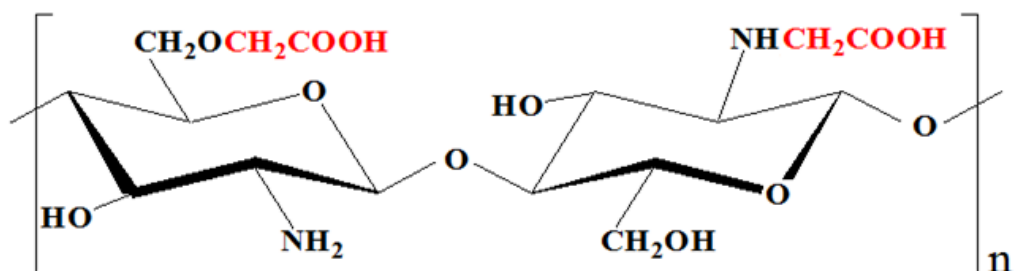


Figura 6- Representação da N,O-carboximetilquitosana.

Para obter como produto final O-CMQ, a reação deve ser processada em meio fortemente alcalino, para que ocorra a ativação das hidroxilas (Figura 7), pois, do contrário, os grupos amino reagirão preferencialmente e o produto final será a N-CMQ. A substituição seletiva nos grupos amino, visando à preparação do derivado N-CMQ, é alcançada quando o ácido glicóxico é empregado como agente alquilante. O ácido glicóxico apresenta em sua estrutura o grupo funcional aldeído, motivo pelo qual é utilizado na síntese de N-CMQ, pois reage seletivamente com os grupos amino da quitosana, gerando a imina (base de Schiff) que é reduzida a N-CMQ⁽⁴³⁾.

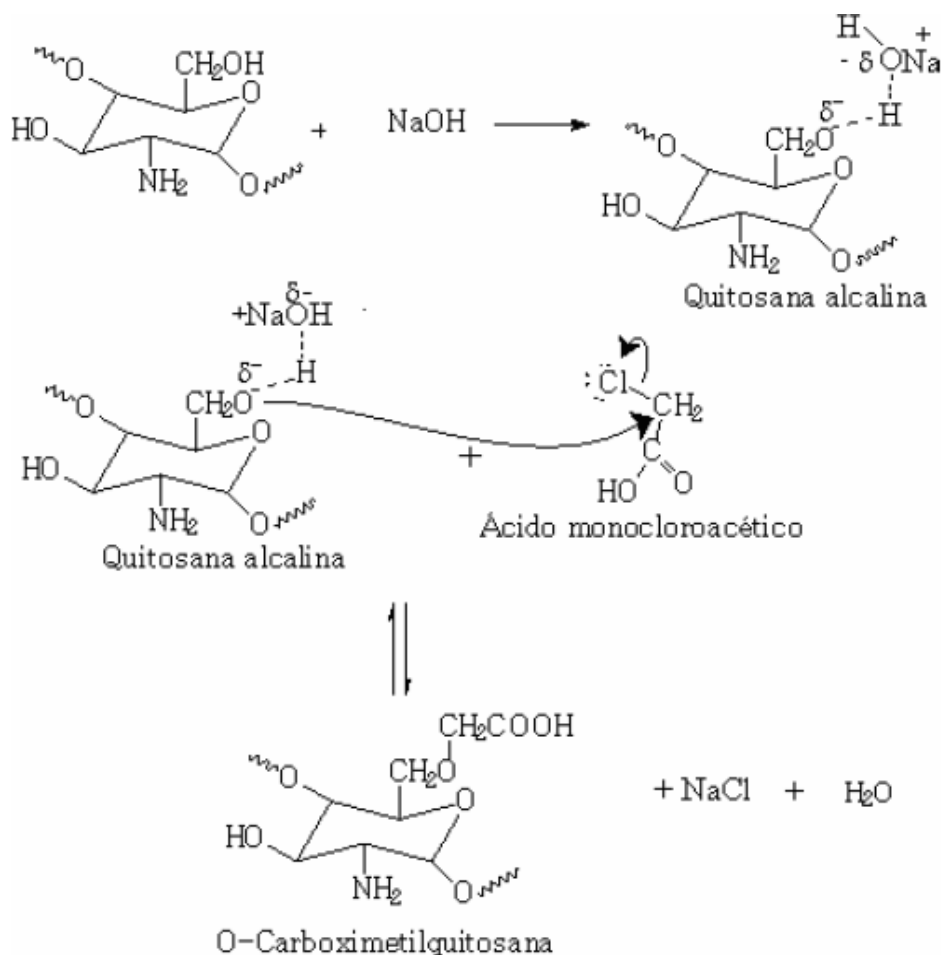


Figura 7- Representação esquemática da reação de O-carboximetilquitosana⁽¹⁰⁾.

A ocorrência de carboximetilação em diferentes sítios das cadeias de quitosana é decorrente das diferentes reatividades dos grupos $-OH$ e $-NH_2$. O grupo hidroxila é um nucleófilo mais fraco que o grupo amina. Para que a reação resulte em O-CMQ em extensão razoável, é necessário que os grupos hidroxila sejam ativados com o uso de um álcali, mais comumente o hidróxido de sódio (NaOH). Deve-se considerar ainda que o grupo $-NH_2$, quando protonado (NH_3^+), não é ativo como nucleófilo⁽⁴⁴⁾. Mas quando ocorre a reação entre a quitosana e o ácido monocloroacético, na presença de NaOH, geralmente o produto obtido é, preferencialmente, o derivado O-subsituído, sendo o produto N,O-subsituído obtido em menor quantidade⁽⁴³⁾.

Chen e colaboradores⁽⁴⁵⁾ estudaram a carboximetilação de quitosana com ácido monocloroacético, sob várias condições, e constataram que o aumento da temperatura de reação aumenta o grau de carboximetilação e que a solubilidade da O-CMQ é função do pH e do grau médio de carboximetilação. Muzzarelli e co-autores⁽⁴⁶⁾ realizaram reações de carboximetilação com ácido glioxílico e observaram que para produção de N-carboximetilquitosana hidrossolúvel é necessário o uso de uma razão equimolar ácido glioxílico/grupos aminos, pois, quando foi usado ácido glioxílico em excesso a N-carboximetilquitosana, foi insolúvel.

2.2 Aplicações de Carboximetilquitosana

Entre as diversas reações de modificação de quitosana, o interesse em reações de carboximetilação tem crescido bastante, especialmente por produzir derivados solúveis em meio fisiológico, que são interessantes para aplicações nas áreas médica, farmacêutica e alimentícia⁽⁴⁵⁾.

As propriedades de CMQ, tais como solubilidade e capacidade de interação com diversas substâncias, permitem antecipar interessantes oportunidades no

desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos. Zhu⁽⁴⁷⁾ aplicou a O-CMQ como matriz para a liberação do antitumoral camptotecina que é um fármaco pouco solúvel em água. O resultado foi o aumento da solubilidade da camptotecina⁽⁴⁸⁾.

Ramesh⁽⁴⁹⁾ avaliou a biocompatibilidade de O-CMQ em pesquisa envolvendo cobaias. Foram pesquisadas alterações no peso corporal, no peso de órgãos vitais, parâmetros hematológicos e histopatológicos dos animais, as quais mostraram que o polímero é biocompatível.

Zhao⁽⁵⁰⁾ sintetizou e caracterizou partículas magnéticas cobertas com uma matriz polimérica de O-CMQ, as quais foram eficientes para liberação de fármacos, inclusive substâncias antitumorais.

Anitha⁽⁵¹⁾ sintetizou e caracterizou nanopartículas de quitosana, O-carboximetilquitosana e N,O-carboximetilquitosana, as quais foram empregadas em estudos para avaliar sua citotoxicidade e sua atividade antibacteriana. Neste estudo, foi observado que o aumento do grau de substituição em O-carboximetilquitosana e N,O-carboximetilquitosana aumenta a atividade antibacteriana, efeito mais evidente na N,O-carboximetilquitosana. Os produtos estudados apresentaram baixa toxicidade para células humanas.

Uma das vantagens dos derivados carboximetilados sobre a quitosana é que a atividade antifúngica da quitosana é limitada somente a meios ácidos ($\text{pH} \leq 6,5$), enquanto que a carboximetilquitosana apresenta essa atividade em intervalo mais amplo de pH ⁽⁵²⁾.

Os derivados carboximetilados de quitosana (O-, N- e O,N-carboximetilquitosana) são solúveis em ampla faixa de pH e apresentam propriedades de interesse para aplicações na área médica. Assim, a N,O-carboximetilquitosana previne a ocorrência de adesões pericárdicas pós-cirúrgicas e seu uso em cirurgias cardíacas tem sido estudado. Krause *et al*⁽⁵³⁾ descreveram pela primeira vez o uso de N,O-CMQ na prevenção de aderências pericárdicas, mostrando que o seu uso diminuiu acentuadamente as aderências pós-cirúrgicas em animais de grande porte.

Cirurgias cardiotorácicas são frequentes em todas as idades, porém, com o tempo, reoperações são necessárias devido o crescimento de adesões pericárdicas. A N,O-CMQ é um biopolímero que apresenta similaridade estrutural com o ácido hialurônico e se distingue por suas propriedades biológicas tais como atoxidade e ação bactericida, o que torna a N,O-CMQ um excelente agente para prevenções de adesões pós-cirúrgicas⁽⁵⁴⁾.

Doraz⁽⁵⁵⁾ avaliou as alterações físico-químicas da carboximetilquitosana, após sua termoesterilização e sua eficácia na prevenção de aderências pericárdicas, e observaram que o método de esterilização empregado não alterou as propriedades físico-químicas da carboximetilquitosana e que esta pode reduzir a intensidade das aderências pós-cirúrgicas no pericárdio.

A carboximetilquitosana também é bastante estudada para aplicações na agricultura, inibindo o crescimento de fungos e bactérias no armazenamento de frutas, legumes e hortaliças. Estas são aplicações de especial interesse na indústria alimentícia, pois quitosana e carboximetilquitosana são biopolímeros que tem baixa ou nenhuma toxicidade, sendo convenientes para administração oral⁽¹⁰⁾.

3 Objetivos

Os objetivos principais deste trabalho são a obtenção de quitosana extensivamente desacetilada e de elevada massa molar viscosimétrica e o seu emprego nas reações de carboximetilação. A influência da razão molar quitosana/ ácido monocloroacético e do tempo de reação sobre a eficiência das reações de carboximetilação e as características estruturais e físico-químicas dos derivados obtidos foram avaliados.

Assim, o desenvolvimento deste projeto também visa contribuir para a elucidação das relações estruturas/propriedades da O-carboximetilquitosana, que será de grande importância para o desenvolvimento e aplicação de biomateriais à base de O-CMQ .

4 Parte Experimental

4.1 Reagentes

Os reagentes empregados neste trabalho, identificados abaixo (Tabela 1), não foram purificados, a não ser quando especificado.

Tabela 1- Reagentes utilizados na realização dos experimentos

Reagente	Marca
Acetato de Sódio 3H ₂ O	J. T. Baker
Acetona	Qhemis
Ácido clorídrico 36,5-38%	Synth
Ácido Clorídrico Deuterado	CIL
Ácido Acético Glacial	Synth
Água Deuterada	CIL
Ácido Monodoacético	Sigma
Brometo de Potássio	Spectrum
Dimetilacetamida	Vetec
Cloreto de Sódio	Qhemis
Etanol	Tec-Lab
Hidróxido de Sódio 99% (mínimo)	Synth
Nitrato de Prata	Tec-Lab
Isopropanol	Qhemis

4.2 Procedimento Experimental

4.2.1 Extração da beta-quitina

Os gládios de lulas (Figura 9), também denominados penas ou plumas, matéria-prima para a extração de β -quitina, são originários das espécies *Loligo plei* e *Loligo sampaulensis* e foram cedidos pela Empresa Miami Pescados (Cananéia/SP).

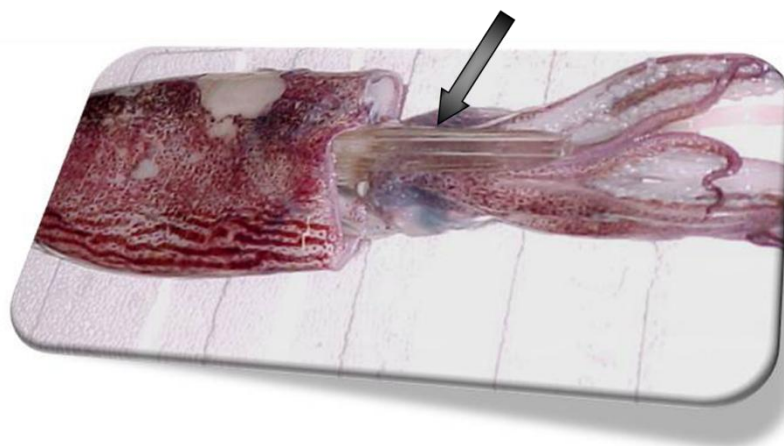


Figura 8- Lula da espécie *Loligo*, com destaque para o gládio inserido na parte interna do molusco⁽²³⁾.

Para efetuar a extração da β -quitina, os gládios foram lavados manualmente, para remoção de resíduos de carne, enxaguados com água destilada e secos em estufa, com circulação e renovação de ar durante 24 horas, a 30°C. Uma vez secos, os gládios foram transferidos para um moinho (MA-048, Micromoinho de rotor vertical com facas móveis, Marconi). Após a moagem, o material foi peneirado (peneiras de 10, 12, 35, 48, 170 mesh) e classificado de acordo com as dimensões das partículas. Os gládios triturados, utilizados na extração de beta-quitina, foram aqueles que apresentavam a maior quantidade de massa peneirada (porcentagem de massa 89%), correspondente a partículas com dimensões médias, no intervalo 250 μm - 425 μm .

Foram suspensos 200g de gládios moídos em 3L de solução aquosa de NaOH 0,1M. A suspensão foi mantida sob agitação magnética, durante 18 horas, à temperatura ambiente. Em seguida, a suspensão foi filtrada e o sólido lavado com água destilada até a neutralidade das águas de lavagem. A beta-quitina foi transferida para placas de Petri e seca em estufa, com circulação e renovação de ar durante 24 horas, a 30°C.

4.3 Preparação da Quitosana

O sistema utilizado para preparação da quitosana é apresentado na figura 9. No reator encamisado, foi adicionada uma suspensão de 4,4g de β -quitina, em 50 mL de NaOH 40%. O sonotrodo do aparelho BRANSON Sonifier, modelo 450, frequência de 20kHz, foi imerso (aproximadamente 2/3 do comprimento) na suspensão de β -quitina. Tal reação foi mantida sob agitação magnética, por 50 minutos, amplitude média ($30\% < A_{\text{máx}} < 50\%$), à temperatura de $65 \pm 2^\circ\text{C}$. A temperatura do sistema foi mantida constante, pois o reator encamisado estava acoplado ao banho de circulação, modelo 2095 Bath & Circulator⁽²³⁾.



Figura 9- Esquema experimental empregado nas reações de desacetilação com: 1) sonotrodo e 2) reator de vidro encamisado⁽²³⁾.

Após 50 minutos, a reação foi interrompida e a suspensão transferida para um béquer de polipropileno, contendo cubos de gelo de água destilada, que foi imerso em gelo. A suspensão foi mantida à baixa temperatura, adicionando-se ácido clorídrico concentrado, em pequenas porções, até atingir pH = 7-8. Em seguida, a suspensão foi filtrada e o sólido lavado com etanol 80%, para eliminar o excesso de cloreto de sódio. O sólido foi transferido para uma placa de Petri e seco em estufa de circulação, a 30°C, por 48 horas e em estufa de vácuo, a 30°C, por 24 horas.

O procedimento de desacetilação, assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade, foi repetido por 2 vezes, até a obtenção de quitosana com grau de acetilação próximo de zero.

4.4 Preparação da Carboximetilquitosana

As amostras de carboximetilquitosana foram preparadas segundo Chen⁽⁴⁵⁾. Em um reator encamisado, acoplado ao banho de circulação modelo 2095 Bath & Cicator, foram adicionados 1g de quitosana, 1,35g de hidróxido de sódio (NaOH), dissolvidos em 10mL de água/isopropanol (1:9 v/v). A suspensão resultante foi agitada por 1 hora, à temperatura de 30°C. Uma solução contendo 1,5g de ácido monocloroacético e 2 mL de isopropanol foi preparada e adicionada lentamente à reação, durante 30 minutos. A reação ocorreu pelo tempo desejado, à temperatura de 30°C, e foi interrompida pela adição de 20 mL de álcool etílico 70%. O sólido foi filtrado e lavado com álcool etílico 70-90 % e seco a vácuo, por 24 horas, à temperatura ambiente. O produto obtido foi a carboximetilquitosana na forma sódica (Na-CMQ)⁽⁴⁵⁾.

Diferentes amostras foram obtidas, variando a razão molar quitosana/ácido monocloroacético e o tempo de reação. A execução da reação, durante 4 horas, empregando as razões molares quitosana/ácido monocloroacético 1:2,5, 1:5 e 1:10,

resultou nas amostras de carboximetilquitosana, denominadas CMQ-2,5, CMQ-5 e CMQ-10, respectivamente. A execução da reação, empregando a razão molar quitosana/ácido monocloroacético (1:2,5) por 4, 8 e 17 horas, deu origem às amostras CMQ-4h (igual a CMQ-2,5), CMQ-8h e CMQ-17h, respectivamente.

4.5 Purificação de Carboximetilquitosana

Em béquer de 2 L, foram adicionados 1,0g de carboximetilquitosana e 500 mL de água destilada. A suspensão foi mantida sob agitação por aproximadamente 24 horas. A solução resultante foi filtrada sob pressão positiva, através de membranas de dimensões médias, de poros de 5 μm e 0,8 μm . Foram adicionados 500 mL de solução de NaCl 0,2mol/L e a solução mantida sob agitação durante aproximadamente 30 minutos. A precipitação do polímero ocorreu por adição de etanol 95%, em porções de 100mL, com forte agitação. Após a decantação do precipitado, foram adicionados 20mL de etanol, para assegurar a precipitação quantitativa da carboximetilquitosana. O precipitado foi filtrado e lavado com soluções de etanol a 75%, 80%, 90%(v/v) e com etanol absoluto e seco à temperatura ambiente⁽¹⁰⁾.

5 Caracterização das Amostras

5.1.1 Análise Termogravimétrica

A Termogravimetria (TG) é uma técnica na qual a massa de uma substância é medida em função da temperatura, enquanto submetida a uma programação controlada de temperatura. A técnica Termogravimétrica é usada quando se deseja acompanhar variações de massa envolvidas num experimento com resultados de ordem quantitativa.

As análises termogravimétricas das amostras de quitina, quitosana e carboximetilquitosana foram executadas em equipamento TGA-50, da Shimadzu. As medidas foram efetuadas usando suporte de amostra de platina, 8mg de amostra, razão de aquecimento de 10°C/min, até 95°C (permanecendo a 95°C durante 20 minutos, para eliminação de água), e de 95°C, até 800°C (permanecendo a 800°C por 5 minutos), em atmosfera dinâmica de ar sintético (20% O₂ e 80 % N₂), com uma vazão de 20 mL/min.

5.1.2 Difração de raios x

A análise pela técnica de difração de raios-X foi executada para permitir a distinção de diferentes arranjos e graus de ordenamento, ou de cristalinidade, em amostras de quitina, quitosana e carboximetilquitosana. As medidas de difração de raios X foram realizadas em difratômetro RIGAKU com tubo de cobre ($\lambda = 1,54\text{\AA}$), no intervalo de 3-50°, empregando varredura contínua, com velocidade de 1°/min. A tensão e a corrente utilizadas foram de 50kV e 100mA, respectivamente.

5.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A desacetilação de quitina assistida por ultrassom de alta intensidade e as reações de carboximetilação de quitosana provocam alterações na morfologia das partículas desses polímeros. Elas podem ser avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As morfologias das superfícies das amostras de beta-quitina, quitosana e das amostras de carboximetilquitosana foram investigadas no microscópio eletrônico de varredura LEO-440. As amostras foram previamente secas em estufa, a vácuo, a 60°C, durante 6 horas, e recobertas com uma camada de ouro de 20nm de espessura. A tensão e a corrente do feixe utilizadas nas análises foram de 20 kV e 2,85 pA, respectivamente. As imagens obtidas foram tratadas digitalmente, utilizando o programa IMAGE J.

5.1.4 Espectroscopia de RMN ¹H

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio de alta resolução é utilizada para a análise das estruturas químicas e para a determinação do grau médio de acetilação de quitina e quitosana⁽⁵⁶⁾. Os espectros das amostras produzidas neste trabalho foram obtidos no equipamento BRUKER AVANCE DRX500 (FFLC/RP-USP).

Para obtenção do espectro de quitina, foram adicionados cerca de 10mg a 1 mL de solução de DCI 35%, e a suspensão mantida sob agitação magnética constante, durante 24 horas, à temperatura de 40°C.

Na aquisição do espectro de quitosana, aproximadamente 6mg da amostra foram solubilizados em 1 mL de solução de HCl/D₂O 1% (v/v), sob agitação magnética constante, durante 24 horas, à temperatura ambiente.

Em ambos os casos, as soluções resultantes foram transferidas para tubos de quartzo (Aldrich 527-PP, $\phi = 5\text{mm}$). As condições empregadas na aquisição dos espectros de quitina e quitosana foram: a) supressão de água com sequência de pulsos 1-1, com intervalo de 3s entre os pulsos de supressão; b) acúmulo de 32 varreduras; c) intervalo de 7s de relaxação; d) temperatura de 90°C; e) janela spectral de 10.0ppm.

O grau médio de acetilação de quitosana foi determinado pela razão entre as áreas dos sinais atribuídos aos hidrogênios da metila dos grupos acetamido e o hidrogênio ligado ao carbono 2 do anel glicosídico⁽²³⁾.

Na figura 11, é mostrado um espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, característico de quitosana. A determinação do grau médio de acetilação por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H) foi feita a partir da equação 1⁽⁵⁷⁾.

$$\%GA = \left(\frac{A_{CH_3} / 3}{A_{H_2-H_6} / 6} \right) * 100 \quad \text{Equação (1)}$$

onde:

A_{CH_3} = área dos hidrogênios metílicos do grupo acetamido

$A_{H_2-H_6}$ = área do hidrogênio ligado ao carbono C(2) do anel glicopiranosídico

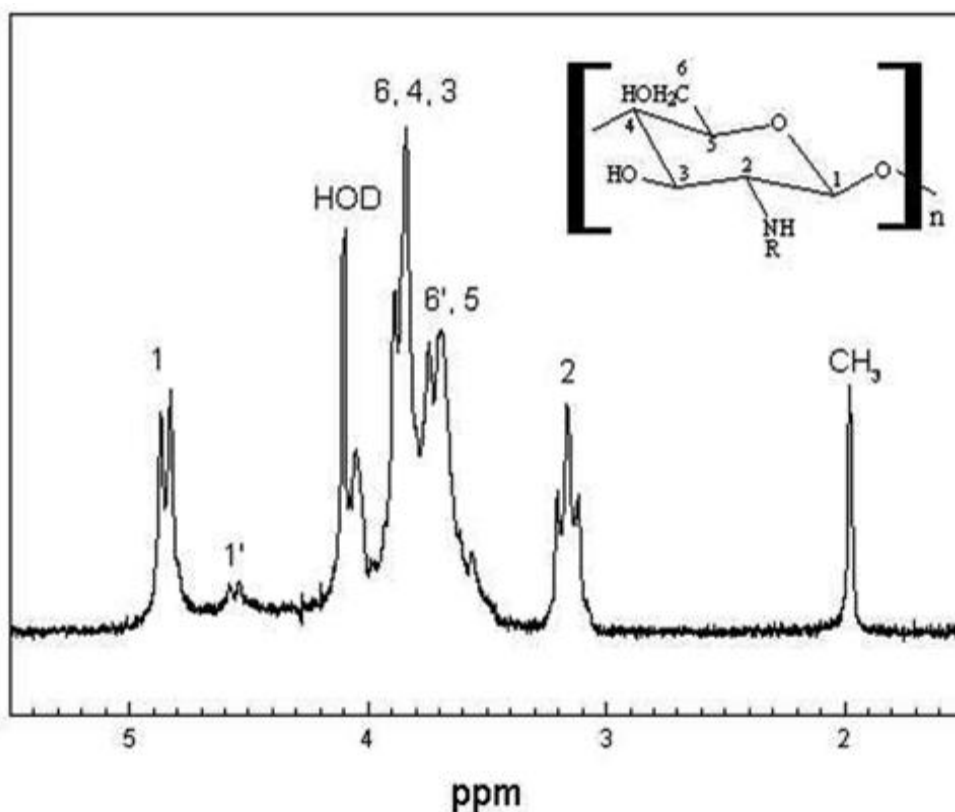


Figura 10- Espectro de RMN-1H característico de quitosana⁽²⁴⁾.

A determinação do grau médio de acetilação da beta-quitina por ressonância magnética nuclear de hidrogênio foi feita a partir da equação 2.

$$\overline{GA}\% = \frac{(A_{\alpha H1A} + A_{\beta H1A + H1D} + A_{H1A}) - A_{H2D}}{(A_{\alpha H1A} + A_{\beta H1A + H1D} + A_{H1A})} \quad \text{Equação (2)}$$

Onde:

os hidrogênios H-1 das unidades acetiladas e desacetiladas são representados pelas integrais $A_{\alpha H1A}$, $A_{\beta H1A + H1D}$, A_{H1A} e os hidrogênios H-2 das unidades desacetiladas, pela integral A_{H2D} .

Para a aquisição dos espectros de carboximetilquitosana, 6mg da amostra foram solubilizados em 1 mL de solução de HCl/D₂O 1% (v/v), sob agitação magnética constante, durante 24 horas, à temperatura ambiente⁽¹⁰⁾. As condições empregadas na

aquisição dos espectros de carboximetilquitosana foram: a) supressão de água com sequência de pulsos 1-1, com intervalo de 3s entre os pulsos de supressão; b) acúmulo de 32 varreduras; c) intervalo de 7s de relaxação; d) temperatura de 90°C; e) tempo de aquisição de 2.03s; f) janela spectral de 10.0ppm.

5.1.5 Massa molar viscosimétrica média

Para determinação da viscosidade intrínseca da amostra de quitina, aproximadamente 5mg de quitina foram solubilizados em 50 mL de solução de N,N-dimetilacetamida/LiCl 5% por 48 horas. As diluições para as medidas de viscosidade, em função da concentração, usaram como solvente a solução de N,N-dimetilacetamida/LiCl 5% e os volumes adicionados foram 1 mL, 2 mL, 3 mL e 4 mL.

Para a determinação da viscosidade intrínseca, cerca de 20mg de quitosana (previamente seca em estufa, a vácuo, a 30°C, durante 6 horas) foram suspensos em 25 mL de solução de ácido acético 0,6M, sob agitação magnética constante, durante 24 horas. Em seguida, foram adicionados 25 mL de acetato de sódio 0,4M. A agitação continuou por mais 24 horas. A solução resultante foi filtrada sob pressão positiva, em membrana com diâmetro dos poros de 0,45 μ m (Millipore – White SCWP). Alíquotas de 15 mL desta solução foram transferidas para um viscosímetro capilar de vidro (do tipo Ubbelohde, $\phi=0,53$ mm) e as medidas de tempo de escoamento foram determinadas em um viscosímetro AVS-350, acoplado a um módulo diluidor automático AVS-20, ambos da Schott-Geräte. Todas as medidas de tempo de escoamento foram realizadas a $25,00 \pm 0,01^\circ\text{C}$, empregando um tampão ácido acético 0,3M/acetato de sódio 0,2M (pH = 4,5), para as sucessivas diluições, de modo a assegurar que a força iônica das soluções fosse mantida constante.

Quando se trata de solução de polieletrólitos, como uma solução de quitosana em ácido diluído ou em tampão, a viscosidade pode ser descrita como função de sua viscosidade intrínseca e de sua concentração, quando não ocorrem interações macromoleculares (sistema diluído) e quando existir a presença de um excesso de eletrólito de baixa massa molar. Nesse caso, a relação de Huggins⁽⁵⁸⁾ pode ser usada (equação 3):

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] + k_H \cdot [\eta]^2 \cdot C \quad \text{Equação (3)}$$

onde:

$\frac{\eta_{sp}}{C}$ = viscosidade reduzida (mL/g);

$[\eta]$ = viscosidade intrínseca (mL/g);

k_H = constante de Huggins;

C = concentração da solução (g/mL).

Desta forma, a viscosidade intrínseca ($[\eta]$) é determinada pela extrapolação à diluição infinita da curva de viscosidade reduzida versus concentração. A viscosidade assim determinada satisfaz a relação de Mark-Houwink. Dessa forma, a massa molar média viscosimétrica (\overline{M}_v) do polieletrólito pode ser determinada empregando a equação 4.

$$[\eta] = K' \overline{M}_v^\alpha \quad \text{Equação (4)}$$

onde:

K' e α são constantes para um dado solvente e temperatura. Para a quitosana, os valores de α e de K' dependem do grau médio de acetilação do polímero^(22, 59).

Para determinar a viscosidade da carboximetilquitosana, aproximadamente 25mg de amostra foram adicionados em 25 mL de água destilada, mantendo uma agitação magnética constante, por 24 horas. Em seguida, foram adicionados 25 mL de solução de NaCl 0,2 M e a agitação continuou por mais 30 minutos. A solução foi filtrada sob pressão positiva, em membrana com diâmetro dos poros de 0,8 μ m (Millipore – White SCWP). As medidas de tempo de escoamento foram realizadas a $30,00 \pm 0,01^{\circ}\text{C}$ e uma solução de NaCl 0,1 M foi empregada para as sucessivas diluições⁽⁶⁰⁾.

Assim como nas amostras de quitosana, a viscosidade intrínseca $[\eta]$ da CMQ foi determinada por extrapolação à concentração nula da viscosidade relativa. A massa molar média viscosimétrica \overline{M}_v foi calculada de acordo com a equação de Mark-Houwink (equação 04)⁽⁶¹⁾. Para CMQ, os valores de $k = 7,92 \times 10^{-2}$ e $7,92 \times 10^{-5}$, $a = 1,00$ ⁽⁶⁰⁾.

5.1.6 Espectroscopia no infravermelho

Os modos de vibração foram determinados por espectroscopia vibracional na região do infravermelho. As amostras foram preparadas com KBr de grau espectroscópico, na proporção 1:100 (polímero/KBr). As amostras de quitosana/carboximetilquitosana sódica e o KBr foram previamente secos na estufa a vácuo, a 60°C por 8 horas, sendo posteriormente triturados em gral de ágata. Após homogeneização, as amostras trituradas foram novamente acondicionadas em estufa a vácuo, a 80°C , durante 15 horas, e prensadas. As pastilhas resultantes foram submetidas à análise. As análises foram realizadas em espectrofotômetro BOMEM MB-102, com acúmulo de 48 varreduras e resolução de 4cm^{-1} .

Para a aquisição, no infravermelho, do espectro da amostra de carboximetilquitosana, na forma ácida (H-CMQ), foram adicionados 500mg da amostra, em 250 mL de água destilada. A suspensão foi mantida sob agitação constante, por 24 horas. A solução resultante foi dialisada contra HCl 0,1 M, utilizando membrana da Viskase Corporation (de 21 mm de diâmetro e limite de exclusão de massa molecular de 12.000-16.000 Da). As membranas de diálise, contendo a solução da amostra, foram colocadas no béquer de 2 L, com solução HCl 0,1 M. A diálise se estendeu por 7 dias. A cada 24 horas, a solução de HCl era trocada. A diálise foi realizada com o objetivo de trocar os contra- íons Na^+ por H^+ . Em seguida, a solução foi colocada em uma placa de Petri e mantida à temperatura ambiente, por 7 dias. O filme de carboximetilquitosana, formado após a evaporação do solvente, foi destacado e submetido a análise ⁽¹⁰⁾.

5.1.7 Solubilidade

A determinação da solubilidade da quitosana e de seus derivados carboximetilados em água foi baseada na turbidez de suas soluções. As amostras foram dissolvidas em água deionizada e o pH das soluções ($C_p=1,5\text{g/L}$) foi ajustado com soluções aquosas de HCl e NaOH 0,5%. A transmitância das soluções foi registrada em um espectrômetro UV: VARIAN - CARY INSTRUMENTS UV - VIS - NIR SPECTROPHOTOMETER 5G, utilizando-se uma cela de quartzo de 1cm. A solubilidade em água das amostras, em diferentes pHs, foi estimada por medidas de transmitância da solução. A proposta para a realização da análise foi a seguinte: considerando-se que o aumento de absorção deve estar diretamente associado à turbidez das soluções, em função do aumento ou diminuição do pH as amostras ficam insolúveis e, ao invés de uma solução, passa-se a ter uma suspensão. As partículas em suspensão, ou seja, as partículas das amostras insolúveis em determinados pHs, difratam e espalham a radiação luminosa que, portanto, não atinge o detector que existe depois da

cela que contém a solução. Assim, o equipamento registra um espectro que mostra um aumento de absorção em determinadas condições de pH, como consequência da presença de partículas (materiais insolúveis) em suspensão^(10, 45, 62).

5.1.8 Análise elementar

A composição elementar das amostras de quitina, quitosana e carboximetilquitosana foi determinada pelo aparelho EA 1110 CHNS-O CE INSTRUMENTS, e elas foram analisadas depois de secas em estufa a vácuo, por 72 horas.

6 Resultados e Discussões

Os resultados foram discutidos com ênfase nas modificações estruturais das propriedades decorrentes da carboximetilação de quitosana, extensivamente desacetilada e de elevada massa molar, e na influência da razão molar quitosana/ácido monocloroacético e do tempo de reação sobre essas modificações.

6.1 Preparação e purificação das amostras

As amostras de carboximetilquitosana, na forma sódica (Na-CMQ), apresentaram-se solúveis em água (pH 7), na concentração de 1 g/L. Isso procede da introdução dos grupos $-\text{CH}_2\text{OO}^- \text{Na}^+$ na quitosana, originando um polieletrólito anfiprótico que contém grupos COO^- e NH_3^+ , ao longo das cadeias poliméricas.

Os dados relativos à variação do rendimento bruto das reações de carboximetilação nas condições reacionais (Tabela 2) mostram que o ganho de massa é fortemente afetado pelo excesso de ácido monocloroacético, enquanto o prolongamento da reação, por mais de 8 horas, não resulta em aumento significativo de rendimento.

Embora a carboximetilação sempre resulte em ganho de massa, devido à substituição dos átomos de H, dos grupos OH, por grupos $\text{CH}_2\text{COO}^- \text{Na}^+$, também ocorre despolimerização. Os fragmentos mais solúveis são eliminados na etapa de purificação, pois eles não precipitam, o que contribui para a perda de massa. Além disso, as cadeias de quitosana que não foram suficientemente substituídas, para resultar em derivado solúvel em água (pH 7), são eliminadas na purificação, na etapa de solubilização/filtração.

Tabela 2- Massas de CMQ obtidas através da reação de carboximetilação e purificação das mesmas.

Amostra (g)	Razão molar	Tempo (h)	Massa CMQ (g)	Ganho de massa bruto (%)*	Massa de CMQ Purificada (g)	Perda de massa na purificação (%)
CMQ-2,5	1:2,5	4	1,30	30	0,61	53
CMQ-5	1:5	4	1,38	38	1,03	18
CMQ-10	1:10	4	1,82	82	1,13	38
CMQ-8h	1:2,5	8	1,36	36	1,13	17
CMQ-17h	1:2,5	17	1,42	42	1,37	3,5

* Relativo à massa inicial de quitosana.

6.2 Caracterização das amostras

6.2.1 Caracterização Estrutural

6.2.1.1 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H)

No espectro de RMN¹H da amostra de quitosana (Figura 12) obtida pela reação de desacetilação de β -quitina, através do processo DAIUS, foi observada a presença dos sinais dos hidrogênios metílicos do grupo acetamida, em 2,0ppm. Os sinais dos hidrogênios ligados aos carbonos 2 a 6, do anel de glicopirranose, foram observados no intervalo de deslocamento químico 3,0 – 4,0ppm e os sinais do hidrogênio ligado ao carbono 1, em aproximadamente 4,9ppm, são característicos do espectro de RMN¹H de quitosana⁽²³⁾.

A partir da análise dos espectros de RMN¹H de quitina (figura 11) e quitosana, o grau médio de acetilação (\overline{GA}) dos polímeros foi determinado, sendo possível observar que o sinal em 2,0ppm, referente às unidades GlcNAc, foi muito menos intenso na quitosana do que na amostra de quitina, fato expresso pelos valores de \overline{GA} dos polímeros (Tabela 3).

Tabela 3- Valores de (\overline{GA}) das amostras de beta-quitina e quitosana, obtidos por espectroscopia de RMN¹H

Amostra	Grau de acetilação (\overline{GA})
Beta-quitina	81,2%
Quitosana	4,5%

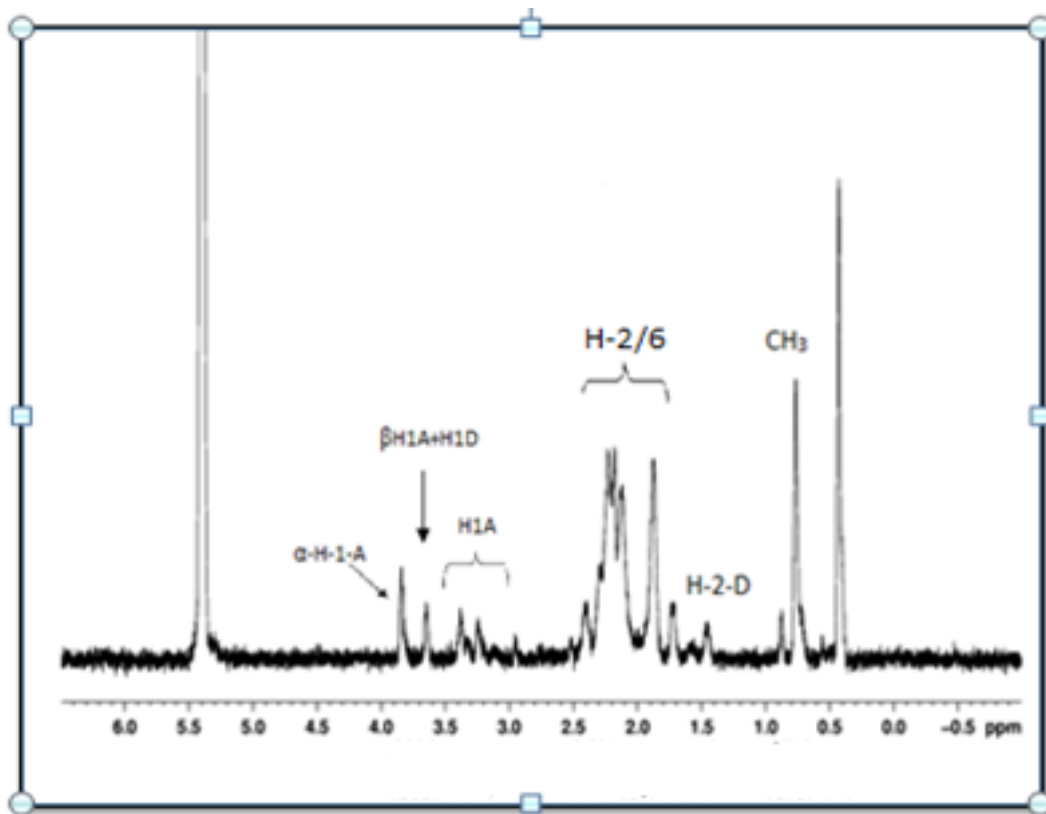


Figura 11- Espectro de RMN 1H (500 MHz) da amostra de quitina (DCI 35%, 40°C).

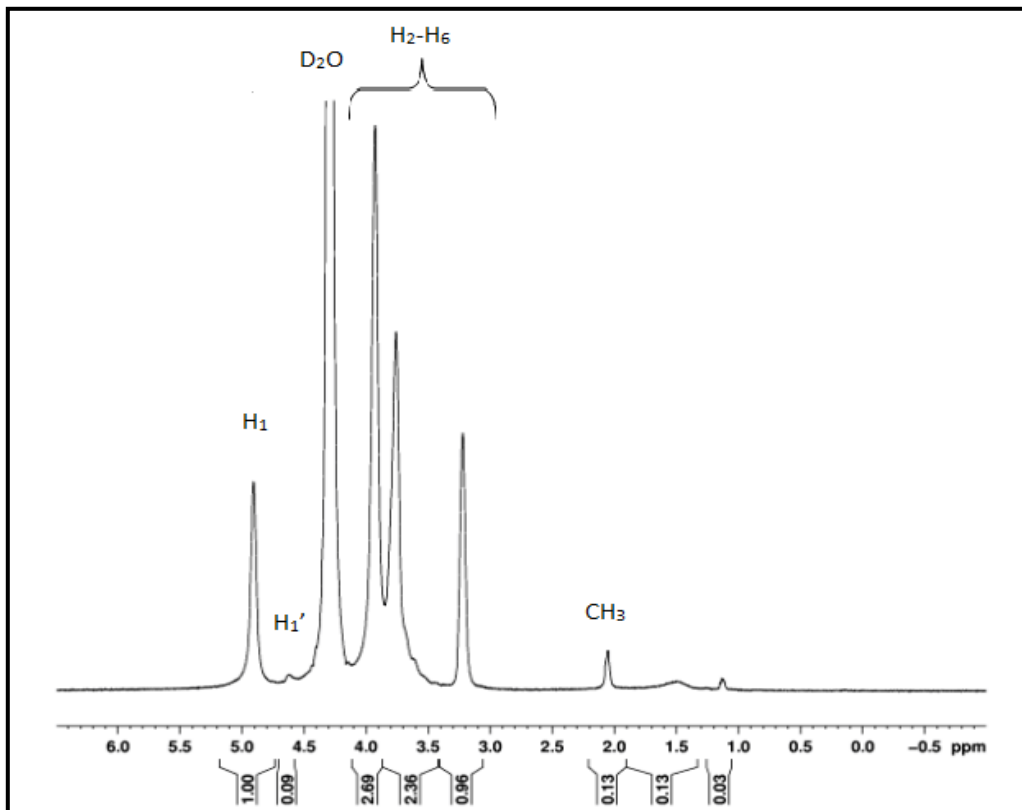


Figura 12- Espectro de RMN 1H (500 MHz) da amostra quitosana (DCI/D2O 1% (v/v), 90°C).

As modificações estruturais introduzidas pela carboximetilação foram observadas através da comparação dos espectros de RMN¹H da quitosana (Figura 12) e da carboximetilquitosana (Figura 13). Foi observado que o espectro do CMQ é consideravelmente diferente e mais complexo que o da quitosana. A ocorrência da N-carboximetilação foi evidenciada pelos sinais, no intervalo de 3,0-3,4ppm, no espectro de carboximetilquitosana, atribuídos à mono e dissustituição dos grupos amino. Entretanto, não é possível determinar se a carboximetilação ocorreu em todos os grupos aminos, porque o sinal do hidrogênio ligado ao C2 (3,0-3,5 ppm) sobrepõe-se aos sinais atribuídos aos sítios de N-CMQ. É possível, porém, observar que a intensidade do sinal é baixa, indicando que a carboximetilação nos grupos aminos ocorreu em baixa extensão^(2, 45, 46). A região entre 4,05-4,55ppm corresponde à ressonância dos hidrogênios dos grupos carboximetil, substituídos no C3 e C6 (-O-CH₂-COOD) de CMQ. Devido à sobreposição dos sinais, não foi possível calcular o grau médio de substituição das amostras de carboximetilquitosana, através do espectro de RMN¹H.

Quando os espectros de RMN¹H das amostras de CMQ possuem sinais bem definidos, é possível calcular a fração de carboximetilação nas posições C6, C3 e C2 e, conseqüentemente, a fração total de carboximetilação, através do método de Ragnhild⁽⁶³⁾. Entretanto, essa análise não foi realizada, pois houve sobreposição dos sinais de interesse.

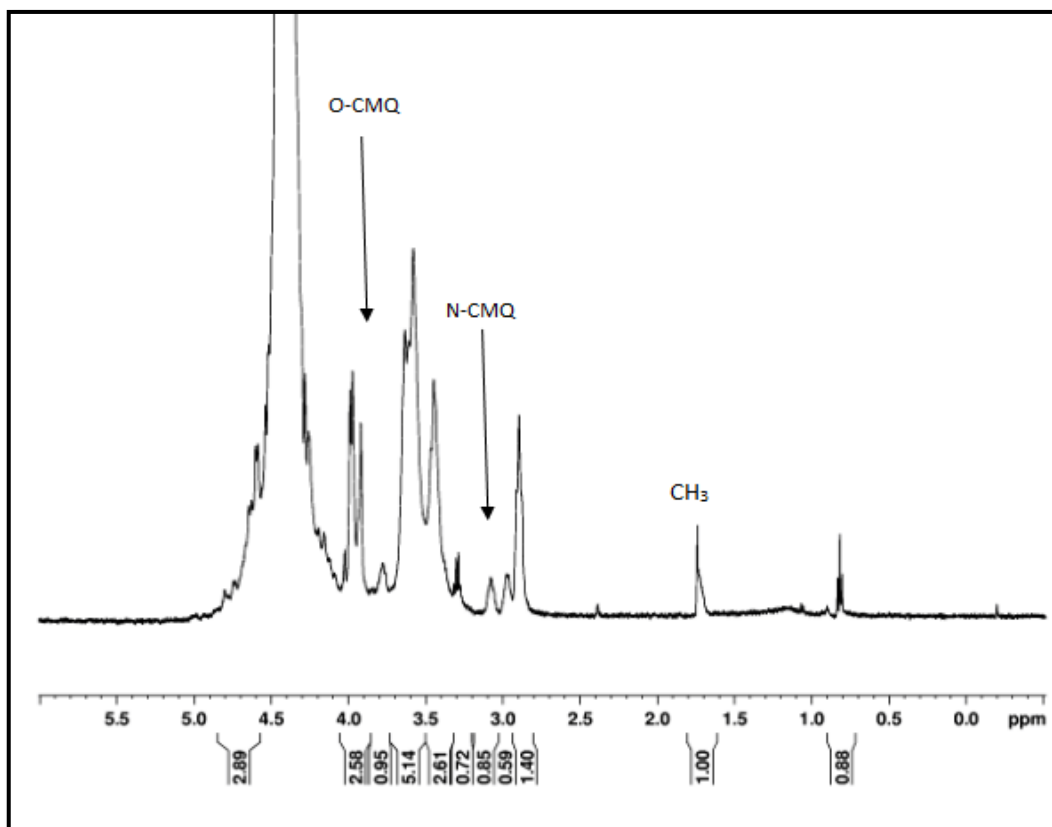


Figura 13- Espectro de RMN1H (500 MHz) da amostra de carboximetilquitosana (CMQ-10) com GS de 0,43 (DCI/D2O) 1% (v/v), 90 °C.

6.2.1.2 Espectroscopia no Infravermelho

A partir das análises de espectroscopia no infravermelho, as amostras de beta-quitina, quitosana e carboximetilquitosana foram identificadas por seus modos de vibração característicos, conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4- Bandas de absorção e números de onda (cm^{-1}) característicos de quitina, quitosana ⁽⁶⁴⁾ e carboximetilquitosana ⁽²⁾

Banda	$\bar{\nu}$ (cm^{-1})	Banda	$\bar{\nu}$ (cm^{-1})
Amida I	$\approx 1\ 650$ e $1\ 630$	Amida II	$\approx 1\ 550$ e $1\ 560$
Amida III	$\approx 1\ 310$	$-\text{N}-\text{H}_3^+$ (s)	$\approx 3\ 350-3\ 100$ e $2\ 100^i$
$-\text{N}-\text{H}_2$ (s)	$\approx 3\ 250-3\ 350$	$-\text{N}-\text{H}_2$ (b)	$\approx 1\ 590-1\ 630$
$-\text{O}-\text{H}$ (s)	$\approx 3\ 450$	$-\text{O}-\text{H}$ (b)	$\approx 1\ 260$
$-\text{C}-\text{OH}$ (s)	$\approx 1\ 030$ e $1\ 070$	$-\text{C}-\text{H}_2$ (b, sc)	$\approx 1410-1\ 420$
$-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{C}-\text{H}_3$ (s)	$\approx 1\ 380$	$-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{C}-\text{H}_3$ (b)	$\approx 2\ 860-2\ 910$
$-\text{COOH}$	1414-1401	$-\text{COOH}$	1731-1737

(a) s = estiramento ("stretching"); b = torção ("bending"); sc = ("scissor")

Os espectros de beta-quitina e quitosana, obtidos nesse trabalho, apresentaram semelhanças (Figura 14). Em ambos os espectros, as principais bandas ocorrem nos intervalos de $3600-3000\text{cm}^{-1}$ (deformações axiais de O-H e N-H), de $1660-1550\text{cm}^{-1}$ (deformações axiais de C=O e angulares de N-H), de $1450-1370\text{cm}^{-1}$ (deformações angulares de C-H), de $1300-1315\text{cm}^{-1}$ (deformação axial de CN), de $1150-1155\text{cm}^{-1}$ (deformação axial de O-H em ligação hidrogênio) e de $1020-1080\text{cm}^{-1}$ (deformação angular de C-O)⁽¹⁸⁾. Observou-se, no espectro de beta-quitina, a banda de deformação axial N-H, em 3370 e 3119cm^{-1} , correspondente às ligações hidrogênio intermoleculares

C=O...H-N, a deformação angular de N-H de amida II, em 1550cm^{-1} , e a deformação axial CO de amida I, em 1630cm^{-1} , atribuídas apenas ao grupo C=O, em ligação hidrogênio intermolecular com grupos N-H. No espectro de quitosana, foi identificada a banda de deformação axial CO (em 1625cm^{-1} de amida I). A banda em 1550cm^{-1} , encontrada no espectro de beta-quitina (figura 14), não foi observada no espectro de quitosana, devido ao decréscimo da porcentagem de grupos acetamida, decorrente da extensiva desacetilação de beta-quitina (Figura 15).

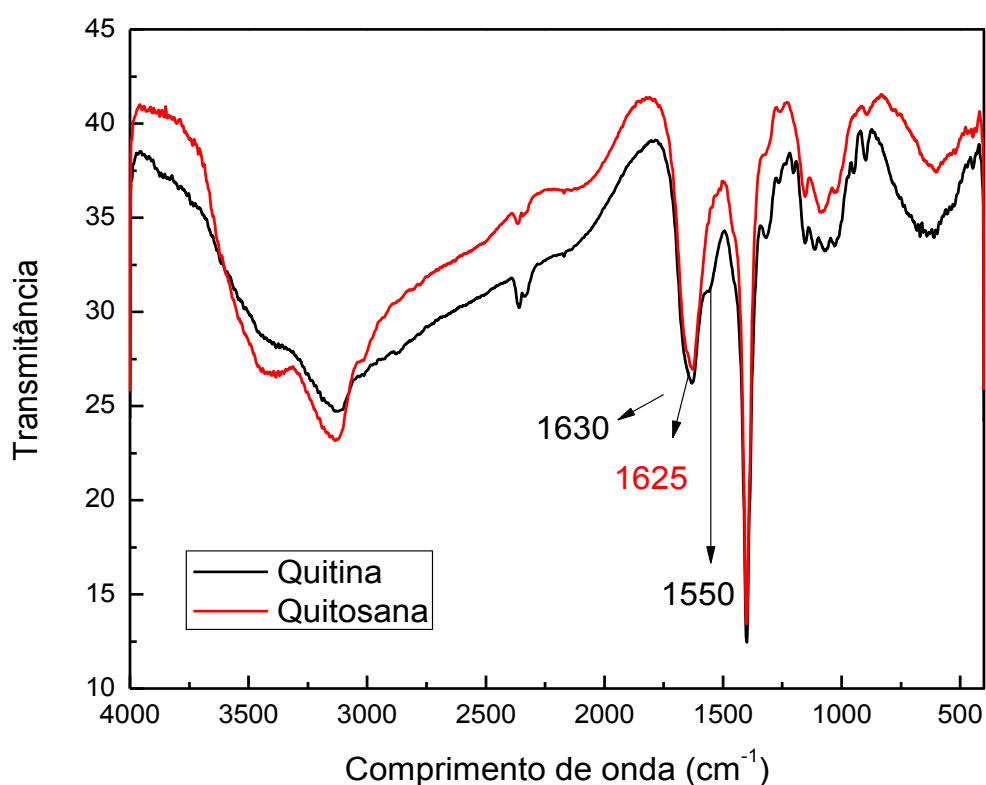


Figura 14- Espectro da região do infravermelho das amostras de β -quitina (GA) = 81%) e quitosana (GA) = 4,5%).

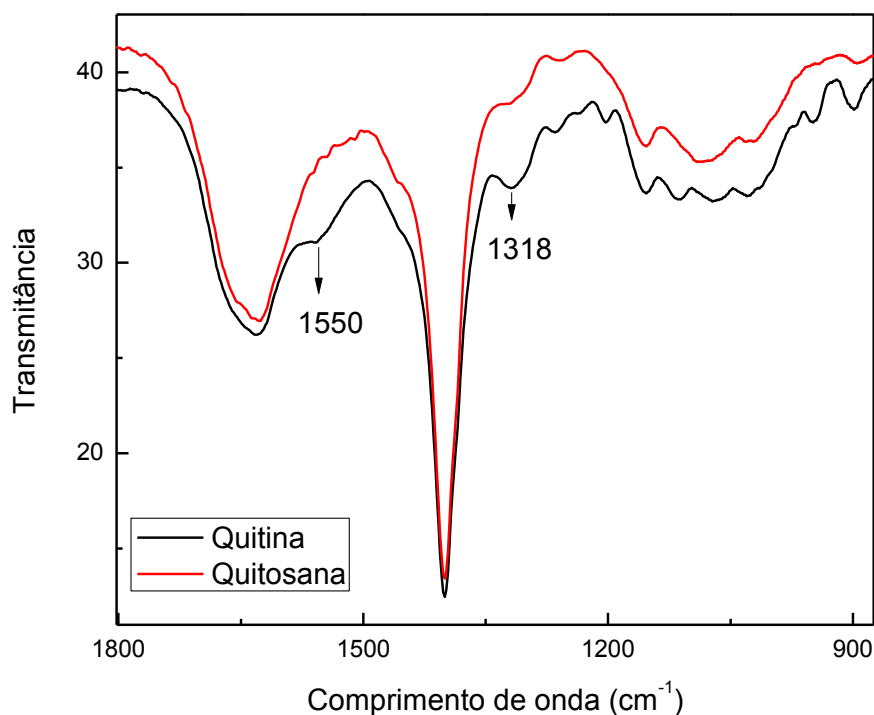


Figura 15- Bandas características na região de 1800-900 cm^{-1} dos espectros no infravermelho das amostras de quitina (GA =81%) e quitosana (GA = 4,5%).

Os espectros de infravermelho de carboximetilquitosana são mostrados nas Figuras 16 e 17 e as principais bandas de quitosana e carboximetilquitosana, na Tabela 7. Após a reação de carboximetilação, foram observadas algumas mudanças no espectro de infravermelho, em relação à quitosana de partida. Conforme é mostrado nas Figuras 16 e 18, o espectro da carboximetilquitosana, na forma sódica, apresentou bandas em 1598-1592 e banda em 1411cm^{-1} , atribuídas às deformações axiais simétricas e assimétricas de COO^- .

Para a carboximetilquitosana, na forma ácida, as bandas foram 1731cm^{-1} ($-\text{COOH}$), $1070-1136\text{cm}^{-1}$ ($-\text{C-O-}$), 1622 e 1517 ($-\text{NH}_3^+$), evidenciando a conversão da amostra para a forma ácida (Figura 20)^(45, 65).

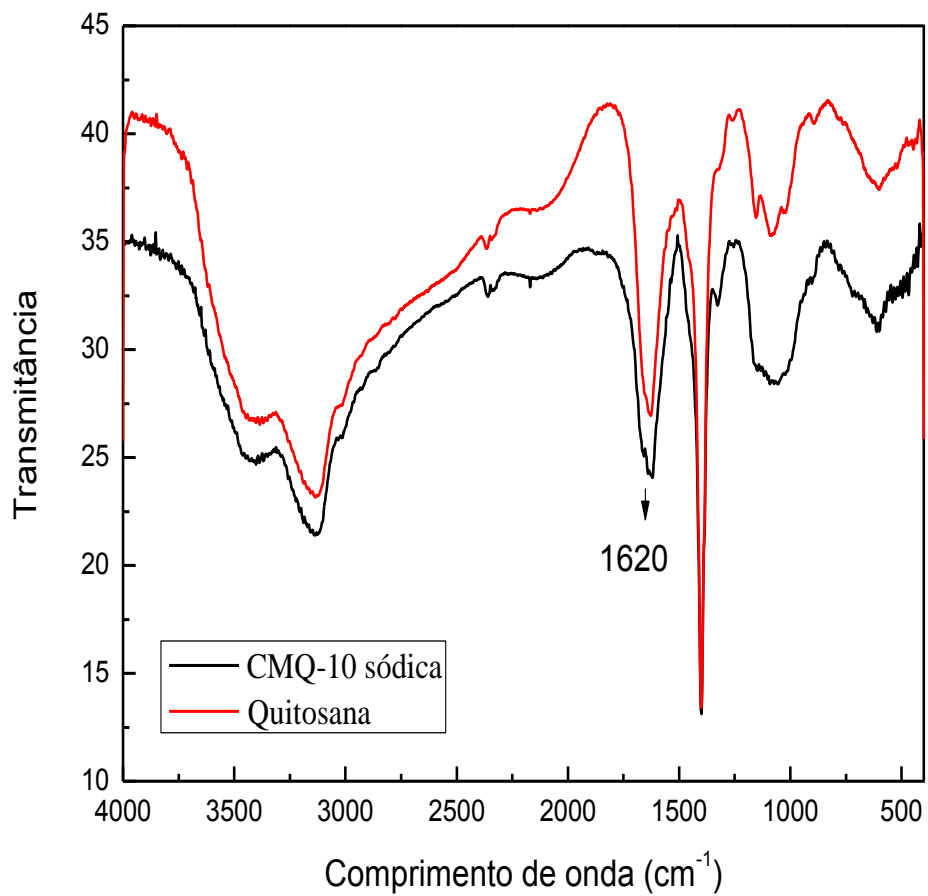


Figura 16- Espectro da região do infravermelho das amostras de CMQ-10 (GS=0,43) na forma sódica e quitosana.

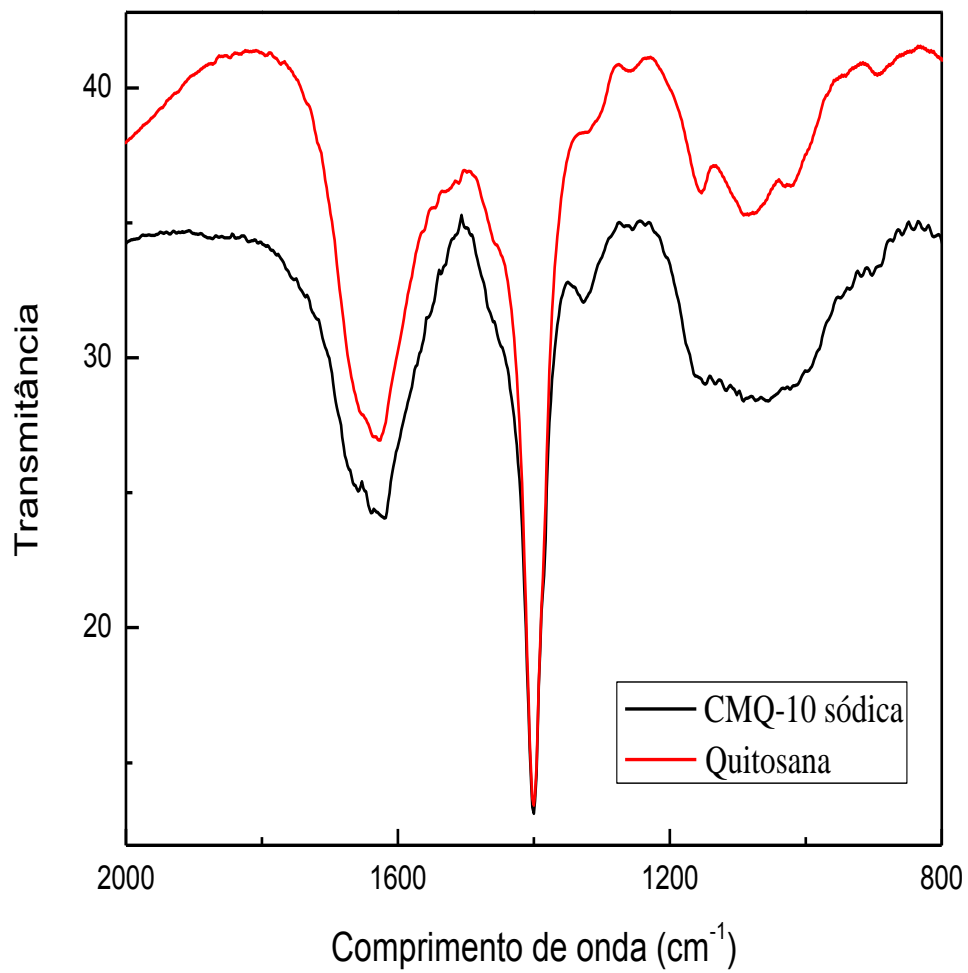


Figura 17- Bandas características na região de 2000-800 cm⁻¹ dos espectros no infravermelho das amostras de quitosana e carboximetilquitosana (GS =0,43).

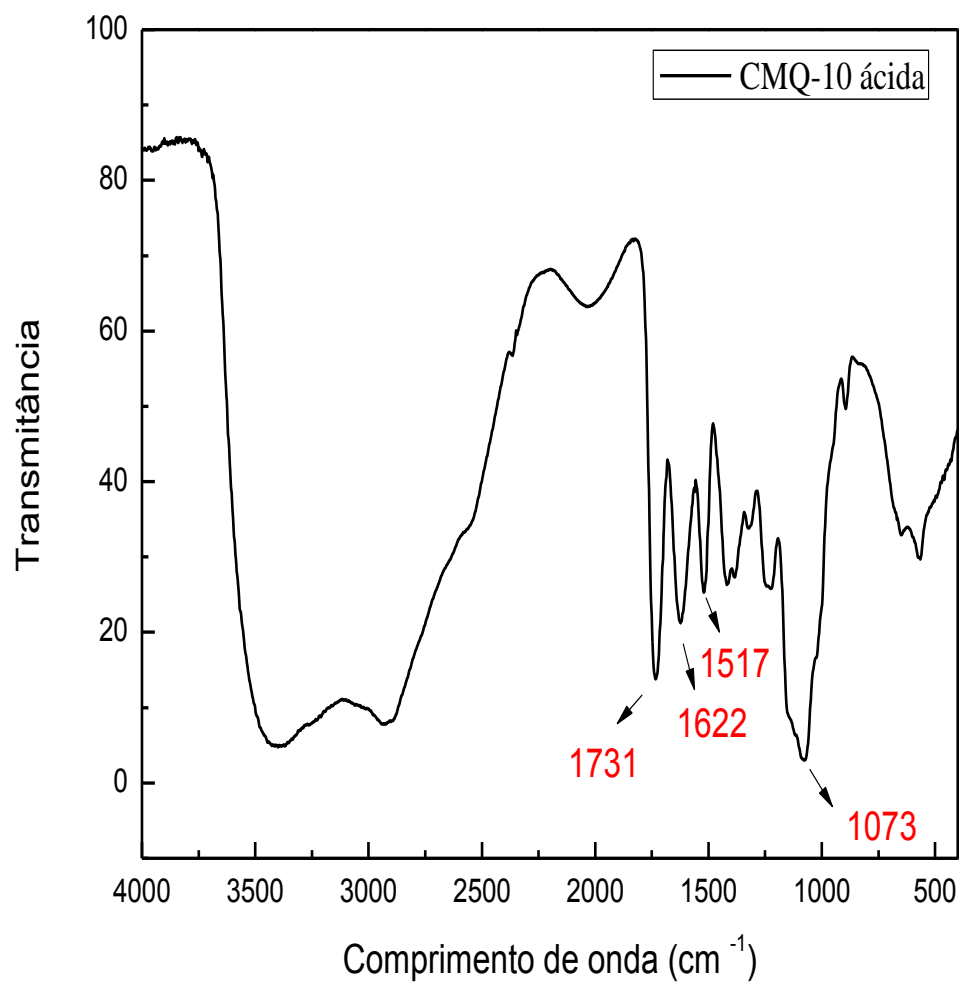


Figura 18- Espectro da região do infravermelho da amostra CMQ-10 (GS=0,43) na forma ácida.

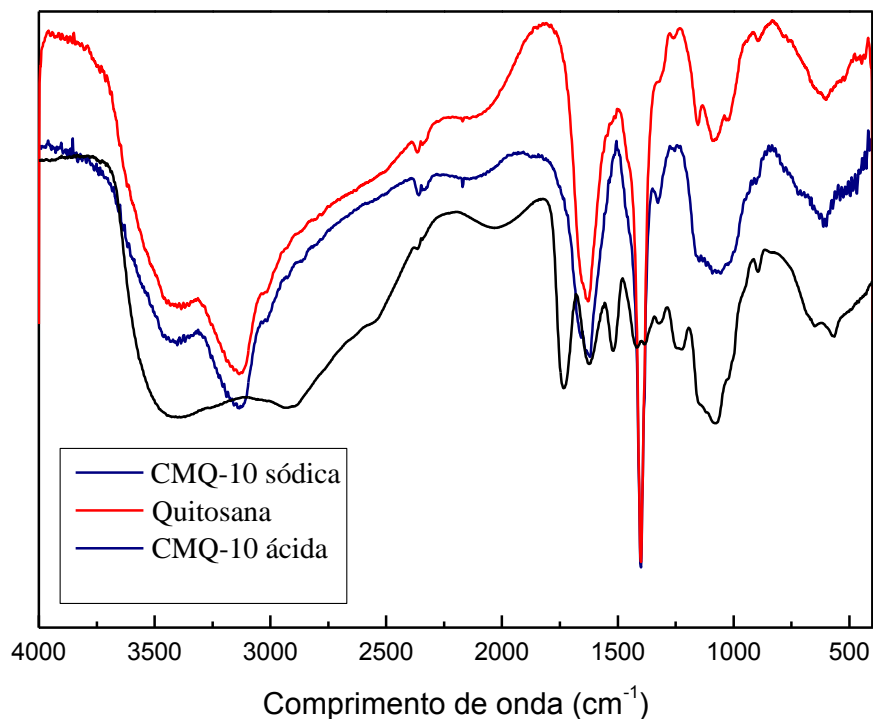


Figura 19- Espectro da região do infravermelho das amostras de quitosana, CMQ-10 sódica e CMQ-10 ácida.

Na Figura 19, foram observadas as diferenças nos espectros de quitosana, CMQ sódica e CMQ ácida. Os espectros de quitosana e CMQ sódica são semelhantes. Ao converter a CMQ sódica em CMQ ácida, é possível observar o alargamento da banda de estiramento de O-H em $3600-3200\text{cm}^{-1}$, devido à substituição dos hidrogênios por grupos carboximetila.

6.2.1.3 Grau médio de substituição

Os espectros na região do infravermelho também foram utilizados para a determinação do grau de substituição (\overline{GS}) das amostras de CMQ. Para isso, foram elaborados filmes das amostras de CMQ, na forma ácida. Assim, foi definida a linha base do espectro na região $1500-1250\text{cm}^{-1}$ e o (\overline{GS}) foi obtido pela razão de intensidades das bandas em 1420cm^{-1} , referente à deformação axial assimétrica de COO^- , e em 1320cm^{-1} , que corresponde à banda de amida III, considerada banda de referência ^(10,66) (Figura 20).

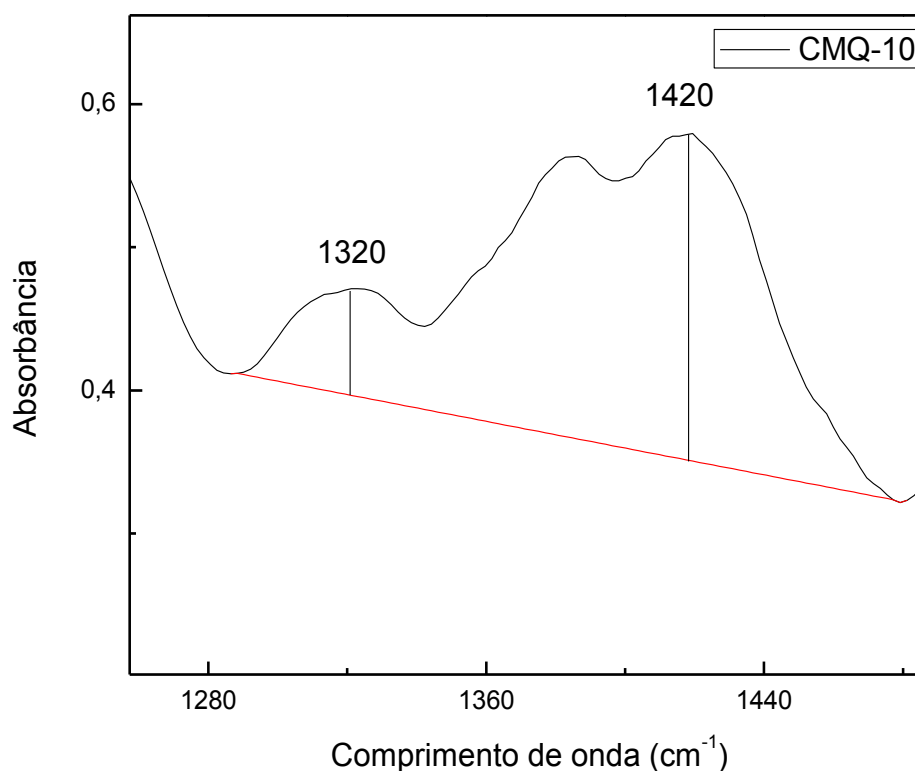


Figura 20- Espectro no infravermelho na região de $1500-1250\text{cm}^{-1}$ de CMQ, na forma ácida, mostrando a linha base e as bandas usadas no cálculo de (\overline{GS}) .

A Tabela 5 mostra os valores de \overline{GS} das amostras de CMQ. Foi observado que, quanto maior a razão molar, maior o grau de substituição das amostras de CMQ. O mesmo comportamento foi observado por Abreu⁽¹⁰⁾. A variação dos valores de \overline{GS} , em função da razão molar, foram pequenas. Entretanto, quando Abreu⁽¹⁰⁾ variou a razão molar quitosana/ácido monocloroacético de 1:4,3 para 1:8,6, o \overline{GS} aumentou de 0,60 para 0,80. Tal constatação pode ser explicada pela diferença da condição reacional, sendo que Abreu⁽¹⁰⁾ realizou a reação de carboximetilação com NaOH 40 % e concentração de 13%. Segundo Chen⁽⁶⁷⁾, a concentração de NaOH influencia no valor de \overline{GS} . Foi observado que, quando a concentração de NaOH aumenta de 40% para 50%, ocorre um aumento no valor de \overline{GS} de 0,15 para 0,63. Conclui-se, então, que as substituições realizadas neste trabalho não foram eficientes, devido a baixa concentração de NaOH.

A Tabela 5 mostra que o aumento da quantidade de agente carboximetilante resulta no aumento linear de \overline{GS} das amostras de CMQ.

Tabela 5- Valores de \overline{GS} das amostras de carboximetilquitosanas determinados por espectroscopia na região do infravermelho

Amostra	Razão molar	Tempo (h)	\overline{GS}
CMQ-2,5	1:2,5	4	0,33
CMQ-5	1:5	4	0,36
CMQ-10	1:10	4	0,43
CMQ- 8h	1:2,5	8	0,26
CMQ-17h	1:2,5	17	0,21

Para as amostras CMQ, variado o tempo de reação (CMQ 4h, 8h e 17h), observou-se que, quanto maior o tempo, menor o \overline{GS} , fato que pode ser explicado pela diminuição da concentração de ácido monocloroacético no meio reacional, uma vez que ele é consumido pelo excesso de hidróxido de sódio presente. Abreu⁽¹⁰⁾ afirma que, a partir de um determinado tempo, a reação de carboximetilação alcança um patamar em que a carboximetilação máxima é alcançada. Portanto, mesmo que o tempo de reação seja aumentado, esta não reagirá. Ge⁽⁶⁰⁾ realizou reações de carboximetilação com irradiação de microondas e observou que, após 20 minutos, é baixa a eficiência da reação de carboximetilação.

6.2.2 Análise Elementar

A técnica de análise elementar foi utilizada para determinar a composição elementar das amostras de quitina, quitosana e carboximetilquitosana. A Tabela 6 apresenta os valores do percentual de C e N, com seus respectivos desvios-padrão. A partir dos dados da Tabela 6, notou-se que as amostras de CMQ apresentaram razão C/N maior que a quitosana de partida. Esses dados também mostram que a razão C/N aumenta com o aumento do grau de substituição.

Tabela 6- Composição elementar e grau de substituição de quitosana e seus derivados carboximetilados.

Amostras	N %	C %	C/N	\overline{GS}
Quitina*	5,32	38,34	7,20	-
Quitosana*	6,87	36,48	6,19	-
CMQ-2,5	5,13±0,73	33,95±1,79	7,29±1,28	0,33
CMQ-5	5,00±0,54	33,19±1,39	7,11±0,99	0,36
CMQ-10	4,50±0,19	31,98±0,22	7,36±0,35	0,43
CMQ-4h	5,13±0,73	33,96±1,78	7,29±1,28	0,33
CMQ-8h	2,76±1,55	21,61±10,34	7,40±8,13	0,26
CMQ-17h	5,49±1,03	34,90±1,15	6,63±1,09	0,21

*Não foram realizadas em duplicata

Para as amostras em que variou a razão molar, os valores da razão C/N são condizentes aos valores de \overline{GS} , mostrando que, quando o derivado carboximetilado é mais substituído (amostra CMQ-10), a razão C/N é maior. Se quando o tempo de reação foi variado, o \overline{GS} das amostras de CMQ diminuiu, a razão C/N também deveria ter diminuído, pois foi adicionado menos grupo carboximetila. Devido a algum problema de manipulação, segundo o \overline{GS} , os resultados obtidos não foram os esperados.

6.2.3 Características Morfológicas

6.2.3.1 Difração de raios-X

A principal aplicação da difração de raios-X refere-se à identificação de domínios cristalinos, sejam eles inorgânicos ou orgânicos. Os planos de difração e suas respectivas distâncias interplanares, bem como as densidades de átomos (elétrons) ao longo de cada plano cristalino, são características específicas e únicas de cada substância cristalina⁽⁶⁸⁾.

A partir da técnica de difração de raios-X, foi possível observar a ocorrência dos diferentes arranjos e graus de ordenamento da beta-quitina, da quitosana e da carboximetilquitosana. Conforme observado na Figura 25, a beta-quitina é facilmente diferenciada da quitosana e da carboximetilquitosana. O espectro da amostra de beta-quitina apresenta dois picos cristalinos em 8° e 19,7°, que são referentes aos planos (010) e (020, 110). Esses picos são mais intensos e definidos na beta-quitina do que na quitosana⁽²³⁾. Na amostra de quitosana, nota-se a ausência do pico em 8°, indício de que a reação de desacetilação, assistida por ultrassom de alta intensidade, resulta em amostras menos cristalinas.

Quando o processo DAIUS é aplicado à suspensão de beta-quitina, ocorre o fenômeno conhecido como cavitação. As ondas acústicas são propagadas e o líquido é submetido alternadamente à compressão e rarefação. Caso a energia aplicada seja suficientemente alta durante a rarefação, ela pode superar as forças intermoleculares que mantêm a estrutura do líquido, formando bolhas cavitacionais. Estas bolhas crescerão durante os ciclos seguintes, adquirindo vapor ou gás do meio. Quando atinge o valor crítico, dependendo da frequência, ocorre um processo de expansão até atingir um tamanho instável, causando um colapso violento que libera grande quantidade de

energia. No colapso de cada bolha cavitacional, há formação de jatos de solventes a velocidades muito elevadas que fragmentam e limpam a superfície do material. Esse fenômeno pode alterar moléculas e ocasionar a ruptura de cadeias poliméricas em fragmentos menores, devido às forças de cisalhamento, alterando a morfologia das partículas e facilitando a acessibilidade aos sítios reativos⁽²³⁾.

A desacetilação, por si só, leva à obtenção de quitosana com menor grau de ordenamento, pois há uma diminuição das interações intramoleculares. Ao realizar a desacetilação, através do processo DAIUS, o fenômeno de cavitação também leva à formação de um polímero que possui menor quantidade de domínios cristalinos, comparado à β -quitina.

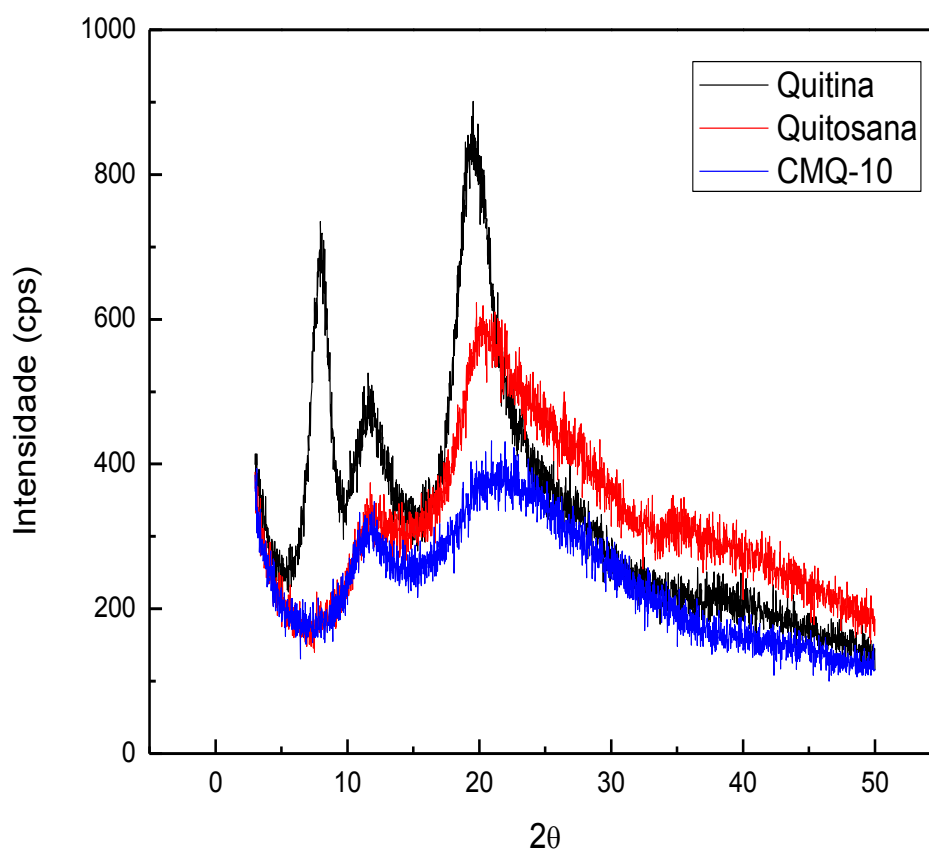


Figura 21- Difratograma das amostras de β -quitina, quitosana e CMQ-10 (GS= 0,43).

Dentre as carboximetilquitosanas, a que apresentou menor índice de cristalinidade foi a CMQ-10 (Figura 21), com sinais menos intensos e definidos que os observados no difratograma de quitosana, indicando que a reação de carboximetilação de quitosana ocasiona mudanças no arranjo estrutural devido à substituição dos grupos OH e/ou NH₂ da quitosana, por CH₂COO⁻ Na⁺.

A carboximetilação de quitosana resulta na substituição de átomos de hidrogênio por grupos carboximetila. Esses grupos, por sua vez, são volumosos, implicando num efeito estérico e quando a carboximetila encontra-se na forma sódica, um efeito polieletrólítico. O efeito estérico se adiciona ao efeito polieletrólítico, pois os grupos se encontram na forma de carboxilato de sódio e a repulsão das cargas dificulta o empacotamento ordenado das cadeias poliméricas⁽¹⁰⁾.

Na Figura 22, estão apresentados os difratogramas das amostras carboximetiladas. Pode-se observar que os difratogramas das amostras CMQ-10, CMQ-8h e CMQ-17h são semelhantes e as amostras CMQ-2,5 (CMQ-4h), CMQ-5 apresentaram sinais mais alargados e de intensidades maiores que as demais carboximetilquitosanas.

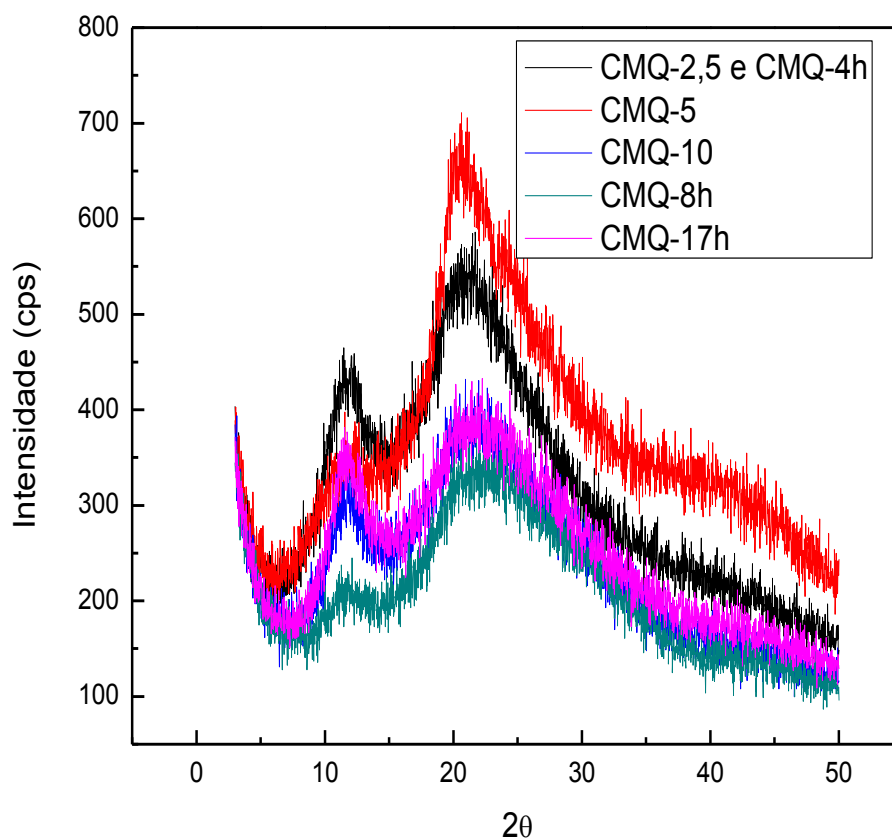


Figura 22- Difratograma das amostras CMQ-2,5 e CMQ-4h (GS= 0,33), CMQ-5 (GS= 0,36), CMQ-10 (GS=0,43), CMQ-8h (GS=0,26) e CMQ-17h (GS= 0,21).

A presença de ramificações, ou grupos substituintes, nas cadeias poliméricas afeta seu empacotamento, gerando domínios não-cristalinos. No caso da carboximetilquitosana, a substituição dos átomos de hidrogênio dos grupos hidroxílicos de quitosana por grupos $\text{CH}_2\text{COO}^- \text{Na}^+$, mais volumosos e hidrofílicos, afeta a conformação espacial das cadeias e suas interações, gerando polímeros menos cristalinos⁽⁶⁹⁾.

Embora não seja feita uma determinação quantitativa de graus de cristalinidade, o exame qualitativo dos difratogramas permite concluir que as amostras de

carboximetilquitosanas possuem grau de cristalinidade inferior ao da quitosana, devido a diminuição da intensidade e do alargamento dos sinais.

6.2.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

A técnica de microscopia eletrônica de varredura foi utilizada com a finalidade de avaliar a morfologia das superfícies das amostras de β -quitina, quitosana e carboximetilquitosana. Conforme apresentadas nas Figuras 23 e 24, observou-se que as partículas de β -quitina apresentam uma superfície relativamente lisa, com aspecto fibroso.

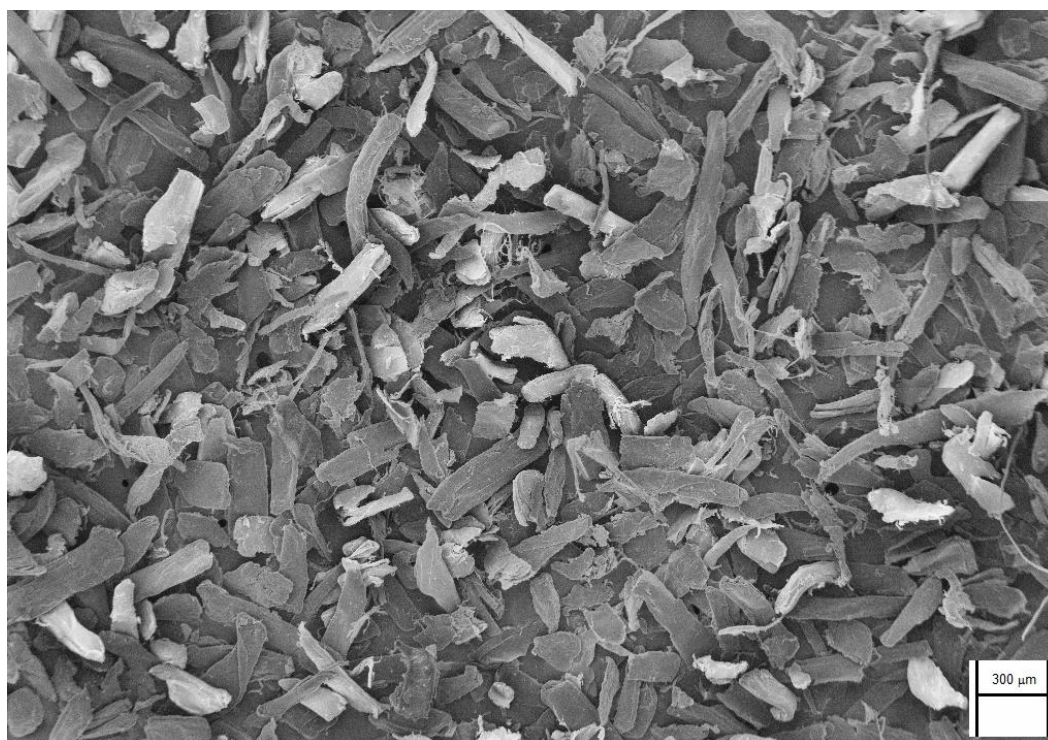


Figura 23- Micrografia da amostra de beta-quitina, ampliação de 75x .

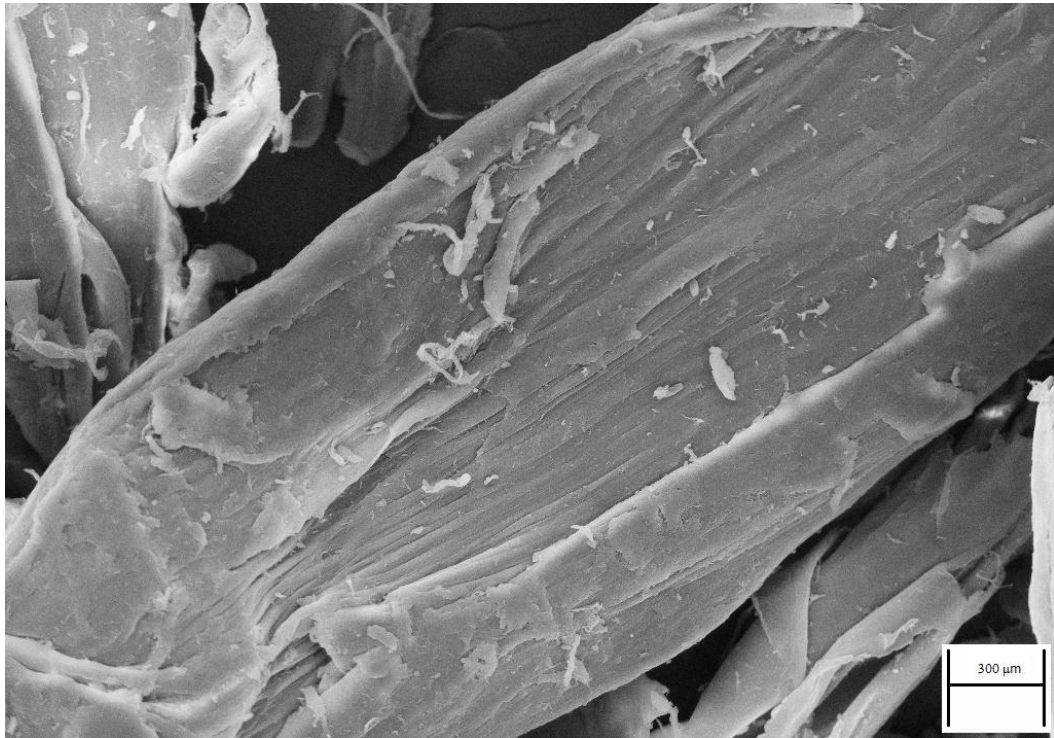


Figura 24- Micrografia da amostra de beta-quitina, ampliação de 500x.

A partir das micrografias da quitosana (Figuras 25 e 26), foi possível observar que, comparada às micrografias da beta-quitina, nela ocorre uma diminuição em relação à área média. A superfície da amostra de quitosana apresentou-se mais rugosa e destituída de fibras. A diminuição da área média das partículas está associada à energia fornecida durante a irradiação da suspensão de quitosana, com ultrassom de alta intensidade. As alterações morfológicas na superfície da quitosana, atribuídas ao efeito de cavitação, resultam na fragmentação das partículas⁽⁷⁰⁻⁷²⁾.

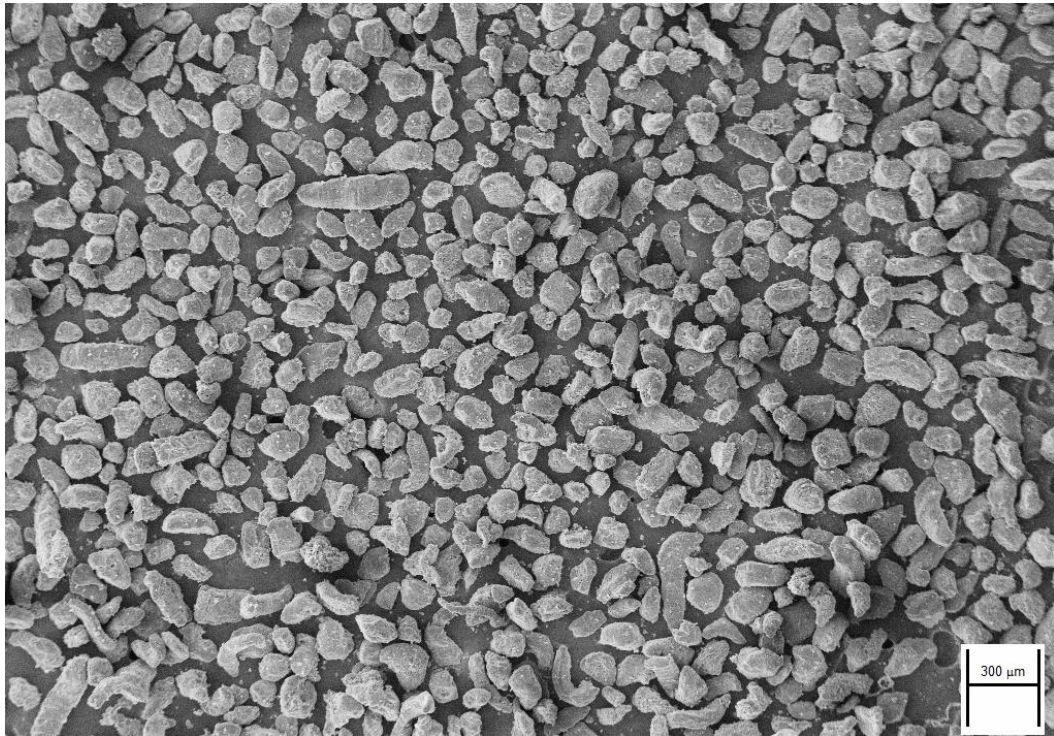


Figura 25- Micrografia da amostra de quitosana, ampliação de 75x.

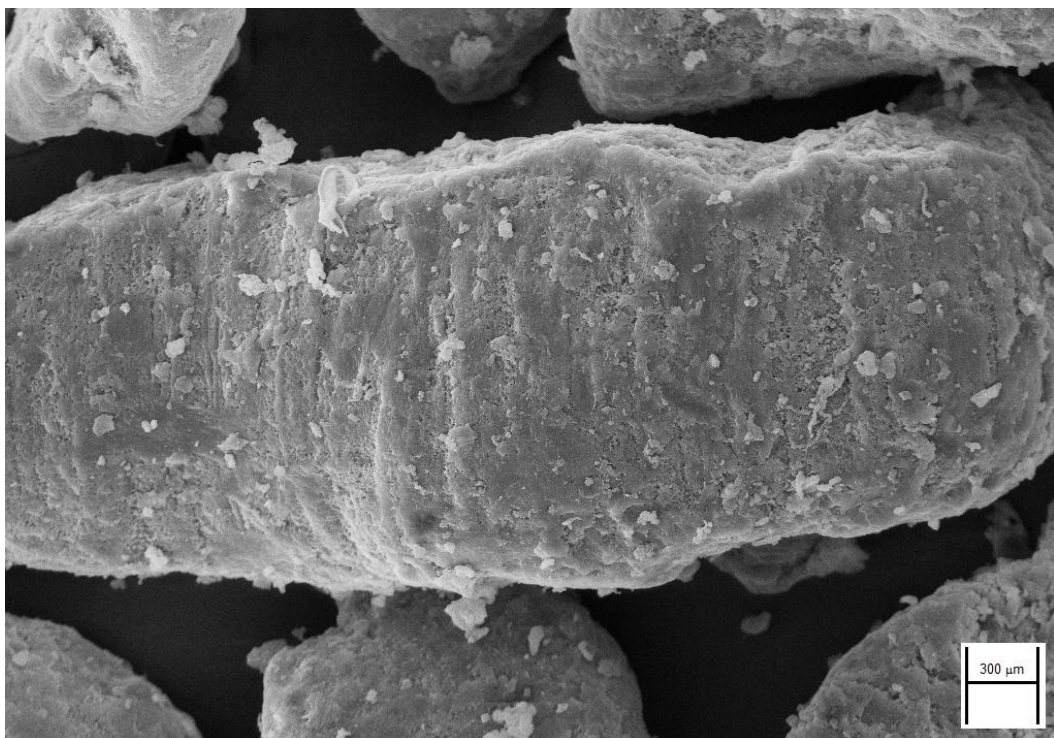


Figura 26- Micrografia da amostra de quitosana, ampliação de 500x.

As micrografias das partículas de amostras de CMQ (Figuras 27 e 28) apresentaram aumento nas dimensões médias, com superfícies relativamente mais lisas do que as da quitosana e houve aumento no tamanho das partículas (Tabela 8).

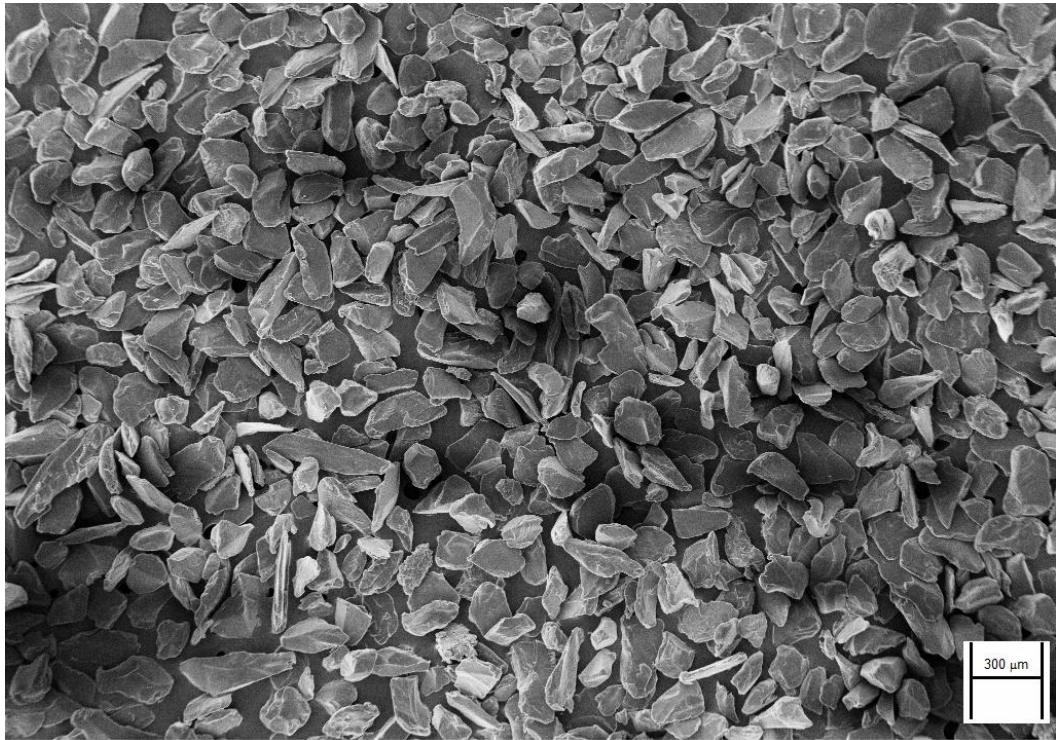


Figura 27- Micrografia da amostra de CMQ-5, ampliação de 75x.

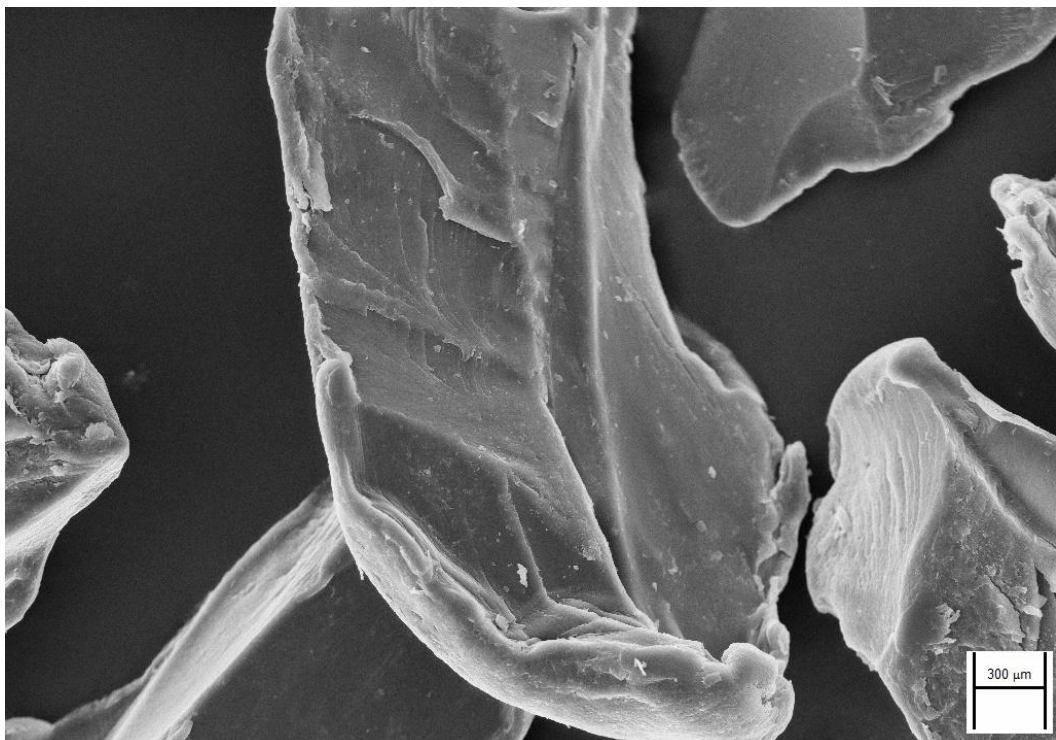


Figura 28- Micrografia da amostra de CMQ-5, ampliação de 500x.

Os dados apresentados na Tabela 7 mostram que, com o aumento da razão molar quitosana/ácido monocloroacético, a área média das partículas diminui, sendo que, na amostra CMQ-5, em relação à amostra CMQ-2,5, essa diminuição é pouco perceptível. Para as amostras obtidas, variando o tempo de reação, o mesmo efeito foi observado: quanto maior o tempo de reação, menor a área média das partículas.

Tabela 7- Valores da área média (μm^2) das partículas de quitina, quitosana e carboximetilquitosana.

Amostra	Razão molar	Tempo (h)	Área média (μm^2)
Quitina	-	-	147,52
Quitosana	-	-	126,57
CMQ-2,5	1:2,5	4	160,45
CMQ-5	1:5	4	158,54
CMQ-10	1:10	4	69,44
CMQ-8h	1:2,5	8	147,94
CMQ-17h	1:25	17	105,73

6.2.4 Propriedades no estado sólido e em solução

6.2.4.1 Análise Térmica

As técnicas termogravimétricas TG e DTG foram utilizadas com o objetivo de avaliar a estabilidade térmica das amostras de quitina, quitosana e carboximetilquitosana. As curvas de Termogravimetria TG e DTG das amostras de quitina e quitosana, obtidas em atmosfera de ar sintético, são apresentadas nas Figuras 29 e 30.

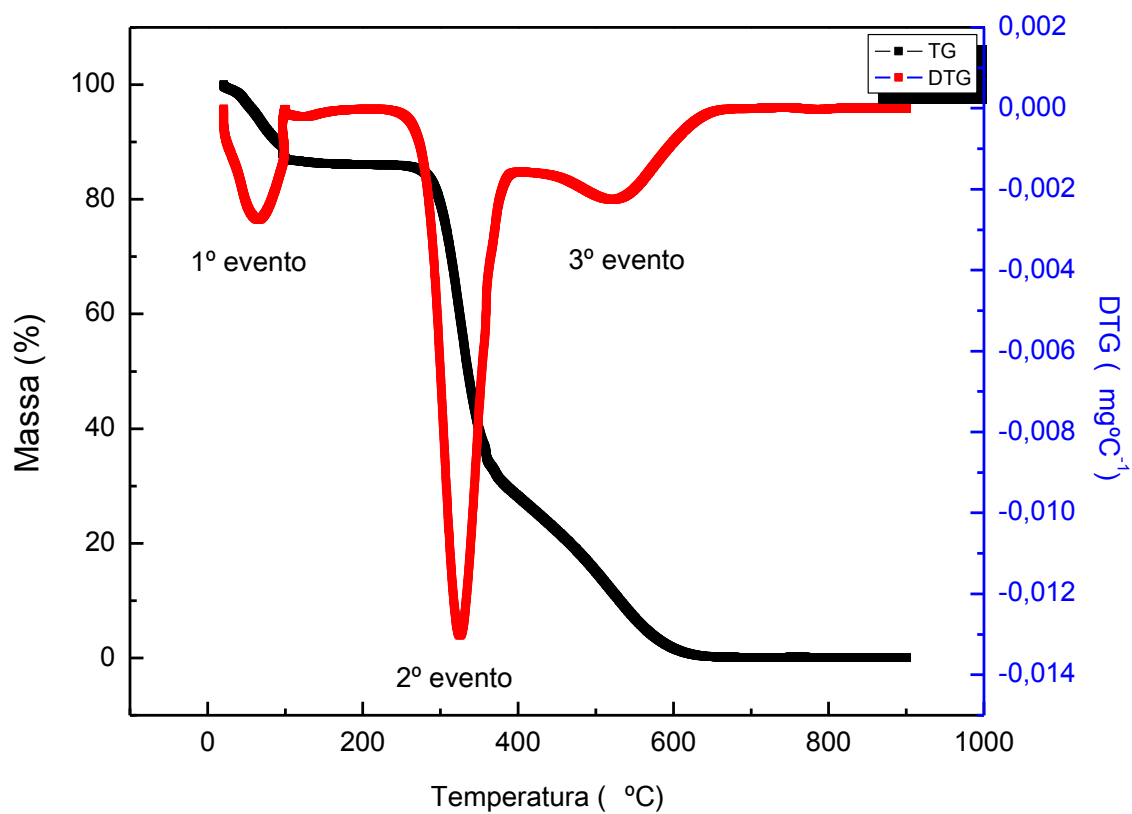


Figura 29- Curvas TG/DTG da amostra de β -quitina sob atmosfera dinâmica de ar sintético (vazão de gás 20 mL/min), massa da amostra 8mg, suporte de amostra de platina.

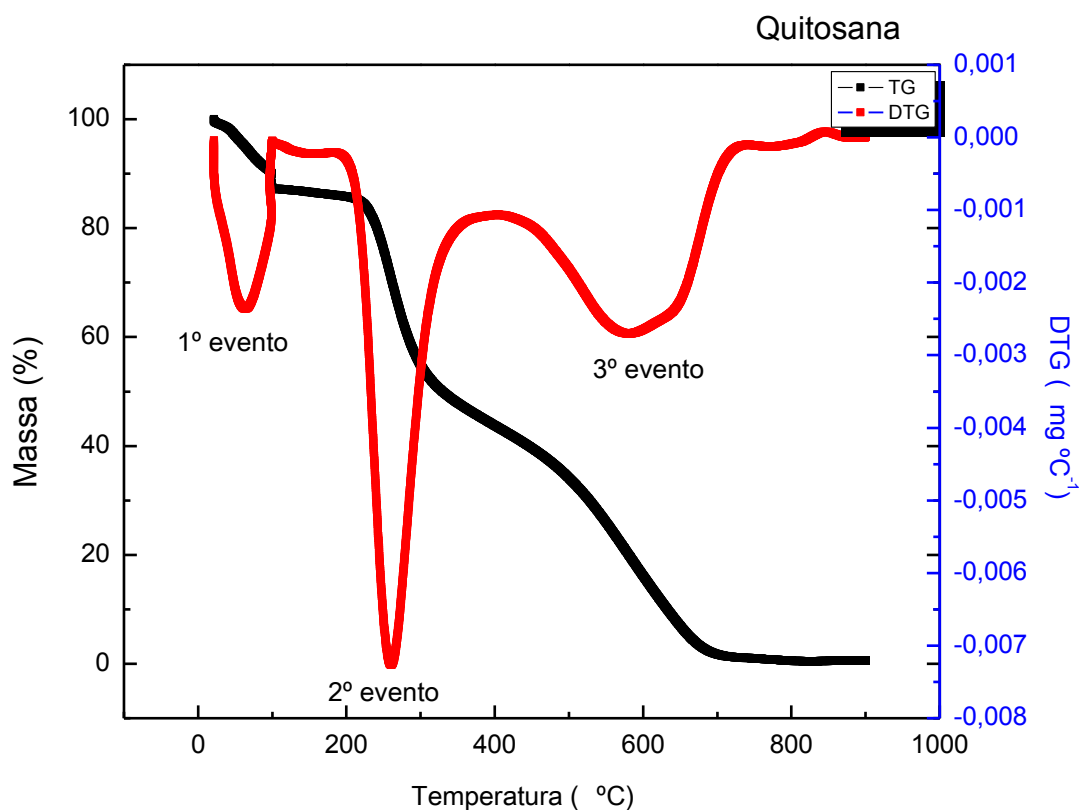


Figura 30- Curvas TG/DTG da amostra de quitosana sob atmosfera dinâmica de ar sintético (vazão de gás 20 mL/min), massa da amostra 8mg, suporte de amostra de platina.

As amostras foram analisadas em atmosfera de ar sintético e dividiram-se em três eventos. O primeiro, na faixa de 23° a 110°C, associado ao processo de desidratação. O segundo corresponde ao primeiro estágio de decomposição térmica do polímero, etapa em que a taxa de pirólise atinge valor máximo para o processo. O terceiro é resultante da decomposição oxidativa dos subprodutos da etapa anterior ⁽⁷³⁾ (Figura 30).

Tabela 8- Valores de temperatura de desidratação relacionada ao primeiro evento das amostras de quitina e quitosana

Amostra	\overline{GA}	Temperatura inicial*	Temperatura final *	Temperatura máxima de degradação*	Perda de massa (%)
Quitina	81,2	23	102	65	9
Quitosana	4,5	21	102	62	15

*Temperatura em °C

Tabela 9- Valores de temperatura de decomposição relacionada ao segundo evento das amostras de quitina e quitosana

Amostra	\overline{GA}	Temperatura inicial*	Temperatura final*	Temperatura máxima de degradação*	Perda de massa (%)
Quitina	81,2	208	419	342	59
Quitosana	4,5	172	397	261	41

*Temperatura em °C

Os teores de umidade das amostras de beta-quitina e quitosana foram determinados a partir do cálculo de perda de massa em relação à massa pesada inicialmente, num intervalo de temperatura de 20°C-105°C. Os teores de umidade retida e a capacidade do polímero de absorver água estão relacionados à cristalinidade e à hidrofilicidade das amostras: as mais cristalinas retém menos água que as amorfas, pois as regiões cristalinas limitam o acesso da água ou sua absorção.

A tabela 8 mostra a diferença nos valores de teor de umidade da quitina e da quitosana, sendo que a β -quitina teve uma perda de 9% e a quitosana, de 15%. A

retenção de água na β -quitina é menor, por apresentar cristalinidade maior, comparada à quitosana.

A estabilidade térmica está ligada à flexibilidade da cadeia, da seguinte forma: à medida que a temperatura aumenta, as moléculas adquirem energia suficiente para romper as ligações intermoleculares, ou seja, quanto mais flexíveis forem as cadeias do polímero, maior sua mobilidade translacional, facilitando o deslizamento de umas sobre as outras. O limite para degradação térmica situa-se no ponto em que as vibrações dos segmentos adquirem tal amplitude que rompem as ligações interatômicas. As cadeias rígidas resistirão a essas vibrações mais fortes, sendo necessárias temperaturas mais altas para que ocorra a degradação térmica⁽⁷⁴⁾.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 9, observa-se que a perda de massa na amostra de quitosana é menor que na β -quitina, no intervalo de 170-420 °C. Tal diferença pode estar relacionada à quantidade de unidades GlcNAc presentes nas cadeias poliméricas das amostras de quitina, β -quitina e quitosana. Assim, durante o segundo evento térmico, é possível ocorrer a decomposição das unidades acetiladas dos polímeros, o que justifica maior perda de massa no caso da β -quitina, ou seja, a perda de massa é maior na quitina, devido à maior quantidade de unidades GlcNAc⁽⁷⁵⁾.

Com base nos valores de temperaturas referentes ao segundo evento térmico, apresentados na Tabela 9, observou-se que a temperatura de degradação inicial é baixa. Nesse estágio, acontece a decomposição das unidades GlcNAc do polímero⁽⁷⁵⁾. A temperatura inicial é maior na amostra de β -quitina, ou seja, a amostra de β -quitina apresenta maior estabilidade térmica do que a amostra de quitosana, fato relacionado ao grau médio de acetilação e à maior cristalinidade das amostras de β -quitina.

Através das curvas de TG e DTG das amostras de quitosana e carboximetilquitosanas, pode-se observar que, no primeiro evento (20-110°C), a

amostra de quitosana perdeu 15% de massa, enquanto que as de CMQ, cerca de 16%, característica da desidratação das amostras. As amostras carboximetiladas absorvem maior quantidade de água, devido à presença dos grupos hidrofílicos (carboximetila), conforme Tabela 10.

Tabela 10- Valores de temperatura de desidratação térmica curva DTG e perda de massa curva TG das amostras de carboximetilquitosana

Amostra	\overline{GS}	Temperatura inicial *	Temperatura final *	Temperatura máxima de degradação*	Perda de massa (%)
CMQ-25	0,33	23,07	102,22	70	12,5
CMQ-5	0,36	23,07	102,22	68	15,5
CMQ-10	0,43	23,07	102,22	63	16,4
CMQ-8h	0,26	23,07	99,16	69	19,0
CMQ-17h	0,21	20	102,22	57	18,2

*Temperatura em °C

As curvas de TG e DTG (Figuras 31 e 32) mostraram que as amostras carboximetiladas apresentam valores de temperatura de degradação térmica diferente da quitosana de partida. Adicionalmente, observou-se que as carboximetilquitosanas são termicamente mais estáveis que a quitosana de partida, pois seu maior grau de decomposição ocorre em aproximadamente 290 °C. A decomposição da quitosana ocorre aos 261°C (Tabela 11). O maior grau de degradação da amostra de quitosana apresentou-se relativamente próximo ao das amostras de CMQ. Segundo Lamim⁽⁷⁶⁾, ocorrem dois picos de decomposição: em 239,4°C e em 305,9°C, para N,O-CMQ. Esses valores foram atribuídos à decomposição, envolvendo os grupos carboxílicos e as unidades glucosamina. Tirkistani⁽⁷⁷⁾ afirma que a menor estabilidade térmica dos

derivados carboximetilados, em relação à quitosana, deve-se à substituição que ocorre nos grupos hidroxílicos e amino.

Tabela 11- Valores de temperatura de decomposição térmica curva DTG e perda de massa curva TG das amostras de carboximetilquitosana

Amostra	\overline{GS}	Temperatura inicial*	Temperatura final*	Temperatura máxima de degradação*	Perda de massa (%) *
CMQ-25	0,33	184	407	294	36
CMQ-5	0,36	199	413	294	34
CMQ-10	0,43	208	420	294	33
CMQ-8h	0,26	205	367	285	29
CMQ-17h	0,21	204	340	291	29

*Temperatura em °C

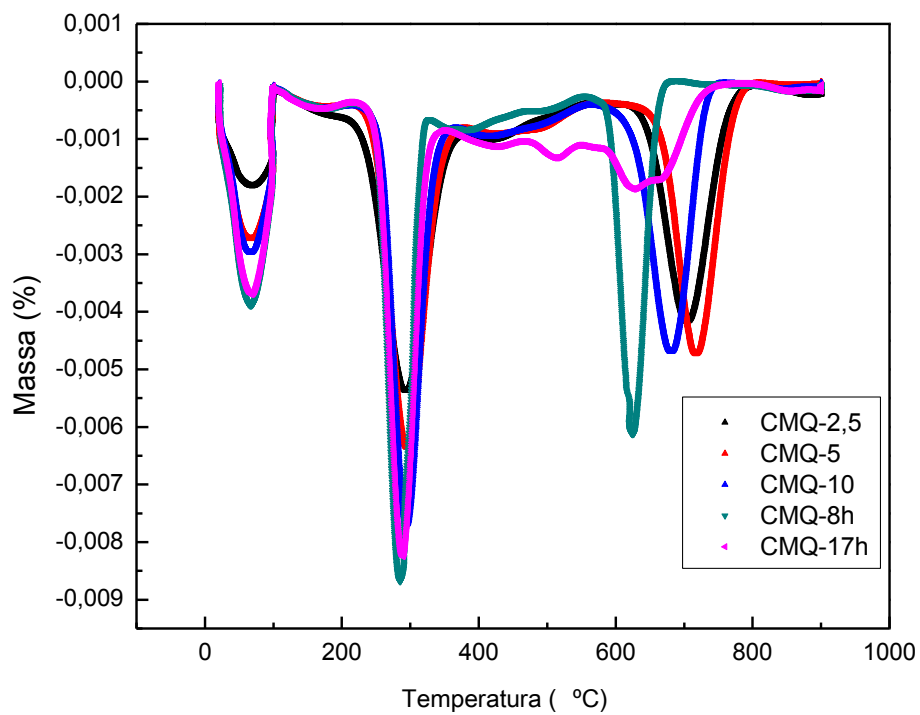


Figura 31- Curvas DTG das amostras de carboximetilquitosana sob atmosfera dinâmica de ar sintético (vazão de gás 20 ml/min), massa da amostra 8mg, suporte de amostra de platina.

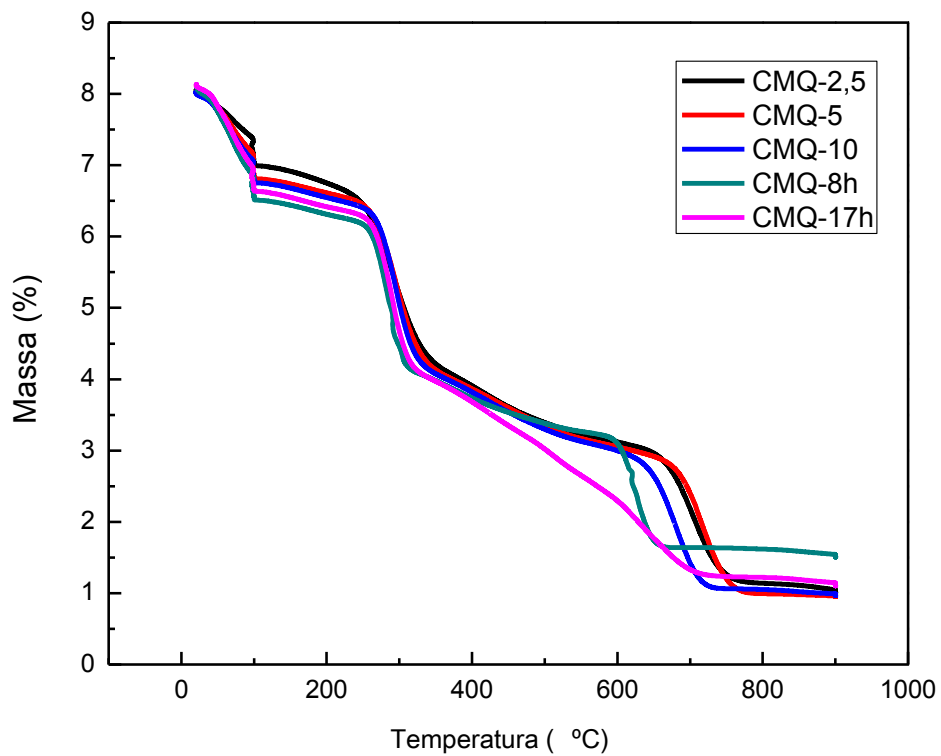


Figura 32- Curvas TG das amostras de carboximetilquitosana sob atmosfera dinâmica de ar sintético (vazão de gás 20 mL/min), massa da amostra 8mg, suporte de amostra de platina.

6.2.5 Solubilidade em diferentes pHs

A determinação de solubilidade da quitosana e de seus derivados carboximetilados em água, com pHs diferentes, foi baseada na turbidez de suas soluções, através das análises de U.V-vísivel. Os espectros apresentados nas Figuras 33 e 35 mostram que a transmitância aumenta em determinado pH, como consequência da presença de material particulado em suspensão. Observa-se que, a partir de 500cm^{-1} para a esquerda, a transmitância é aumentada para determinados valores de pH, ou seja, nas soluções que contêm particulados. As Figuras 34 e 36 mostram o comportamento das amostras de quitosana e CMQ-10, em diferentes faixas de pH. Essa avaliação é feita quando o comprimento de onda das amostras é de 300cm^{-1} . Observa-se que a quitosana, em meio ácido, apresenta-se solúvel, mas a carboximetilquitosana é insolúvel apenas no intervalo de pH de $3,5 < \text{pH} < 7,5$.

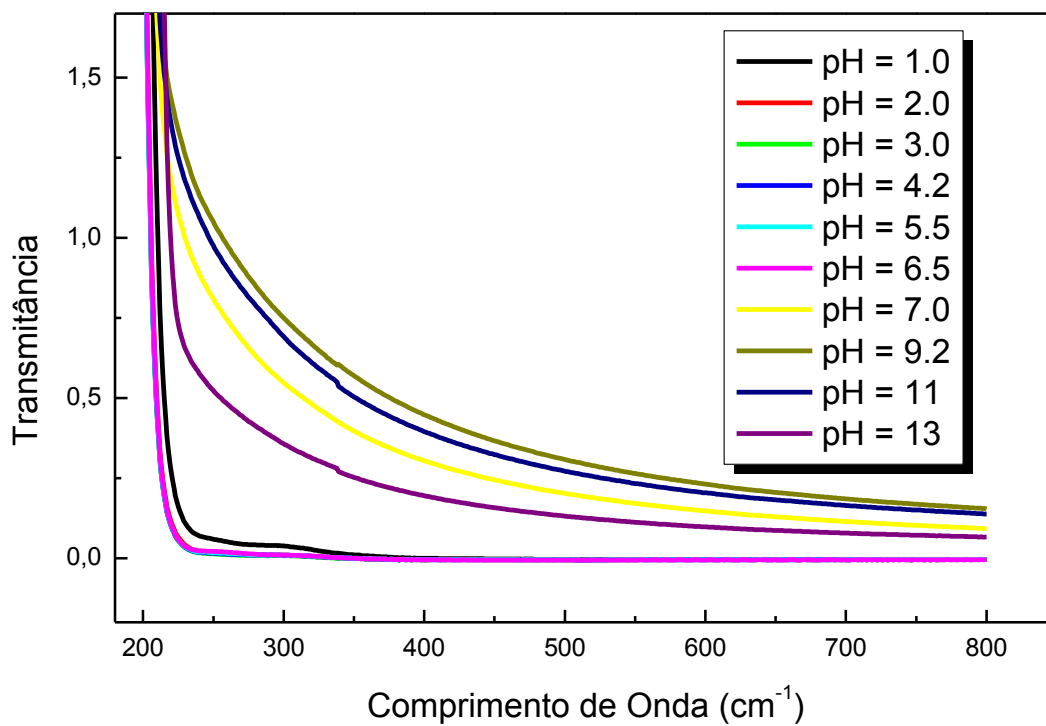


Figura 33- Gráfico de comprimento de onda versus transmitância para quitosana obtida através de U.V-visível.

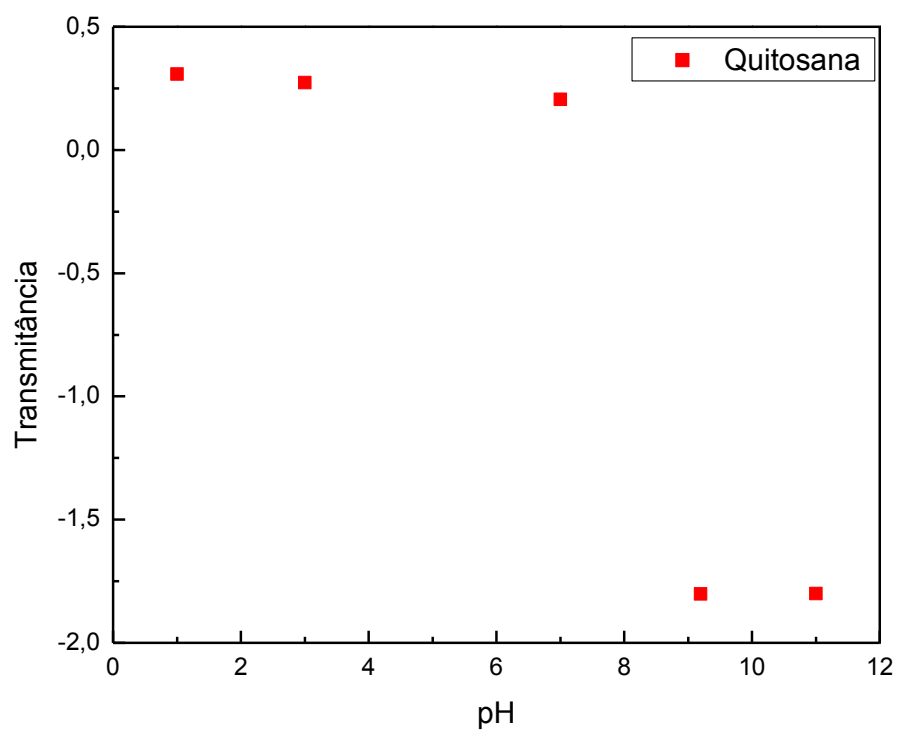


Figura 34- Gráfico do pH versus transmitância (comprimento de onda de 500 cm^{-1}) da amostra de quitosana.

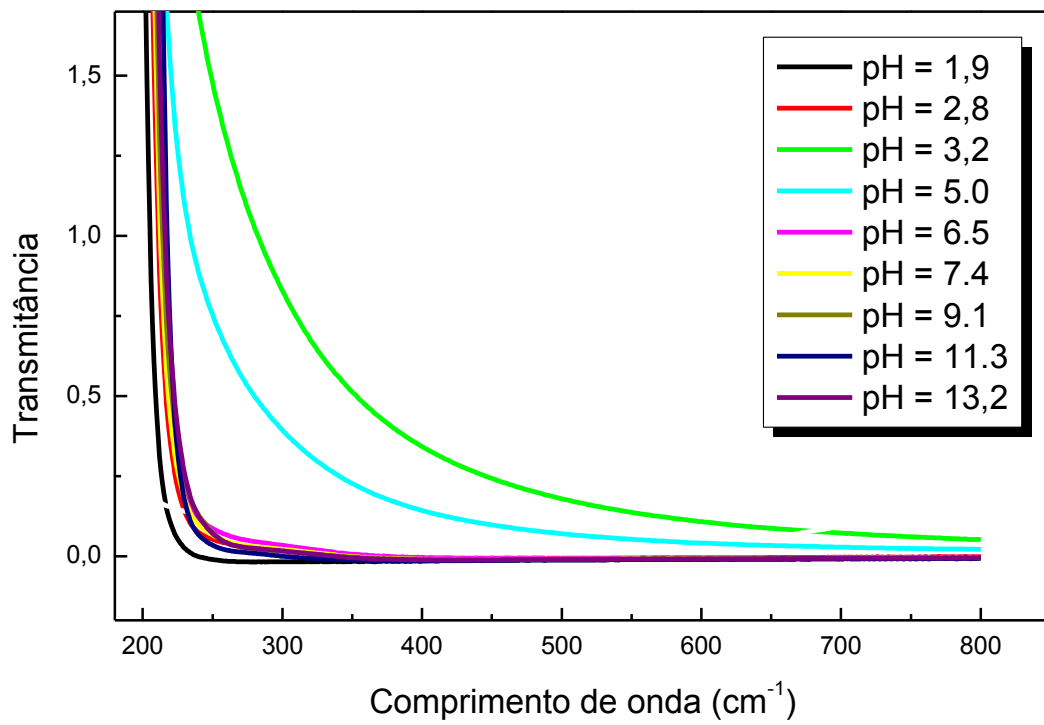


Figura 35- Gráfico de comprimento de onda versus transmitância para carbo ximetilquitosana (CMQ-10) obtida através de U.V-visível.

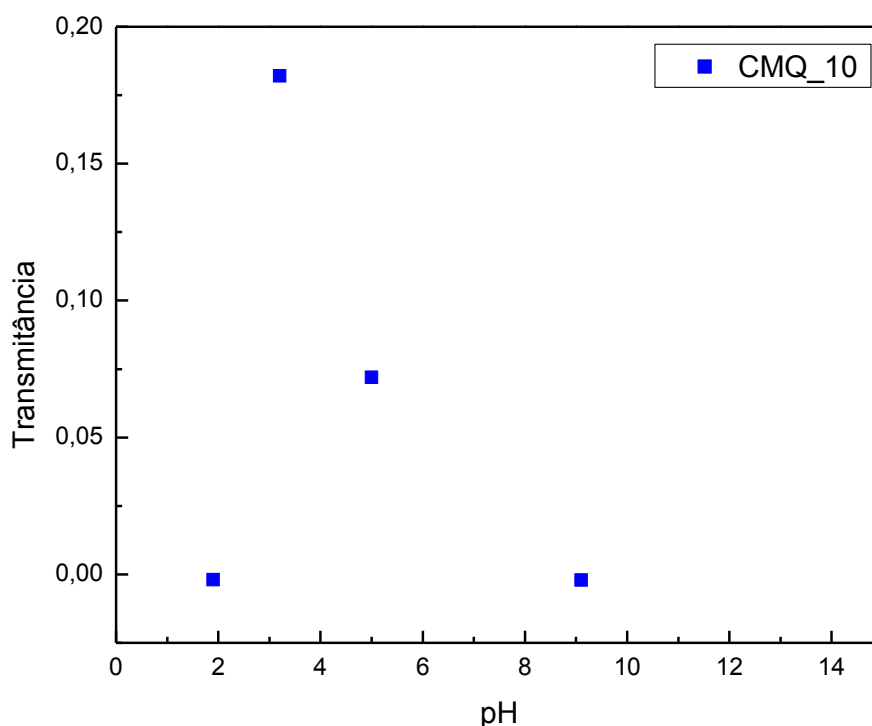


Figura 36- Gráfico do pH versus transmitância (comprimento de onda de 500 cm^{-1}) da amostra de carboximetilquitosana.

A solubilidade da quitosana e da carboximetilquitosana, em soluções aquosas com diferentes pHs, são mostradas na Tabela 12, onde os quadros pintados de preto mostram as amostras que foram solúveis e os quadros sem preenchimento, as amostras que foram consideradas insolúveis.

A quitosana foi solúvel até o $\text{pH} = 6,5$, conforme descrito na literatura⁽⁶²⁾. Já os derivados carboximetilados apresentaram-se solúveis em meios alcalinos ($\text{pH} > 8$) e em meios ácidos ($\text{pH} < 3$). Os derivados carboximetilados apresentaram \overline{GS} entre 0,21 e 0,43. Todos apresentaram grupos aminos e carboximetila, sendo, então, anfipróticos. As carboximetilas foram solúveis na mesma faixa de pH, pois seus valores de \overline{GS} são próximos. A solubilidade na região ácida deve ser atribuída à protonação dos grupos

amino ($-\text{NH}_2 \rightarrow -\text{NH}_3^+$) e à ionização do grupo carboximetila ($-\text{COOH} \rightarrow -\text{COO}^-$), responsável pela solubilidade na região alcalina⁽²⁾.

A diferença de solubilidade encontrada entre a quitosana e a carboximetilquitosana é devido à presença dos grupos carboximetila, responsáveis pela solubilidade em meio alcalino, ou seja, quanto maior a quantidade de COOH, maior a solubilidade das amostras de carboximetilquitosana, fato observado por Abreu *et al*⁽²⁾.

Tabela 12- Solubilidade de quitosana e carboximetilquitosana em soluções aquosas de vários pH

Amostra	GS	Solubilidade (pH)												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	13	
Quitosana		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
CMQ-2,5		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
CMQ-5		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
CMQ-10		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
CMQ-8h		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
CMQ-17h		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

6.2.6 Massa Molar Viscosimétrica Média

Uma das propriedades mais importantes das soluções poliméricas diluídas é a viscosidade intrínseca $[\eta]$, que depende da massa molecular, do intumescimento no solvente considerado e também da forma e rigidez da macromolécula^(41, 74). Polímeros que apresentam massa molar elevada possuem volume hidrodinâmico maior em sistemas diluídos, ou seja, maior viscosidade intrínseca.

A massa molar média viscosimétrica das amostras de quitina, quitosana e carboximetilquitosana foi determinada a partir dos valores de viscosidade intrínseca, fazendo uso da equação Mark-Houwink (equação 6). Na Tabela 13 são apresentados os valores de viscosidade intrínseca $[\eta]$, massa molar média viscosimétrica (\overline{M}_v) e graus médios de polimerização (GPv) e de carboximetilação (GS) das amostras de quitina, quitosana e carboximetilquitosana. As Figuras 41 e 42 mostram as curvas de viscosidade reduzida versus concentração das amostras de quitosana e CMQ-10.

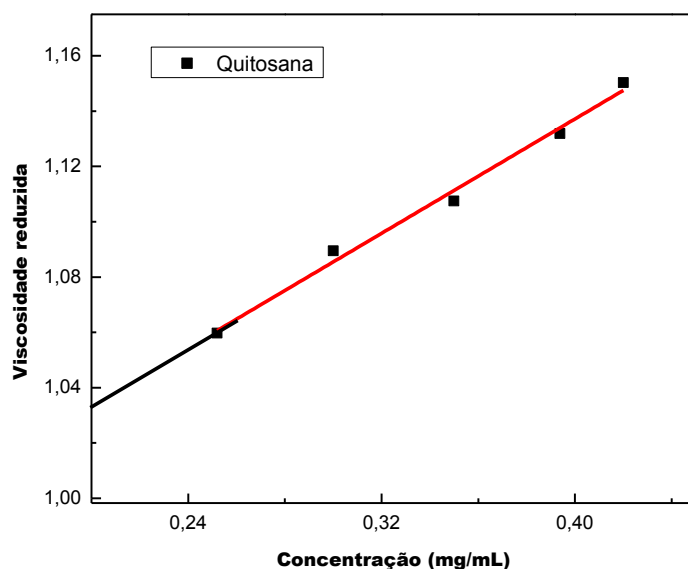


Figura 37- Curva da viscosidade reduzida em função da concentração da amostra quitosana.

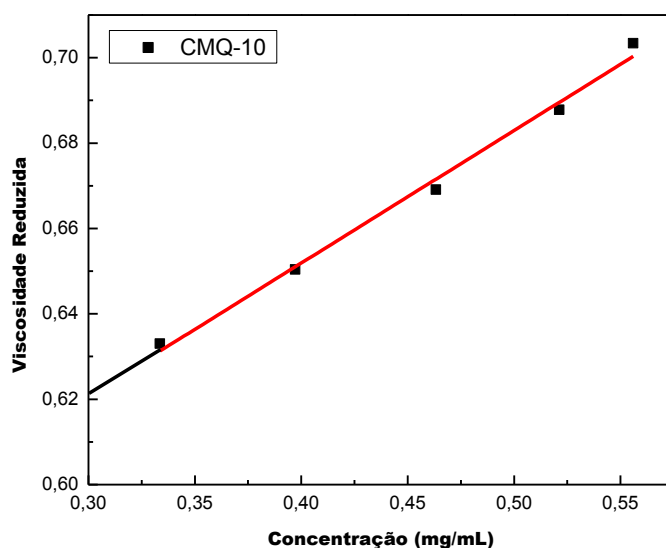


Figura 38- Curva da viscosidade reduzida em função da concentração da amostra CMQ-10.

Foi observado que os valores de viscosidade intrínseca e de massa molar viscosimétrica média da quitina são maiores que os da quitosana de partida. Esta diferença é explicada principalmente pela despolimerização decorrente da irradiação da suspensão alcalina de beta-quitina com ultrassom de alta intensidade, durante a aplicação do Processo DAIUS, visando a produção de quitosana. De fato, esse efeito já foi descrito. Considerando a execução consecutiva do Processo DAIUS, por três vezes visando a preparação da quitosana extensivamente desacetilada, a despolimerização resultou em queda acentuada ($\approx 79\%$) do grau médio de polimerização^(38, 78, 79).

Nas amostras de CMQ, foi observado que os valores de viscosidade intrínseca e massa molar viscosimétrica média são menores que os da quitosana de partida (Tabela 13).

No comportamento viscosimétrico de polieletrólitos, tal como a CMQ, espera-se que em solução os grupos $\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+$ se dissociem, gerando cargas nas cadeias e

interações de longa distância, do tipo eletrostáticas. Nesse caso, os contra-íons se distanciam e as cargas localizadas no macro-íon provocam a expansão da cadeia polimérica, resultando no aumento da viscosidade⁽⁴¹⁾.

Apesar de as interações intercadeias, das ligações hidrogênio e da repulsão eletrostática contribuírem para o aumento da massa molar viscosimétrica média, o que prevalece é a despolimerização da cadeia polimérica, provocada pelo álcali presente no meio reacional em que as amostras de CMQ são preparadas. Sendo assim, os valores de massa molar média viscosimétrica e viscosidade intrínseca são menores nas amostras de CMQ.

Para as amostras CMQ-4h, CMQ-8h e CMQ-17h, o mesmo efeito é observado. O tempo de reação, porém, também afeta o valor da viscosidade intrínseca, pois, quanto maior o tempo de reação, maior será a despolimerização das cadeias, como pode ser observado na Tabela 13.

Tabela 13- Valores de viscosidade intrínseca e massa molar média viscosimétrica das amostras de quitina, quitosana e carboximetilquitosana

Amostras	$[\eta]$ (mL/mg)^(a)	\overline{M}_v (mg/mol)^(b)	Coefficiente de correlação	\overline{GP}_v	\overline{GS}
Beta-quitina	3,9651	$1,28 \cdot 10^6$	0,9986	6564	-
Quitosana	0,9304	$2,30 \cdot 10^5$	0,9884	1420	-
CMQ-2,5, CMQ-4h	0,8558	$1,080 \cdot 10^5$	0,9941	461	0,33
CMQ-5	0,8054	$1,016 \cdot 10^5$	0,9989	421	0,36
CMQ-10	0,5276	$6,661 \cdot 10^4$	0,9908	260	0,43
CMQ-8h	0,7206	$9,098 \cdot 10^4$	0,9984	415	0,26
CMQ-17h	0,7017	$8,859 \cdot 10^4$	0,9824	425	0,21

(a) Determinado por viscosimetria capilar.

(b) Determinado através da equação de Mark-Houwink, onde as constantes K e α estão descritas na literatura^(60,80).

7 Conclusões

O predomínio de O-carboximetilação de quitosana, nas condições reacionais empregadas, foi constatado. Observou-se também a ocorrência de N-carboximetilação, em baixa extensão. Os graus médios de carboximetilação das amostras de carboximetilquitosana variaram conforme as condições reacionais, no intervalo $20 < GS < 45$, sendo a razão molar quitosana/ácido monocloroacético um fator mais importante do que o tempo de reação. As amostras de carboximetilquitosana adotaram arranjos menos ordenados no estado sólido e também foram termicamente menos estáveis em comparação à quitosana de partida. A reação de carboximetilação de quitosana também resultou em despolimerização, conforme constatado através de medidas de viscosidade, provavelmente por hidrólise alcalina das ligações glicosídicas. As amostras de carboximetilquitosana apresentaram solubilidade em meio ácido ($pH < 3,0$), neutro ($pH \approx 7,5$) e alcalino ($pH > 8,0$), devido à ocorrência de cargas ao longo de suas cadeias nesses meios, mas foram insolúveis no intervalo $3,5 < pH < 7,5$.

8 Referencias Bibliográficas

1. CAMPANA-FILHO, S.P.; BATTISTI, M. V. . Obtenção e caracterização de α -quitina e quitosanas de cascas de *Macrobrachium rosenbergii* **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2014-2019, 2008.
2. ABREU, F.R. **Estudos de obtenção e caracterização de esferas entrecruzadas de carboximetilquitosana**. 2006. 182 f. Tese(Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais)- Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais São Carlos: Universidade de São Paulo-São Carlos 2006.
3. DUNG, P.I; MILAS, M.; RINAUDO, M.; DESBRIÈRES, J. Water soluble derivatives obtained by controlled chemical modifications of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 24, n. 3, p. 209-214, 1994.
4. HARISH PRASHANTH, K.V.; THARANATHAN, R.N.. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential--an overview. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 3, p. 117-131, 2007.
5. WANG, J.; JIN, X.; CHANG, D. Chemical modification of chitosan under high-intensity ultrasound and properties of chitosan derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 1, p. 175-177, 2009.
6. DUNG PHAN LE, M., M., M. RINAUDO, and J. DESBRIÈRES. Water soluble derivaties obtained by controlled chemical modifications of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v 24, n 3, p. 209-214, 1994.
7. CHEN, L.; YUMIN, D., ZENG, X. Relationship between the molecular t structure and moisture-absortion and moisture-retention abilities of carboxymethyl chitosan. II. Effect of degree de deacetylation an carboxymethylation. **Carbohydrate Research**, v 338, n 4, p. 333-340, 2003.
8. ABREU, F.R. **Estudos de obtenção e caracterização de esferas entrecruzadas de carboximetilquitosana**. 2006. 182 f. Tese(Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais)- Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais São Carlos: Universidade de São Paulo-São Carlos 2006.
9. XI-GUANG, C. and P. HYUN-JIN. Chemical characteristics of O-carboxymethyl chitosans related to the preparation conditions. **Carboydrate Polymers**, v. 53, p. 355-359 , 2003.

10. ABREU, F.R. **Estudos de obtenção e caracterização de esferas entrecruzadas de carboximetilquitosana**. 2006. 182 f. Tese (Doutorado em Ciências e Engenharia de Materiais) - Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Estadual de São Paulo, São Carlos, 2006.
11. SHAHIDI, F.; ARACHCHI J.K.V.; JEON, Y.J. Food applications of chitin and chitosans. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 2, p. 37-51, 1999.
12. ROBERTS, G.A.F. **Chitin chemistry**. London: Macmillan, v. único. 1992. 350 p.
13. CAMPANA-FILHO, S.P.; SIGNINI, R.. Efeitos de Aditivos na Desacetilação de Quitina. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, p.169-173, 2001.
14. CAMPANA-FILHO, S.P.; CURTI, E. D.B.; ABREU, F.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R.; LAVALL ,R. L. Extração , Estrutura e Propriedades de α - e β -quitina. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 644-650, 2007.
15. RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006.
16. PILLAI, C.K.S.; PAUL,W.; SHARMA, C.P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science**, v. 34, n. 7, p. 641-678, 2009.
17. CAMPANA-FILHO, S.P., et al. EXTRAÇÃO, ESTRUTURAS E PROPRIEDADES DE α - E β -QUITINA. **Química Nova**. 30: 644-650 p, 2007.
18. LAVAL, R.L. **Estudos de Obtenção, Desacetilação e Caracterização Físico-Química de β -Quitina dos Gládios de Lulas do Gênero loligo**. 2003. 151 f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) - Departamento de Instituto de Química de São Carlos, Universidade Estadual de São Paulo, São Carlos, 2003.
19. TOLAIMATE, A.; DESBRIÈRES, J.; RHAZI, M.; ALAGUI, A.; VINCENDON, M.; VOTTERO, P. On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin. **Polymer**, v. 41, n. 7, p. 2463-2469, 2000.
20. RAVI KUMAR, M.N.V. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.

21. KURITA, K.; TOMITA, K.; TODA, T.; ISHII, S.; NISHIMURA, S.; SHIMODA, K. Squid chitin as a potential alternative chitin source: Deacetylation behavior and characteristic properties. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 485-491, 1993.
22. SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S.P. On the preparation and characterization of chitosan hydrochloride. **Polymer Bulletin**, v. 42, n. 2, p. 159-166, 1999.
23. DELEZUK, J.A.M. **Desacetilação de beta-quitina assistida por ultrassom de alta intensidade: Estudo dos efeitos da amplitude e do tempo de irradiação e da temperatura de reação**. 2009. 97 f. Dissertação (Mestre em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.
24. SANTOS, J.E.; SOARES, J.P.; DOCKAL, R.E.. Caracterização de Quitosanas Comerciais de Diferentes Origens. **Polímeros -Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.
25. AIBA, S.I. Studies on chitosan: 2. Solution stability and reactivity of partially N-acetylated chitosan derivatives in aqueous media. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 11, n. 4, p. 249-252, 1989.
26. LAVALL, R.L. **Estudos de obtenção, desacetilação e caracterização físico-química de beta quitina dos gládios de lulas do gênero loligo**. 2003. 151 F. Dissertação(mestrado em Físico-Química) - Departamento de Instituto de Química de São Carlos, Universidades de São Paulo, São Carlos,, 2003.
27. VACHOUD, L.; ZYDOWICZ ,N.; DOMARD, A. Formation and characterization of a physical chitin gel. **Carbohydrate Research**, V. 302, p. 169-177 , 1997.
28. HÉLIO, S. R.; COSTA SILVA*, K. S. C. R.; SANTOS , E .I . F. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785. 2006.
29. AZEVEDO, V.V.C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; FOOK-LIA, M. V.. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, V. 2.3, p. 27-34 , 2007.
30. MATHUR, N. K. Chitin and chitosan, veratile polysaccharides from marine animals. **J.Chem. Educ**, v. 67, p. 11 , 1990.

31. MARCOS.V.B. and S.P. CAMPANA-FILHO. Obtenção e caracterização de alfa quitina e quitosana de casca de *Macrobrachium rosenbergii*. **Química Nova**. 31: 2014-2019 p, 2008.
32. CARDOSO, M. B.; SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S. P. On the Sonication of Chitin: Effects on its Structure and Morphology and Influence on its Deacetylation. **Polymer Bulletin**, v. 47, p. 183-190 , 2001.
33. GOYCOOLEA, F.M.. Preparation of Chitosan from Squid (*Loligo* spp.) Pen by Microwave-Accelerated Thermochemical Process. **Advances in Chitin Science**. Lyon: Jacques Andre Publisher, v. 2, p. 78-83, 1998.
34. DELEZUK, J.A.D.M. **Desacetilação de beta-quitina assistida por ultrassom de alta intensidade: estudo dos efeitos da amplitude e do tempo de irradiação e da temperatura da reação**. 2009, 97 f. Dissertação (mestrado em Físico-Química)- Departamento do Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.
35. AL-SAGHEER, F. A.; AL-SUGHAVER, M. A.; MUSLIM, S.. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. **Carbohydrate Polymer**, v. 77, p. 410-419 , 2009.
36. TAHTAT, D.; UZUN, C.; MAHLOUS, M.; GUVEN, O. Beneficial effect of gama irradiation on the N-deacetylation of chitin to form chitosan. **Bean Interactions with Materials & Atoms**, 256, n. 1, p. 425-428 , 2007.
37. Lamarque, G.; CRETENET, M.; CRISTOPHE, V.; DOMARD, A. New Route of Deacetylation of α - and β -Chitins by Means of Freez Pump Out Thaw Cycles. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 3, p. 1380-1388, 2005.
38. DELEZUK, J.A., et al. Ultrasound-assisted deacetylation of beta-chitin: influence of processing parameters. **Polymer International**, p.n/a-n/a. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1002/pi.3037>>.
39. KURITA, K. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. **Progress in Polymer Science**, v. 26, n. 9, p. 1921-1971, 2001.
40. PETER, M.G. Applications and Environmental Aspects of Chitin and Chitosan. **Journal os Macromolecular Science-Pure & Applied Chemistry**, v. 32A, p. 629-640, 1995.
41. MILAS, M. **Polieletrólitos**. São carlos: Instituto de Física e Química de São Carlos, v. único. 1991

42. ABREU, F.R.e.a. Polyelectrolyte Derivatives of Chitosan: Preparation and characterization of N,N,N- trimethylchitosan and N,O-carboxymethylchitosan. **Current Research and Developments on Chitin and Chitosan in Biomaterials Science**, v. 2, 2009. p. 107-121.
43. BAUMANN, H.F. V. Concepts for improved regioselective placement of O-sulfo, N-sulfo, N-acetyl and N-carboxymethyl groups in chitosan derivatives. **Carbohydrate Research**, v. 331, n. 1, p. 43-57, 2001.
44. SOLOMONS, T.W.F., C. B. **Química Orgânica 2**. Rio de Janeiro: LTC, v. 2006
45. CHEN, X.-G.; PARK , H.-J. Chemical characteristics of O-carboxymethyl chitosans related to the preparation conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, n. 4, p. 355-359, 2003.
46. Muzzarelli, R.A.A.; Ilari P.; Petrarulo, M. Solubility and structure of N-carboxymethylchitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 16, n. 4, p. 177-180, 1994.
47. ZHU, A.L., J.; YE,W. Effective loading controlled release of camptecin by O-carboxymethylchitosan aggregate. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, n. 1, p. 89-96, 2006.
48. Aiping, Z.; Jianhong, L.; Wenhui, Y. Effective loading and controlled release of camptothecin by O-carboxymethylchitosan aggregates. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, n. 1, p. 89-96, 2006.
49. RAMESH, H. P. V.; THA, S. Safety evaluation of formulations containing carboxymethyl derivatives of starch and chitosan in albino rats. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, n. 4, p. 435-441, 2004.
50. ZHAO, A.Y.; KANG, P.C.; YUANG, X.; CHANG, J.; PU, P. Synthesis and characterization of tat-mediated O-CMQ magnetic nanoparticles having anticancer function. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 295, n., p. 37-43, 2005.
51. ANITHA, A.; DIVYA, V. V.; KRISHNA, R.; SREEIA, V.; SELVAMURUGAN, N.; NAIR, S.V.; TAMURA, H.; JAYAKUMA, R. . Synthesis, characterization, cytotoxicity and antibacterial studies of chitosan, O-carboxymethyl and N,O- carboxymethyl chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v.78, n. 4, p. 672-677, 2009.

52. LIU, X. F.; GUAN, Y. L.; YANG, D. Z.; LI, Z.; YAO, K. Antibacterial Action of Chitosan and Carboxymethylated Chitosan. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 79, n.7, p. 1324-1335, 2001.
53. KRAUSE, T.J.Z.; MALATESTA G.; SOLINA, A. Prevention of pericardial adhesions with N-O carboxymethylchitosan in the rabbit model. **Journal of Investigative Surgery**, v. 14, p. 93-97, 2001.
54. LOPES, J. B.; DALAN, L.A.; MOREIRA, L.F.; CAMPANA FILHO, S.P.; GUTIERREZ, P. S.; LISBOA, L. A.; OLIVEIRA, S. A.; STOLF, N. A. Synergism Between Keratinocyte Growth Factor and Carboxymethyl Chitosan Reduces Pericardial Adhesions. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 90, n. 2, p. 566-572, 2010.
55. DAROZ, L.R.D.; LOPES, J. B.; DALAN, L.A.; MOREIRA, L.F.; CAMPANA FILHO, S.P.; GUTIERREZ, P. S.; LISBOA, L. A.; OLIVEIRA, S. A.; STOLF, N. A, et al. Prevenção de Aderências Pericárdicas Pós-operatórias. **Revista Brasileira de Cirurgias Cardiovasculares**, v. 23, p. 480-487, 2008.
56. Focher, B., et al. **Carbohydr. Polym.**, v. 17, n. null, p. 97, 1992.
57. HIRAI, H.; A. ODANI, H.; NAKAJIMA, A. Determination of degree of deacetylation of chitosan by ¹H NMR spectroscopy. **Polymer Bulletin**, v. 26, n., p. 87-94, 1991.
58. HUGGINS, M.L. Theory of Solutions of High Polymers¹. **Journal of the American Chemical Society**, v. 64, n. 7, p. 1712-1719, 1942.
59. RINAUDO, M.; MILAS, M.; DUNG, P.L. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 15, n. 5, p. 281-285, 1993.
60. GE, H.C.; LUO, D. K.. Preparation of carboxymethyl chitosan in aqueous solution under microwave irradiation. **Carbohydrate research**, v. 340, n. 7, p. 1351-1356, 2005.
61. HUANG, L. Radiation-induced degradation of carboxymethylated chitosan in aqueous solution. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, n. 3, p. 305-312, 2007.
62. Sashiwa, H.; Shigemasa, Y. Chemical modification of chitin and chitosan 2: preparation and water soluble property of N-acylated or N-alkylated partially deacetylated chitins. **Carbohydrate Polymers**, v. 39, n. 2, p. 127-138, 1999.

63. RAGNHILD, J.H., N.; VARUM, K. M.; GRASDALEN, H.; TOKURA, S. e SMIDSROD, O. Chemical composition of O-(carboxymethyl)-chitins in relation to lysozyme degradation rates. **Carbohydr. Polym.**, v. 34, n., p. 131-139, 1997.
64. CARDOSO, M.B. **Contribuição ao estudo da reação de desacetilação de quitina: Estudos da desacetilação assistida por ultra-som de alta potência.** 2008. 95 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
65. LIU, X. F.; GUAN, Y. L.; YANG, D. Z.; LI, Z.; YAO, K. Antibacterial Action of Chitosan and Carboxymethylated Chitosan. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 79, n.7, p. 1324-1335, 2001.
66. NAHALKA, J.; NAHÁLKOVÁ, J.; GEMEINER, P.; BLANÁRIK, P. Elicitation of plumbagin by chitin and its release into the medium in *Drosophyllum lusitanicum* Link. suspension cultures. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 9, p. 841-845, 1998.
67. CHEN, L.; DU, Y.; ZENG, X. Relationships between the molecular structure and moisture-absorption and moisture-retention abilities of carboxymethyl chitosan: II. Effect of degree of deacetylation and carboxymethylation. **CARBOHYDRATE RESEARCH**, v. 338, n. 4, p. 333-340, 2003.
68. CANEVAROLO, S.V. **Ciências dos polímeros: um texto básico tecnólogos e engenheiros.** São Paulo: Artliber, v. único. 2002
69. AKCELRUD, L. **Fundamentos da ciência dos polímeros.** Barueri-SP: Manole, v. único. 2007. 288 p.
70. CARDOSO, M.B.; SIGNINI, R.; CAMPANA-FILHO, S.P. On the sonication of chitin: effects on its structure and morphology and influence on its deacetylation. **Polymer Bulletin**, v. 47, n. 2, p. 183-190, 2001.
71. CARDOSO, M.B. **Contribuição ao estudo da reação de desacetilação de quitina: Estudos da desacetilação assistida por ultra-som de alta potência.** 2008. 96 f. Tese (Doutorado em Físico-Química) - Departamento de Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
72. KJARTANSSON, G.T.; ZIVANOVIC, S.; KRISTBERGSSON, K.; WEISS, J. Sonication-Assisted Extraction of Chitin from Shells of Fresh Water Prawns (*Macrobrachium rosenbergii*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 9, p. 3317-3323, 2006.

73. HOLME, H.K.F.; PETTERSEN, H. Thermal depolymerization of chitosan chloride. **Carbohydr. Polym.**, v. 46, n. 3, p. 287-294, 2001.
 74. ACKCELROD, L. **Fundamentos da Ciência dos Polímeros**. São Paulo: Manole, v. único. 2007. 288 p.
 75. CAMPANA FILHO, S.P.; CAVALHEIRO, E.T.G.; SANTOS, J.E.; SOARES, J.P.; DOCKAL, E.R. . Caracterização de Quitosanas Comerciais de Diferentes Origens. **Polímeros: Ciências e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.
 76. LAMIM, R; FREITAS, R. A.; RUDEK, E. I.; WILHELM, H.M.; CAVALCANTI, O. A.; BRESOLIN, T. M. B. Films of chitosan and N-carboxymethylchitosan. Part II: effect of plasticizers on their physiochemical properties. **Polymer International**, v. 55, n. 8, p. 970-977, 2006.
 77. TIRKISTANI, F.A.A. Thermal analysis of some chitosan Schiff bases. **Polymer Degradation and Stability**, v. 60, n. 1, p. 67-70, 1998.
 78. CARDOSO, M.B.; CAMPANA-FILHO, S. P. On the sonication of chitin: effects on its structure and morphology and influence on its deacetylation. **Polymer Bulletin**, v. 47, n. 2, p. 183-190, 2001.
 79. POPA-NITA, S.; LUCAS, J. M.; LADAVIE, C. DAVID, L.; DOMARD, A . Mechanisms Involved During the Ultrasonically Induced Depolymerization of Chitosan: Characterization and Control. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 5, p. 1203-1211, 2009.
 80. RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006.
-