UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Estudos físico-químicos de N-acetilação de quitosanas em meio homogêneo

Sara Cristina Pereira Veiga

São Carlos
2011

Sara Cristina Pereira Veiga

Estudos físico-químicos de N-acetilação de quitosanas em meio homogêneo

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

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

São Carlos, 24 / 10 / 2011

Nome e Assinatura do Autor Sara Cristiana Pereira Veiga

Sara Cristiana Pereira Veiga

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.

Dedico este trabalho a minha Família em especial a minha mãe, Divina, pelo apoio incondicional na minha formação acadêmica, ao meu namorado e amor da minha vida, Guilherme, pelo incentivo, por todo o carinho e amor e por estar sempre ao meu lado. Aos meus grandes amigos Alessandro, Carolinne, Daniella e Fabyana por acreditarem e me apoiarem sempre.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana Filho pela orientação, dedicação e por ter confiado na minha capacidade de trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa concedida.

Ao Instituto de Química de São Carlos, pela infra-instrutora oferecida para a realização deste trabalho.

Aos membros do Serviço de Pós-Graduação Andreia Cristina Cardozo de Moraes, Maria Silvia de Guzzi Plepis e Gustavo Moraes da Costa pela gentileza no atendimento e pela competência e disponibilidade de cuidar dos meus assuntos acadêmicos.

Ao aluno de doutorado Jorge Augusto de Moura Delezuk, pelas críticas construtivas e pelo auxílio durante o trabalho.

Aos colegas do Grupo de Físico-Química Orgânica: Adriana, Anderson, Bruna, Daniella, Érika, Tonimar, Virgínia e Willian, pela ajuda no laboratório, pelo companheirismo e pelos momentos de descontração.

Aos colegas do Grupo de Materiais Macromoleculares e Fibras Lignocelulosicas, Bianca, Cristina, Elaine, Daniele, Raquel, Talita, Bruno e Fernando, por compartilharem os materiais de trabalho e os momentos de descontração, pelas discussões e pelo companheirismo.

Aos Técnicos: Sylvana, Thiago, Luiz Antônio, Márcio, Augusto, Vinícius pelas análises realizadas, pela ajuda nas análises dos dados e pelo incentivo.

Aos colegas de pós-graduação em especial a Turma de Termodinâmica Química Avançada (2009) pela ajuda direta ou indireta na realização deste trabalho e pelos momentos alegres.

Aos meus colegas Carla, Daniella, Fabyana, Lukese, Kariny, Virgínia, Francielle, Eliene, Guedmiller pela compreensão, amizade e convivência.

RESUMO

As principais propriedades físico-químicas da quitosana dependem da massa molar média, grau médio de acetilação ($\overline{GA}$) e do parâmetro de acetilação (PA) que expressa o padrão de distribuição das unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranosose (GlcNAc) e 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosose (GlcN) ao longo de suas cadeias. A distribuição alternada, randômica ou em blocos das unidades GlcN e GlcNAc ao longo das cadeias poliméricas está diretamente relacionada com as condições de preparação da quitosana, sendo que as reações executadas em condições homogêneas geram quitosanas em cujas cadeias há o predomínio da distribuição randômica, enquanto que nas quitosanas produzidas em condições heterogêneas a distribuição em blocos predomina. Neste trabalho β -quitina extraída de gládios de lulas (*Loligo* sp) foi submetida a 3 etapas consecutivas do processo de desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade (processo DAIUS), resultando em quitosana extensivamente desacetilada ($\overline{GA} \approx 2\%$) e de elevada massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v \approx 354000$ g/mol) comparada a quitosanas obtidas por outros métodos. Essa amostra, denominada amostra QSo, foi dissolvida em ácido acético aquoso e então submetida à reação de N-acetilação por 24 h à temperatura ambiente. A ocorrência de O-acetilação foi evitada pela adição de 1,2-propanodiol ao meio reacional e a variação da razão molar anidrido acético/grupos amino permitiu a obtenção de cinco amostras de quitosanas N-acetiladas, as quais foram caracterizadas por espectroscopia de RMN ^1H , espectroscopia na região do infravermelho, difração de raios X, viscosimetria capilar, microscopia eletrônica de varredura e análise termogravimétrica. O parâmetro de acetilação (PA) das quitosanas N-acetiladas foi determinado a partir dos espectros de RMN ^1H de modo a permitir a avaliação do tipo de distribuição de unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranosose (GlcNAc) e 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosose (GlcN) predominante nos produtos. As reações de N-acetilação foram executadas em duplicata gerando as amostras dos conjuntos 1 e 2, as quais

apresentaram $\overline{GA}$ variando no intervalo $25\% < \overline{GA} < 55\%$, sendo constatada variação linear de $\overline{GA}$ com a razão molar anidrido acético/grupos amino. As quitosanas N-acetiladas apresentaram parâmetro de acetilação variando com $0,9 < PA < 1,5$, indicando o predomínio da distribuição randômica das unidades GlcNAc e GlcN. As quitosanas N-acetiladas apresentaram maior estabilidade térmica em comparação com a quitosana de partida (amostra QSo), devido a porcentagem de unidades GlcNAc nas cadeias dos polímeros que provocaram alterações na sua estrutura cristalina. Os ângulos de Bragg característicos de β -quitina (amostra QTo) extraída de gládios de lulas foram identificados nos difratogramas das quitosanas N-acetiladas com $30\% < \overline{GA} < 55\%$, o que sugere que essas amostras adquiriram características semelhantes a da β -quitina. Outra evidência desse fato foi comprovada através da análise das micrografias das amostras de quitosana N-acetiladas, que revelaram que as características das superfícies das partículas das amostras mais acetiladas são semelhantes a da β -quitina.

Palavras Chaves: gládios de lulas, β -quitina, quitosana, N-acetilação, parâmetro de acetilação, homogênea.

ABSTRACT

The main physicochemical properties of chitosan rely on its average molar mass, average degree of acetylation ($\overline{GA}$) and the parameter of acetylation (PA), which expresses the distribution pattern of 2-deoxy-2-acetamido-D-glucopyranose (GlcNAc) and 2-deoxy-2-amino-D-glucopyranose (GlcN) units along its chains. The occurrence of alternated, random or block-like distribution of GlcN and GlcNAc along the polymer chains is directly related to preparation conditions of chitosan. When homogeneous conditions are applied chitosan chains exhibiting random distribution are produced, while the chitosan generated from heterogeneous reactions presents block-like distribution. In this work, β -chitin extracted from squid pens (*Loligo sp.*) was submitted to three consecutive steps of ultrasound-assisted deacetylation process (USAD process), resulting in an extensively deacetylated chitosan (DA=2%) with high viscosity average molar mass ($\overline{M}_v$ = 354,000 g/mol) compared to chitosan obtained by other methods. This chitosan, named sample CSo, was dissolved in aqueous acetic acid and then it was submitted to N-acetylation reaction for 24 hours at room temperature. The occurrence of O-acetylation was prevented by adding 1,2-propanediol to the reaction medium and the variation of the molar ratio acetic anhydride/amino groups allowed the preparation of five N-acetylated chitosans, named as samples RCSo_n, which were characterized by ¹H NMR spectroscopy, infrared spectroscopy, X-ray diffraction, viscometry, scanning electron microscopy and thermogravimetric analysis. The parameter of acetylation (PA) of N-acetylated chitosans was determined from the ¹H NMR spectra, allowing the assessment to the distribution pattern of GlcNAc and GlcN units. The N-acetylation reactions were carried out in duplicate, generating two independent sets of N-acetylated chitosans whose average degree of acetylation ranged as 25% < DA < 55%, a linear increase of DA with increasing molar ratio acetic anhydride/amino groups being observed. The N-acetylated chitosans

presented parameter of acetylation ranging as $0,9 < PA < 1,5$, indicating the predominance of random distribution of GlcNAc and GlcN units. The N-acetylated chitosans showed higher thermal stability as compared to the parent chitosan (CSo sample), probably due to the changes in the degree of order resulting from the higher content of GlcNAc units present in former samples. The Bragg angles characteristic of beta-chitin (CTo sample) were identified in the XRD patterns of N-acetylated chitosans, suggesting that these samples acquired similar characteristics as beta-chitin. Further evidence of this fact was observed through the SEM analyses, which revealed that the characteristics of particle's surfaces of N-acetylated chitosans are similar to those of beta-chitin.

Keywords: squid pens, β -chitin, chitosan, N-acetylation, parameter of acetylation, homogeneous.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Representação da estrutura primária idealizada da quitina, onde n é o grau de polimerização ⁽¹³⁾	20
Figura 2-Representação da estrutura da celulose, onde n é o grau de polimerização ⁽¹³⁾	20
Figura 3-Representação esquemática da disposição das cadeias nas polimorfos de α , β e γ -quitina ⁽⁶⁾ , onde as setas representam as cadeias poliméricas no sentido do terminal não-redutor para o redutor.	21
Figura 4-Estrutura Molecular e ligações hidrogênio da α -quitina ⁽⁹⁾	22
Figura 5-Estrutura Molecular e ligações hidrogênio da β -quitina ⁽⁹⁾	22
Figura 6-Representação da estrutura primária idealizada da quitosana, onde n é o grau de polimerização ⁽¹³⁾	26
Figura 7-Ilustração de alguns dos possíveis sítios reativos da quitosana ⁽⁹⁾	28
Figura 8-Representação proposta da estrutura da quitosana N-acetilada. Glucosamina; N-acetilglucosamina ⁽³³⁾	30
Figura 9-Representação do esquema de sequências de unidades GlcN e GlcNAc em quitosana ($GA = 50\%$): distribuição em blocos ($PA=0$), distribuição randômica ($PA=1$) e distribuição alternada ($PA=2$) ⁽³⁵⁾	31
Figura 10-Estruturas meso e racêmica de sequências de copolímeros.....	31
Figura 11-Diagrama de polimerização segundo o modelo de Bernoulli ⁽³⁷⁾	32
Figura 12- Lula da espécie Loligo, com destaque para o gládio inserido na parte interna do molusco.....	36

Figura 13 - Esquema experimental empregado nas reações de desacetilação com: 1) sonotrodo e 2) reator de vidro encamisado.....	38
Figura 14-Espectro de RMN ^1H característico de quitosana, onde $\text{R}=\text{COCH}_3$ ou $\text{R}=\text{H}$ ⁽¹³⁾	43
Figura 15-Espectro de RMN ^1H na região de ressonância dos hidrogêneos de quitosana N-acetilada (GA =49%).	45
Figura 16-Difração de raios X de β -quitina e quitosana.....	49
Figura 17-Espectros na região do infravermelho das amostras de QTo e QSo.....	53
Figura 18-Bandas características na região de $1800\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ dos espectros na região do infravermelho das amostras de QTo e QSo.....	54
Figura 19-Difratogramas da amostras QTo e QSo.	55
Figura 20-Micrografias das amostras QTo e QSo, com ampliação de 75x.....	57
Figura 21-Micrografias das amostras QTo e QSo, com ampliação de 500x.....	58
Figura 22-Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da amostra QTo (DCl 35%, 40°C).....	60
Figura 23-Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da amostra QSo (DCl/D $_2\text{O}$ 1% (v/v), 90°C.....	60
Figura 24-Curvas TG/DTG da amostra QTo sob atmosfera dinâmica de ar sintético (vazão de gás 20 ml/min), massa da amostra 8mg, suporte de amostra de platina.	61
Figura 25-Curvas TG/DTG da amostra QSo sob atmosfera dinâmica de ar sintético (vazão de gás 20 ml/min), massa da amostra 8mg, suporte de amostra de platina.....	62
Figura 26-Relação entre o grau médio de acetilação e razão molar $\text{Ac}_2\text{O}/\text{NH}_2$	65
Figura 27-Espectro na região do infravermelho da amostra QSo, bandas características na região de $1800\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$	69

Figura 28-Espectros na região do infravermelho conjunto 1 e conjunto 2, bandas características na região de 1800-1000 cm^{-1}	70
Figura 29-Micrografias das amostras RQSo1 e RQSo5, com ampliação de 500x.....	71
Figura 30-Micrografias das amostras RQSo1r e RQSo5r, com ampliação de 500x.....	72
Figura 31-Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da amostra RQSo4 (DCI/D $_2\text{O}$ 1% (v/v), 90°C, pD 2-3.....	73
Figura 32-Espectro de RMN ^1H (500 MHz) na região de ressonância dos hidrogêneos anoméricos da amostra RQSo4 (GA = 49%)......	75
Figura 33-Deconvolução do espectro de RMN ^1H da amostra RQSo4.....	75
Figura 34-Relação entre o PA e (GA) Conjunto 1 e Conjunto 2.	78
Figura 35-Relação entre (GA) e frequências (F_{AA} ▼, F_{DD} ● e F_{AD} ■) Conjunto1 e Conjunto2.	80
Figura 36-Difratogramas das amostras de quitosana N-acetiladas conjunto1 e conjunto2.....	84
Figura 37-Deconvolução dos difratogramas das amostras RQSo1 e RQSo5.....	85
Figura 38-Curvas TG das amostras conjunto 1 sob atmosfera dinâmica de ar sintético (vazão de gás 20 ml/min), massa da amostra 8mg, suporte de amostra de platina.	86
Figura 39-Curvas DTG das amostras conjunto 1 sob atmosfera dinâmica de ar sintético (vazão de gás 20 ml/min), massa da amostra 8mg, suporte de amostra de platina.	87
Figura 40-Curvas TG das amostras conjunto 2 sob atmosfera dinâmica de ar sintético (vazão de gás 20 ml/min), massa da amostra 8mg, suporte de amostra de platina.	87
Figura 41-Curvas DTG das amostras conjunto 2 sob atmosfera dinâmica de ar sintético (vazão de gás 20 ml/min), massa da amostra 8mg, suporte de amostra de platina.	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Composição química representativa de diversos tipos de resíduos que contêm quitina	23
Tabela 2-Reagentes utilizados na realização dos experimentos	35
Tabela 3-Razões molares $\text{Ac}_2\text{O}/\text{NH}_2$ empregadas nas reações de N-acetilação da amostra QSo	39
Tabela 4-Valores das constantes k e α da equação de MHS para diferentes graus médios de acetilação de quitosana	41
Tabela 5-Bandas de absorção e números de onda ($\bar{\nu} \text{ cm}^{-1}$) características de quitina e quitosana.....	47
Tabela 6-Valores de índice de cristalinidade (I_{Cr})	56
Tabela 7-Valores do grau médio de acetilação ($\overline{GA}$).....	59
Tabela 8-Valores de temperatura de decomposição térmica e perda de massa no intervalo 180-450 °C das amostras QTo e QSo	63
Tabela 9-Valores de viscosidade intrínseca, massa molar média viscosimétrica e grau médio viscosimétrico de polimerização ($\overline{GPv}$) das amostras QTo e QSo	64
Tabela 10-Valores do grau médio de acetilação ($\overline{GA}$) das quitosanas N-acetiladas e da razão molar $\text{Ac}_2\text{O}/\text{NH}_2$ empregada nas reações de N-acetilação da quitosana de partida (amostra QSo).....	65
Tabela 11-Valores do grau médio de acetilação, viscosidade intrínseca, massa molar média viscosimétrica e grau médio viscosimétrico de polimerização ($\overline{GPv}$).....	66

Tabela 12-Deslocamentos químicos (ppm) de hidrogênio no espectro de RMN ^1H da amostra RQSo4	74
Tabela 13-Valores da intensidade dos sinais referentes às sequências I_{AA} (GlcNAc- GlcNAc), I_{DD} (GlcN-GlcN), I_{AD} (GlcNAc-GlcN) e I_{DA} (GlcN-GlcNAc) (Conjunto 1).....	76
Tabela 14-Valores da intensidade dos sinais referentes às sequências I_{AA} (GlcNAc- GlcNAc), I_{DD} (GlcN-GlcN), I_{AD} (GlcNAc-GlcN) e I_{DA} (GlcN-GlcNAc) (Conjunto 2).....	76
Tabela 15-Valores do grau médio de acetilação ($\overline{GA}$), parâmetro de acetilação (PA) e das sequências de díades (F_{AA} , F_{DD} , F_{AD}) (Conjunto 1)	79
Tabela 16-Valores do grau médio de acetilação ($\overline{GA}$), parâmetro de acetilação e das seuqências de díades (F_{AA} , F_{DD} , F_{AD}) (Conjunto 2)	79
Tabela 17-Média do grau médio de acetilação ($\overline{GA}$) e do índice cristalinidade (I_{cr}) das amostras de quitosana N-acetiladas (Conjunto 1 e 2).....	81
Tabela 18-Ângulos de Bragg 2θ dos difratogramas das amostras QTo e QSo	82
Tabela 19-Ângulos de Bragg 2θ dos difratogramas das amostras de quitosanas N-acetiladas do conjunto 1	83
Tabela 20-Ângulos de Bragg 2θ dos difratogramas das amostras de quitosanas N-acetiladas do conjunto 2	83
Tabela 21-Valores de temperatura de decomposição térmica e perda de massa no intervalo 180-450 °C da amostra de quitosana e quitosanas N-acetiladas (conjunto 1).....	88
Tabela 22-Valores de temperatura de decomposição térmica e perda de massa no intervalo 180-450 °C da amostra de quitosana e quitosanas N-acetiladas (conjunto2).....	89

LISTA DE SIGLAS

GlcNAc - 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose;

GlcN - 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose;

PA- Parâmetro de acetilação;

$\overline{GA}$ - Grau médio de acetilação;

Ac₂O/NH₂ – Razão molar anidrido acético/grupo amino;

AA - (GlcNAc-GlcNAc);

DD - (GlcN-GlcN);

AD- (GlcNAc-GlcN);

[η] - Viscosidade intrínseca;

$\overline{M}_v$ - Massa molar média viscosimétrica;

$\overline{GP}_v$ - Grau médio viscosimétrico de Polimerização;

DAIUS - Desacetilação da quitina assistida por ultrassom de alta intensidade;

IV - Espectroscopia na região do Infravermelho;

TG - Análise Termogravimétrica;

DTG – Análise Termogravimétrica Derivada;

MEV - Microscopia eletrônica de varredura;

DRX - Difração de Raios X;

RMN ¹H - Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio;

RQSo - Quitosana N-acetiladas;

RQSo - Quitosana N-acetiladas repetição.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE QUITINA	20
1.2. FONTES E PROCESSO DE OBTENÇÃO DA QUITINA	23
1.3. DESACETILAÇÃO DA QUITINA E OBTENÇÃO DA QUITOSANA	24
1.4. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA QUITOSANA	26
1.5. N-ACETILAÇÃO DE QUITOSANA.....	29
1.5.1. Modelo Estatístico de Bernoulli para copolímeros	31
2. PARTE EXPERIMENTAL	35
2.1. OBTENÇÃO DA BETA-QUITINA	36
2.2. DESACETILAÇÃO DE BETA-QUITINA ASSISTIDA POR IRRADIAÇÃO DE ULTRASSOM DE ALTA INTENSIDADE.....	37
2.3. N-ACETILAÇÃO DA QUITOSANA EM MEIO HOMOGÊNEO	38
3. CARACTERIZAÇÕES	40
3.1. DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLAR MÉDIA DE QUITOSANA POR VISCOSIMETRIA CAPILAR	40
3.2. ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (RMN ¹ H).....	43
3.2.1. DETERMINAÇÃO DO GRAU MÉDIO DE ACETILAÇÃO (%GA)	43
3.2.2. DETERMINAÇÃO DO PARÂMETRO DE ACETILAÇÃO (PA)	45
3.3. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO.....	46
3.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	48
3.5. DIFRAÇÃO DE RAIOS X.....	48
3.6. ESTABILIDADE TÉRMICA.....	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.1. CARACTERIZAÇÃO DE BETA-QUITINA E QUITOSANA	52
4.1.1. Espectroscopia na Região do Infravermelho.....	53
4.1.2. Difração de raios X.....	55
4.1.3. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	56
4.1.4. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio RMN ¹ H	59
4.1.5. Análise Termogravimétrica	61
4.1.6. Determinação da massa molar média viscosimétrica de quitina e quitosana.....	63

4.2. ESTUDOS DE N-ACETILAÇÃO DE QUITOSANA.....	64
4.2.1. Massa molar média viscosimétrica de quitosanas N-acetiladas	66
4.2.2. Espectroscopia na Região do Infravermelho.....	68
4.2.3. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	70
4.2.4. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H).....	73
4.2.5. Difração de raios X.....	81
4.2.6. Análise Termogravimétrica	86
5. CONCLUSÕES	90
ANEXO.....	92
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

1. INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos, macromoléculas constituídas por resíduos de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas, ocorrem abundantemente na biomassa, podendo ser encontrados em animais, plantas e microrganismos. A quitina é um polissacarídeo encontrado em animais invertebrados e em alguns microrganismos, como componente de exoesqueletos e paredes celulares, respectivamente. A quitina não é encontrada na natureza como uma substância pura, pois geralmente ocorre combinada com outras substâncias, como proteínas, sais de cálcio, pigmentos e lipídeos ⁽¹⁻²⁾.

A quitina é capaz de adsorver, reter umidade e intumescer em contato com alguns solventes, mas é insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos. Essa última característica dificulta a aplicação de quitina, por isso a proposta de se realizar modificações químicas ⁽³⁻⁴⁾. Contudo, as modificações da quitina também são dificultadas devido a sua limitada solubilidade. De fato, a grande maioria das reações da quitina ocorre sob condições heterogêneas, o que torna difícil o controle do grau de substituição e resulta em produtos estruturalmente não-uniformes e, conseqüentemente, em variações de propriedades ⁽⁵⁾.

A quitosana é o principal derivado da quitina, sendo obtida pela desacetilação química ou enzimática da mesma. Os processos químicos podem ser realizados pela via homogênea ou heterogênea, sendo a última a mais empregada e estudada. A principal diferença entre quitina e quitosana é o conteúdo médio de unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcNAc) e 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcN) presentes nas cadeias poliméricas, que tem efeito marcante sobre a solubilidade desses polímeros. Define-se o grau médio de acetilação ($\overline{GA}$) como a fração média de unidades GlcNAc presentes nas cadeias poliméricas. O produto da reação de desacetilação de quitina é considerado quitosana quando o polímero é solúvel em solução diluída de ácido ⁽⁶⁾. A distribuição de ambas as unidades, GlcNAc e GlcN, ao longo cadeias poliméricas de quitosana pode ser descrita pelo parâmetro de acetilação (PA), sendo

que a determinação dessas seqüências é importante para entender as propriedades da quitosana.

A quitosana apresenta algumas propriedades que a distinguem de outros polímeros, como a sua baixa toxicidade, atividade antimicrobiana, biodegradabilidade e biocompatibilidade, que possibilitam sua aplicação na área farmacêutica e biomédica. As possibilidades de aplicações são enriquecidas pelo fato que a quitosana pode sofrer modificações estruturais, gerando derivados com características e propriedades diferentes da quitosana de partida, e por sua versatilidade, já que pode ser preparada em diferentes formas, tais como soluções de viscosidade controlada, géis, filmes, microesferas, nanofibras e nanopartículas. A aplicação da quitosana nas áreas mencionadas anteriormente depende fortemente da sua solubilidade, que é influenciada pelo grau médio de acetilação ($\overline{GA}$) e pelo parâmetro de acetilação (PA) ⁽⁷⁾. O conhecimento acerca da distribuição das unidades GlcNAc e GlcN é essencial para entender as propriedades da quitosana, sendo conhecido que a distribuição pode ser diferente em função da reação de obtenção da quitosana ocorrer em meio homogêneo ou heterogêneo. Reações em meio heterogêneo ocorrem preferencialmente nas regiões amorfas, e os produtos das reações apresentam heterogeneidade ao longo das cadeias poliméricas, no entanto, reações em meio homogêneo geram produtos com estruturas químicas mais uniformes.

Com o objetivo de melhorar as propriedades físico-químicas da quitosana, e conseqüentemente suas aplicações, algumas reações de modificações, tais como N-acetilação, N-ftaloilação, têm sido propostas ⁽²⁾. As reações de N-acetilação consistem na conversão de unidades GlcN em unidades GlcNAc, dependendo das condições reacionais é possível obter quitosanas N-acetiladas com diferentes distribuições das unidades GlcNAc e GlcN e, conseqüentemente, com diferentes propriedades físico-químicas.

1.1. Características físico-químicas de quitina

A quitina é um polissacarídeo linear composto por unidades GlcNAc e GlcN, unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1 $\rightarrow$ 4)^(6,8). A quitina (Figura 1) é estruturalmente semelhante à celulose (Figura 2), sendo que a principal diferença encontra-se no carbono 2 do anel de glicopirranose, que contém um grupo hidroxila na celulose e um grupo acetamido na quitina. A presença dos grupos acetamido em quitina é vantajosa para propiciar funções biológicas distintas e para permitir a execução de reações de modificações⁽⁷⁾.

Figura 1-Representação da estrutura primária idealizada da quitina, onde n é o grau de polimerização⁽¹³⁾.

Figura 2-Representação da estrutura da celulose, onde n é o grau de polimerização⁽¹³⁾.

A quitina é um polímero semicristalino e no seu estado nativo ocorre como polimorfos, α , β e γ -quitina, as quais são encontradas nas estruturas esqueléticas de crustáceos, insetos, cogumelos, gládios de lulas e nas paredes celulares de fungos⁽⁴⁾.

As polimorfos de quitina correspondem a diferentes arranjos no estado sólido, decorrentes de disposições distintas das cadeias do polímero nas lamelas ou folhas que constituem os domínios cristalinos (Figura 3) ⁽⁶⁾.

Figura 3-Representação esquemática da disposição das cadeias nas polimorfos de α , β e γ -quitina ⁽⁶⁾, onde as setas representam as cadeias poliméricas no sentido do terminal não-redutor para o redutor.

As polimorfos α - e β -quitina se distinguem pelo arranjo de suas cadeias nas regiões cristalinas, que se orientam paralelamente (cadeias que têm o mesmo sentido, da extremidade redutora para a não-redutora) na β -quitina e anti-paralelamente na α -quitina ⁽⁶⁾. Segundo a orientação assumida, o estabelecimento de ligações hidrogênio inter-cadeias e intra-cadeias é favorecido, resultando em empacotamentos mais densos. A orientação antiparalela favorece o estabelecimento de ligações hidrogênio inter e intramoleculares e também interfolhas (Figura 4), resultando no empacotamento denso adotado por α -quitina. No entanto a disposição paralela prejudica o estabelecimento de ligações de hidrogênio intermoleculares e interfolhas (Figura 5), e a β -quitina adota empacotamento menos denso que o da α -quitina. Na γ -quitina ocorre uma combinação dos arranjos da α - e da β -quitina, pois duas cadeias em disposição antiparalela são intercaladas por uma cadeia disposta de maneira paralela ^(7,9).

Figura 4-Estrutura Molecular e ligações hidrogênio da α -quitina ⁽⁹⁾.

Figura 5-Estrutura Molecular e ligações hidrogênio da β -quitina ⁽⁹⁾.

A polimorfa mais estável e mais abundante na biomassa é a α -quitina ⁽¹⁰⁾, sendo encontrada principalmente em estruturas que demandam grande resistência mecânica, como os exoesqueletos de animais invertebrados. Nestes organismos, a α -quitina se encontra combinada, principalmente, com proteínas, minerais e pigmentos. Já a forma β -quitina é encontrada em estruturas que requerem maior flexibilidade como, por exemplo, em gládios de moluscos.

1.2. Fontes e Processo de Obtenção da Quitina

A quitina é encontrada em várias classes de invertebrados, mas as principais fontes para a produção industrial de quitina são as cascas de camarões e carapaças de caranguejos, que possuem composições variadas quanto aos teores de proteínas, sais de cálcio (principalmente fosfatos e carbonatos), lipídios e pigmentos (Tabela 1) ⁽²⁾.

Tabela 1-Composição química representativa de diversos tipos de resíduos que contêm quitina ⁽²⁾

FONTES	TEORES			
	Proteína % ^a	Cinzas % ^a	Lipídios % ^a	Quitina % ^a
Cabeças de camarões	42,0 ± 1,8	20,5 ± 0,5	2,4 ± 0,02	35,5 ± 2,1
Cascas de camarões	58,0 ± 2,8	24,2 ± 0,3	1,4 ± 0,02	16,4 ± 1,8
Carapaças de lagostas	23,1	33,7	2,2	20,2
Resíduos de krill	41	23,0	11,6	24,0
Gládios de lulas	55,3 ± 3,1	0,9 ± 0,04	0,6 ± 0,03	43,2 ± 2,4

^a % em base seca.

(1)

O processo de extração da α -quitina a partir de cascas de camarões e carapaças de caranguejos envolve tratamentos químicos sequenciais destinados a eliminar as substâncias que a acompanham. Estas etapas se destinam a eliminar carbonatos e fosfato de cálcio e/ou

magnésio, as proteínas e os pigmentos contidos na biomassa. Os procedimentos mais utilizados para a extração da quitina geralmente compreendem a utilização de soluções ácidas na desmineralização, que tem por finalidade a eliminação dos sais minerais, e de soluções alcalinas na etapa de desproteinização, o que resulta na eliminação das proteínas. A eliminação dos pigmentos ocorre via extração por solventes orgânicos ou por oxidação ⁽¹¹⁾. O processo de extração da β -quitina a partir de gládios de lulas não necessita da etapa de desmineralização, pois o conteúdo de sais inorgânicos presentes nos gládios é baixo (Tabela 1). Assim, a extração de β -quitina a partir de gládios de lulas requer procedimentos mais brandos do que aqueles empregados para extrair α -quitina de carapaças de crustáceos, nos quais o polímero ocorre fortemente combinado a carbonatos de cálcio e magnésio. Portanto, um procedimento brando de desproteinização dos gládios, executado a temperatura ambiente e empregando soluções alcalinas diluídas, permite a obtenção de β -quitina com teor bastante reduzido de contaminantes ⁽¹²⁾.

1.3. Desacetilação da quitina e obtenção da quitosana

Uma das principais reações realizadas em quitina é a desacetilação. Essa reação consiste na hidrólise dos grupos acetamido das unidades GlcNAc para gerar grupos amino e, portanto, converter unidades GlcNAc em unidades GlcN. Embora os grupos acetamido das unidades GlcNAc possam ser hidrolisados sob condições ácidas ou básicas, o uso de hidrólise ácida é evitado devido à susceptibilidade das ligações glicosídicas da quitina à hidrólise ácida. O método mais usado para desacetilação de quitina é a hidrólise alcalina, geralmente pela execução de um processo heterogêneo que apresenta como variáveis a concentração do álcali, a temperatura e o tempo de reação ⁽¹⁾. O tratamento de quitina com soluções concentradas de hidróxido de sódio em temperaturas elevadas produz quitosana e em tais condições ocorre

apenas à hidrólise parcial dos grupos acetamido de quitina, no entanto se o tempo de reação for longo a despolimerização ocorre simultaneamente.

Novas metodologias ⁽¹³⁻¹⁵⁾ têm sido propostas para evitar os longos tempos de reação, aumentar a eficiência da reação e minimizar a ocorrência de despolimerização. Dentre essas metodologias podemos citar a reação de desacetilação da quitina assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade (processo DAIUS) ⁽¹⁶⁾, que permite que quitosanas com baixo grau de acetilação e elevada massa molar média viscosimétrica sejam obtidas em tempos curtos (<60 min) e temperaturas relativamente baixas (<80°C).

Como já mencionado a reação de desacetilação de quitina se processa em condições heterogêneas e, assim, o acesso dos reagentes aos sítios reativos ocorre principalmente nas regiões não-ordenadas das cadeias, resultando em polímeros nos quais as unidades GlcNAc e GlcN estão distribuídas em blocos ⁽⁵⁾. A utilização do ultrassom de alta intensidade no processo de desacetilação de quitina ⁽¹⁷⁻¹⁹⁾ resulta na trituração das partículas de quitina devido à ocorrência de cavitação, o que resulta no aumento da área superficial das partículas sólidas, intumescimento e em um aumento na acessibilidade aos sítios reativos.

1.4. Características físico-químicas da quitosana

A quitosana (Figura 6), é constituída por unidades GlcN e GlcNAc, e é solúvel em soluções aquosas diluídas de ácido clorídrico e ácido acético ⁽²⁰⁾.

Figura 6-Representação da estrutura primária idealizada da quitosana, onde n é o grau de polimerização ⁽¹³⁾.

As propriedades físico-químicas da quitosana dependem do grau médio de acetilação, $\overline{GA}$, da massa molar média e da distribuição das unidades GlcN e GlcNAc ⁽⁷⁾. O valor do parâmetro $\overline{GA}$ é um dos critérios empregados para diferenciar quitina e quitosana e, além disso, a solubilidade dos polímeros é diferente. De fato, a quitosana é solúvel em soluções aquosas de ácidos diluídos e a quitina é insolúvel, sendo solúvel apenas em sistemas solventes como N, N-dimetilacetamida/LiCl ^(6,13). A solubilidade da quitosana em meios de acidez moderada está diretamente relacionada com $\overline{GA}$, pois seu valor expressa a quantidade de grupos amino disponíveis para protonação e que geram cargas ($-NH_3^+$) na cadeia polimérica. Assim, quanto menor o valor de $\overline{GA}$ maior a quantidade de cargas, mais importante a repulsão eletrostática entre as cadeias e maior a solubilidade da quitosana. A distribuição das unidades GlcN e GlcNAc e o valor da massa molecular média também afetam a solubilidade da mesma ⁽²¹⁾.

A forma de obtenção da quitina e as condições em que a reação de desacetilação foi realizada afetam o valor do $\overline{GA}$. Além disso, devido aos diferentes arranjos adotados pelas polimorfos de quitina no estado sólido, a solubilidade, a capacidade de intumescimento em solventes e a reatividade são diferentes. Assim a hidrólise alcalina dos grupos acetamido das unidades GlcNAc é mais favorecida no caso da β -quitina como consequência da maior acessibilidade aos sítios reativos nas cadeias dessa polimorfa quando comparada à α -quitina (22-24).

Como já mencionado a solubilidade da quitosana depende de alguns parâmetros tais como o grau médio de acetilação, $\overline{GA}$, a distribuição das unidades GlcN e GlcNAc ao longo das cadeias poliméricas e a massa molar média. Já é bem conhecido que quitosana é solúvel em ácidos inorgânicos (HCl, HBr, HNO₃), ácidos orgânicos e solventes orgânicos, no entanto também já é conhecido que a quitosana é insolúvel em água, meio neutro e meios alcalinos, o que é uma desvantagem para certas aplicações⁽²⁵⁾. Cadeias poliméricas longas e com elevada massa molar média favorecem as interações entre segmentos, diminuindo a solubilidade da quitosana⁽⁸⁾. A forma de obtenção da quitosana também influencia na sua solubilidade, pois quitosanas obtidas por desacetilação ou acetilação homogênea são solúveis em água para graus de acetilação entre 45-50%, no entanto amostras com o mesmo grau de acetilação produzidas por desacetilação ou acetilação heterogênea não são solúveis em água⁽²⁶⁾. O valor do $\overline{GA}$ controla a solubilidade em água em termos de interações intermoleculares entre as unidades GlcNAc e propriedades hidrofílicas das unidades GlcN livres⁽²⁷⁾.

A distribuição alternada, randômica ou em blocos das unidades GlcN e GlcNAc ao longo das cadeias de quitosana influencia a solubilidade do polímero. A distribuição está diretamente relacionada com as condições de preparação da quitosana, sendo que as reações executadas em condições homogêneas geram quitosanas em cujas cadeias há o predomínio da distribuição randômica, enquanto que nas quitosanas produzidas em condições heterogêneas a

distribuição em blocos predomina. A distribuição randômica das unidades GlcNAc favorece a solubilidade da quitosana ⁽²⁸⁾.

A quitosana possui alguns sítios suscetíveis a reações de modificações (Figura 7), nos quais são executadas reações que têm como objetivo melhorar suas propriedades físico-químicas.

Figura 7-Ilustração de alguns dos possíveis sítios reativos da quitosana ⁽⁹⁾.

Inúmeras vantagens são encontradas quando as reações de modificações de quitosana são realizadas em condições homogêneas, dentre as quais podem ser citadas: condições experimentais moderadas, regularidade e possível seletividade na distribuição dos substituintes, despolimerização minimizada e alto rendimento das reações ⁽²⁹⁾. No entanto, as reações de modificações de quitosana (N-acilação, O-acilação, N e O carboximetilação) realizadas em condições heterogêneas ocorrem preferencialmente nas regiões amorfas, gerando produtos heterogêneos. Um exemplo de reação de modificação de quitosana que é realizada em condições homogêneas é a reação de N-acetilação, na qual ocorre a acetilação dos grupos amino das unidades GlcN ⁽³⁰⁾.

1.5. N-acetilação de quitosana

Através do processo de desacetilação de quitina em meio heterogêneo é possível obter quitosanas com diferentes graus médio de acetilação, e empregando temperaturas elevadas e longos tempos de reação podem ser obtidas quitosanas extensivamente desacetiladas. No entanto, tais produtos apresentam uma distribuição em blocos das unidades GlcNAc e GlcN⁽³¹⁾. Uma alternativa para solucionar o problema descrito acima seria execução de reação de N-acetilação de quitosana em meio homogêneo, pois o substrato da reação (quitosana) é solúvel em solução diluída de ácido e os produtos obtidos apresentam uma distribuição randômica das unidades GlcNAc e GlcN⁽²⁸⁾. É interessante que o substrato utilizado nas reações de N-acetilação seja extensivamente desacetilado, ou seja, que a porcentagem de unidades GlcNAc nas cadeias de quitosana seja a menor possível, pois isso torna o substrato uniforme, o que contribui para a uniformidade dos produtos.

As reações de N-acetilação são realizadas sob condições homogêneas e na presença de cossolvente hidroxilado com o objetivo de preservar os grupos hidroxila da quitosana de reagirem com o agente acetilante, pois o objetivo é obter quitosana N-acetilada e não produtos O-acetilados. A razão molar $\text{Ac}_2\text{O}/\text{NH}_2$ (anidrido acético/grupos amino das unidades GlcN) empregada em tais reações é variada para permitir a preparação de quitosanas com diferentes graus médios de acetilação⁽³⁰⁾.

A quitosana é um copolímero linear que pode ser obtido pela execução da reação de desacetilação de quitina ou N-acetilação parcial de quitosana, sendo que essas reações podem se processar de maneira homogênea ou heterogênea, gerando copolímeros com diferentes tipos de distribuições de unidades GlcNAc e GlcN. Assim, a desacetilação de quitina sob condições heterogêneas ocorre preferencialmente nas regiões amorfas formando copolímeros

em blocos, já a desacetilação de quitina e a N-acetilação de quitosana sob condições homogêneas produzem copolímeros randômicos ⁽³²⁻³³⁾.

O grau médio de acetilação também interfere na sequência das unidades GlcNAc e GlcN de quitosanas N-acetiladas, pois se a quitosana de partida é pouco desacetilada o copolímero obtido apresenta unidades GlcNAc e GlcN em blocos e randômicas (Figura 8 a). No entanto se a quitosana de partida é extensivamente desacetilada o copolímero obtido apresenta unidades GlcNAc e GlcN randomicamente distribuídas (Figura 8 b) ⁽³³⁾.

Figura 8-Representação proposta da estrutura da quitosana N-acetilada. ○ Glucosamina; ● N-acetilglucosamina ⁽³³⁾.

A distribuição das unidades GlcNAc e GlcN ao longo das cadeias de quitosana pode ser caracterizada pelo parâmetro de acetilação (PA), se a estatística for consistente com o modelo de Bernoulli para copolímeros ⁽³⁴⁾. Os valores de PA de 0,1 e 2 são associados, respectivamente, as distribuições ideais em bloco, randômica e alternada das unidades

GlcNAc ao longo das cadeias de quitosana (Figura 9). O parâmetro de acetilação pode ser determinado por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H), porém a análise requer uma boa resolução dos sinais ⁽³⁴⁻³⁶⁾.

Figura 9-Representação do esquema de sequências de unidades GlcN (●) e GlcNAc (■) em quitosana ($\overline{GA}$ =50%): (a) distribuição em blocos (PA=0), (b) distribuição randômica (PA=1) e (c) distribuição alternada (PA=2) ⁽³⁵⁾.

1.5.1. Modelo Estatístico de Bernoulli para copolímeros

Na Figura 10 estão representados os seis tipos de díades que podem ser encontradas em copolímeros que apresentam centros quirais ⁽³⁷⁾.

Figura 10-Estruturas meso (a) e racêmica (b) de sequências de copolímeros.

A espectroscopia de RMN ^1H é útil para a caracterização microestrutural e para a determinação do mecanismo de propagação nas reações de polimerização, pois picos podem

ser atribuídos para longas sequências configuracionais. As intensidades dos picos para as diferentes sequências são sensíveis ao mecanismo de propagação e podem ser usadas para distinguir entre os possíveis mecanismos. Na Figura 11 é mostrada uma cadeia cujo encadeamento de unidades observa a estatística do modelo de Bernoulli, onde P_m é a probabilidade da estrutura ser meso e P_r é a probabilidade da estrutura ser racêmica. Na etapa de propagação, segundo o modelo de Bernoulli, o final da cadeia não é representado como tendo qualquer estereoquímica particular, ou seja, não é importante saber se é m (meso) ou r (racêmico). Neste processo o resultado da introdução de uma nova unidade à cadeia em crescimento não depende da configuração da unidade que foi introduzida na etapa anterior. Assim, o modelo de Bernoulli assume que a adição dos monômeros é randômica, ou seja, que a estereoquímica da cadeia já existente não tem influência na adição do próximo monômero⁽³⁷⁾.

Figura 11-Diagrama de polimerização segundo o modelo de Bernoulli ⁽³⁷⁾.

Através da Figura 11 é possível concluir que:

$$(mm) = P_m^2 = (m)^2$$

$$(rm) = 2 P_m (1 - P_m) = 2 (r)(m)$$

$$(rr) = (1 - P_m)^2 = (r)^2$$

Estas relações podem ser usadas para verificar se as intensidades dos picos de díades estão de acordo com a estatística de Bernoulli. Outra forma de verificar se as intensidades dos picos estão de acordo com a estatística de Bernoulli é usando as equações 1 e 2.

$$P_{m/r} = \frac{(mr)}{2(mm) + (mr)} [= (1 - Pm)] = Pr \quad [1]$$

$$P_{r/m} = \frac{(mr)}{2(rr) + (mr)} = Pm \quad [2]$$

Assim se $P_{m/r} + P_{r/m} = 1$ as frequências de díades do polímero são randômicas, o que está de acordo a estatística de Bernoulli.

O modelo de Bernoulli pode ser utilizado para caracterizar as amostras de quitosana se considerarmos a possibilidade que as unidades GlcNAc (A) ou GlcN (D) podem ser adicionadas a uma unidade não especificada (A ou D). Assim, adicionando uma unidade A (ou unidade D) a outra unidade A (ou D), quatro diferentes sequências de díades podem ser identificadas: F_{AD} , F_{AA} , F_{DD} e F_{DA} . Os valores da intensidade dos sinais (I_{AD} , I_{DD} , I_{AA} e I_{DA}) das sequências de díades das amostras de quitosana podem ser obtidos experimentalmente por espectroscopia de RMN 1H e o tratamento dos dados é realizado empregando a ferramenta deconvolução do programa Origin Lab ⁽³⁵⁾.

OBJETIVOS

Os principais objetivos deste trabalho são a preparação de quitosana extensivamente desacetilada ($\overline{GA}=0$), com elevada massa molecular para ser empregada como substrato em reações homogêneas de N-acetilação, visando a preparação de quitosanas com diferentes graus médios de acetilação e distribuição randômica de unidades GlcN e GlcNAc ao longo de suas cadeias.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Os reagentes utilizados neste trabalho são identificados abaixo (Tabela 2) os quais foram utilizados como recebidos a não ser quando especificado.

Tabela 2-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 99,5%	Cambridge Isotope laboratories. Inc
Ácido Acético Glacial 99,7%	Synth
Água Deuterada 99,9%	Cambridge Isotope laboratories. Inc
Anidrido Acético	Synth
Brometo de Potássio	Spectrum
Dimetilacetamida	Vetec
Cloreto de Lítio	Vetec
Etanol	Tec-Lab
Hidróxido de Sódio 99% (mínimo)	Synth
Nitrato de Prata	Tec-Lab
Nitrito de Sódio	Synth
1,2 propanodiol	Qhemis

2.1. Obtenção da beta-quitina

Os gládios de lulas (Figura 12) de duas espécies (*Loligo plei* e *Loligo sampaulensis*), cedidos pela Empresa Miami Pescados (Cananéia/SP), foram utilizados como matéria-prima para extração de beta-quitina neste trabalho. Para realizar a extração da beta-quitina, os gládios de lulas foram lavados manualmente para a remoção de resíduos de carne, enxaguados com água destilada e secos em estufa com circulação e renovação de ar durante 24 h, a 30°C. Depois de secos, os gládios foram transferidos para um moinho (MA-048, Micromoinho de rotor vertical com facas móveis, Marconi) e após moagem o material foi peneirado (peneiras de 10, 12, 35, 48, 170 e 200 Mesh) e classificado de acordo com as dimensões das partículas. A fração mais abundante dos gládios triturados (85% de massa) foi utilizada na extração de beta-quitina e é composta por partículas com dimensões médias no intervalo 250 µm- 425µm.

Figura 12- Lula da espécie *Loligo*, com destaque para o gládio inserido na parte interna do molusco.

De acordo com trabalho realizado por Kurita e colaboradores⁽³⁸⁾, os gládios de *Loligo sp.* não contém quantidades significativas de sais minerais, o que permite dispensar a etapa de desmineralização. Assim, a extração de beta-quitina foi realizada por execução da remoção de proteínas da biomassa como descrito a seguir.

Para eliminação das proteínas presentes nos gládios de lulas foi adotado o procedimento descrito por Chaussard *et al.*⁽¹²⁾. Assim, aproximadamente 200g de gládios moídos foram suspensos em 3L de uma solução aquosa de NaOH 1M e a suspensão resultante foi mantida sob agitação mecânica (350 rpm) durante 18 h 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, denominada amostra QTo, foi então transferida para placas de Petri e seca em estufa com circulação e renovação de ar durante 24h, a 30°C.

2.2. Desacetilação de beta-quitina assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade

Aproximadamente 4,4 g de beta-quitina (amostra QTo) foram suspensos em 50 mL da solução de NaOH 40%, a suspensão foi transferida para um béquer, que foi disposto no interior da caixa de isolamento acústico do equipamento de ultrassom (BRANSON Sonifier modelo 450, frequência de 20kHz). O sonotrodo foi imerso (aproximadamente 2/3 do comprimento) na suspensão de beta-quitina, que foi mantida sob agitação magnética constante por 50 minutos, amplitude média ($30\% < A_{\text{máx}} < 50\%$) e temperatura de $65 \pm 2^\circ\text{C}$. Em seguida a suspensão foi transferida para um béquer imerso em um banho de gelo e o pH foi ajustado (8-9). A suspensão foi filtrada e o sólido obtido foi lavado com etanol 80% até que o excesso de cloreto de sódio fosse eliminado. O sólido foi transferido para a placa de Petri e seco em estufa de circulação a 30°C por 24 horas. O produto obtido foi submetido por mais duas vezes

ao processo de desacetilação assistida por irradiação de alta intensidade, nas condições descritas, para resultar em quitosana extensivamente desacetilada, denominada amostra QSo.

Figura 13 - Esquema experimental empregado nas reações de desacetilação com: 1) sonotrodo e 2) reator de vidro encamisado.

2.3. N-acetilação da quitosana em meio homogêneo

Aproximadamente 0,5 g de quitosana (amostra QSo) foram suspensos em 50 mL de ácido acético (0,5%) e a suspensão foi mantida sob agitação magnética por 24 horas, à temperatura ambiente. À solução resultante foram adicionados 40 mL de 1,2-propanodiol e a solução foi mantida sob agitação magnética por 15 horas. Em seguida, anidrido acético destilado foi adicionado lentamente à solução, que foi mantida sob agitação magnética por 24 horas à temperatura ambiente. O produto foi isolado por precipitação após ajuste do pH (≈ 8). O sólido foi isolado por filtração e então lavado com etanol 80% (5 lavagens) e com etanol absoluto (1 lavagem). O sólido foi transferido para a placa de Petri e seco em estufa de circulação a 30°C por 24 horas. Foram executados cinco experimentos (em duplicata) de N-

acetilação da amostra QSo, empregando as razões molares anidrido acético/grupos amino das unidades GlcN (Tabela 3).

Tabela 3-Razões molares $\text{Ac}_2\text{O}/\text{NH}_2$ empregadas nas reações de N-acetilação da amostra QSo

Amostra	Razão $\text{Ac}_2\text{O}/\text{NH}_2$
RQSo1	0,3
RQSo2	0,4
RQSo3	0,5
RQSo4	0,6
RQSo5	0,7

3. CARACTERIZAÇÕES

O grau médio de acetilação ($\overline{GA}$), a massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$) e o parâmetro de acetilação (PA) influenciam as propriedades físico-químicas da quitosana e por isso a necessidade de determiná-los. Outras características, tais como a morfologia das superfícies e a cristalinidade também exercem influência nas propriedades físico-químicas da quitosana. As características estruturais citadas e suas determinações são descritas a seguir.

3.1. Determinação da Massa Molar Média de Quitosana por Viscosimetria Capilar

A viscosimetria é o método mais utilizado para obtenção da massa molar de quitosana, pois apesar da desvantagem de não ser um método absoluto e por requerer a determinação de constantes para correlação dos valores de viscosidade intrínseca e de massas molares determinadas por métodos absolutos, sua principal vantagem é a sua simplicidade ⁽²⁾.

Soluções de quitosana em ácido diluído ou em tampão se comportam como soluções de polieletrólitos, nesta situação a viscosidade pode ser descrita como função de sua viscosidade intrínseca $[\eta]$ e de sua concentração, se não houver interações macromoleculares (sistema diluído) e quando existir concentração suficientemente elevada de sal. Neste caso, a relação de Huggins ^(39,40) pode ser aplicada (equação 3).

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] + k_H [\eta]^2 C \quad [3]$$

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 maneira, a viscosidade intrínseca ($[\eta]$) é determinada pela extrapolação à diluição infinita da curva de viscosidade reduzida versus concentração (Equação 3). A viscosidade determinada desta forma satisfaz a relação de Mark-Houwink (Equação 4) ⁽⁴¹⁻⁴³⁾, logo, a massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$) pode ser determinada empregando a equação 4.

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

onde K' e α são constantes para um dado solvente e temperatura e $\overline{M}_v$ é a massa molar média viscosimétrica. Os valores de K' e α utilizados no cálculo de massa molar média viscosimétrica de quitosana são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4-Valores das constantes k e α da equação de MHS para diferentes graus médios de acetilação de quitosana ^(7,44)

$\overline{GA}\%$	K	α
25	0,068	0,800
40	0,063	0,823
41	0.062	0,813
56	0,057	0,825

Em soluções diluídas a viscosidade da cadeia polimérica exhibe comportamento de fluidos Newtonianos, portanto a viscosidade é função de seu volume hidrodinâmico. Logo a medida da viscosidade da solução do polímero reflete a resistência ao escoamento e a viscosidade intrínseca da cadeia macromolecular dependerá também de sua permeabilidade ao solvente, isto é, de sua capacidade de deixar o solvente permear o espaço definido como seu volume hidrodinâmico. Assim mede-se o tempo “ t ” necessário para que um dado volume de solução escoe por um capilar, e desta maneira a viscosidade relativa é dada por:

$$\eta_r \cong t_c/t_0 \quad [5]$$

Para os valores de tempo de escoamento da solução (t_c) e tempo de escoamento do solvente (t_0) foi feita a correção de Hagenbach ⁽⁴⁵⁾, conforme a equação 6.

$$\Delta t_{HC} = \frac{E}{Kt_2} \quad [6]$$

Sendo:

Δt_{HC} = correção de Hagenbach para o tempo de escoamento;

t = tempo de escoamento médio;

E/K = constante relacionada com o diâmetro do capilar utilizado.

Para a determinação da viscosidade intrínseca aproximadamente 20 mg da amostra de quitosana foram suspensos em 25 mL de solução de ácido acético 0,6M sob agitação magnética constante durante 24h. Em seguida foram adicionados 25 ml de acetato de sódio 0,4M e a agitação procedeu 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). Aliquota de 15 mL desta solução foi transferida para um viscosímetro capilar de vidro (do tipo Ubbelohde, $\phi=0,53$ mm) e as medidas de tempo de escoamento foram determinadas em 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 $25,00 \pm 0,01^\circ\text{C}$ e tampão ácido acético 0,3M/acetato de sódio 0,2M (pH = 4,5) foi empregado para as sucessivas diluições, de modo a assegurar que a força iônica das soluções fosse mantida constante.

3.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H)

A técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio é bastante conveniente para a determinação do conteúdo das unidades GlcNAc em quitosana. A técnica de RMN ^1H também fornece informações acerca da sequência de ambas as unidades GlcNAc e GlcN ao longo das cadeias poliméricas, a qual pode ser descrita pelo parâmetro de acetilação (PA) ^(46,47).

3.2.1. Determinação do grau médio de acetilação ($\% \overline{GA}$)

Na Figura 14 ⁽¹³⁾ é apresentado um espectro de RMN ^1H típico de quitosana obtido em HCl/D₂O 1% (v/v).

Figura 14-Espectro de RMN ^1H característico de quitosana, onde $\text{R}=\text{COCH}_3$ ou $\text{R}=\text{H}$ ⁽¹³⁾.

O sinal em 2,0 ppm determina a presença de hidrogênios metílicos do grupo acetil, em 3,2 ppm observa-se o sinal referente ao átomo de hidrogênio ligado ao carbono 2 do anel D-glicosamina e em 4,9 ppm temos o sinais do hidrogênio ligado ao carbono 1 do anel D-

glicosamina. O grau médio de acetilação ($\% \overline{GA}$) de quitosana foi calculado a partir da razão entre as áreas dos hidrogênios metílicos do grupo acetil (sinais 2,0 ppm) e da soma das áreas dos hidrogênios ligados aos carbonos 2 a 6 do anel glicopiranosídico. (cujos sinais foram observados na região de deslocamento químico de 3 a 4,2 ppm), conforme a equação 7.

$$\% \overline{GA} = \left(\frac{A_{CH_3} / 3}{A_{H_2-H_6} / 6} \right) * 100 \quad [7]$$

O grau médio de acetilação ($\% \overline{GA}$) de β -quitina foi calculado através da equação 8.

$$\% \overline{GA} = \frac{(I_{\alpha H1A} + I_{\beta H1A+H1D} + I_{H1A}) - I_{H2D}}{(I_{\alpha H1A} + I_{\beta H1A+H1D} + I_{H1A})} \quad [8]$$

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

Para calcular o parâmetro de acetilação é necessário que o espectro de RMN 1H tenha sinais bem definidos, por isso a necessidade de despolimerizar as amostras de quitosana. A despolimerização das amostras de quitosana com $NaNO_2$ sólido diminui a viscosidade das soluções, melhora a solubilidade e estreita a largura dos sinais. O $NaNO_2$ promove a hidrólise das ligações glicosídicas adjacentes a unidades GlcN nas cadeias de quitosana⁽⁴⁸⁾.

Para aquisição do espectro de quitina cerca de 10 mg da amostra foram solubilizadas em 1mL de solução de DCl 35%, sob agitação magnética constante, durante 24h, à temperatura de 40°C. A solução obtida foi transferida para tubo de quartzo (Aldrich 527-PP, ϕ = 5mm) e o espectro foi obtido em espectrômetro Bruker Avance DRX 500 MHz a 90 °C; foi utilizado supressão de água com sequência de pulsos 1-1, sendo o intervalo entre os pulsos de supressão de 3 segundos, acumulando 32 varreduras e tempo de relaxação foi de 7 segundos. A janela espectral foi de 10.0 ppm e o tamanho do fid 32K.

Para obtenção dos espectros as amostras de quitosana e quitosana N-acetiladas (6mg) foram solubilizadas em 1mL de solução de DCl/D₂O 1% (v/v) pD 3-4, sob agitação magnética constante durante 24h à temperatura ambiente. A solução obtida foi transferida para tubo de quartzo (Aldrich 527-PP, $\phi = 5\text{mm}$) e o espectro foi obtido em espectrômetro Bruker Avance DRX 500 MHz a 90 °C; foi utilizado supressão de água com sequência de pulsos 1-1, sendo o intervalo entre os pulsos de supressão de 3 segundos, acumulando 32 varreduras e tempo de relaxação foi de 7 segundos. A janela espectral foi de 10.0 ppm e tamanho do fid 32K.

3.2.2. Determinação do parâmetro de acetilação (PA)

O parâmetro de acetilação (PA) foi determinado por espectroscopia de RMN ¹H de acordo com o método descrito por Vårum e colaboradores ⁽⁴⁸⁾. Para determinar o PA das amostras de quitosana N-acetiladas é importante que os espectros tenham boa resolução, pois é necessário conhecer as intensidades dos sinais (I_{DD} , I_{DA} , I_{AA} , I_{AD}) referentes aos núcleos de hidrogênio das sequência de díades AD-AA e DA-DD (Figura 15) ⁽⁴⁹⁾.

Figura 15-Espectro de RMN ¹H na região de ressonância dos hidrogênios de quitosana N-acetilada ($\overline{GA}$ =49%).

Os valores experimentais das intensidades dos sinais I_{AD} , I_{AA} , I_{DA} e I_{DD} das sequências de díades das amostras de quitosanas podem ser determinados usando a ferramenta de deconvolução do Programa Origin Lab. As intensidades relativas dos sinais devem ser normalizadas de acordo com a estatística de Bernoulli ⁽³⁷⁾ e podem ser expressas como:

$$F_{AD} = \frac{I_{AD} + I_{DA}}{I_{AD} + I_{DA} + I_{DD} + I_{AA}}$$

$$F_{AA} = \frac{I_{AA}}{I_{AD} + I_{DA} + I_{DD} + I_{AA}}$$

$$F_{DD} = \frac{I_{DD}}{I_{AD} + I_{DA} + I_{DD} + I_{AA}}$$

[9]

Nas equações acima F_{AA} (F_{DD}) é a probabilidade que duas unidades A (D) sejam adjacentes e F_{DA} é a probabilidade que uma unidade A tenha D como um vizinho, e vice-versa. A partir desses dados é possível calcular o PA pela seguinte expressão ^(37,50):

$$PA = \frac{F_{AD}}{2(F_{AA}) + F_{AD}} + \frac{F_{AD}}{2(F_{DD}) + F_{AD}}$$

[10]

3.3. Espectroscopia na região do infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho é uma técnica simples que é amplamente utilizada na caracterização de quitina e quitosana. A técnica baseia-se nas vibrações dos átomos de uma molécula, o espectro de infravermelho é obtido pela passagem de radiação eletromagnética infravermelha através de uma amostra que possui um momento de dipolo permanente ou induzido e determina qual a fração de radiação incidente é absorvida com uma energia específica. A energia em cada pico no espectro de absorção corresponde à frequência de vibração de uma parte da molécula, permitindo a identificação qualitativa de certos tipos de

ligações na amostra ^(49,51). As principais bandas de absorção características na região do infravermelho de quitina e quitosana são ilustradas na Tabela 5.

Tabela 5-Bandas de absorção e números de onda ($\bar{\nu}$ cm⁻¹) características de quitina e quitosana ⁽¹³⁾

Banda	$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)	Banda	$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)
Amida I	≈ 1 650 e 1 630	Amida II	≈ 1 550 e 1 560
Amida III	≈ 1 310	-N-H ₃ ⁺ (s)	≈ 3 350-3 100 e 2 100
-N-H ₂ (s)	≈ 3 250-3 350	-N-H ₂ (b)	≈ 1 590-1 630
-O-H (s)	≈ 3 450	-O-H (b)	≈ 1 260
-C-OH (s)	≈ 1 030 e 1 070	-C-H ₂ (b, sc)	≈ 1410-1 420
-NH-C(O)-C-H ₃ (s)	≈ 1 380	-NH-C(O)-C-H ₃ (b)	≈ 2 860-2 910

(a) s = estiramento (“stretching”); b = angular (“bending”); sc = (“scissor”)

As bandas de amida I (≈ 1650 e 1630 cm⁻¹) deformação axial de CO ou as bandas de amida II (≈ 1550 e 1560 cm⁻¹) deformação angular de NH são usadas como bandas características de N-acetilação na região de 1800-1000 cm⁻¹. As principais bandas de absorção ocorrem nos intervalos 3600-3000 cm⁻¹ (deformações axiais de O-H e N-H), 2980-2800 cm⁻¹ (deformações axiais de C-H), 1660-1550 cm⁻¹ (deformações axiais de C=O e angulares de N-H), 1450-1370 cm⁻¹ (deformações angulares de C-H), 1300-1315 cm⁻¹ (deformação axial de

CN), 1150-1155 cm^{-1} (deformação axial de O-H em ligação hidrogênio) e 1020-1080 cm^{-1} (deformação angular de C-O) ⁽⁵¹⁾.

As pastilhas foram preparadas em KBr (grau espectroscópico) na proporção de 1:100 amostra/KBr. O KBr e as amostras foram previamente secas em estufa a vácuo a 30°C por 24 h e depois foram misturadas e trituradas em gral de ágata e prensadas para resultar em pastilhas, que foram secas em estufa a vácuo a 30°C por 6 horas. As análises foram realizadas em equipamento Thermo Nicolet Nexus 470 com transformada de Fourier, com acúmulo de 48 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} , no intervalo de 4000 – 500 cm^{-1} .

3.4. Microscopia eletrônica de varredura

As micrografias das amostras (beta-quitina e quitosana) foram obtidas em um equipamento LEO (modelo 440) com detector OXFORD, operando com feixe de elétrons de 20kV e tensão de 2.85pA. As amostras foram previamente secas em estufa a vácuo a 60°C por 6h, recobertas com ouro (10nm) em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 e mantidas em dessecador até o momento de análise. As imagens obtidas foram tratadas digitalmente utilizando o programa image Tool para a determinação do comprimento das partículas (μm) analisadas.

3.5. Difração de raios X

Difração de raios X é a técnica utilizada para caracterizar materiais de todas as formas. Existem dois tipos gerais de informações estruturais que podem ser estudados por difração de raios X: estrutura eletrônica e estrutura geométrica. Quando o feixe de raios X difrata em um cristal desconhecido a medida do(s) ângulo(s) de difração do(s) raio(s) emergente(s) pode elucidar a distância dos átomos no cristal e, conseqüentemente, a estrutura cristalina.

Em 1937 Clark e Smith ⁽⁴⁹⁾ realizaram estudos sobre a estrutura cristalina de quitina e quitosana usando a técnica de difração de raios X, foi observado que quitina e quitosana apresentam diferentes picos de difração de raios X. Espectros de difração de raios X de β -quitina e quitosana são apresentados na Figura 16 (a) e Figura 16 (b) respectivamente.

(a)

(b)

Figura 16-Difração de raios X de β -quitina (a) e quitosana (b).

Nota-se que o pico cristalino intenso referente ao plano cristalográfico (010) correspondente a $2\theta = 8.21^\circ$ não aparece no difratograma de quitosana. Portanto os picos cristalinos referentes aos planos cristalográficos (010) e (020,110) os quais correspondem a $2\theta = 8.21^\circ$ e $2\theta = 19,76^\circ$ respectivamente diminui com a diminuição do grau de acetilação⁽⁵²⁾. Entretanto quando se trata de quitosanas N-acetiladas as observações acima sofrem variações, espera-se que a adição de unidades GlcNAc as cadeias poliméricas de quitosana seja randômica, o que resulta na ocorrência de produtos menos cristalinos e cristais menos anidros⁽⁵³⁾.

As medidas de difração de raios X foram realizadas em difratômetro RIGAKU com tubo de cobre ($\lambda = 1,54\text{\AA}$), no intervalo de $3-50^\circ$, empregando varredura contínua com velocidade de $1^\circ/\text{min}$. A tensão e a corrente utilizadas foram de 50kV e 100mA, respectivamente. A partir destas medidas, os índices de cristalinidade das amostras de beta-quitina e quitosana foram determinados através da equação abaixo⁽⁵⁴⁾:

$$I_{cr} = \frac{I_{110} - I_{am}}{I_{110}} * 100 \quad [11]$$

Onde:

I_{cr} = índice de cristalinidade

I_{110} = intensidade máxima (em unidades arbitrárias) da difração de rede (110) em $2\theta = 20^\circ$

I_{am} = intensidade de difração (em unidades arbitrárias) de regiões não-ordenadas; nos difratogramas obtidos, foi considerada a intensidade de difração em $2\theta = 16^\circ$

3.6. Estabilidade térmica

A estabilidade térmica das amostras de quitina e quitosana foram estudadas através de medidas termogravimétricas, utilizando o equipamento TGA-50, da Shimadzu, empregando atmosfera dinâmica de ar sintético (20% O_2 e 80% N_2) a uma vazão de 20 mL/min e porta-

amostra de platina. As amostras foram aquecidas a uma razão de 10°/min até 100°C (permanecendo a 100°C durante 20 min, para eliminação de água), e de 100°C até 900°C (permanecendo a 900°C por 5 min). A quantidade de amostra utilizada em cada análise foi de aproximadamente 8 mg.

As amostras de quitina e quitosana analisadas foram previamente armazenadas em um dessecador contendo sílica gel durante 10 dias.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, dividido em duas partes, são apresentados os resultados referentes aos trabalhos desenvolvidos. A primeira parte relata as caracterizações da β -quitina (amostra QTo) extraída de gládios de lulas e da quitosana extensivamente desacetilada (amostra QSo) obtida pelo processo de desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade (Processo DAIUS). Para tais caracterizações as seguintes técnicas foram empregadas: espectroscopia na região do infravermelho (IV), microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios X (DRX), espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H), análise termogravimétrica e viscosimetria capilar. A segunda parte do capítulo se refere aos estudos de N-acetilação da amostra QSo por reação em meio homogêneo e tendo como variável a razão molar $\text{Ac}_2\text{O}/\text{NH}_2$ das unidades GlcN da quitosana de partida.

4.1. Caracterização de beta-quitina e quitosana

A β -quitina (amostra QTo) foi utilizada como matéria-prima para a produção de quitosana por apresentar cadeias poliméricas com orientação paralela nos domínios cristalinos, característica que confere maior acessibilidade aos sítios reativos e a torna mais susceptível à desacetilação que a α -quitina. A quitosana extensivamente desacetilada (amostra QSo) obtida através do Processo DAIUS apresentou características distintas em relação a β -quitina, as quais são evidenciadas nos espectros de infravermelho, nas análises de difração de raios X, microscopia eletrônica de varredura, na espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e por análise termogravimétrica. Todas as caracterizações descritas a seguir tiveram como objetivo avaliar e comparar as estruturas e morfologia das amostras QTo e QSo.

4.1.1. Espectroscopia na Região do Infravermelho

Os espectros das amostras QTo ($\overline{GA} = 80\%$) e QSo ($\overline{GA} = 2\%$) (Figura 17) apresentam diferenças referentes aos conteúdos de unidades GlcNAc e à existência de interações (ligações hidrogênio) nesses polímeros.

Figura 17-Espectros na região do infravermelho das amostras de QTo e QSo.

As bandas de estiramento de $-OH$ e $-NH$ na região de $3600-3000\text{ cm}^{-1}$ nos espectros das amostras QTo e QSo, não apresentam diferenças significativas. As diferenças nos espectros das amostras QTo e QSo são claras na região de $1800-1000\text{ cm}^{-1}$ (Figura 16), pois nesta região as bandas características de quitina e quitosana são evidenciadas^(55,56).

Figura 18-Bandas características na região de 1800-1000 cm^{-1} dos espectros na região do infravermelho das amostras de QTo e QSo.

No espectro da amostra QTo foram identificadas as bandas de deformação angular de NH (banda de amida II, próxima de 1560 cm^{-1}), deformação axial CO (banda de amida I, próxima de 1660 cm^{-1}) atribuída apenas ao grupo C=O em ligação hidrogênio intermolecular com grupos N-H, deformação axial C=O (banda de amida I, próxima de 1630 cm^{-1}), atribuídas as ligações do grupo C=O em ligação hidrogênio, tanto do grupo -NH como do grupo OH do carbono na posição 6, e deformação axial de amida III próxima de 1315 cm^{-1} ⁽⁵⁷⁾. No espectro da amostra QSo as bandas de deformação angular de NH (amida II, próxima de 1560 cm^{-1}) e deformação axial de amida III (próxima de 1315 cm^{-1}) não são observadas

devido ao baixo teor de unidades GlcNAc, decorrente da hidrólise da maioria dos grupos acetamido de β -quitina de partida.

4.1.2. Difração de raios X

Através dos espectros de difração de raios X (Figura 19), é possível distinguir as amostras QTo e QSo. O espectro da amostra QTo apresenta dois picos cristalinos em 2θ aproximadamente $8,3^\circ$ e $19,8^\circ$, referentes aos planos (010) e (020,110), respectivamente, ⁽⁶⁾ com sinais mais intensos e mais bem definidos do que os apresentados pela amostra QSo. Esses fatos e a ausência do pico cristalino em $2\theta=8^\circ$ no difratograma da amostra QSo fornecem indicativos de que a reação de desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade resulta em amostras menos cristalinas ⁽¹³⁾.

Figura 19-Difratogramas da amostras QTo e QSo.

De fato os valores de índice de cristalinidade das amostras QTo e QSo (Tabela 6), calculados empregando o método descrito por Focher e colaboradores ⁽⁵⁴⁾, confirmam que a quitosana (amostra QSo) é menos cristalina que a β -quitina de partida.

Tabela 6-Valores de índice de cristalinidade (I_{Cr})

Amostra	I_{Cr} (%)
QTo	77
QSo	58

4.1.3. Microscopia Eletrônica de Varredura

A desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade provoca alterações na morfologia das partículas, as quais podem ser avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), como pode ser observado nas micrografias das amostras QTo e QSo (Figuras 20 e 21). De fato, as partículas da amostra QTo apresentam superfície relativamente lisa, enquanto que as partículas da amostra QSo, obtida pelo processo DAIUS, apresentam superfície mais rugosa e destituída de fibras, sendo também observada a redução das dimensões médias e o conseqüente aumento da área superficial das partículas. A diminuição da área média das partículas está associada à energia fornecida durante a irradiação da suspensão QTo com ultrassom de alta intensidade, sendo as alterações morfológicas da amostra QSo atribuídas ao efeito de cavitação ⁽⁵⁸⁾. Fazendo uso do programa Image Tool foi possível determinar o comprimento das amostras QTo (691,83 μm) e QSo (255,57 μm), confirmando a diminuição da área média das partículas.

(a)

(b)

Figura 20-Micrografias das amostras (a) QTo e (b) QSo, com ampliação de 75x.

(a)

(b)

Figura 21-Micrografias das amostras (a) QTo e (b) QSo, com ampliação de 500x.

Analisando as micrografias apresentadas nas Figuras 20 (b) e 21 (b), observamos a ocorrência de um acentuado processo de desgaste e descamação da superfície das partículas da amostra QSo. No entanto esse desgaste da superfície das partículas não é verificado nas micrografias da amostra QTo (Figura 20(a) e 21(a)). Portanto podemos associar esse desgaste das superfícies das partículas ao processo de desacetilação e ao efeito de cavitação ⁽¹⁷⁾.

4.1.4. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio RMN ¹H

A técnica de RMN ¹H foi utilizada para determinar o grau médio de acetilação ($\overline{GA}$) das amostras QTo e QSo (Tabela 7).

Tabela 7-Valores do grau médio de acetilação ($\overline{GA}$)

Amostra	$\overline{GA}$ (%)
QTo	80
QSo	2

Os espectros de RMN ¹H das amostras QTo e QSo são apresentados na Figura 22 e 23 respectivamente.

Figura 22-Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da amostra QTo (DCI 35%, 40°C).

Figura 23-Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da amostra QSo (DCI/D $_2$ O 1% (v/v), 90°C).

Através dos espectros é possível observar que o sinal em 2,1 ppm referente aos hidrogênios metílicos das unidades GlcNAc é bem mais intenso no espectro da amostra QTo ($\overline{GA} = 80\%$) do que naquele da amostra QSo ($\overline{GA} = 2\%$). A diminuição da intensidade desse

sinal está relacionada com a quantidade de unidades GlcNAc presentes nas cadeias poliméricas, sendo que essa quantidade diminui durante o processo de Desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade, pois ocorre a hidrólise dos grupos acetamido das unidades GlcNAc. Tais evidências confirmam a eficiência do processo DAIUS para obtenção de quitosana extensivamente desacetilada (amostra QSo).

4.1.5. Análise Termogravimétrica

O uso da técnica termogravimétrica TG bem como o cálculo da sua derivada (DTG) teve como objetivo avaliar a estabilidade térmica das amostras QTo e QSo. As curvas de Termogravimetria (TG)/ Termogravimetria derivada (DTG) das amostras QTo e QSo obtidas em atmosfera de ar sintético são apresentadas nas Figuras 24 e 25, respectivamente.

Figura 24-Curvas TG/DTG da amostra QTo sob atmosfera dinâmica de ar sintético (vazão de gás 20 ml/min), massa da amostra 8mg, suporte de amostra de platina.

Figura 25-Curvas TG/DTG da amostra QSo sob atmosfera dinâmica de ar sintético (vazão de gás 20 ml/min), massa da amostra 8mg, suporte de amostra de platina.

A partir das curvas TG/DTG das amostras QTo e QSo é possível inferir que o primeiro evento térmico (20-190 °C) refere-se ao processo de desidratação e o segundo evento térmico (190-410 °C) refere-se ao processo de decomposição dos polímeros ⁽²⁰⁾. A temperatura *onset*, é definida como a temperatura do início do evento térmico, é determinada pelo ponto de intersecção dos segmentos lineares da curva TG (Tabela 8) é maior na amostra QTo, ou seja, a amostra QTo apresenta uma maior estabilidade térmica do que a amostra QSo, e este fato está relacionado com o grau médio de acetilação e com a cristalinidade das amostras ⁽²⁰⁾.

Tabela 8-Valores de temperatura de decomposição térmica e perda de massa no intervalo 180-450 °C das amostras QTo e QSo

Amostra	$T_o^{(a)}$	$T_f^{(b)}$	$T_{m\acute{a}x}^{(c)}$	T_{onset}	Perda de massa (%) ^(d)
QTo	190	408	329	298	60
QSo	185	400	272	240	41

(a) Temperatura inicial de degradação, (b) temperatura final de degradação, (c) temperatura de máxima degradação, (d) perda de massa.

Através dos dados apresentados na Tabela 8 é observado que a perda de massa da amostra QSo é menor que a da amostra QTo, portanto é provável que a perda de massa esteja relacionada com a quantidade de unidades GlcNAc presentes nas cadeias poliméricas das amostras QTo e QSo. Assim durante o segundo evento térmico é provável que ocorra a decomposição das unidades acetiladas dos polímeros, o que justifica a perda de massa ser maior no caso da amostra QTo.

4.1.6. Determinação da massa molar média viscosimétrica de quitina e quitosana.

As viscosidades intrínsecas das amostras QTo e QSo foram determinadas por viscosimetria capilar. A viscosidade intrínseca é proporcional ao volume hidrodinâmico, depende da massa molar, do intumescimento no solvente, da forma e da rigidez da macromolécula ⁽⁵⁹⁾. As massas molares médias viscosimétricas das amostras QTo e QSo foram determinadas a partir da viscosidade intrínseca, fazendo uso da equação Mark-Houwink. Na Tabela 9 são apresentados os valores de viscosidade intrínseca, massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$) e grau médio viscosimétrico de polimerização $\overline{GP}_v$ das amostras de QTo e QSo.

Tabela 9-Valores de viscosidade intrínseca, massa molar média viscosimétrica e grau médio viscosimétrico de polimerização ($\overline{GP}_v$) das amostras QTo e QSo

Amostra	$[\eta]$ (mL/mg)	$\overline{M}_v$ (g/mol) ^(a)	$\overline{GP}_v$ ^(c)
QTo	4,0079	$1,32 \times 10^6$	6783
QSo	1,3528	$3,54 \times 10^5$	2187

(a) Determinado através da equação de Mark-Houwink, onde as constantes K e α estão descritas na literatura ⁽⁷⁾

(b) Determinado através do $\overline{GA}$ e $\overline{M}_v$.

É observado que os valores de viscosidade intrínseca e de massa molar média viscosimétrica da amostra QTo são maiores que os da amostra QSo, sendo as diferenças decorrentes da quantidade de unidades GlcNAc presentes nas cadeias poliméricas e da ocorrência de despolimerização durante a etapa de desacetilação. A Desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade provoca a hidrólise dos grupos acetamido das unidades GlcNAc da amostra QTo, e também provoca a despolimerização das cadeias poliméricas através da clivagem das ligações glicosídicas ^(58,60). Outro fato que confirma a ocorrência de despolimerização das cadeias poliméricas é o valor do grau médio viscosimétrico de polimerização, esse é menor na amostra QSo, assim a amostra QSo apresenta menor massa molar média viscosimétrica e menor tamanho médio das cadeias.

4.2. Estudos de N-acetilação de quitosana

As reações de N-acetilação de quitosana (amostra QSo) resultaram em experimentos reprodutíveis, que em todos os casos propiciaram uma recuperação de 70-90% da massa do material inicial na forma de produto, *i. e.* quitosana N-acetilada. As amostras de quitosana N-acetilada obtidas neste trabalho foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho (IV), microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios X (DRX) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H), viscosimetria

capilar, análise termogravimétrica e os resultados das análises foram comparados com os da quitosana de partida (amostra QSo).

A relação entre o grau médio de acetilação das quitosanas N-acetiladas e a razão molar $\text{Ac}_2\text{O}/\text{NH}_2$ empregada nas reações de N-acetilação da quitosana de partida (amostra QSo) pode ser avaliada analisando os dados da Tabela 10 e da Figura 26.

Tabela 10-Valores do grau médio de acetilação ($\overline{GA}$) das quitosanas N-acetiladas e da razão molar $\text{Ac}_2\text{O}/\text{NH}_2$ empregada nas reações de N-acetilação da quitosana de partida (amostra QSo)

Amostra	Razão molar $\text{Ac}_2\text{O}/\text{NH}_2$	$\overline{GA}$ (%) ^{*(a)}
RQSo1	0,3	25,5
RQSo2	0,4	34
RQSo3	0,5	40,5
RQSo4	0,6	48
RQSo5	0,7	51,5

(a) Determinado por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio * Média dos resultados do conjunto 1 e 2.

Figura 26-Relação entre o grau médio de acetilação e razão molar $\text{Ac}_2\text{O}/\text{NH}_2$.

Foi observada uma relação linear entre o grau médio de acetilação e a razão molar $\text{Ac}_2\text{O}/\text{NH}_2$ (Figura 26). Assim à medida que a razão molar $\text{Ac}_2\text{O}/\text{NH}_2$ aumenta o grau médio de acetilação aumenta. Essa observação está em concordância com trabalho anterior ⁽²⁸⁾.

4.2.1. Massa molar média viscosimétrica de quitosanas N-acetiladas

A viscosidade intrínseca é uma propriedade hidrodinâmica que pode ser utilizada para determinar a massa molar média do polímero ⁽⁶¹⁾. As massas molares médias viscosimétricas das amostras de quitosana N-acetiladas foram calculadas a partir dos valores de viscosidade intrínseca determinados por viscosimetria capilar. Na Tabela 11 são apresentados os valores de viscosidade intrínseca, massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$), grau médio viscosimétrico de polimerização ($\overline{GP}_v$) e grau médio de acetilação das amostras de quitosana N-acetiladas.

Tabela 11-Valores do grau médio de acetilação, viscosidade intrínseca, massa molar média viscosimétrica e grau médio viscosimétrico de polimerização ($\overline{GP}_v$) ^(a)

Amostra	$\overline{GA}\%$	$[\eta]$ (mL/mg)	$\overline{M}_v$ (g/mol)	$\overline{GP}_v$
QSo	2	1,3528	$3,54 \times 10^5$	2187
RQSo1/RQSo1r	25,5	1,1005	$1,82 \times 10^5$	1059
RQSo2/RQSo2r	34	0,9361	$1,49 \times 10^5$	850
RQSo3/RQSo3r	40,5	0,8142	$1,10 \times 10^5$	617
RQSo4/RQSo4r	48	1,0686	$1,51 \times 10^5$	833
RQSo5/RQSo5r	51,5	1,0836	$1,53 \times 10^5$	837

(a) Valores médios calculados a partir das análises de amostras obtidas pela execução de duas reações independentes de N-acetilação de quitosana.

A reação de N-acetilação de quitosana introduz grupos acetamido nas cadeias poliméricas, convertendo unidades GlcN em unidades GlcNAc, o que provoca o aumento da massa molar média. No entanto através dos resultados apresentados na Tabela 10, observamos que as massas molares médias viscosimétricas das amostras de quitosanas N-acetiladas foram

menores do que a da quitosana de partida (amostra QSo). A diminuição da massa molar média viscosimétrica das amostras de quitosanas N-acetiladas pode ser devido à ocorrência de despolimerização ou ao fracionamento das quitosanas N-acetiladas em partes solúveis e insolúveis durante a etapa de recuperação do produto após a execução da reação de N-acetilação.

Segundo Vårum e colaboradores ⁽²⁵⁾, quitosanas parcialmente N-acetiladas podem ser separadas em frações solúveis em meio neutro e em frações insolúveis em meio neutro. Assim, o fracionamento de quitosanas parcialmente N-acetiladas em pH 7,5 resulta em uma fração de quitosana solúvel que possui $\overline{GA}$ elevado e baixa massa molar, e uma fração de quitosana insolúvel que apresenta $\overline{GA}$ baixo e massa molar elevada.

Tsao e colaboradores ⁽⁶²⁾ realizaram um estudo cinético sobre a despolimerização de quitosana em função da concentração de ácido acético aquoso e da temperatura e concluíram que a despolimerização é favorecida com o aumento da temperatura e com o aumento da concentração do ácido. Morris e colaboradores ⁽⁶³⁾ realizaram um estudo cinético de despolimerização de quitosanas em diferentes temperaturas e observaram que a despolimerização em tampão de acetato de sódio/ácido acético 0,2 M (pH=4,3) a 25 °C ocorre apenas após longos tempos de armazenamento. Solier e colaboradores ⁽³⁰⁾ relataram que a precipitação de quitosanas N-acetiladas pela adição de amônia aquosa torna-se mais difícil de ser alcançada nos casos das amostras cujos valores de $\overline{GA}$ estão inseridos no intervalo $45\% < GA < 60\%$.

A ocorrência de despolimerização durante a reação de obtenção das quitosanas N-acetiladas é pouco provável, já que a reação de N-acetilação foi realizada em solução de ácido acético aquoso 0,5%, temperatura de 25 °C e tempo de reação de 3 dias. De fato, como mencionado anteriormente ⁽⁶²⁾, a despolimerização de quitosana em solução de ácido acético aquoso ocorre apenas em concentrações elevadas do ácido, temperaturas elevadas e longos

tempos de reação. Portanto é possível associar a diminuição da massa molar média viscosimétrica (Tabela 11) ao fracionamento das amostras de quitosanas N-acetiladas durante o processo de recuperação dos produtos.

Após a execução da reação de N-acetilação, solução diluída de NaOH foi adicionada ao meio reacional até $\text{pH} \approx 7,5$, sendo que é conhecido que nesse meio as quitosanas com elevados valores de $\overline{GA}$ são mais solúveis ⁽³⁰⁾ e, assim, a fração de quitosana insolúvel é menor nas amostras de quitosanas N-acetiladas com elevados valores de $\overline{GA}$. As quitosanas N-acetiladas não foram purificadas, essas foram dissolvidas em tampão 0,3M AcOH/0,2M AcONa para realização das medidas de viscosidade intrínseca, todas as amostras foram solúveis nesse tampão. Portanto a diminuição da massa molar média viscosimétrica não é devido à falta de solubilidade das amostras de quitosana N-acetiladas, essa diminuição esta relacionada com a quantidade de material precipitado.

4.2.2. Espectroscopia na Região do Infravermelho

Para confirmar que não ocorreu a O-acetilação da quitosana de partida (amostra QSo) durante as reações de N-acetilação foram analisados os espectros de infravermelho das amostras de quitosanas N-acetiladas. Tais análises revelaram a ausência da banda de vibração próxima de 1730 cm^{-1} correspondente a éster carboxílico, confirmando que a acetilação de grupos hidroxila de quitosana não ocorreu. Através da comparação dos espectros de infravermelho das amostras QSo (Figura 27) e das amostras de quitosana N-acetiladas (Conjunto 1 (Figura 28 (a)) e (Conjunto 2 (Figura 28 (b))) na região de $1800\text{-}1000 \text{ cm}^{-1}$ foi verificado que as amostras de quitosana N-acetiladas apresentaram as mesmas bandas características da amostra QSo, com alguns deslocamentos.

Figura 27-Espectro na região do infravermelho da amostra QSo, bandas características na região de 1800-1000 cm^{-1} .

(a)

(b)

Figura 28-Espectros na região do infravermelho (a) conjunto 1 e (b) conjunto 2, bandas características na região de 1800-1000 cm^{-1} .

No espectro da amostra QSo a banda de amida I está desdobrada em duas bandas (1660 e 1623 cm^{-1}), sendo que esse desdobramento geralmente está associado a interações intermoleculares nos domínios cristalinos ⁽⁵⁶⁾. Padrões semelhantes são observados nos espectros das quitosanas N-acetiladas e, assim como observado no espectro da amostra QSo, a banda de estiramento angular de amida II na região de 1550 cm^{-1} está ausente.

4.2.3. Microscopia Eletrônica de Varredura

As micrografias das amostras RQSo1 e RQSo5 (Representativas do conjunto 1) e RQSo1r e RQSo5r (Representativa do conjunto 2), são apresentadas nas Figuras 29 e 30.

(a)

(b)

Figura 29-Micrografias das amostras (a) RQSo1 e (b) RQSo5, com ampliação de 500x.

(a)

(b)

Figura 30-Micrografias das amostras (a) RQSo1r e (b) RQSo5r, com ampliação de 500x.

Foi observada (Figuras 29 (a) e 30 (a)) a ocorrência de um processo de desgaste da superfície das partículas das amostras RQSo1 ($\overline{GA} = 26\%$) e RQSo1r ($\overline{GA} = 25\%$), o qual é menos acentuado nas amostras RQSo5 ($\overline{GA} = 51\%$) e RQSo5r ($\overline{GA} = 52\%$) (Figuras 29 (b) e 30 (b)). Tais observações sugerem que o aumento na porcentagem de unidades GlcNAc torna as superfícies das partículas mais semelhantes à superfície das partículas da amostra QTo (Figura 20 (a)). Essas alterações na superfície das partículas das amostras de quitosanas N-acetiladas estão relacionadas com os processos envolvidos na reação de acetilação. Durante a reação a matéria-prima de partida (amostra QSo) passa por um processo de solubilização, onde ocorre interação polímero-solvente, fato que provoca mudança na superfície da partícula.

4.2.4. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H)

A técnica de RMN ^1H foi utilizada para determinar o grau médio de acetilação ($\overline{GA}$) e o parâmetro de acetilação (PA) das amostras de quitosana N-acetiladas (Conjunto 1 e 2).

O espectro de RMN ^1H da amostra RQSo4 (representativa dos conjuntos 1 e 2) é mostrado na Figura 31.

Figura 31-Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da amostra RQSo4 (DCI/D2O 1% (v/v), 90°C, pD 2-3).

Por intermédio da análise do espectro de RMN ^1H da amostra RQSo4 cinco sinais (a-e) foram identificados (Tabela 12).

Tabela 12-Deslocamentos químicos (ppm) de hidrogênio no espectro de RMN ^1H da amostra RQSo4

Unidade	Hidrogênio			
	H-1	H-2	H-2/6	H-GlcNAc
GlcNAc (A)	4,6	-	3,1-4,0	2,1
GlcN (D)	4,9	3,2	3,1-4,0	-

Os sinais dos núcleos H-1 e H-2 da unidade GlcN ocorrem em 4,9 ppm (a) e 3,2 ppm (d), respectivamente, enquanto o sinal em 4,6 ppm (b) corresponde ao H-1 da unidade GlcNAc e o sinal em 2,1 ppm (e) refere-se aos três hidrogênios metílicos das unidades GlcNAc. Os sinais observados na região de deslocamento químico 3,1-4,0 ppm correspondem aos hidrogênios ligados aos carbonos 2 a 6 do anel glicopiranosídico ⁽⁴⁸⁾. Quando comparamos os espectros das amostras QSo (Figura 23) e RQSo4 (Figura 31), a diferença mais significativa encontra-se em $\delta=2,1$, sendo que esse sinal é mais definido e mais intenso no espectro da amostra RQSo4, o que confirma uma porcentagem maior de unidades GlcNAc na amostra RQSo4.

Na Figura 32 é apresentada a região de ressonância dos hidrogênios anoméricos da amostra RQSo4. O sinal do H-1 da unidade GlcNAc tem dois picos relativamente bem resolvidos, que refletem duas sequências de díades AD(GlcNAc-GlcN) e AA(GlcNAc-GlcNAc). Essas ressonâncias sugerem que o sinal do H-1 da unidade GlcNAc é sensível a um vizinho mais próximo, muito provavelmente, o resíduo que se segue na cadeia ⁽⁴⁸⁾.

Figura 32-Espectro de RMN ^1H (500 MHz) na região de ressonância dos hidrogêneos anoméricos da amostra RQSo4 ($\overline{GA}$ = 49%).

Para obter os valores das intensidades dos sinais de H-1 de unidades GlcNAc e GlcN, os espectros de RMN ^1H foram tratados matematicamente empregando-se uma função Lorentziana, o qual permite a deconvolução de seus picos componentes. A seguir é apresentado o gráfico de deconvolução da amostra RQSo4 (Figura 33).

Figura 33-Deconvolução do espectro de RMN ^1H da amostra RQSo4.

Os valores das intensidades I_{AA} , I_{AD} , I_{DD} e I_{DA} (Conjunto 1 e 2) são apresentados nas Tabelas 13 e 14 respectivamente.

Tabela 13-Valores da intensidade dos sinais referentes às sequências I_{AA} (GlcNAc- GlcNAc), I_{DD} (GlcN-GlcN), I_{AD} (GlcNAc-GlcN) e I_{DA} (GlcN-GlcNAc) (Conjunto 1)

Amostra	I_{AA}	I_{DD}	I_{AD}	I_{DA}
RQSo1	0,088	0,253	0,234	0,333
RQSo2	0,170	0,270	0,210	0,310
RQSo3	0,281	0,225	0,293	0,199
RQSo4	0,190	0,130	0,140	0,140
RQSo5	0,303	0,207	0,253	0,174

Tabela 14-Valores da intensidade dos sinais referentes às sequências I_{AA} (GlcNAc- GlcNAc), I_{DD} (GlcN-GlcN), I_{AD} (GlcNAc-GlcN) e I_{DA} (GlcN-GlcNAc) (Conjunto 2)

Amostra	I_{AA}	I_{DD}	I_{AD}	I_{DA}
RQSo1r	0,078	0,258	0,210	0,381
RQSo2r	0,148	0,261	0,248	0,252
RQSo3r	0,209	0,247	0,251	0,221
RQSo4r	0,287	0,190	0,268	0,177
RQSo5r	0,370	0,164	0,243	0,154

Os valores das intensidades dos sinais são essenciais para calcular os parâmetros F_{AA} , F_{AD} e F_{DA} e então convertê-los em um único parâmetro PA.

A comparação entre os valores de PA e GA das amostras de quitosanas N-acetiladas do conjunto 1 e 2 revelou uma relação aproximadamente linear expressando a diminuição dos valores de PA com aumento dos valores de GA (Figura 34). Foi verificado que para as amostras pouco acetiladas (RQSo1, RQSo1R) PA apresentou valores acima de 1, indicando ligeira tendência a uma estrutura alternada, contudo nas amostras cujo $\overline{GA}$ variou no intervalo

33%<GA<50% PA apresentou valores próximos de 1, indicando o predomínio de uma distribuição randômica das unidades GlcNAc e GlcN ao longo das cadeias poliméricas, o que é consistente com o modelo estatístico de Bernoulli para copolímeros. Somente para valores de PA abaixo de 0,5 ou acima de 1,5 é que ocorrem os predomínios das distribuições em blocos ou alternada das unidades GlcNAc e GlcN, respectivamente, situações que não foram observadas nas amostras do conjunto 1 e 2.

(a)

(b)

Figura 34-Relação entre o PA e ($\overline{GA}$) (a) Conjunto 1 e (b) Conjunto 2.

Nas Tabelas 15 e 16 são apresentados os valores de $\overline{GA}$, PA e das sequências de díades (F_{AA} , F_{DD} , F_{AD}) das amostras do conjunto 1 e 2. Analisando esses dados é observado que nos dois conjuntos os valores da sequência de díade F_{AA} aumentam com o aumento do $\overline{GA}$ e que os valores da sequência de díade F_{AD} são maiores quando o valor de $\overline{GA}$ é baixo ($\overline{GA} \leq 35\%$), o que pode ser mais facilmente observado na Figura 35. O aumento nos valores de F_{AA} é consequência da reação de N-acetilação homogênea que converte as unidades GlcN em unidades GlcNAc, gerando mais díades AA ao longo das cadeias do polímero.

Tabela 15-Valores do grau médio de acetilação ($\overline{GA}$), parâmetro de acetilação (PA) e das sequências de díades (F_{AA} , F_{DD} , F_{AD}) (Conjunto 1)

Amostra	F_{AA}	F_{DD}	F_{AD}	PA	$\overline{GA}$ (%)
RQSo1	0,0969	0,278	0,624	1,3	26
RQSo2	0,177	0,281	0,541	1,09	35
RQSo3	0,281	0,225	0,492	0,988	41
RQSo4	0,316	0,216	0,466	0,942	49
RQso5	0,323	0,220	0,455	0,921	51

Tabela 16-Valores do grau médio de acetilação ($\overline{GA}$), parâmetro de acetilação e das sequências de díades (F_{AA} , F_{DD} , F_{AD}) (Conjunto 2)

Amostra	F_{AA}	F_{DD}	F_{AD}	PA	$\overline{GA}$ (%)
RQSo1r	0,084	0,278	0,637	1,32	25
RQSo2r	0,163	0,287	0,550	1,11	33
RQSo3r	0,225	0,266	0,508	1,01	40
RQSo4r	0,311	0,206	0,482	0,975	47
RQso5r	0,397	0,176	0,426	0,896	52

(a)

(b)

Figura 35-Relação entre $(\overline{GA})$ e frequências (F_{AA} ▼, F_{DD} ● e F_{AD} ■) (a) Conjunto 1 e (b) Conjunto 2.

4.2.5. Difração de raios X

Para que um polímero cristalize é necessário que o mesmo apresente um alto nível de organização das unidades repetitivas (meros), tanto do ponto de vista de composição quanto de estereoquímica. Copolímeros são constituídos por dois meros diferentes na cadeia principal e podem formar-se segundo vários arranjos geométricos (alternado, aleatório e bloco), quanto mais irregulares ou aleatórios os arranjos, maior a tendência a estrutura não cristalina.

Os valores de índice de cristalinidade das amostras de quitosanas N-acetiladas (Conjunto 1 e 2) foram calculados empregando o método descrito por Focher e colaboradores⁽⁵⁴⁾ e a média dos valores de índice de cristalinidade é apresentado na Tabela 17.

Tabela 17-Média do grau médio de acetilação ($\overline{GA}$) e do índice cristalinidade (I_{cr}) das amostras de quitosana N-acetiladas (Conjunto 1 e 2)

Amostra	$\overline{GA}$ (%)	$\bar{I}_{cr}$ (%)
QSo	2	58
RQSo1/RQSo1r	25,5	69
RQSo2/RQSo2r	34	62,7
RQSo3/RQSo3r	40,5	65,5
RQSo4/RQSo4r	48	62,4
RQSo5/RQSo5r	51,5	55,5

A presença de unidades GlcNAc nas cadeias de quitosana em decorrência da reação de N-acetilação provocou mudanças na estrutura cristalina das amostras de quitosana N-acetiladas em comparação com a quitosana de partida (amostra QSo). Essas mudanças estão relacionadas com a distribuição dessas unidades ao longo das cadeias poliméricas, e analisando os resultados apresentados na Tabela 17 observamos que as amostras RQSo1 e RQSo1r apresentam maior valor de índice de cristalinidade. Essas amostras são constituídas

por cadeias que possuem menor porcentagem de unidades GlcNAc, e apresentam uma tendência a formação de arranjos alternados, o que favorece a formação de estrutura mais cristalina. Já o menor valor de índice de cristalinidade foi evidenciado nas amostras RQSo5 e RQSo5r, cujas cadeias são constituídas por porcentagem maior de unidades GlcNAc, e essas estão distribuídas aleatoriamente nas cadeias poliméricas.

Segundo Ogawa e Yui ⁽⁵³⁾ as três formas estruturais de quitosana (formas hidratada, anidra e amorfa) podem ser analisadas através de difração de raios X (ângulos de Bragg). A forma hidratada apresenta pico intenso em $2\theta = 10,4^\circ$ referente ao plano cristalográfico (020), a forma anidra apresenta pico intenso em $2\theta = 15^\circ$, referente ao plano cristalográfico (120). Contudo a forma amorfa da quitosana não apresentou pico definido, apenas um pico alargado em $2\theta \approx 20^\circ$. Campana-Filho e colaboradores ⁽⁶⁾ relataram que a β -quitina extraída de gládios de lulas exibe dois picos cristalinos bem definidos, referentes aos planos (010) e (020,110), os quais correspondem a $2\theta = 8,21^\circ$ e $2\theta = 19,76^\circ$ respectivamente. Os ângulos de Bragg das amostras QTo e QSo são apresentados na Tabela 18. Nota-se que esses ângulos são semelhantes aos descritos por Ogawa e Yui ⁽⁵³⁾ e Campana Filho ⁽⁶⁾ e colaboradores, e que a forma estrutural anidra da quitosana não foi identificada na amostra QSo.

Tabela 18-Ângulos de Bragg 2θ dos difratogramas das amostras QTo e QSo

Amostra	2θ
QTo	$\approx 8,2^\circ, \approx 11,6^\circ, \approx 19,8^\circ$
QSo	$\approx 11,6^\circ, \approx 20^\circ$

Os valores de ângulos de Bragg referentes aos principais picos identificados nos difratogramas das amostras QTo e QSo também foram observados nos difratogramas das amostras de quitosana N-acetiladas (Tabelas 19 e 20).

Tabela 19-Ângulos de Bragg 2θ dos difratogramas das amostras de quitosanas N-acetiladas do conjunto 1

Amostra	2θ
RQSo1	$\approx 11,3^\circ, \approx 20,03^\circ$
RQSo2	$\approx 8,8^\circ, \approx 11,3^\circ \approx 20,03^\circ$
RQSo3	$\approx 8,5^\circ, \approx 11,05^\circ \approx 20,03^\circ$
RQSo4	$\approx 8,5^\circ, \approx 11,09^\circ \approx 19,91^\circ$
RQSo5	$\approx 8,6^\circ, \approx 20,15^\circ$

Tabela 20-Ângulos de Bragg 2θ dos difratogramas das amostras de quitosanas N-acetiladas do conjunto 2

Amostra	2θ
RQSo1r	$\approx 9,6^\circ, \approx 20,3^\circ$
RQSo2r	$\approx 8,2^\circ, \approx 11,2^\circ \approx 20^\circ$
RQSo3r	$\approx 8,5^\circ, \approx 11,7^\circ \approx 20,10^\circ$
RQSo4r	$\approx 8,3^\circ, \approx 11,5^\circ \approx 20,15^\circ$
RQSo5r	$\approx 8,5^\circ, \approx 20,15^\circ$

Foi verificado que amostras menos acetiladas (RQSo1 e RQSo1r) não apresentaram picos em $2\theta \cong 8^\circ$ referente ao pico cristalino de β -quitina. No entanto nas amostras mais acetiladas ($30 < \overline{GA} < 55\%$) um pico em $2\theta \cong 8^\circ$ é observado, logo podemos sugerir que as amostras de quitosana N-acetiladas adquiriram características semelhantes a da β -quitina. Essas observações são melhor visualizadas nos difratogramas das amostras de quitosanas N-acetiladas (Figura 36) e das amostras RQSo1 e RQSo5, os quais foram tratados matematicamente empregando-se uma função Lorentziana, e separados em seus picos componentes (Figura 37).

(a)

(b)

Figura 36-Difratogramas das amostras de quitosana N-acetiladas (a) conjunto 1 e (b) conjunto 2.

(a)

(b)

Figura 37-Deconvolução dos difratogramas das amostras RQSo1 e RQSo5.

Analisando o difratograma da amostra RQSo1 (Figura 37(a)) fica evidente a presença de um pico cristalino bem definido ($2\theta \cong 20,03^\circ$), a presença de um ombro em torno de $2\theta \cong 11,3^\circ$ e ausência de qualquer pico em torno de $2\theta \cong 8^\circ$, no entanto no difratograma da amostra RQSo5 (Figura 37(b)) é observado a presença de dois picos cristalinos bem definidos, sendo um pico referente a $2\theta \cong 8^\circ$.

4.2.6. Análise Termogravimétrica

As curvas de Termogravimetria (TG) e Termogravimetria Derivada (DTG) das amostras do conjunto 1 (Figuras 38 e 39) e conjunto 2 (Figuras 40 e 41) foram obtidas em atmosfera dinâmica de ar sintético.

Figura 38-Curvas TG das amostras conjunto 1 sob atmosfera dinâmica de ar sintético (vazão de gás 20 ml/min), massa da amostra 8mg, suporte de amostra de platina.

Figura 39-Curvas DTG das amostras conjunto 1 sob atmosfera dinâmica de ar sintético (vazão de gás 20 ml/min), massa da amostra 8mg, suporte de amostra de platina.

Figura 40-Curvas TG das amostras conjunto 2 sob atmosfera dinâmica de ar sintético (vazão de gás 20 ml/min), massa da amostra 8mg, suporte de amostra de platina.

Figura 41-Curvas DTG das amostras conjunto 2 sob atmosfera dinâmica de ar sintético (vazão de gás 20 ml/min), massa da amostra 8mg, suporte de amostra de platina.

Tabela 21-Valores de temperatura de decomposição térmica e perda de massa no intervalo 180-450 °C da amostra de quitosana e quitosanas N-acetiladas (conjunto 1)

Amostra	T _o ^(a)	T _f ^(b)	T _{máx} ^(c)	T _{onset}	Perda de massa (%) ^(d)
QSo	185	400	272	240	41
RQSo1	190	425	309	283	48
RQSo2	210	440	307	274	50
RQSo3	206	430	311	281	49
RQSo4	210	427	312	294	46
RQSo5	218	425	312	291	48

(a) Temperatura inicial de degradação, (b) temperatura final de degradação, (c) temperatura de máxima degradação, (d) perda de massa.

Tabela 22-Valores de temperatura de decomposição térmica e perda de massa no intervalo 180-450 °C da amostra de quitosana e quitosanas N-acetiladas (conjunto2)

Amostra	T _o ^(a)	T _f ^(b)	T _{máx} ^(c)	T _{onset}	Perda de massa (%) (d)
QSo	185	400	272	240	41
RQSo1r	220	435	308	282	44
RQSo2r	200	430	305	284	46
RQSo3r	208	430	309	288	46
RQSo4r	212	425	307	281	46
RQSo5r	218	430	307	282	46

(a) Temperatura inicial de degradação, (b) temperatura final de degradação, (c) temperatura de máxima degradação, (d) perda de massa.

A partir das curvas TG/DTG das amostras de quitosanas N-acetiladas é possível inferir que o primeiro evento térmico (20-220 °C) refere-se ao processo de desidratação e o segundo evento térmico (220-440 °C) refere-se ao processo de decomposição dos polímeros. Na amostra QSo os eventos térmicos de desidratação (20-185 °C) e decomposição do polímero (185-400 °C), ocorrem em temperaturas inferiores às amostras de quitosanas N-acetiladas. As temperaturas *onset* (Tabelas 21 e 22) das amostras de quitosanas N-acetiladas são maiores que a da amostra QSo e, portanto, as quitosanas N-acetiladas apresentam maior estabilidade térmica que a amostra QSo. Este fato está relacionado com a conversão de unidades GlcN em GlcNAc em decorrência da acetilação homogênea da amostra QSo, o que provoca mudanças na estrutura cristalina do polímero e afeta a sua estabilidade térmica. A perda de massa da amostra QSo é menor que a das amostras de quitosanas N-acetiladas, assim podemos relacionar a perda de massa com a porcentagem de unidades GlcNAc presentes nas cadeias do polímero.

5. CONCLUSÕES

A aplicação do processo de desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade (Processo DAIUS) à beta-quitina extraída de gládios de *Loligo sp* propiciou a obtenção de quitosana com grau médio de acetilação baixo ($\overline{GA} = 2\%$) e elevada massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v = 3,54 \times 10^5$ g/mol). Esse produto, denominado como amostra QSo, foi empregado como substrato para as reações homogêneas de N-acetilação e seu emprego permitiu variar amplamente o conteúdo de unidades GlcNAc nas cadeias das quitosanas N-acetiladas, sendo que os valores de $\overline{GA}$ variaram no intervalo $25\% < GA < 50\%$.

Através das análises de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio foi comprovada a obtenção das amostras de quitosana N-acetiladas pela execução da reação de N-acetilação homogênea da amostra QSo. Os picos nos espectros de RMN ^1H que evidenciam a N-acetilação de quitosana foram observados na região de deslocamento químico de 2,1 ppm, sinal correspondente aos hidrogênios metílicos das unidades GlcNAc e em 4,6 ppm, sinal referente ao H-1 da unidade GlcNAc. Assim, tais sinais se tornaram mais intensos e definidos com o aumento do $\overline{GA}$, cuja variação foi diretamente proporcional à razão molar $\text{Ac}_2\text{O}/\text{NH}_2$ empregada na reação de N-acetilação.

Com base nos espectros de RMN ^1H foi possível determinar o parâmetro de acetilação, PA, das quitosanas N-acetiladas e assim determinar a distribuição das unidades GlcN e GlcNAc nas cadeias poliméricas. Todas as amostras de quitosanas N-acetiladas (Conjunto 1 e 2) apresentaram distribuição randômica das unidades GlcN e GlcNAc, confirmando que a reação de N-acetilação de quitosana em meio homogêneo é um processo eficiente para produção de quitosanas com distribuição randômica das unidades GlcNAc e GlcN e, consequentemente, mais solúveis, o que é muito importante para aplicações diversas, como por exemplo, biomédica.

As amostras de quitosanas N-acetiladas obtidas nesse trabalho apresentaram mudanças na estrutura cristalina com a variação do $\overline{GA}$. Os ângulos de Bragg característicos de β -quitina extraída de gládios de lulas foram identificados nas amostras de quitosanas N-acetiladas com $30 < \overline{GA} < 55\%$, o que sugere que essas amostras adquiriram característica semelhantes a da β -quitina. Outra evidência desse fato foi comprovada através das análises por microscopia eletrônica de varredura das amostras de quitosana N-acetiladas, que revelaram que as características das superfícies das partículas das amostras mais acetiladas são semelhantes a da β -quitina.

As amostras de quitosanas N-acetiladas apresentaram maior estabilidade térmica e maior perda de massa que a quitosana de partida (amostra QSo), fatos que estão relacionados com a porcentagem de unidades GlcNAc nas cadeias do polímero, que resultaram em alterações importantes na sua estrutura cristalina e que também afetaram a estabilidade térmica.

ANEXO

Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da amostra RQSo1 (DCl/D $_2$ O 1% (v/v), 90°C, pD 2-3).

Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da amostra RQSo2 (DCl/D $_2$ O 1% (v/v), 90°C, pD 2-3).

Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da amostra RQSo3 (DCl/D $_2$ O 1% (v/v), 90°C, pD 2-3.

Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da amostra RQSo4 (DCl/D $_2$ O 1% (v/v), 90°C, pD 2-3.

Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da amostra RQSo5 (DCl/D $_2$ O 1% (v/v), 90°C, pD 2-3.

Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da amostra RQSo1r (DCl/D $_2$ O 1% (v/v), 90°C, pD 2-3.

Espectro de RMN ¹H (500 MHz) da amostra RQSo2r (DCI/D2O 1% (v/v), 90°C, pD 2-3).

Espectro de RMN ¹H (500 MHz) da amostra RQSo3r (DCI/D2O 1% (v/v), 90°C, pD 2-3).

Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da amostra RQSo4r (DCI/D2O 1% (v/v), 90°C, pD 2-3).

Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da amostra RQSo5r (DCI/D2O 1% (v/v), 90°C, pD 2-3).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ROBERTS, G. A. F. **Chitin chemistry**. London: McMillan, 1992. 350 p.
- 2 AGULLÓ, E.; PENICHE, C.; TAPIA, C.; HERAS, Á.; ROMÁN, J. S.; ARGÜLLES, W.; GOYCOOLEA, F.; MAYORGA, A.; NAKAMATSU, J.; ABRAM, A. P. **Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones**. Perú: Pontificia Universidad Católica Del Perú/ Fondo Editorial, 2004. p. 312.
- 3 PRASHANTH, H.,K.V.; THARANATHAN, R.N. Chitin/Chitosan modifications and their unlimited application potencial-an overview. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 117-131, 2007.
- 4 MAJETI, N.V.; KUMAR, R. A Review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, p. 1-27, 2000.
- 5 KURITA, K. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. **Progress in Polymer Science**, v. 26, p. 1921-1971, 2001.
- 6 CAMPANA FILHO, S.P.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F.; CARDOSO, M.; BATTISTI, M.; SIM, P.; GOY, R.; SIGNINI, R.; LAVALL, R. Extração, estruturas e propriedades de alfa e beta-quitina. **Química Nova**, v. 30, p. 644-650, 2007.
- 7 RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v.31, p. 603-632, 2006.
- 8 VACHOUD, L.; ZYDOWICZ, N.; DOMARD, A. Formation and characterisation of a physical chitin gel. **Carbohydrate Research**, v. 302, p. 169-177, 1997.
- 9 PILLAI, S.K.S.; PAUL, W.; SHARMA, C.P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science**, v. 34, p. 641-678, 2009.
- 10 NOISHIKI, Y.;TAKAMI, H.;NISHIYAMA, Y.;WADA, M.;OKADA, S.;KUGA, S. Alkali-Induced Conversion of β -chitin to α -chitin **Biomacromolecules**, v. 4, p. 896-899, 2003.
- 11 SGHEER, F. Al., et al. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 410-419, 2009.
- 12 CHAUSSARD, G.; DOMARD, A. New Aspects of the Extraction of Chitin from Squid Pens. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 559-564, 2004.
- 13 DELEZUK, J. **Desacetilação de Beta-Quitina assistida por ultassom de alta intensidade: estudo dos efeitos da amplitude e do tempo de irradiação e da temperatura de reação**. 2009. 97 f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

- 14 CAMPANA FILHO, S. P.; SIGININI, R. Efeito de aditivos na desacetilação de quitina. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, p. 169-173, 2001.
- 15 ROGOVINA, S. Z.; AKOPOVA, T. A.; VIKHOREVA, G. A. Investigation of properties of chitosan obtained by solid-phase and suspension methods. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 70, p. 927-933, 1998.
- 16 DELEZUK, J. A. M.; CARDOSO, M. B.; DOMARD, A.; CAMPANA-FILHO, S. P. Ultrasound-assisted deacetylation of beta-chitin: influence of processing parameters. **Polymer International**, 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pi.3037/abstract>>. Acesso em: 03 maio. 2011.
- 17 MASON, T. J. Ultrasound in synthetic organic chemistry. **Chemical Society Reviews**, v. 26, n. 6, p. 443-451, 1997.
- 18 SUSLICK, K. S.; HAMMERTON, D.A.; CLINE JUNIOR, R. E. The sonochemical hot spot. **Journal of the American Chemical Society**, v. 108, p. 5641-5642, 1986.
- 19 PETERS, D. Ultrasound in material chemistry. **Journal of Materials Chemistry**, v. 6, n. 10, p. 1605-1618, 1996.
- 20 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.
- 21 SIGNINI, R.; DESBRIÈRES, J.; CAMPANA FILHO, S. P. On the stiffness of chitosan hydrochloride in acid-free aqueous solutions. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, p. 351-357, 2000.
- 22 LAMARQUE, G.; VITON, C.; DOMARD, A. Comparative study of the first heterogeneous deacetylation of α - and β -chitins in a multistep process. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 992-1001, 2004.
- 23 LAVALL, R. L.; ASSIS, B. G. O.; CAMPANA FILHO S. P. β -Chitin from the pens of *Loligo sp.*: Extraction and characterization. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2465–2472, 2007.
- 24 CHEN, C.; WANG, F.; OU, Z. Deacetylation of β -Chitin. I. Influence of the deacetylation conditions. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 93, p. 2416 –2422, 2004.
- 25 VÅRUM, K.M.; METTE, H.; SMIDSRØD, O. Water-solubility of partially N-Acetylated chitosans as a function of pH: effect of chemical composition and depolymerisation. **Carbohydrate Polymers**, v. 25, p. 65-70, 1994.
- 26 SASHIWA, H.; SAIMOTO, H.; SHIGEMASA, Y.; TOKURA, S. N-acetyl group distribution in partially deacetylated chitins prepared under homogeneous conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 242, p. 167-172. 1993.

- 27 RINAUDO, M.; DOMARD, A. Solution properties of chitosan. In: SKJAK-BRAEK, G.; ANTHONSEN, T.; SANDFORD, P., (Ed.). **Chitin and chitosan**. New York: Elsevier Applied Science, 1989. p. 73.
- 28 KURITA, K.; KAMIYA, M.; NISHIMURA, S-I, N. Solubilization of a rigid polysaccharide: controlled partial N-Acetylation of chitosan to develop solubility. **Carbohydrate Polymers**, v. 16, p. 83-92, 1991.
- 29 TERBOJEVICH, M.; COSANI, A.; TORRI, C.; TORRI, G. Homogeneous-phase synthesis of chitin derivatives. In: SKJAK-BRAEK, G.; ANTHONSEN, T.; SANDFORD, P., (Ed.). **Chitin and Chitosan**. New York: Elsevier Applied Science, 1989. p. 407.
- 30 SORLIER, P.; DENUZIÈRE, A.; DOMARD, A.; CHRISTOPHE, V. Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan. **Biomacromolecules**, v. 2, p. 765-772, 2001.
- 31 KURITA, K.; SANNAN, T.; YWAKURA, Y. Studies on chitin 4: Evidence for formation of block and random copolymers of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine by hetero-and homogeneous hydrolyses. **Die Makromolekulare Chemie**, v. 178, p. 3197-3202, 1977.
- 32 GARCIA, R. B.; SILVA, D. L. P.; COSTA, M. Avaliação de géis obtidos a partir da acetilação da quitosana em meio heterogêneo. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 486-492, 2008.
- 33 AIBA, S. Studies on chitosan: 3. Evidence for the presence of random and block copolymer structures in partially N-acetylated chitosans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 13, p. 40-44, 1991.
- 34 KUMIRSKA, J.; WEINHOLD, M.X.; SAUVAGEAU, J. C.M.; THÖMING, J.; KACZYŃSKI, Z.; STEPNOWSKI, P. Determination of the pattern of acetylation of low-molecular-weight chitosan used in biomedical applications. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 50, p. 587-590, 2009.
- 35 WEINHOLD, M.X.; SAUVAGEAU, J. C.M.; KUMIRSKA, J.; THÖMING, J. Studies on acetylation patterns of different chitosan preparations. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 4, p. 678-684, 2009.
- 36 KUMIRSKA, J.; WEINHOLD, M.X.; STEUDTE, S.; THÖMING, J.; BRZOSOWSKI, K.; STEPNOWSKI, P. Determination of the pattern of acetylation of chitosan samples: Comparison of evaluation methods and some validation parameters. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, p. 56-60, 2009.
- 37 BOVEY, F.A.; MIRAU, P.A. **NMR of polymers**. San Diego: Academic Press, 1996. 459 p.
- 38 KURITA, K.; NISHIMURA, S. I.; ISHII, S.; TOMITA, K.; TADA, T.; SHIMODA, K. Characteristic properties of squid chitin. In: Brine, C. J.; Sandford, P. A.; Zikakis, J. P., ed. **Advances in Chitin and Chitosan**. London: Elsevier Applied Science, p. 188-195, 1992.

- 39 HUGGINS, M. L. Theory of Solutions of High Polymers. **Journal American Chemistry Society**, v.64, p.1712-1719, 1942.
- 40 HUGGINS, M.L. The Viscosity of Dilute Solutions of Long-Chain Molecules. **Journal of the American Chemical Society**, v. 64, p. 2716-2718, 1942.
- 41 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, p. 281-285, 1993.
- 42 MILAS, M. **Polieletrólitos**. São Carlos: Instituto de Física e Química de São Carlos, 1991. 84p.
- 43 KASSAI, M. Calculation of Mark-Houwink-Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent-temperature system using experimental reported viscometric constants dada. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 477-488, 2007.
- 44 BRUGNEROTTO, J.; DESBRIÈRES, J.; ROBERTS, G.; RINAUDO, M. Characterization of chitosan by steric exclusion chromatography. **Polymer**, v. 42, p. 9921-9927.
- 45 SIGNINI, R. **Estudos de obtenção, purificação e caracterização de quitosana**. 1998. 110 f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) - Departamento do Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1998.
- 46 LAVERTU, M.; XIA, Z.; SERRIQUE, A.N.; BERRADA, M.; RODRIGUES, A.; WANG, D.; BUSCHMANN, M.D.; GUPTA, A. A Validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, p. 1149-1158, 2003.
- 47 DOMARD, A.; RINAUDO, M. Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 5, p. 49-52, 1983.
- 48 VÅRUM, K.M.; ANTHONSEN, M.W.; GRASDALEN, H.; SMIDSRØD. Determination of the degree N-acetylation and the distribution of N-acetyl groups in partially N-deacetylated chitins (chitosans) by high-field n.m.r. spectroscopy. **Carbohydrate research**, v. 211, p.17-23, 1991.
- 49 KUMIRSKA, J.; CZERWICKA, M.; KACZYNSKI, Z.; BYCHOWSKA, A.; BRZOZOWSKI, K.; THÖMING, J.; STEPNOWSKI, P. Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. **Journal Marine Drugs**, v. 8, p. 1567-1636, 2010.
- 50 MIRAU, A. P. **A Practical guide to understanding the NMR of polymers**. New Jersey: Hardcover, 2005. 418 p.
- 51 BRUGNEROTTO, J.; LIZARDI, J.; GOYCOOLEA, F. M.; ARGUÈELLES-MONAL, W.; DESBRIÈRES, J.; RINAUDO, M. An Infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. **Polymer**, v. 42, p. 3569-3580, 2001.

- 52 ZHANG, Y.; XUE, C.; XUE, Y.; GAO, R.; ZHANG, X. Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 1914-1017, 2005.
- 53 OGAWA, K.; YUI, T. Crystallinity of Partially N-Acetylated Chitosans. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 57, n. 9, p. 1466-1469, 1993.
- 54 FOCHER, B.; BELTRAME, P.L.; NAGGI, A.; TORRI, G. Alkaline N-deacetylation of chitin enhanced by flash treatments. Reaction kinetics and structure modifications. **Carbohydrate Polymer**, v. 12, p. 405-418, 1990.
- 55 KURITA, K.; TOMITA, K.; TADA, T.; ISHII, S.; NISHIMURA, S. I.; 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.
- 56 FOCHER, B.; NAGGI, A.; TORRI, G.; COSANI, A.; TERBOJEVICH, M. Chitosans from *Euphausia superba*. 2. Characterization of solid state structure. **Carbohydrate Polymers**, v. 18, p. 43-49, 1992.
- 57 KURITA, K.; TOMITA, K.; ISHI, S.; NISHIMURA, S. I.; SHIMODA, K. β -chitin as a convenient starting material for acetolysis for efficient preparation of N-acetylchitooligosaccharides. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 31, p. 2393-2395, 1993.
- 58 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.
- 59 LUCAS, E. L., SOARES, B. G., MONTEIRO, E. **Caracterização de Polímeros – Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica**. Rio de Janeiro: E-Papers Serviços Editoriais, 2001. 366 p.
- 60 POPA-NITA, S.; LUCAS, J.M.; LADAVIERE, 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.
- 61 ANTHONSEN, M.W.; VÅRUM, K. M.; SMIDSRØD, O. Solution properties of chitosans: conformation and chain stiffness of chitosans with different degrees of N-acetylation. **Carbohydrate Polymers**, v. 22, p. 193-201, 1993.
- 62 TSAO, C.T.; CHANG, C.H.; LIN, Y.Y.; WU, M.F.; HAN, J.L.; HSIEH, K.H. Kinetic study of acid depolymerization of chitosan and effects of low molecular weight chitosan on erythrocyte rouleaux formation. **Carbohydrate Research**, v. 346, p. 94-102, 2011.
- 63 MORRIS, G.A.; CASTILE, J.; SMITH, A.; ADAMS, G.G.; HARDING, S.E. The kinetics of chitosan depolymerisation at different temperatures. **Polymer Degradation and Stability**, v. 94, p. 1344-1348, 2009.