UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia Químico- Farmacêutica

**Síntese e avaliações físico-químicas de quitosanas
quimicamente modificadas pela inserção de radicais de
anidrido succínico**

Karine Gargioni Pereira Correa de Mello

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador: Prof.Dr. Bronislaw Polakiewicz

São Paulo, 2005

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011264

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

M527s Mello, Karine Gargioni Pereira Correa de
Síntese e avaliações físico-químicas de quitosanas
quimicamente modificadas pela inserção de radicais de
anidrido succínico / Karine Gargioni Pereira Correa de
Mello. -- São Paulo, 2005.
84p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento
de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Polakiewicz, Bronislaw

1. Tecnologia químico-farmacêutica 2. Biopolímero :
Biotecnologia 3. Quitosana I. T. II. Polakiewicz,
Bronislaw, orientador.

660 CDD

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Tecnologia Bioquímico-
Farmacêutica
Área de Tecnologia Químico- Farmacêutica

Síntese e avaliações físico-químicas de quitosanas
quimicamente modificadas pela inserção de radicais de anidrido
succínico

Karine Gargioni Pereira Correa de Mello

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE
Orientador: Prof.Dr. Bronislaw Polakiewicz

São Paulo, 2005

Karine Gargioni Pereira Correa de Melo

Síntese e avaliações físico-químicas de quitosanas
quimicamente modificadas pela inserção de radicais de anidrido
succínico

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Bronislaw Polakiewicz
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, 01 de Set. de 2005.

*“Na natureza nada se perde, nada se cria; tudo se transforma”,
como afirmou Lavoisier (1743-1794).*

*Dedico este trabalho
a meu pai que juntamente comigo está realizando um sonho.
A meu marido Alexssandro
por me orientar e incentivar a atingir este objetivo.*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Bronislaw Polakiewicz pela orientação, conhecimentos e momentos descontraídos que foram uma constante durante este período.

Aos professores: Suzana Caetano Lannes, Cristina Northfleet de Albuquerque, José Abrahão Neto, Luiz AntOnio Gioelli, Ronaldo Nogueira de Moraes Pitombo, Marina Franco Maggi Tavares pela atenção e auxílio na realização de etapas deste projeto.

Aos amigos do laboratório: especialmente Marcos Knirsch, Carla Aparecida Pedriali, Karine Adati e Leandra de Cássia Bernusso que participaram deste projeto.

Aos colaboradores Andréa Rodas (IPEN) e Antônio Abrant (IQ), pelos testes de infravermelho.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Tecnologia Bioquímica Farmacêutica (FBT) e Secretaria Geral da Pós-Graduação, por sempre terem sido muito gentis e prestativos em seu atendimento.

À comissão de Apoio a Pesquisa do Ensino Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

E por fim, agradeço a todos que de alguma modo colaboraram para realização deste trabalho.

Obrigada!

Agradecimentos Especiais

Ao Alex por me ajudar na formatação da minha vida...

A Catarina por me tirar do trabalho e me proporcionar momentos realmente felizes...

A minha mãe e amiga, Irene Virgínia, pelo apoio incondicional em tudo que empreendi em minha vida...

RESUMO

A N-succinil-quitosana é um derivado quimicamente modificado do polímero quitosana. A inserção de radicais de anidrido succínico nas aminas protonadas presentes ao longo da cadeia do polímero quitosana, conferem diferentes características físico-químicas à molécula de quitosana.

Esta modificação química possibilitou à quitosana, solubilidade em pHs que variam do ácido (2.0) até alcalino (14.0). Estas propriedades são atribuídas ao alongamento da cadeia alquílica, que afasta a ponte hidrofílica da cadeia fechada da D-glicosamina, facilitando o acesso da água, a qual irá estabelecer uma interação mais forte com a molécula de quitosana. Esta propriedade não está presente em amostras de quitosana pura, a qual sabe-se que solubiliza-se apenas em pHs abaixo de 5.5.

ABSTRACT

The N-succinil-chitosan is a chemically modified derivative of the biopolymer chitosan. The succinic anhydride attached to the free amino groups presented along the chitosan's polymer chain imparts to the molecule different physicochemical properties not exhibited before the modification. These chemical modifications enhance chitosan's solubility in slightly acid, neutral and alkaline media. These properties are related to the long alkyllic chains attached to hydrophilic parts. In this case the hydrophilic part of D-glucosamine promotes stronger interactions with the water molecules, and consequently, enhances the solubility of the chitosan polymer. It is worthy mentioning that non-modified free chitosan is soluble only in acidic medium ($\text{pH} \leq 5.5$).

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

DO – Densidade ótica

GD – Grau de desacetilação

GS – Grau de substituição

IV – Infra-vermelho

Mv – Massa molar viscosimétrica média

QCom – Quitosana comercial

QLab – Quitosana laboratório

QLS(1:0,25) - Quitosana laboratório succinil – relação 1g quitosana:0,25g anidrido succínico

QLS(1:0,5) - Quitosana laboratório succinil – relação 1g quitosana:0,5g anidrido succínico

QLS(1:1)- Quitosana laboratório succinil – relação 1g quitosana:1g anidrido succínico

QLS(1:3) – Quitosana laboratório succinil – relação 1g quitosana: 3g anidrido succínico

η_{esp} – Viscosidade específica

$[\eta]$ – Viscosidade intrínseca

SUMÁRIO

I- INTRODUÇÃO.....	12
II- OBJETIVOS.....	15
III– REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
III. 1 Definição de polímeros.....	16
III.1. 2 Propriedades dos polímeros.....	21
III.1.2.1 Distribuição de peso molecular.....	21
III.1.2.2 Configuração dos polímeros.....	21
III. 2. Definição de quitina.....	22
III. 3 Definição de quitosana.....	28
III. 4 Produção de quitina e quitosana.....	30
III. 5 Aplicações da quitosana.....	33
II. 5.1 Aplicações biomédicas e farmacêuticas.....	34
II. 5. 2 Aplicações gerais da quitosana.....	35
III. 6 Características das amostras de quitosana.....	36
III. 6.1. Propriedades físico-químicas.....	37
III. 6.2 Formas de apresentação.....	38
III. 7 Derivados de quitosana.....	39
III. 7.1 Derivado N-Succinil-quitosana.....	41

III. 8 Obtenção e reações do anidrido succínico.....	42
III. 8.1 Reações com anidrido succínico.....	42
III. 8.1.1 Síntese de amidas.....	43
III. 8.1.2 Síntese de ésteres.....	43
IV. MATERIAIS.....	44
V. MÉTODOS.....	44
V.1 Grau de desacetilação da quitosana.....	45
V.1.1 Técnica colorimétrica da ninhidrina.....	46
V.1.2 Titulação do sal de Br-quitosana.....	46
V. 1.3 Infra-vermelho (IV).....	46
V. 2 Distribuição de peso molecular médio.....	48
V.2.1 Medida da massa molar viscosimétrica média (Mv)	49
V. 3 Grau de substituição (GS).....	51
V. 4 Solubilidade.....	51
V. 5 Grau de higroscopia.....	52
VI. PARTE EXPERIMENTAL.....	54
VI. 1 Preparação das amostras.....	54
VI. 1.1 Quitosana de partida (QLab).....	54
VI. 1.2 Processo de extração da quitina da casca de crustáceos.....	54
VI. 1.3 Processo para obtenção de quitosana a partir da quitina.....	57
VI. 1.4 Síntese do derivado N-succinil-quitosana.....	59
VI. 2 Ensaio analítico.....	62
VI. 2.1 Medida do grau de desacetilação da quitosana (GD)	62
VI. 2.1.1 Método colorimétrico da ninhidrina.....	62

VI. 2.1.2 Titulação dos sais de Br-quitosana	62
VI. 2.1.3 Infra vermelho (IV).....	63
VI. 2.2 Determinação da distribuição de peso molecular médio.....	64
VI. 2.2.1 Determinação da massa molar viscosimétrica média Mv.....	64
VI. 2.3 Grau de solubilidade em diferentes pHs.....	65
VI. 2.4 Grau de substituição (QS).....	66
VI. 2.5 Grau de higroscopia	66
VII. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
VIII. CONCLUSÕES.....	84
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
X. ANEXOS.....	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Representação gráfica da estrutura química da celulose.....	27
Figura 2- Representação gráfica da estrutura química da quitina.....	28
Figura 3- Representação gráfica da estrutura química da quitosana.....	30
Figura 4- Representação gráfica da estrutura química da N-succinil-quitosana.....	41
Figura 5- Representação gráfica do anidrido succínico.....	42
Figura 6 - Distribuição de peso molecular médio das amostras de quitosana.....	49
Figura 7 - Representação gráfica de retenção de água pela quitosana.....	53
Figura 8 – Rota utilizada para obtenção de quitina a partir de cascas de secas de camarão.....	56
Figura 9 - Rota utilizada para obtenção de quitosana a partir de quitina.....	58
Figura 10 - Rota utilizada para obtenção da N-succinil-quitosana.....	61
Figura 11- Curva de densidade ótica obtida do monômero D-glicosamina pelo teste colorimétrico da ninidrina. Concentração das amostras em microgramas.....	70
Figura 12- Resultados do grau de desacetilação das amostras de quitosana obtidos pelas técnicas: colorimétrica da ninidrina, titulação dos sais de Br-quitosana e IV.....	71
Figura 13 - Representação dos resultados da viscosidade específica e intrínseca da amostra QLab em viscosímetro de Ubbelohde.....	73
Figura 14 - Solubilidade das amostras de quitosana em três diferentes pHs. As nomenclaturas das amostras da esquerda para direita: Padrão=QLab, A=QLS(1:0,25), B= QLS(1:0,5), C= QLS(1:1) e D= QLS(1:3).....	76
Figura 15 - Resultados do grau de substituição das amostras de quitosana obtidos pelas técnicas: colorimétrica da ninidrina, titulação dos sais de Br-quitosana e IV.....	79
Figura 16 - Representação dos resultados de sorção de água das amostras de quitosana (ganho de massa em g) na câmara de saturação 33,10% em relação ao tempo.....	81

Figura 17 - Representação dos resultados de sorção de água das amostras de quitosana (ganho de massa em g) na câmara de saturação 59,20% em relação ao tempo.....	82
Figura 18 - Representação dos resultados de sorção de água das amostras de quitosana (ganho de massa em g) na câmara de saturação 90,70% em relação ao tempo.....	83

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Principais fontes de quitina.....	25
Tabela 2 - Propriedades físico-químicas da quitosana.....	38
Tabela 3 - Valores de K e a para solventes de quitosana.....	50
Tabela 4 - Representação da relação estequiométrica (moles e massa) das amostras de quitosana.....	60
Tabela 5 - Sais utilizados nas câmaras de saturação à 20 °C.....	66
Tabela 6 – Resultados de $[\eta]$ e M_v da amostra QLab	72

I- INTRODUÇÃO

Atualmente, toneladas de matérias-prima são industrializadas e consumidas gerando rejeitos e resíduos. O ato de reduzir, reutilizar e reciclar resíduos é um processo que obtém êxito com a crescente participação da comunidade e de parcerias, a fim de que, corrija-se as más conseqüências da modernidade.

É importante não desperdiçar, tão pouco acumular de forma poluente materiais potencialmente recicláveis, retornando a matéria-prima ao ciclo de produção do qual foi descartado viabilizando sua reutilização.

Entre os muitos tipos de materiais desprezados, estão as cascas de crustáceos provenientes da industrialização de pescado pela indústria alimentícia. Estes materiais constituem rejeitados que são acumulados na forma de resíduos e que constituem um poluente em potencial. Porém, a existência da possibilidade de aproveitamento lucrativo destes materiais, tem atraído para si atenção de pesquisadores e industriais por vislumbrarem a possibilidade de retirada destes materiais do meio ambiente. Processá-los novamente e dar origem a materiais variados com largo leque de possíveis aplicações e através deste processo, gerar divisas para o setor.

As possibilidades de aplicações oferecidas por um polímero de origem natural oriundo de materiais que seriam descartados e poluiriam o ambiente, fazem da quitina e da quitosana um material em potencial para estudo. Os países de primeiro mundo entre eles China, Japão e EUA que por sua posição geográfica favorável e por sua consciência de aproveitar recursos próprios e beneficiá-los para um mercado amplamente receptor, despontaram no início da

década de 1970 em estudos neste sentido. O Brasil, somente neste século, passou de forma ainda muito restrita a desenvolver estudos com este biomaterial também abundante em nossa costa. Até este momento a pequena parte processada de cascas na forma de quitina e quitosana vêm sendo exportada quase que totalmente *in natura* sem prévio beneficiamento. Pouco deste material é manipulado sendo utilizado pelo mercado farmacêutico na forma de quitosana que por sua vez é utilizada como redutor de obesidade por ligar-se a lipídeos no trato intestinal, porém estudos mais amplos de modificações químicas e ampliação das possibilidades de aplicações em biotecnologia ainda estão muito aquém das que são viáveis.

Entre os fatores que contribuem para a pesquisa da quitina e seu derivado quitosana, pode-se destacar:

- ⇒ Abundância na natureza
- ⇒ Fonte biologicamente renovável
- ⇒ Principal componente de cascas de crustáceos que são descartadas como resíduo do processo industrial
- ⇒ Biodegradável
- ⇒ Biocompatível e atóxica
- ⇒ Apresentação possível em diversas formas (pó, flocos, fibras, géis, outras)

Estas e muitas outras características apontam os biopolímeros como materiais de grande potencial de uso e aplicações no século XXI (NIFANT' EV, 1998).

A quitosana, principal derivado da quitina, apresenta características físico-químicas próprias dependentes do seu grau de desacetilação e sua distribuição de peso molecular. A presença do grupo amino livre na quitosana que através de reações específicas mudam seu comportamento físico-químico de solubilidade e viscosidade, características estas determinantes para sua posterior aplicação.

Devido a isto foi sintetizada uma série de derivados de quitosana solúveis em solução ácida (pH 2.0), em água (pH 7.0) e solução alcalina (pH 10.0). Cada composto foi sintetizado através da adição de diferentes concentrações de anidrido succínico. Estes grupamentos foram inseridos no grupamento amino da molécula de quitosana de tal modo que o derivado de quitosana resultante apresentou características hidrofílicas.

O comportamento destas amostras, segundo suas características físico-químicas de grau de desacetilação, peso molecular, solubilidade em diferentes pHs e caráter higroscópico foram comparados com a amostra de origem produzida em nosso laboratório a partir de cascas de camarão.

Através dos resultados obtidos foi verificado quais amostras que apresentaram as melhores propriedades para uso na área farmacêutica e cosmética, na qual há necessidade de produtos compatíveis com o pH da pele (pH neutro) ou ainda, para produtos capilares que necessitam de pH mais elevado (pH 9,0), sem que se perdesse as propriedades naturais do polímero de quitosana quanto a formação de filmes e viscosidade.

II- OBJETIVOS

O presente trabalho foi direcionado para obtenção de derivados de quitosana que tivessem características de solubilidade diferentes da quitosana de partida. O alvo principal foi à obtenção de derivados de quitosana que se dissolvessem em água sem a adição de ácidos e se possível, obter derivados de quitosana que se dissolvessem em meio alcalino em vistas da possibilidade de aplicação de tais produtos na área de cosméticos e sabões, entre outras. Para tal, optou-se por reagir a quitosana com anidrido succínico, pelo fato de que este reagente pode expor o grupo carboxilato que é hidrofílico e afastá-lo do sítio hidrofóbico que é o núcleo da glicosamina, monômero da quitosana. Soma-se a isto, o fato de que o ácido succínico, é empregado como acidificante na área farmacêutica e alimentícia, além das suas propriedades de salificar fármacos. Também foi incluído no escopo do trabalho a realização de algumas avaliações físico-químicas e caracterizações dos produtos obtidos.

III– REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

III.1. Definição de polímeros

A palavra polímero quer dizer “muitas partes”. Um polímero é uma macromolécula formada originalmente de muitos grupos repetidos, constituídos basicamente de carbono e hidrogênio, chamados de unidades monoméricas as quais são unidas por ligações covalentes. Os polímeros podem ser formados por material orgânico ou inorgânico, natural ou sintético. São moléculas de alto peso molecular, e devido a isto, são chamadas de macromoléculas. A reação que produz o polímero é denominada reação de polimerização. A molécula inicial (monômero), vai sucessivamente unindo-se a outras, originando o dímero, trímero, tetrâmero e assim por diante até chegar a um valor de aproximadamente cem monômeros quando então é chamado de polímero, porem esta não é uma regra muito rígida. Aparentemente, o processo poderia prosseguir, sem parar, até produzir uma molécula de tamanho "infinito", no entanto, fatores práticos limitam a continuação da reação (RIANDE,2000).

O polímero mais simples é o polietileno, obtido a partir do monômero etileno, $H_2C = CH_2$, e possui a fórmula geral:

O número de monômeros do etileno, n , pode alcançar valores entre 10^3 e 10^6 unidades monoméricas.

Os grupos terminais são os que influenciam algumas das características do polímero, porém em cadeias com alto peso molecular, os grupos terminais Φ_1 e Φ_2 estão presentes em baixas concentrações e não tem efeito sobre as propriedades mecânicas do polímero (RIANDE,2000).

Os polímeros podem ser lineares ou ramificados. Os polímeros lineares são representados por cadeias com dois grupos terminais, já os polímeros ramificados possuem cadeias laterais ligadas covalentemente à cadeia principal. Estes polímeros são caracterizados pelo número ou tamanho das ramificações. Há também polímeros não lineares conhecidos como “cross-linked”, os quais apresentam cadeia tridimensional em que a macromolécula tem ligações em todas as direções do espaço formando uma verdadeira rede (RIANDE,2000).

Muitos polímeros possuem uma estrutura que se repete regularmente ao longo da cadeia. A estrutura de repetição é denominada estrutura constitutiva ou estrutura monomérica. Um polímero regular contém um único tipo de estrutura em um arranjo seqüencial único. Quando um polímero contém estruturas diferentes repetidas é chamado de copolímero. Logo diz-se:

· *Homopolímeros:* são polímeros cuja cadeia polimérica é representada pela repetição de um único tipo de unidade. A estrutura química dos polímeros é representada geralmente pelo monômero entre colchetes, por exemplo, o homopolímero -A-A-A-A-A-, pode ser representado por $[A]_n$, em que n é o número de vezes que a unidade se repete para formar a macromolécula (RIANDE,2000).

A quitina é um homopolímero natural formado por monômeros D-glicosamina N-acetilados (ROBERTS,1992). Outros exemplos de polímeros formados a partir de um só monômero são: o polietileno, o nylon e a celulose.

- *Copolímeros*: são polímeros constituídos por dois ou mais tipos de unidades repetidas. Existem vários tipos de copolímeros dependendo de como as unidades repetidas se organizam ao longo da cadeia polimérica. São exemplos de polímeros formados a partir de dois ou mais monômeros diferentes: o poliéster, a proteína da seda e a quitosana.

Para simplificar consideremos copolímeros constituídos apenas por unidades A e B:

- *Copolímeros de seqüência aleatória*: são polímeros cuja seqüência dos monômeros se repete ao acaso.

-B-B-B-A-B-B-A-A-B-A-

A quitosana que tem origem a partir da desacetilação parcial da quitina, é um exemplo de copolímero de seqüência aleatória por apresentar ao longo de sua cadeia polimérica tanto monômeros de D-glicosamina acetilados quanto desacetilados.

- *Copolímeros de seqüência alternada*: são polímeros formados por dois tipos de unidades repetidas arranjadas alternadamente.

- A-B-A-B-A-B-A-B-A-B-

- *Copolímeros de seqüência em bloco*: são copolímeros de seqüência linear em que a repetição das unidades aparece em grupos ou blocos do mesmo tipo.

-A-A-A-A-A-B-B-B-B-B-

- *Copolímeros de seqüência ramificada*: são copolímeros cuja estrutura química das ramificações difere da cadeia principal.

De forma simplificada, consistem em uma longa cadeia principal e um segundo polímero ligado quimicamente a cadeia principal.

Na natureza existem muitas macromoléculas, como: os polissacarídeos (celulose, amido, glicogênio), as proteínas e a borracha. A celulose é um polímero natural formado pela repetição de grupos originários da glicose $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$, onde o valor de n varia de 1.500 a 3.000. A celulose é usada há milênios pela humanidade sob forma de algodão, e outras (RIANDE,2000).

As proteínas são macromoléculas mais complexas em que se repetem predominantemente moléculas de aminoácidos (RIANDE,2000).

A borracha natural é obtida da árvore *Hevea brasilienses* (seringueira) através de incisão feita em seu caule, obtendo-se um líquido branco de aspecto leitoso, conhecido como látex. As cadeias que constituem a borracha natural apresentam um arranjo desordenado e, quando submetidas a uma tensão, podem ser alongadas, formando estruturas com comprimento maior que o original (MONTEIRO,1999).

A química macromolecular, muito desenvolvida, pode produzir os polímeros mais diversos possíveis, aparecendo, então, várias maneiras de classificá-los: quanto à reação de preparação, quanto à estrutura do polímero e também quanto à sua aplicação nos mais diversos segmentos da atividade humana.

São múltiplas as aplicações dos polímeros, entre elas podemos ressaltar: o vestuário que usamos, é feito de tecidos, e estes são feitos de fibras muito diversas. Todas elas são polímeros. Também os plásticos, que têm as aplicações mais diversas, são polímeros.

Em nosso século, os químicos começaram a fabricar os polímeros sintéticos. Atualmente, eles são extensamente usados na forma de plásticos (folhas, chapas, brinquedos, tubos para encanamentos, etc.), tecidos (náilon, poliéster, etc.) e de borrachas sintéticas. Vivemos hoje o que se poderia chamar de "era dos plásticos".

A maioria dos polímeros sintéticos tem como origem matérias-primas naturais como: o petróleo, o carvão e o gás natural. Estas matérias-primas podem ser usadas puras ou combinados com outros elementos como: pigmentos e cargas, os quais agregados aos polímeros alteram as suas propriedades.

As fibras, que podem ser naturais ou sintéticas, apresentam resistência semelhante à do algodão, seda ou lã e são muito usadas na indústria têxtil. Por exemplo: a viscose, que é celulose tratada com dissulfeto de carbono, os nylons que são poliamidas, a lycra que é à base de poliuretanos, o flúor que combinado com etileno da origem ao Teflon[®], cadeias longas de silício e hidrogênio que geram os silicones e etc.

Todas as etiquetas do vestuário trazem a indicação do tipo das fibras com que são feitas. Muitos tecidos contêm uma mistura de fibras naturais e sintéticas para conseguir propriedades diferentes como, elasticidade, duração, brilho e toque.

Quanto aos plásticos, as suas aplicações são múltiplas, pois podem ser transformados em objetos que vão desde sacos, embalagens, garrafas, calçados, peças automotivas, lanternas, mobiliário de jardim à lentes de contacto e próteses cirúrgicas.

III.1. 2. Propriedades dos polímeros:

III.1.2.1. Distribuição de peso molecular:

Muitas das propriedades dos polímeros são dependentes de seu tamanho que é expressado em termos de peso molecular, M . O peso molecular de um polímero é relacionado ao grau de polimerização, α , que é definido como o número de unidades repetidas que formam a cadeia polimérica. Por consequência, $M = \alpha M_0$, onde M_0 é o peso molecular da unidade repetida.

Em geral, os polímeros naturais apresentam distribuição de peso molecular com diferentes intervalos de αM_0 , e a distribuição de peso molecular se faz pela média desta distribuição (ROBERT, 1992).

III.1.2.2. Configuração dos polímeros:

As propriedades dos materiais poliméricos não dependem somente da composição química e peso molecular. A estrutura molecular também exerce influência sobre as propriedades físicas dos polímeros. A estrutura molecular depende do arranjo dos átomos na molécula. O termo configuração, refere-se ao arranjo espacial dos átomos e substituintes de uma cadeia polimérica. Diferentes conformações podem ser obtidas com a simples rotação em torno de uma ligação primária. A configuração do polímero é definida pelo método de polimerização, e

o polímero preserva esta configuração até que reaja quimicamente (RIANDE,2000).

III.2. Definição de quitina

O termo quitina é derivado da palavra Grega “ $\chi\iota\tau\omega\nu$ ”, que quer dizer: túnica ou cobertura, por funcionar como uma capa protetora de invertebrados (ROBERTS, 1992).

A quitina foi descoberta em 1811, pelo professor francês Henri Braconnot, Professor de História Natural e Diretor do Jardim Botânico da Academia de Ciências em Nancy. Foi isolada em algumas espécies de fungos, recebendo então a denominação de fungina (KNORR, 1991).

O nome quitina foi dado por Odier, em 1823, quando esta foi isolada de insetos. Odier foi o primeiro a relatar a semelhança entre as substâncias suportes presente na armadura dos insetos e nos tecidos vegetais. Existem dúvidas se ele tinha conhecimento da substância encontrada por Braconnot nos fungos, pois neste e em trabalhos posteriores, não se refere ao autor. Posteriormente, Odier também observou a presença de quitina na carapaça de caranguejo e sugeriu que ela seria o material formador do exoesqueleto dos insetos e possivelmente dos aracnídeos. Entretanto, somente em 1843, Payen descobriu que a quitina continha nitrogênio em sua estrutura. (ROBERTS, 1992).

A quitosana foi descrita pela primeira vez em 1859 por Rouget. O nome quitosana foi proposto em 1894 por Hoppe-Seyler devido ao fato de possuir

quantidade de nitrogênio igual a quitina original. (ROBERTS, 1992; NIFANT'EV 1998).

Devido à grande similaridade entre a celulose, a quitina e a quitosana, uma enorme confusão estabeleceu-se entre elas e manteve-se até o início do século XX, quando as pesquisas demonstraram definitivamente que tratavam-se de substâncias diferentes. A celulose por ser já naquela época, bastante explorada pelas indústrias de papel e têxtil, passou a ser alvo de grande investimento científico e tecnológico, enquanto a quitina ficou restrita à pesquisa básica com pouco investimento financeiro (NIFANT'EV 1998).

Os estudos e usos da quitina foram negligenciados por um longo tempo, voltando a ser estudada somente por volta da década de 70, quando começou-se a perceber o grande potencial de aplicações que apresentavam tanto a quitina como a própria quitosana (KNORR, 1991; HONG, 1996). Assim, a quitosana passou a ser produzida industrialmente a partir de 1971 no Japão (HIRANO, 1989).

Atualmente estes polissacarídeos vêm tomando destaque considerável nas pesquisas, sendo até mesmo considerados um dos materiais de maior potencial para este século. Esta afirmação vem sendo tomada com base na grande versatilidade de aplicações encontradas para estes biopolímeros e seus derivados (NIFANT'EV 1998).

O Japão, a China, a Coréia e os EUA são os países que vêm se destacando como os maiores produtores destes polissacarídeos e seus derivados (HIRANO, 1989; KOBELKE, 1990; NIFANT'EV 1998). Também pode-se citar os países do báltico como : Suécia, Polônia que vêm trabalhando com a casca do krill.

Atualmente o Japão vem se destacando em pesquisas sobre quitina e quitosana seguido pelos EUA. Outros países passaram a desenvolver pesquisas nesta área, entre eles encontram-se: China, Coréia, Itália, Polônia, Rússia, Índia, Brasil e muitos outros (SINGLA, 2002).

Embora muitos estudos estejam sendo desenvolvidos a respeito da quitosana, sua utilização biomédica ainda não é efetiva devido principalmente, ao número de amostras de quitosana oferecidas no mercado e pela dificuldade de obtenção de laudos de qualidade consistente dificultando a aquisição de uma matéria-prima, a base de quitosana, padronizada. Por esta razão, o processo de produção de amostras de alta qualidade para aplicações biomédicas, tem sido desenvolvidas (DEE, 2001).

A quitina é biologicamente sintetizada, estimando-se um total de 1 bilhão de toneladas anualmente principalmente por animais marinhos. A quitina está presente nas cascas de crustáceos tais como: camarão (a casca do camarão possui 15 a 20% de quitina), lagosta, caranguejo, krill e lula, bem como por fermentação. Este volume é biodegradado sem acúmulo excessivo na natureza através do ciclo da quitina, uma vez que as enzimas hidrolíticas [lisozima (EC 3.2.1.17), quitinase (EC 3.2.1.14), quitina desacetilase e quitosanase] envolvidas neste processo, estão largamente distribuídas nos tecidos e fluidos corporais dos animais e plantas e também no solo (BRINE, 1991; HIRANO, 1996).

A quitina é um polissacarídeo que faz parte do exoesqueleto e do endoesqueleto de artrópodes, juntamente com: proteínas, lipídeos, sais minerais (carbonatos e fosfatos de cálcio) e alguns pigmentos, incluindo carotenóides. As

cascas secas de crustáceos contêm 15-20% de quitina, 25-40% de proteínas e 40-55% de carbonato de cálcio (MANTHUR, 1990; DEE, 2001).

Tabela 1 - Principais fontes de quitina (MATHUR, 1990)

Artrópodes (invertebrados)		
Animais marinhos	Insetos	Microorganismos
Lulas	Escorpiões	Algas verdes
Crustáceos	Aranhas	Levedura (Tipo β)
Lagostas	Baratas	Fungos (parede celular)
Caranguejos	Formigas	<i>Mycelia penicillium</i>
Camarão	Besouros	Algas verdes e marrons
Krill		Esporos

A quitina associada às proteínas, forma oligoproteínas que funcionam como matrizes que interagem com outros constituintes, como os taninos fenólicos na cutícula dos insetos e os minerais no exoesqueleto dos crustáceos (PETER, 1995; CHEN, 1998).

A existência de um esqueleto externo duro formado pela quitina é uma das causas da resistência da estrutura dos artrópodes. Ao contrário da cutícula fina e flexível dos anelídeos, os artrópodes possuem o exoesqueleto composto por uma cutícula grossa, responsável pela rigidez do corpo. Sua porção externa é impermeável, sendo composta de proteínas e cera. A porção interna, mais espessa, é formada por camadas de quitina, pigmentos e carbonato de cálcio, sendo um material de proteção extraordinário. Como a quitina é rígida e impermeável, proporciona sustentação, proteção mecânica e atua contra a

desidratação, o que representa uma importante adaptação à vida em meio terrestre.*

A quitina representa a segunda biomassa orgânica mais abundante na natureza após a celulose. No entanto como não se sabe ao certo a quantidade de biomassa presente em regiões inacessíveis do oceano, as diferenças das ordens de grandeza entre a quitina e a celulose, podem ser menores (BERKELEY,1978).

A celulose é o principal polissacarídeo produzido pela fotossíntese das plantas que compõe cerca de 50% da biomassa total.

Entende-se por biomassa, todo material produzido por seres vivos, a qual tem sido uma grande fonte de interesse dos pesquisadores nos últimos anos. O uso das biomassas têm tido grande atenção pela importância em relação a fatores ecológicos, por serem fontes renováveis e também pelo fato de que o descarte de algumas delas pode ser fonte de poluição, causando muitos problemas ambientais.

* Material obtido em: Reino Animalia III - <http://members.tripod.com/~netopedia/biolog/AnimaliaIII.htm> : e animal Show - <http://www.animalshow.hpg.com.br> – Acesso em Agosto/2002.

Estrutura química da celulose:

Fig.1- Representação gráfica da estrutura química da celulose

A diferença estrutural, entre as duas fibras de celulose e quitina, deve-se aos grupos hidroxila, localizados no carbono C2 da celulose que na quitina são substituídos por grupos acetoamino.

A quitina é um polímero constituído por uma seqüência linear de açúcares monoméricos β -(1-4)2-acetoamino-2-deoxi-D-glicose (N-acetilglicosamina) unidos por ligações glicosídicas que arranjam-se em alfa hélice estabilizadas por pontes de hidrogênio intramoleculares (SINGLA, 2001).

A quitina é conhecida em três formas estruturais cristalinas diferentes α -, β - e γ . Destas, as α e β -quitinas, são mais conhecidas, sendo a α -quitina, a mais comum e por isso mais estudada (MUZZARELLI, 1973; TAKAI, 1989, KURITA, 1993).

A análise elementar da quitina mostra a presença de moléculas de água incorporadas ao polímero (KIM, 1997; MUZZARELLI, 1997).

Alguns pesquisadores estimam que a quitina é constituída de 82,5% de unidades acetiladas, 12,5% de unidades desacetiladas e 5% de água (MUZZARELLI, 1973).

A quitina não é solúvel em água ou em solventes orgânicos, e é apresentada na forma de pó ou flocos (MATHUR, 1990).

Estrutura química da quitina:

Fig.2- Representação gráfica da estrutura química da quitina

III.3. Definição de quitosana

Quitosana é uma poli-(β -1-4)-D-glicosamina derivada da desacetilação parcial ou total de quitina em suspensões alcalinas concentradas. É solúvel em meios ácidos diluídos, tomando sua aplicação mais favorável que a quitina. Além disto, apresenta uma grande vantagem em relação aos polímeros sintéticos, por ser: natural, renovável, biodegradável e não tóxica (KURITA, 1993; DUNG, 1994). Entretanto, a quitosana não é uma entidade química uniforme, e sim, um copolímero constituído tanto de monômeros acetilados como monômeros

desacetiladas em sua cadeia. Amostras de quitina que apresentam grau de desacetilação acima de 40% e até 98% e peso molecular entre 50 kDa até 2.000 kDa, já podem ser considerados como quitosana, sendo que as aplicações e características do polímero dependem fundamentalmente do grau de desacetilação e do tamanho da cadeia (DEE, 2001; SINGLA, 2001).

A desacetilação da quitina produz quitosanas com grupos amino livres, cuja porcentagem varia de acordo com o método empregado para tal. Usualmente, a quitosana é preparada utilizando-se soluções concentradas de hidróxido de sódio (NaOH) 40–50%, que costumam promover reações de degradação do polímero. Esta reação remove parte dos grupamentos acetil, liberando os grupamentos amino que conferem a natureza catiônica à quitosana (CUROTTO, 1993; YOMOTA, 1993; OTTFY, 1996).

O grupamento amino, possui um pKa em torno de 6.2 a 7.0, o qual torna a molécula de quitosana um polieletrólito quando dissolvida em meios cujo pH seja menor do que 6.0 (ANTHONSEN, 1993).

Para caracterizar o comportamento da quitosana em solução, é importante selecionar o sistema de solvente mais apropriado, de forma a eliminar os efeitos iônicos. A quitosana apresenta alta densidade de carga, adere a superfícies carregadas negativamente e quela íons metálicos (RINAUDO, 1993).

A quitosana pode ser caracterizada tanto em termos de sua qualidade, quanto das suas propriedades intrínsecas (pureza, peso molecular, viscosidade e grau de desacetilação), e também quanto a sua apresentação física, fatores estes, que muito influenciam nas características finais do produto em que será utilizada (LI, 1992).

Estrutura química da quitosana:

Fig.3- Representação gráfica da estrutura química da quitosana

De um modo prático, pode-se diferenciar a quitina da quitosana pelo critério de solubilidade em solução aquosa de ácido (ácido acético 2%). Quando o polímero possui alto teor de grupos N-acetil (>60%) distribuídos na cadeia polimérica, ele é normalmente insolúvel, sendo denominado de quitina. Quando o teor dos mesmos grupos é menor que 60%, este polissacarídeo passa a ser solúvel em solução aquosa de ácido, e então, é denominado quitosana (PETER, 1995).

A presença de grupos acetoamino na quitina, e amino na quitosana, as tomam mais interessantes do ponto de vista químico do que a celulose, pois a presença destes grupamentos, amplia as possibilidades de modificações químicas destes biopolímeros (PETER, 1995).

III.4. Produção de quitina e quitosana

A estimativa mundial para produção industrial de quitina a partir de carapaças de crustáceos é de 50.000 toneladas anualmente. Somente a

produção de crustáceos nos Estados Unidos (150.000 ton. de camarão, 25.000 ton. de lagosta e 85.000 ton. de caranguejo) é capaz de fornecer matéria-prima para produção de aproximadamente 15.000 toneladas de quitina todos os anos (DEE, 2001).

A importância do desenvolvimento de tecnologia para a extração da quitina no Brasil se justifica pelo fato deste, possuir uma das áreas costeiras mais extensas do mundo, com cerca de 8.500 quilômetros de extensão em linha contínua e estar entre os maiores produtores de crustáceos do mundo.

O Brasil produz grande quantidade de resíduos de crustáceos que são quase completamente desperdiçados. Estudos demonstram que existe boa quantidade de α -quitina no cefalotórax de camarão (*P. schimitti*; *P. brasiliensis* e *P. paulensis*) (TENUTA, 1987), no caranguejo-uça (*Ucides cordatus*) e na lagosta (*Panulirus argus*) (OGAWA, 1973), sendo encontrado em torno de 14% de quitina nos resíduos destes crustáceos, demonstrando a grande potencialidade do Brasil em produzir quitina/quitosana em larga escala (MONTEIRO, 1999).

No Brasil, a exploração da quitina e posterior transformação em quitosana já é feita, porém, em uma escala muito aquém das possibilidades existentes em função da extensão do litoral brasileiro. Sendo que:

O Brasil é um dos maiores produtores de crustáceos do mundo, quer através da pesca sazonal, quer através da cultura em cativeiro, que atualmente já esta ultrapassando a pesca tradicional.

As partes descartadas dos crustáceos que são descascados, em sua maioria antes de ir para o consumo, geram uma grande quantidade de cascas, que causam problemas ambientais significativos para o seu descarte.

A exploração comercial das cascas de crustáceos poderá solucionar o problema ambiental, e gerar uma renda adicional aos que se dedicam ao trabalho com a pesca.

Finalmente, desenvolver-se-ia uma tecnologia destinada a trabalhar com uma matéria prima renovável e ao mesmo tempo que pouparíamos divisas importando este material, podendo inclusive ser viabilizada a exportação da quitina e seus derivados, uma vez que, devido as várias aplicações, este produto é muito procurado no exterior.

O descarte de resíduos orgânicos sólidos como: cascas e cabeças de crustáceos, que são gerados pelas indústrias de beneficiamento de pescados, se constitui em um grande agente poluidor. Nas águas, causam a proliferação de organismos patogênicos. No solo através dos aterros sanitários, são responsáveis pela transmissão de doenças através de vetores como ratos, baratas, mosquitos e moscas (IBAMA, 2001).

A contribuição para um benefício da qualidade ambiental e atendendo a vários interesses econômicos e sociais, seria um melhor aproveitamento de recursos naturais, por exemplo, a utilização destes resíduos de crustáceos para extração e industrialização da quitina com o desenvolvimento da química dos seus derivados, como a quitosana, a qual apresenta características para desempenhar funções tanto como matéria-prima ou ainda como veículo de formulações (KURITA, 1993).

Para tanto, é importante o desenvolvimento da química de derivados de quitina, os quais são muito recentes e estão se expandindo rapidamente. No Brasil, praticamente não são executados estudos neste sentido, sendo o material exportado na sua forma bruta.

Nos últimos anos, devido ao aumento acelerado no interesse científico e principalmente industrial em relação a quitina e quitosana, outras fontes destes materiais estão sendo avaliadas como, por exemplo, extração de quitina de microrganismos, os quais poderão ser uma das principais fontes de quitina e quitosana em futuro próximo (MUZZARELLI, 1994; ABEDEL-AZIZ, 1999).

Estas fontes ainda não têm demonstrado viabilidade econômica, devido ao alto custo de obtenção, além de problemas técnicos que acabam encarecendo o produto final, sendo assim, as fontes naturais, basicamente os resíduos de crustáceos, são as mais utilizadas.

No entanto para evitar um desequilíbrio ecológico, cada vez mais crescem as investigações em busca de novas fontes e tecnologias adequadas para obtenção de quitina e quitosana (ARCIDIACONO, 1992).

III.5. Aplicações da quitosana

A quitosana é um biopolímero com grande potencial de desenvolvimento, gerando diferentes tipos de materiais com variadas funções, incluindo atividades biológicas específicas. Conforme as modificações na estrutura, a quitina tem encontrado aplicações na área farmacêutica, cosmética, alimentícia e de diagnóstico, enfim, um grande leque de aplicações longe de ser esgotado

(OGAWA, 1973; MAGDASSI, 1990; ORNUM, 1992; YOSHIOKA, 1993; MORIMOTO, 2001).

II.5.1. Aplicações biomédicas e farmacêuticas

O uso da quitosana em aplicações biomédicas vem sendo muito estudado. Isto inclui curativos para feridas, lentes de contato, agentes hemostáticos, sistema de liberação de fármacos, agente redutor de níveis séricos de colesterol entre outras.

O fato da quitosana se ligar a gorduras presentes no intestino, após administração oral, levou vários pesquisadores a acreditarem que uma suplementação alimentar diária com quitosana, poderia inibir a formação de placas de aterosclerose. Em função disto muitos trabalhos estão sendo realizados neste sentido (ZACOUR, 1992).

As principais propriedades da quitosana para uso com finalidades biomédicas são: biocompatibilidade, não toxicidade pelo fato de sua degradação resultar em metabólitos naturais, capacidade de cicatrizar feridas, coagular sangue, capacidade de reter líquido e formar filmes protetores flexíveis, são algumas das propriedades que fazem da quitosana uma matéria-prima importante com possibilidade de múltiplas aplicações (MATHUR, 1990; KNAUL, 1998).

Abaixo estão citadas algumas aplicações de quitosana na área biológica segundo Sanford (1989):

Suturas cirúrgicas: blendas de quitina /quitosana são muito utilizadas em suturas cirúrgicas. Estas fibras são biocompatíveis e não produzem reações alérgicas.

Lentes de contato: quando feitas de quitina apresentam maior compatibilidade do que as feitas de polímeros sintéticos. São confortáveis, absorvem água e são permeáveis ao ar, podendo ser usadas por um período de tempo mais longo.

Biotecnologia: biomembranas, encapsulação e imobilização de enzimas e células, nestes casos pode-se utilizar a quitosana adicionada à complexos com soluções de polímeros aniônicos, como os polifosfatos, alginatos, pectinas e carragena.

Indústria cosmética: a quitosana pertence à classe de biopolímeros chamada hidrocolóides.

A quitosana é um polissacarídeo catiônico, isto é, carregado positivamente em $\text{pH} < 6,0$. Desta forma, a quitosana carregada positivamente irá interagir com superfícies carregadas negativamente como o cabelo e a pele. A capacidade bioadesiva da quitosana é, portanto, o principal fator do uso da quitosana em cosméticos. Além disto, é um agente umectante e hidratante, formando uma camada protetora transparente que auxilia a hidratação da pele e do cabelo. Funciona como um doador de viscosidade em xampus anfóteros/não-iônicos. É um agente condicionante fixador para os cabelos, forma filmes substantivos e substratos protéicos, pode encapsular fragrâncias, pigmentos e ingredientes ativos. Não é alergênico.

II.5.2. Aplicações gerais da quitosana:

Outros autores como Mathur (1990) e Singla (2001), ressaltaram a versatilidade da quitosana em seus artigos em aplicações como:

Clarificação: flocula e coagula proteínas de processamento de alimentos, flocula microorganismos de bebidas fermentadas, remove metais, flocula microorganismos nos tratamentos de efluentes, forma complexos com corantes aniônicos permitindo sua remoção, precipita materiais protéicos permitindo sua recuperação e reaproveitamento e ainda remoção de substâncias químico-tóxicas por formação de complexos metálicos (ex.: Hg, Cd, Pb).

Indústria alimentícia: acelera fermentações, clarifica sucos e fermentados, é um produto fibroso sem calorias, forma adutos com ácidos graxos em queijos, protetor de sabor para conservas, carnes, etc. Estabilizante de emulsões.

Agricultura: proporciona proteção de sementes contra fungos, aumentando a produtividade, retenção de umidade e nutrientes. Agente encapsulante para liberação lenta de nutrientes, adubos, e defensivos, e revestimento de frutas.

Curtumes: auxiliar de curtimento e acabamento aumenta a temperatura de encolhimento, penetração e fixação de corantes. Melhora a resistência à água.

III.6. Características das amostras de quitosana

A quitina e a quitosana são encontradas comercialmente na forma de pó ou de flocos. Entretanto não existe ainda um padrão internacional dos parâmetros físicos e químicos para estes biopolímeros. Estes parâmetros dependem fundamentalmente do processo utilizado para sua obtenção (JONSON, 1982; HIRANO, 1989).

Sabe-se que altas concentrações das soluções reagentes utilizadas no processo de extração da quitina e obtenção da quitosana, bem como altas temperaturas podem acarretar danos irreparáveis à qualidade destes biopolímeros, como grau de desacetilação, despolimerização, massa molecular, e viscosidade, etc (MANDRAVAN, 1974; AUSTIN, 1981; HIRANO, 1989; NO, 1995; KNAL, 1998). Soma-se a isto as variações substanciais na solubilidade, peso molecular, número de grupos acetil, rotação específica de amostras de quitina e quitosana originárias de diferentes fontes relacionadas à estrutura alfa, beta e gama.

III. 6.1. Propriedades físico-químicas

A caracterização da quitosana pode ser feita levando em consideração as seguintes propriedades (SANFORD, 1989):

Físicas: tamanho das partículas, densidade, solubilidade, viscosidade e descrição de suas diversas apresentações;

Químicas: distribuição de peso molecular, grau de desacetilação, pH, índice de cristalinidade, valor de retenção de água, níveis de metais pesados e proteínas;

Biológicas: apirogenicidade, citotoxicidade e biocompatibilidade.

As propriedades físico-químicas da quitosana segundo Knapczyk, 1989; Sanford, 1990, estão resumidas na tabela abaixo:

Tabela 2 – Propriedades físico-químicas da quitosana

Propriedades		
Físicas	Tamanho da partícula	< 30 µm
	Densidade	1.35 – 1.40 g/cc
	Solubilidade	Insolúvel em água Solúvel em meio ácido
	Alto peso molecular	
Químicas	pH	> 5,5
	Alta densidade de carga	em pH > 5,5
	Adere a superfícies carregadas negativamente	
	Forma gel com poliânions	
	Polieletrólito linear	
	Quela metais de transição	
	Favorável a modificações químicas	
	Reage com hidróxido	

III.6.2. Formas de apresentação

A disponibilidade de amostras de quitosana purificadas e suas possibilidades de apresentação em várias formas facilitam sua aplicação comercial, principalmente na área biomédica e cosmética em que um maior grau de pureza se faz necessário (SANDFORD, 1989).

A descrição das características da quitosana, suas propriedades e suas diversas formas de apresentação são apresentadas abaixo (RINAUDO, 1992):

Pó: fino, sem cheiro, insípido, cor branca a amarelada de baixa densidade, alta pureza, rápida dissolução, hidrofílico;

Filme: flexível, claro, resistente, permeável, facilmente moldável, grande aderência a superfícies negativas;

Gel: bastante consistente em concentrações acima de 2%, reage facilmente com poliânions;

Grânulos: encapsulação, tamanho seletivo, porosidade variável, fácil ataque enzimático e *crosslinking*;

Loções: excelente toque, fácil incorporação de ativos;

Soluções: claras, muito ou pouco viscosas dependendo da distribuição de peso molecular e concentração da solução. Os grupos aminos livres (NH_2) presentes na quitosana fazem com que esta seja insolúvel em $\text{pH} > 6.0$ e na maioria dos solventes orgânicos. Estes grupos quando são protonados conferem à matriz características policatiónicas (NH_3^+) tornando-se solúvel em $\text{pH} < 6.0$.

III. 7. Derivados de quitosana

Modificações químicas na estrutura da quitosana tem sido largamente estudadas por abrirem possibilidades para novas aplicações (DUNG, 1993).

A presença de grupos amino primário no carbono C2 da cadeia polimérica piranosídica da quitosana, permite modificações químicas seletiva através de reações típicas deste grupo funcional, viabilizando a síntese de derivados químicos de quitosana com potenciais usos comerciais (NIFANT'EV, 1998).

As reações mais utilizadas para a obtenção de derivados de quitosana são:

Acilação parcial dos grupos amino com anidridos ou haletos de ácidos carboxílicos.

Formação de bases de Schiff com aldeídos, incluindo-se aqui reticulação da quitosana com o glutaraldeído, formol e glioxal. A reticulação da

quitosana com glutaraldeído ou glioxal visam o aumento do peso molecular, e em consequência, aumento da viscosidade.

Há procedimentos eficientes para a síntese de polissacarídeos bioativos provenientes de derivados solúveis da quitosana e tivemos a experiência de sintetizá-los em nosso laboratório, como exemplo podemos citar:

(1-4)-2-deoxy-ftalimido-β-D-glicose preparado através da reação de quitosana com anidrido ftálico. Esta modificação conferiu melhor solubilidade da quitosana em solventes orgânicos como: -N-dimetilformamida, dimetilsulfóxido, piridina bem como em água pura.

Quitosana mono e dicarboxilada em que a derivação ocupa os carbonos C3, C5 ou ambos no caso da quitosana dicarboxilada. Estas modificações não ocupam a amina do C2 viabilizando-a para outras reações.

Quitosana adicionada de cinamaldeído, através da reação da amina da quitosana com aldeído do cinamaldeído dá-se origem a uma base de Schiff. Esta técnica permite ligar a quitosana a outros aldeídos usados em perfumaria e na indústria alimentícia conferindo à quitosana a propriedade de fixação de aromas.

III.7.1. Derivado N-Succinil-quitosana

Os derivados de quitosana N-succinilados, tem apresentado diferentes características físico-químicas quando comparadas com as amostras sem estas modificações (YAMAGUCHI, 1981).

A N-succinil-quitosana foi liberada pela agência regulatória, Foods and Drugs Administration – FDA, no período entre Janeiro de 1987 à Setembro de 2001, tendo seu registro no **CAS** como : Chitosan Succinamide [**78809-92-04**].

Estrutura química da N- succinil-quitosana:

Fig.4- Representação gráfica da estrutura química da N-succinil- quitosana

A adição de radicais succínicos em diferentes concentrações ao grupo amino da quitosana, gera carboxiamidas, que conferem ao polímero, solubilidade em água e características eletrolíticas devido a presença de longa cadeia alquílica, tendo ao seu final um grupo carboxilato altamente hidrofílico afastado dos sítios hidrofóbicos.

III.8. Obtenção e reações do anidrido succínico:

CAS#: 108-30-5

PM: 100,08

FM: $C_4H_4O_3$

Fig. 5 – Representação gráfica do anidrido succínico

Os ácidos carboxílicos reagem com os cloretos de acila na presença de piridina para dar os correspondentes anidridos. Este método é geral e pode ser usado para obtenção de anidridos simples ou mistos.

Os sais de sódio dos ácidos carboxílicos também reagem com o cloreto de acila para formarem anidridos.

Anidridos com anel de quatro a cinco membros, que é o caso do anidrido succínico, podem ser sintetizado pelo simples aquecimento do ácido dicarboxílico apropriado. O ácido succínico aquecido à 300°C originará anidrido succínico. Este também pode ser obtido por refluxo do ácido succínico com o anidrido acético.

III.8.1. Reações com anidrido succínico

Os anidridos de ácidos carboxílicos são muito reativos, e dependendo da situação podem originar amidas ou ésteres.

III.8.1.1. *Síntese de amidas*

As amidas podem ser preparadas de várias maneiras: a partir dos cloretos de ácidos, dos ésteres, de anidridos de ácidos carboxílicos, dos ácidos carboxílicos e dos sais de ácidos carboxílicos ou ainda através da hidrólise parcial de nitrilas.

A molécula de quitosana através de seu grupamento amino reage com o anidrido succínico para formar uma amida.

III.8.1.2. *Síntese de ésteres*

Os anidridos de ácidos carboxílicos reagem com os álcoois e formam ésteres por uma reação conhecida como esterificação.

Segundo a metodologia que utilizamos para a síntese da N-succinil-quitosana neste trabalho, embora a molécula de quitosana apresente além de seu grupamento amino no carbono C2 e uma hidroxila no carbono C6, a reação de esterificação não apresenta condições favoráveis para que aconteça. As reações de esterificação são catalisadas por ácidos fortes, na ausência destes são muito lentas. Atingem o equilíbrio, quando se refluxa o ácido e o álcool com pequena quantidade de ácido sulfúrico ou de ácido clorídrico concentrados. O excesso de ácido carboxílico ou de álcool aumentam o rendimento da reação com base no reagente limitante.

IV- MATERIAIS

A amostra de quitosana utilizada neste projeto foi preparada em nosso laboratório a partir de cascas de camarão. Os reagentes utilizados, como: hidróxido de sódio, etanol, metanol, acetona, ácido clorídrico, ácido acético e anidrido succínico, foram de grau técnico obtidos comercialmente. Para dosagens analíticas, foram utilizados reagentes de grau analítico Merck ou equivalente.

V- MÉTODOS

Os ensaios realizados neste trabalho foram divididos da seguinte forma:

A quitosana de partida (**QLab**) foi caracterizada quanto ao grau de desacetilação (**GD**) por três metodologias: análise colorimétrica da ninhidrina, titulação dos sais de Br-quitosana com NaOH 0.1 Mol/L e infra-vermelho (IV). A distribuição de peso molecular médio foi determinada através da massa molar viscosimétrica média (**Mv**).

As amostras modificadas (**QLS 1:0,25; QLS 1:0,5; QLS 1:1 e QLS 1:3**) foram caracterizadas quanto ao grau de substituição (**GS**), sua relação com a solubilidade em diferentes pHs, caráter higroscópico e espectrometria de infra-vermelho.

V.1. Grau de desacetilação da quitosana

O grau de desacetilação, (GD), é uma característica muito importante da quitosana, pois disto depende uma rigorosa interpretação físico-química da amostra (HIRANO & YAGI, 1980; DOMARD, 1989; KAUSS, 1989; LIÉNART, 1993).

Uma das dificuldades encontradas são as condições dos métodos de desacetilação, que para produzir quitinas completamente desacetiladas utiliza-se tratamento alcalino concentrado (NaOH 50%) e temperaturas elevadas (100°C) por intervalos de tempo de até 5 horas, o que pode acarretar perdas na estrutura molecular do polímero.

Numerosos métodos têm sido propostos pela literatura a fim de se obter uma determinação precisa do grau de desacetilação de amostras de quitosana, mas infelizmente acontece uma grande discrepância entre os valores obtidos. Os métodos de titulação geralmente não são precisos e nem sempre de fácil execução, dando-se preferência às determinações espectroscópicas como: ressonância nuclear magnética (RNM) e infra-vermelho (IV). Outra dificuldade encontrada é a ausência de padrões confiáveis e métodos que viabilizem correlação dos resultados obtidos pelas análises.

De uma maneira geral, os métodos propostos medem de forma direta ou indireta a quantidade de grupos NH_2 livres no carbono C2 do anel piranosídico da quitosana.

Neste trabalho três técnicas foram realizadas na obtenção da determinação do grau de desacetilação das amostras de quitosana:

V.1.1. Técnica colorimétrica da ninhidrina

A ninhidrina é um reagente comumente utilizado para reconhecer e quantificar grupamentos amino. É uma metodologia rápida, sensível, reprodutível e de baixo custo que pode ser utilizada como método de rotina em laboratório para quantificar grupamentos amino livres de quitosanas (CUROTTO, 1993).

V.1.2. Titulação do sal de Br-quitosana

O método de titulação do sal Br-quitosana com hidróxido de sódio (NaOH 0.1Mol/L), determina a quantidade de aminas protonadas da quitosana que se ligaram ao bromo. A presença de proteínas, na amostra de quitosana, remanescente da extração a partir da quitina, assim como no método anterior da ninhidrina, podem interferir dando resultados falsamente elevados (KHAN, 2002).

V. 1.3. Infra-vermelho (IV)

A espectroscopia no infravermelho (IV), depende da interação das moléculas ou átomos com a radiação eletromagnética. É uma técnica instrumental simples e rápida que pode evidenciar a presença de vários grupos funcionais. A radiação IV causa aumento da amplitude de vibração das ligações covalentes entre os átomos e grupos funcionais de compostos orgânicos. Como os grupos funcionais de compostos orgânicos incluem átomos ligados por arranjos específicos, a absorção de energia IV por uma molécula orgânica

ocorrerá de modo característico destes grupos funcionais, específicos daquela molécula.

Um espectrômetro de IV opera passando o feixe de radiação através da amostra e compara a radiação que é transmitida pela amostra com um feixe de referência. Os compostos absorvem a energia IV em regiões particulares do espectro e são quantificadas. Qualquer frequência absorvida pela amostra será evidenciada pela diferença entre os feixes. O espectrômetro registra os resultados na forma de um gráfico, mostrando a absorbância versus a frequência ou comprimento de onda.

A grande maioria dos trabalhos publicados sobre a determinação do grau de desacetilação da quitina, o fazem pela técnica de espectroscopia na região do infravermelho, cujos dados são ajustados em equações relacionadas às bandas associadas aos grupos carbonila (C=O) do N-acetil e hidroxila (OH) presentes na quitina e quitosana. Geralmente as equações propostas, utilizam os valores de absorbância das bandas em 1655 e 3450 cm^{-1} , associadas a carbonila e hidroxila, respectivamente. A primeira banda varia conforme o grau de desacetilação da quitina, diminuindo da quitina para quitosana e a segunda, está presente tanto no espectro da quitina quanto no da quitosana, portanto, não sofre alteração. (TERBOJEVICH, 1988; CHO, 1998; ARCIDIACONO, 1992; MONTEIRO, 1999).

Os valores obtidos em absorbância relativos a estes dois comprimentos de onda são utilizados para o cálculo do grau de desacetilação da amostra (GD) segundo equação proposta por Domszy e Roberts que segue:

$$GD = 100 - [(A_{1655} / A_{3450}) \times 100 / 1,33] \quad \text{Equação 1}$$

O fator 1,33 corresponde a constante que representa a razão (A_{1655} / A_{3450}) para quitinas completamente acetiladas. É assumido valor igual a zero para quitosanas completamente desacetiladas (DOMSZY, 1985; CANELA, 2001; KHAN, 2002).

V.2. Distribuição de peso molecular médio

Devido ao alto peso molecular e sua estrutura linear, a quitosana confere viscosidade às soluções em meio ácido em pequena concentração (2-3%) e um comportamento pseudoplástico exibindo uma diminuição da viscosidade a medida que aumenta a tensão de cisalhamento. A viscosidade de soluções de quitosana aumenta a medida que: aumenta a concentração da amostra, diminui a temperatura e aumenta o grau de desacetilação da amostra (SINGLA, 2001).

O tamanho da cadeia polimérica e seu peso molecular também interferem na solubilização da amostra. Por exemplo, uma amostra de quitosana com peso molecular alto, em torno de 1.000.000 Daltons, irá formar um gel quando solubilizada a 3% com solução aquosa de ácido acético.

Por tratar-se de um polímero natural, o peso molecular de diferentes amostras de quitosana é inconsistente. Muitos valores podem ser obtidos dependendo da procedência da amostra e dos tipos de tratamento que foram empregados na sua obtenção. Para diminuir discrepâncias nas faixas de peso molecular obtidos, classificou-se as amostras de quitosana segundo a distribuição de peso molecular em: baixo, médio e alto peso molecular. As quitosanas

consideradas de baixo peso molecular estão na faixa de 100.000 g/mol, as de médio peso estão na faixa de 500.000 g/mol e as de alto peso, 1.000.000 g/mol, conforme representadas na figura 6 (DEE, 2001):

Fig.6 - Distribuição de peso molecular médio das amostras de quitosana

V.2.1. Medida da massa molar viscosimétrica média (Mv)

Viscosimetria é um método simples e rápido para determinar a massa molar viscosimétrica média de polímeros. A equação mais comumente utilizada que relaciona viscosidade e peso molecular é a equação de Mark-Houwink-Sakurada:

$$[\eta] = K \cdot Mv^a \quad \text{Equação 2}$$

onde $[\eta]$ é a viscosidade intrínseca, Mv é a massa molar viscosimétrica média, K e a são constantes viscosimétricas independentes da massa molecular, porém são dependentes do solvente, temperatura e da estrutura química do polímero (MAGHAMI e ROBERTS, 1988).

A densidade linear de carga das moléculas de quitosana em solução ácida irá variar conforme a quantidade de grupamentos amino livres ao longo da cadeia polimérica e isto afetará a configuração da cadeia da quitosana em solução, bem como os valores de K e a (MAGHAMI, 1988).

Muitos valores para K e a têm sido propostos para diferentes sistemas solventes de quitosana, conforme tabela 3. Estes solventes têm como finalidade minimizar o efeito de polieletrólito da quitosana quando dissolvida em soluções aquosas de ácidos fracos (ROBERTS, 1992).

Tabela 3 - Valores de K e a para solventes de quitosana

Sistema solvente	K ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)	a	P.M(10^5)
0.2M AcOH - 0.1M NaCl - 4M uréia	8.93×10^{-2}	0.71	1.13-4.92
0.1M AcOH - 0.2M NaCl	1.81×10^{-3}	0.93	0.9-11.4
0.33M AcOH - 0.3M NaCl	3.41×10^{-3}	1.02	0.13-1.35
0.33M AcOH - 0.2M NaOAc - 0.67M $\text{Cl}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	1.38×10^{-2}	0.85	0.61-1.60

O solvente de escolha para o teste da massa molar viscosimétrica média utilizado neste trabalho foi citado por Roberts e Domszy (1982), que relataram valores de $K = 1.81 \times 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{g}^{-1}$ e $a = 0.93$, para amostras de quitosana dissolvidas AcOH 0.1 Mol/L e NaCl 0.2 Mol/L (MAGHAMI, 1988).

Os valores de a dependem diretamente da configuração do polímero. Para polímeros lineares de cadeia aleatória, os valores de a , devem ser maiores que 0.5, uma vez que valores abaixo de 0.5 são típicos para proteínas globulares em que a cadeia polimérica é hidratada e a configuração é em espiral. Estas duas características não são observadas nas cadeias de quitosana. Valores de a em

tomo de 1.2 são utilizados para cadeias estendidas e muito longas (ANTHONSEN, 1993).

Segundo Maghami e Roberts (1987), utilizando-se os valores, $K=1.81 \times 10^{-3}$ e $a = 0.93$, tem-se observado resultados aceitáveis de M_v .

V.3. Grau de substituição (GS)

As metodologias utilizadas para determinação do grau de substituição das aminas pelo anidrido succínico foram as mesmas utilizadas para medida do grau de desacetilação mencionadas acima.

V.4. Solubilidade

A dissolução da quitosana em solução aquosa de ácido não se deve apenas ao rompimento das ligações intermoleculares envolvendo os grupos N-acetil presentes na quitosana, mas principalmente, às propriedades hidrofílicas das unidades (Glc-NH₂), que em pH abaixo de 6.0 encontram-se protonadas levando ao equilíbrio:

Portanto, a solubilidade da quitosana pode ser associada a vários fatores: quantidade de grupos N-acetil (NHCOCH₃), grupos amina (NH₂) e a distribuição destes grupos por toda a extensão da cadeia polimérica. Interferem ainda a força iônica da solução, pH e pureza do produto (ANTHONSEN, 1993; DEE, 2001).

A solubilidade da quitosana em ácidos inorgânicos é limitada quando comparada à solubilidade em ácidos orgânicos. Quando dissolvida em meio ácido, os grupamentos amino do polímero tornam-se protonados (RNH_3^+), solubilizando o polissacarídeo.

Em solução, a quitosana apresenta-se em conformação estendida devido a repulsão das unidades desacetiladas vizinhas que estão carregadas positivamente. A adição de eletrólitos diminui este efeito resultando em uma conformação em espiral da molécula (DOMARD, 1987; SKAUGRUD, 1991; SINGLA, 2001).

Quitosanas com grau de desacetilação (85%) solubilizam-se em até pH 6.5 porque os grupamentos N-acetil que conferem o efeito de repulsão quando em contato com as moléculas de água, estão presente em pequena quantidade (15%) ao longo da cadeia polimérica, prevalecendo assim, a interação das moléculas de água com os grupamentos amino protonados que foram expostos com a reação de desacetilação.

A escolha da solução ácida também afeta a solubilidade. Os ácidos cítrico e tartárico formam complexos quando em solução com a quitosana causando instabilidade da solução final (DEE, 2001).

V.5. Grau de higroscopia

A propriedade da quitosana em sorver umidade confere a este polímero boa capacidade de formação de géis e emulsões. Além disto atribuem boas características aos filmes e membranas de quitosana que apresentam além de outras finalidades, hidratação.

Interação das moléculas de água com a quitosana

(A) Interação da água com o monômero da quitosana

(B) Interação da água com as cadeias poliméricas da quitosana

Fig. 7– Representação gráfica de retenção de água pela quitosana
Publicado na Revista Cosmetics & Toiletries, Ago/98

VI. Parte Experimental

VI.1. Preparação das amostras:

VI.1.1 – Quitosana de partida (QLab)

A amostra de quitosana utilizada foi sintetizada em nosso laboratório e como era esperado, não era solúvel em água, álcool, acetona, porém solúvel em soluções ácido acético/ água em pH < 6.0.

VI.1.2. Processo de extração da quitina da casca de crustáceos

O processo básico utilizado para a extração da quitina envolve a remoção de proteínas (desproteínização), minerais (desmineralização) como: carbonato de cálcio e fosfato de cálcio, e pigmentos (despigmentação) (CANELLA, 2001).

O método utilizado para a extração de quitina das cascas de camarão foi o seguinte:

Etapa 1 - desproteínização: a extração dos componentes protéicos ligados covalentemente à matriz polimérica das cascas secas dos camarões, foi feita através do tratamento de 100g de casca seca com 1000mL de solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH) 10% por 6 horas, sob agitação constante em temperatura ambiente. O material obtido foi filtrado e lavado com água destilada até pH 7.0.

Etapa 2 - desmineralização: o material obtido da etapa anterior (50g) foi imerso em 1000mL de ácido clorídrico 10% (HCl), para a remoção de sais minerais como o carbonato e fosfato de cálcio. A reação foi mantida por 6 horas, sob agitação constante e à temperatura ambiente. O material resultante da reação foi filtrado e lavado diversas vezes com água destilada.

Etapa 3 - despigmentação: o produto da etapa 2 (aproximadamente 22g) foi colocado em suspensão em 500mL de hipoclorito de sódio, (NaOCl), contendo 3% de cloro ativo por 3 horas, nesta fase foram removidos os pigmentos contidos na matriz polimérica.

Finalmente a amostra foi filtrada, lavada e obteve-se a quitina purificada. Após o tratamento a quitina obtida foi secada e estocada, uma vez que é um intermediário estável para posterior desacetilação que deu origem a quitosana.

O rendimento médio de quitina em relação a casca seca de camarão foi de aproximadamente 20% em massa, condizente com dados da literatura.

PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE QUITINA A PARTIR DE CASCAS DE CRUSTÁCEOS

Fig. 8 – Rota utilizada para obtenção de quitina a partir de cascas secas de camarão.

VI.1.3 – Processo para obtenção de quitosana a partir da quitina

O processo de desacetilação visa converter a quitina em quitosana, o qual, consiste no tratamento da quitina com solução de hidróxido de sódio (NaOH) concentrado (50%) em temperatura elevada (100-110°C), para remover os grupos acetil presentes na quitina (NO, 1995). O procedimento descrito acima foi o que utilizamos para obtenção da quitosana.

As etapas de desmineralização e desacetilação são normalmente as mais importantes na obtenção da quitina e quitosana. Durante estas etapas, condições relacionadas a altas temperaturas (100°C) por tempo prolongado (5-6 horas) e concentração dos reagentes influenciam diretamente no peso molecular da cadeia interferindo na qualidade do produto final (JONSON, 1982; NO, 1995; PETER, 1995).

O rendimento obtido no processo empregado neste trabalho partindo-se de cascas secas de camarão foi de 22% de quitina. Após o processo de desacetilação obteve-se 20% de quitosana em massa.

PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE QUITOSANA A PARTIR DA QUITINA

Fig. 9 – Rota utilizada para obtenção de quitosana a partir da quitina.

VI.1.4 – Síntese do derivado N-succinil-quitosana

Yamagushi e colaboradores em 1981 sintetizaram uma biblioteca de amostras de N-succinil-quitosana através da reação com anidrido succínico, porém em concentrações molares muito maiores do que as realizada neste estudo.

A metodologia utilizada neste trabalho para síntese das amostras de N-succinil- quitosana foi baseada no estudo de Yamagushi *et al.* com algumas modificações. Primeiramente no que está relacionado a concentração molar, em que no trabalho original era de 16,4 moles/amino grupo, enquanto nós trabalhamos com concentrações molares menores e que estão representadas na tabela 4, além disso precipitamos as amostras com etanol e não metanol como foi inicialmente proposto pelo autor. A solubilização prévia do anidrido succínico em acetona foi substituída pela adição direta no meio reacional.

Em uma primeira etapa sintetizamos uma biblioteca de quatro diferentes amostras de N-succinil-quitosana a partir da amostra QLab. Para cada 1,0g de quitosana, foram adicionados 0,25g; 0,5g; 1,0g e 3,0g em massa de anidrido succínico e na tabela 4 estão representados as correlações molares.

Tabela 4- Representação da relação estequiométrica (moles e massa) das amostras de quitosana

Amostras	Abreviatura	Estequiometria Moles		Estequimometria Massa (g)	
		Quitosana	Succinil	Quitosana	Succinil
Quitosana comercial	QCom	0,06	-	1	-
Quitosana sintetizada no laboratório	QLab	0,06	-	1	-
N-succinil-quitosana substituída em 1: 0,25	QLS (1: 0,25)	0,06	0,0025	1	0,25
N-succinil-quitosana substituída em 1:0, 5	QLS (1: 0,5)	0,06	0,005	1	0,5
N-succinil-quitosana substituída em 1:1	QLS (1:1)	0,06	0,010	1	1,0
N-succinil-quitosana substituída em 1:3	QLS (1:3)	0,06	0,030	1	3,0

Foram dissolvidas quatro amostras de 10,0g de quitosana QLab em solução aquosa de ácido acético 3% (300mL). Após dissolução completa e sob agitação constante, foram adicionados 1000mL de etanol. Em seguida, foram adicionado lentamente a cada amostra 2,5; 5,0; 10,0 e 30,0g em massa de anidrido succinico dissolvido diretamente no meio reacional. Seguiram-se 3 horas de agitação em agitador mecânico e 12 horas de repouso, então, as amostras foram precipitadas levando-se o pH=10.0 e a seguir as amostras foram filtradas a vácuo. O precipitado foi lavado com etanol/éter, filtrado e secado novamente a vácuo até peso constante. Feito isto obtivemos sais sódicos de N-succinil-quitosana.

PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE N-SUCCINIL - QUITOSANA

PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE N-SUCCINIL - QUITOSANA

Fig. 10 – Processo de síntese da N-succinil-quitosana

VI. 2. Ensaios analíticos

VI.2.1 – Medida do grau de desacetilação da quitosana (GD)

A amostra obtida pelo processo exposto acima (Qlab) foi medida quanto ao grau de desacetilação segundo o método colorimétrico da ninhidrina, titulação dos sais de Br-quitosana e IV. A amostra foi dosada em comparação com uma outra amostra de quitosana adquirida no comércio local (Qcom) e com o monômero D-glicosamina como padrão de desacetilação total.

VI.2.1.1. Método colorimétrico da ninhidrina

A análise quantitativa dos amino grupos livres da molécula de quitosana podem ser determinados pela técnica da ninhidrina, reagente normalmente utilizado para identificar e quantificar grupamentos amino (CUROTTO, 1993).

Soluções 0,1 mg/ml de quitosana em ácido acético 3%, foram preparadas à 20°C sob agitação. As amostras permaneceram sob agitação por 24 horas a fim de garantir a total solubilização das amostras. Alíquotas de 0,5 mL destas soluções foram adicionadas a 0,5 mL de tampão acetato (4 mol L⁻¹, pH 5,5). Cada amostra foi adicionada de 2,0 mL de reagente de ninhidrina. As amostras foram agitadas vigorosamente e colocadas em banho fervente por 20 minutos. Depois foram resfriadas e a absorbância foi lida a 570 nm em Espectrofotômetro Incibrás MF 200 UV-VIS.

VI.2.1.2. Titulação dos sais de Br-quitosana

A medida do grau de desacetilação da quitosana por titulação dos sais de Br-quitosana titulados com NaOH 0.1Mol/L foi realizada segundo o método citado

a seguir: 0,5g das amostras de quitosana foram dissolvidas em 100 mL de HBr 0.2 Mol/L. A estas soluções foram adicionado 50 mL de HBr 9.0 Mol/L sob agitação vigorosa a fim de precipitar o sal de Br-quitosana. Centrifugou-se as soluções por 30 minutos à 2000 rpm. Descartou-se o sobrenadante.

O precipitado de cada amostra foi lavado várias vezes com solução metanol/ éter (1:1, v/v), até neutralidade. O precipitado foi secado em dessecador por 12 horas até obtenção dos respectivos sais de Br-quitosana (KHAN, 2002).

Foram pesados 0,2 g dos sais obtidos na etapa anterior e dissolvidos em 100 mL de água destilada. A seguir foram titulados 20 mL destas soluções com NaOH 0.1Mol/L na presença do indicador fenolftaleína.

O número de moles de álcali neutralizados correspondem ao número de moles de Br presente. Os moles de Br neutralizados, por sua vez, correspondem aos moles de unidades D-glicosamina inicialmente presentes na solução, resultado indiretamente no grau de desacetilação das amostras de quitosana.

VI.2.1.3. *Infra vermelho (IV)*

As medidas através de infra-vermelho do grau de desacetilação da quitosana e seus derivados, foram realizados em paralelo às medidas titulométricas como método de confirmação dos resultados obtidos pelos ensaios da ninidrina e dos sais de Br-quitosana. O ensaio de IV foi realizado em parceria com o Departamento de Biologia Molecular do Instituto de Pesquisa em Energia Nuclear (IPEN) e Instituto de Química (IQ), Central Analítica que possuem o equipamento.

VI.2.2. Determinação da distribuição de peso molecular médio

O ensaio para determinação da distribuição do peso molecular médio foi realizado pelo teste de massa molar viscosimétrica média (M_v) para a amostra de quitosana de partida (QLab) em viscosímetro de Ubbelohde. Considerando-se que a modificação química realizada neste trabalho não provocou aumento ou diminuição da cadeia polimérica, o teste foi realizado apenas para amostra QLab, ou seja, quitosana de origem sem modificação química.

VI.2.2.1. Determinação da massa molar viscosimétrica média M_v :

A determinação da massa molar viscosimétrica média, M_v foi calculada pela equação Mark-Houwink-Sakurada:

$$[\eta] = K \cdot M_v^a \quad \textbf{(equação 2)}$$

Utilizado o viscosímetro Ubbelohde – Schott Geratte CK100 – AVS 350, mediu-se o tempo de escoamento das soluções de quitosana, nas concentrações de 1,0 g/L a 2,5 g/L, variando de 0,25 em 0,25 g/L, no seguinte solvente: 0,1 Mol/L de ácido acético e 0,2 Mol/L de cloreto de sódio, cujas constantes para este solvente são $K = 1,81 \times 10^{-3}$ e $a = 0,93$. As soluções foram filtradas através de membranas de acetato de celulose de tamanho de poro 0,45 μm antes das determinações de viscosidade. O teste foi realizado à temperatura de $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ em banho termostático estabilizado. As amostras foram dosadas em triplicata.

A medida da viscosidade específica foi calculada a partir da seguinte equação:

$$\eta_{\text{esp}} = [(t_{\text{solução}} - t_{\text{solvente}}) / t_{\text{solvente}}] / c \quad (\text{equação 3})$$

onde η_{esp} , é a viscosidade específica para cada concentração de amostra e c , a concentração da solução de quitosana. A viscosidade intrínseca $[\eta]$ é o valor referente a extrapolação da reta das medidas de viscosidade quando considera-se c igual a zero.

VI.2.3. Grau de solubilidade em diferentes pHs

Após a síntese da biblioteca de derivados da quitosana com diferentes graus de substituição as amostras obtidas foram testadas quanto a solubilidade em diferentes pHs. Em tubos de ensaio foram preparadas três baterias de soluções 1% das amostras de quitosana QLab, QLS(1:0,25), QLS(1:0,5), QLS(1:1) e QLS(1:3), bem como uma amostra de quitosana comercial **Qcom** . Um primeiro grupo foi dissolvido em solução ácido acético 3% pH=4.0; um segundo grupo dissolvido em água destilada e pH acertado para 7.0 e finalmente em um terceiro e último grupo, as amostras foram dissolvidas em solução aquosa de NaOH 3% , pH = 10.0. As amostras foram agitadas de 15 em 15 minutos durante um intervalo de 1 hora, seguidas de um repouso de 10 horas.

A amostra que apresentou melhor solubilidade em pH=7.0 e 10.0, que é a característica principal almejada neste estudo, foi a amostra QLS(1:3) que apresenta maior grau de substituição. A partir deste resultado as amostras escolhidas para prosseguimento das análises e experimentos foram as amostras QLab, Qcom, QLS(1:1) e QLS(1:3).

VI.2.4. Grau de substituição (QS)

A metodologia utilizada para determinação do grau de substituição nas aminas presentes na quitosana pelos grupamentos de anidrido succínico foi a mesma utilizada para medida do grau de desacetilação, mencionados acima. As técnicas propostas para GD medem a quantidade de aminas livres após desacetilação, e no caso da modificação proposta, as aminas livres foram transformadas em amidas com a inserção do grupamento succínico, dando origem a leituras muito baixas de aminas livres proporcionais ao grau de substituição. Este teste foi realizado para as amostras QLS(1:1) e QLS(1:3) em comparação com as amostras Qlab e Qcom .

VI.2.5. Grau de higroscopia

Foram preparados dessecadores com soluções saturadas dos seguintes sais e colocados no fundo das câmaras:

Tabela 5 – Sais utilizados nas câmaras de saturação à 20° C

Sal	Umidade relativa à 20°C
MgCl ₂ .6H ₂ O	33,10 %
NaBr	59,20 %
BaCl ₂	90,70 %

As amostras de quitosana QLab, QCom, QLS(1:1) e QLS(1:3) foram secas por 24 horas que antecederam ao teste em um liofilizador. Em seguida foram pesadas em balança analítica, e colocadas nos dessecadores com diferentes

graus de umidade. As pesagens foram feitas em intervalos de 1 hora, durante um prazo de 5 horas, quando as amostras apresentaram peso constante.

Foram tomados os cuidados necessários de uma gravimetria, fechando os frascos imediatamente após abrir o dessecador. Após as pesagens as amostras foram rapidamente recolocados nos dessecadores fazendo-se vácuo novamente.

VII – RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização da amostra de quitosana obtida a partir das cascas de camarão (Qlab) quanto ao grau de desacetilação (GD) está representada na figuras 12, segundo as três técnicas empregadas para tal análise.

Primeiramente, realizamos uma curva de calibração para técnica de titulação com ninhidrina com o monômero D-glicosamina em concentrações de 10 μ L à 70 μ L . Como pode-se observar na figura 11, os resultados obtidos com o monômero D-glicosamina foram diretamente proporcionais a concentração, obtendo-se uma leitura de densidade ótica muito próxima de 100% para amostra D-glicosamina em concentração de 50 μ L. A partir deste resultado os testes com as amostras de quitosana também foram feitos na concentração de 50 μ L de amostra. Uma terceira amostra comercial (Qcom) também foi medida. Os resultados obtidos da titulação com ninhidrina foram em torno de 40% para as amostras Qlab e Qcom .

Os resultados obtidos do GD das amostras analisadas pela técnica de titulação dos sais de Br-quitosana com NaOH 0,1 Mol/L , foram 70% e 60% para as amostras Qlab e Qcom respectivamente.

Os resultados de GD calculados a partir dos resultados obtidos da análise em IV, (equação 1, pág.34) para as amostras de quitosana Qlab e Qcom ficaram em torno de 45% .

Os resultados foram muito similares para todas as amostras pelas técnicas de titulação com ninidrina e IV enquanto a titulação dos sais de Br-quitosana obtivemos resultados aumentados para as mesmas amostras. Sendo que o

método do IV é considerado de escolha para determinação do GD de amostras de quitosana, podemos dizer que o método da titulação com ninidrina, uma técnica de fácil execução que independente de equipamentos mais sofisticados gerou resultados satisfatórios. Levando-se em conta referências bibliográficas que preconizam o teste de IV como mais preciso e exato consideramos os resultados obtidos pela titulação com ninidrina e IV como os resultados de GD das amostras de quitosana mais confiáveis que a titulação com sais de Br-quitosana, sendo assim assumimos o valor de GD=40% para a amostra QLab.

Fig.11- Curva de densidade óptica obtida do monômero D-glicosamina pelo teste colorimétrico da ninhidrina. Concentração das amostras em μg .

Fig.12 – Resultados do grau de desacetilação das amostras de quitosana obtidos pelas técnicas: colorimétrica da ninidrina, titulação dos sais de Br-quitosana e IV

Na figura 13 está representada a extrapolação da reta dos valores da viscosidade específica (η_{esp}) obtidos do tempo de escoamento da amostra QLab, para cada concentração dosada (viscosidade intrínseca $[\eta]$). Pela equação de Mark-Houwink-Sakurada,

$$[\eta] = K \cdot M_v^a \quad \text{Equação 2}$$

conhecendo-se os valores de $[\eta]$, K e a chegamos a massa molar viscosimétrica média (M_v). A medida da massa molar viscosimétrica média foi realizada com a amostra quitosana QLab, e os resultados podem ser observados na tabela 6.

Tabela 6- Resultados de $[\eta]$ e M_v da amostra QLab

Amostra	Solvente	$K(\text{cm}^3 \text{g}^{-1})$	a	$[\eta]$	$M_v \text{ g/mol}$	$M_v \text{ KDa}$
QLab	0,1M AcOH/ 0,2M NaCl	$1,81 \times 10^{-3}$	0,93	0,514	728.256	700

Este resultado coloca a quitosana QLab em uma faixa de distribuição de peso molecular médio, segundo a classificação representada na figura 6 (ver página 35) deste trabalho.

Fig.13- Representação dos resultados da viscosidade específica e intrínseca da amostra QLab em viscosímetro de Ubbelohde.

Solubilidade da biblioteca de amostras de quitosana

Estão representados na figura 14 os resultados do teste de solubilidade à 25°C.

Após o tratamento em solução ácida (AcOH 2%) das amostras de quitosana QCom, QLab e as variações QLS(1:0,25), QLS(1:0,5), QLS(1:1) e QLS(1:3), verificou-se que as amostras QLab e QCom quando em meio ácido diluído pH=4.0, apresentaram-se muito solúveis. As amostras QLS(1:0,25), QLS(1:0,5) e QLS(1:1) com grau de substituição crescente por grupamentos succínicos, aparecem parcialmente solubilizadas devido ao número de grupamentos amino livres estarem presentes em maior quantidade que os substituídos, os quais encontram-se protonados e solúveis em pH ácido (pH=4.0). A amostra QLS(1:3), mais substituída, aparece muito pouco solubilizada em pH 4.0 devido a presença do anidrido succínico inserido nos grupamentos amino, os quais não estão mais livres para interagirem diretamente com o solvente. Soma-se a isto, a presença de grupos carboxilatos do anidrido succínico que em meio ácido favorecem a precipitação da amostra.

Quando as amostras de quitosana foram adicionadas de água, pH=7.0 as amostras QLab e QCom permanecem completamente insolúveis. As amostras QLS(1:0,25), QLS(1:0,5) e QLS(1:1) aparecem parcialmente solubilizadas demonstrando que os grupamentos amino estão concorrendo com os monômeros substituídos pela interação com o solvente. Neste caso as amostras começam a interagir com a água promovendo a solubilização parcial destas amostras. A amostra QLS(1:3), aparece totalmente solubilizada devido a interação da cadeia do grupamento succínico com as moléculas da água.

Em soluções alcalinas (pH=10.0), as amostras de quitosana Qlab e QCom aparecem insolúveis. A amostra QLS(1:0,25), pouco substituída aparece muito pouco solúvel neste pH. As amostras QLS(1:0,5) e QLS(1:1) aparecem mais solubilizadas que a amostra QLS(1:0,25) devido ao teor maior de anidrido presente que começa a solubilizar-se melhor em pH=10.0. A amostra QLS(1:3) aparece completamente solubilizada por causa da presença dos grupamentos alquil ácidos do anidrido presentes, os quais encontram condições favoráveis de solubilização em meio alcalino.

As floculações que permaneceram nas primeiras 5 horas foram dissolvendo-se no período seguinte de mais 5 horas, no qual, as amostras tornaram-se mais homogêneas.

Após este período as amostras não apresentaram modificações na solubilização que pudessem ser observadas qualitativamente.

SOLUBILIDADE DAS AMOSTRAS DE QUITOSANA EM pH ÁCIDO, NEUTRO e ALCALINO

Fig. 14 – Solubilidade das amostras de quitosana em três diferentes pHs. As nomenclaturas das amostras seguindo da esquerda para direita: Padrão=QLab, A= QLS(1:0,25), B= QLS(1:0,5) , C= QLS(1:1) , D= QLS(1:3)

Grau de Substituição

Na figura 15 estão representados os resultados do grau de substituição das amostras QLab, QCom, QLS(1:1) e QLS(1:3). Os testes empregados para medir o grau de substituição (GS) das amostras foram os mesmos empregados para as medidas do grau de desacetilação (GD), ou seja, titulação com ninidrina, titulação dos sais de Br-quitosana e IV. Considerando-se que estes métodos medem a quantidade de aminas livres, o fato destas aminas terem sido substituídas pelo anidrido succínico, obtivemos resultados menores de aminas livres conforme aumentamos o grau de substituição.

As amostras modificadas pela inserção do grupamento succínico QLS(1:1) e QLS(1:3) comparadas com a sua amostra de origem Qlab, apresentava viabilidade de inserção do grupamento succínico em 40% dos carbonos na posição C2 do anel que estavam desacetilados segundo os resultados do grau de desacetilação. À medida que um maior número de grupamentos succinil foi adicionado, 1,0 e 3,0g em massa nas amostras QLS(1:1) e QLS(1:3) respectivamente, menor a densidade óptica (DO) obtida, confirmando que os grupamentos amino antes livres, foram ligados aos grupamentos succínico.

As curvas do GS não se apresentam de forma linear devido a estequiometria do anidrido succínico empregado na síntese, tendo sido adicionado às amostras nas quantidades de 1,0 e 3,0g, para cada 1,0g de quitosana (m/m) respectivamente. Os resultados obtidos em termos de substituição dos grupos amino livres não obedeceram uma relação linear uma vez que é sempre necessário adicionar um excesso de anidrido succínico para

obter a substituição desejada da quitosana. Tal situação decorre do fato de que o anidrido succínico quando adicionado neste meio também reage com o álcool (esterificação) e a água presente (hidrólise) e, portanto, apenas uma parte do anidrido succínico reage com o grupo amino da quitosana. Sendo a proporção 1:1 insuficiente para ocupar todos os grupamentos amino pelos motivos citados acima.

Se observarmos a relação molar verificamos que pudemos obter N-succinilquitosanas solúveis em meio alcalino a partir do emprego de uma relação de 1:1 grupo amino livre e anidrido succínico respectivamente. Tal resultado na literatura, foi obtido somente com uma relação 1:14,6 Moles. A referência no entanto não faz qualquer alusão de grau de desacetilação do produto de partida que foi empregado.

Fig. 15 -- Resultados do grau de substituição das amostras de quitosana obtidos pelas técnicas: colorimétrica da ninidrina, titulação dos sais de Br-quitosana e IV

Grau de higroscopia

As figuras 16, 17 e 18 representam a capacidade das amostras de quitosana em sorver umidade em função do tempo a 25°C. Observando-se os resultados, todas as amostras apresentaram maior hidratação na primeira hora de análise, seguido de um aumento menor após a primeira hora até atingir um valor máximo e neste valor ficar estabilizado. Também é possível observar que a amostra QLS(1:3), com maior grau de substituição, foi a que mais se hidratou em relação a mostra QLab, seguida da amostra QLS(1:1) em função do tempo a 25°C.

Na figura 18, com 99,70% de umidade, todas as amostras sofreram maior grau de hidratação, mas mantiveram o perfil relacionado ao grau de substituição. Quanto maior a umidade relativa do dessecador e maior o grau de substituição (GS), maior o ganho de umidade.

Fig. 16 – Representação dos resultados de sorção de água das amostras de quitosana (ganho de massa em g) na câmara de saturação 33,10% em relação ao tempo.

Fig. 17 - Representação dos resultados de sorção de água das amostras de quitosana (ganho de massa em g) na câmara de saturação 59,20% em relação ao tempo.

Fig. 18 - Representação dos resultados de sorção de água das amostras de quitosana (ganho de massa em g) na câmara de saturação 90,70% em relação ao tempo.

VIII- CONCLUSÕES

As amostras de N-succinil-quitosana sintetizadas QLS(1:0,25), QLS(1:0,5), QLS(1:1) e QLS(1:3) apresentaram diferentes características físico-químicas. A diferença mais notável foi quanto a solubilidade quando comparadas com a amostra QLab. A amostra QLS(1:3), com alto grau de substituição, apresentou solubilidade desde pH=7.0 até pH=14.0 abrindo ainda mais as possibilidades de emprego da quitosana em aplicações diversas a que vem sendo proposta.

O caráter higroscópico apresentou-se aumentado para as amostras modificadas de quitosana, favorecendo a formação de filmes e membranas com finalidade hidratante e de curativos.

O ensaio de grau de desacetilação pelo método colorimétrico da ninhidrina, realizado para caracterizar a amostra de quitosana de partida, Qlab apresentou-se eficaz, reprodutível e de fácil execução quando comparado ao teste de infra-vermelho.

Sob o ponto de vista tecnológico, estabeleceu-se um método seguro e reprodutível de obtenção da N-succinilquitosana com vários perfis de propriedades físico-químicas.

Esta tecnologia foi estabelecida podendo ser aplicada de forma verticalizada em grande escala diretamente do descarte, que são as cascas de crustáceos.

X - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

- . Anthonsen, M. W.; Varum, K. M.; Smidsrod, O.; "Solution properties of chitosans: conformation and chain stiffness of chitosans with different degrees of N-acetylation", *Carbohydr. Polym.*, 22, 193-201, 1993.
- . Arcidiacono, S.; Kaplan, D. L. "Molecular weight distribution of chitosan isolated from *Mucor rouxii* under different culture and processing conditions" *Biotechnol. Bioeng.*, 39, 281-286, 1992.
- . Austin, P. R., Brine, C. J., Castle J. E., Zikakis, J., P.; "Chitin: new facets of research" *Science*, 212, 749-753, 1981.
- . Batista, I.; Roberts, G.A .F, "A novel facile techique for deacetylating chitin". *Makromol.Chem.* 191, 429-434, 1990.
- . Berkeley, R.C.W.; "Chitonolytic and chitosanolytic microorganisms and the potential biodeterioration problem in the commercial application of chitin and its derivatives. Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan, 570-577, 1978.
- . Brine, C. J.; "Advences in Chitin Chitosan". *Proceedings of 5th Conference of Chitin/Chitosan*, 1991, 685p. Elsevier Applied Science, 1992. New York.
- . Canella, K. M. N.; Garcia, R. B.; "Caracterização de Quitosana por Cromatografia de Permeação em Gel – Influência do Método de preparação e do Solvente". *Quim. Nova*, Vol. 24, nº 1, 13-17, 2001.
- . Chen, J.; Wang, M.; Ho, C., J.; "Volatile compounds generated from thermal degradation of N-acetylglucosamine" *Agric. Food Chem.*, 46, 3207– 3209, 1998.
- . Cho, I. Y., No, H. K., Meyers, S. P., *J. Agrc. Chem.*, 46, 3839-3843, 1998.
- 0. Craveiro, A. A.; "Quitosana a Fibra do Futuro". Ceará, PADETC, 124p, 1999.
- 1. Curotto, E.; Aros, F.; "Quantitative detemination of chitosan and the percentage of free amino groups". *Analytical Biochemistry*, 211, 240-241, 1993.
- 2. Dee, G. J., Rhode, O., Wachter, R., "Chitosan- multi-functional marine polymer". *Cosmetics & Toiletries*, 116, 2, 39-42, 2001.
- 3. Demarger, S., A.; Domard, A.; "Chitosan behaviours in a dispersion of undecylenic acid. Structural parameters". *Carbohydrate Polymers*, 24, 177-184, 1994.
- 4. Desbrieres, J., "Viscosity of semiflexible chitosan solutions: influence of concentration, temperature and role of intermolecular interactions". *Biomacromolecules*, 3, 342-349, 2002.
- 5. Domard, A.; "pH and c.d. measurements on a fully deacetylated chitosan". *Int. J. Macromol.*, 9, 98-104, 1987.

16. Domard, A.; Roberts, G.A.F.; Varum, K.M.; *In Advances in Chitin Science; vol. II; Proceedings of 7th International Conference on Chitin Chitosan and Euchis'97*; Ed.; Jacques Andre Publisher; Lion, p 410, 1997.
17. Domszy, J. G. and Robets, G.A .F, "Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analyzing chitosan", *Makromol Chem.*, 186, 1671- 1685, 1985.
18. Dung, P., Mila, M., Rinaudo, M., Desbrières, J.; "Water soluble derivatives by controlled chemical modifications of chitosan". *Carbohydrate Polymers* , 24, 209 – 214, 1994.
19. Filar, L. J. and Wirick, M.G., "Bulk and solution properties of chitosan". *Proceedings of the 1st International Conference on Chitin/ Chitosan*. Ed., R.A.A. Muzarelli and E.R. Pariser, 169-181, 1978.
20. Grant, St.; Blair, H. S.; McKay, G "Structural studies on chitosan and other chitin derivatives", *Makromol. Chem.*, 190(9), 2279-86,1989.
21. Hirano, S.; *Biotech. Ann. Res.* 2, 237 – 258, 1996.
22. Hirano, S.; *Chitin and Chitosan*, Elsevier, 37-43, New York, 1989.
23. Hong, Xiao-Yin; J. M. S.; *Pure Appl. Chem.*,10, 1459-1477, 1996.
24. Hwang, K.T.; Jung, S.T.; Lee, G.D.L.; "Controlling molecular weight and degree of deacetylation of chitosan by response surface methodology", *J. Agric. Food Chem.*, 50, 1876-1882, 2002.
25. IBAMA, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. *Recursos Pesqueiros: GeoBrasil e Estatística da Pesca 2000*. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/recursospesqueiros/geobrasil1.htm>>. Acesso em: 03 mai. 2003.
26. Jonson, E. L., Peniston, Q. P., "Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products", *Chem. Biochem. Marine Food*, A VI Publishing Co., Westport, 1982
27. Kato, Y., Onishi,, H., Machida, Y., "Depolymerization of N-succinyl-chitosan by hydrochloric acid". *Carbohydrate Research*, 337, 561-564, 2002.
28. Khan, T. A., Peh, K.K., Ching, S.H., "Reporting degree of deacitilation values of chitosan: the infuence of analytical methods". *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 5, 3, 205-212, 2002.
29. Kim, C. Y.; Choin, Hyung-min; Cho, H. T. J., "Effect of deacetylation on sorption of dyes and chromium of chitin", *Appl. Polym. Sci.*, 63, 725-736, 1997.
30. Knaul, J. Z., Kasaai, M. R.; Tam Bui, V., Creber, K. A. M., "Characterization of deacetylated chitosan and chitosanmolecular weight review", *Can. J. Chem.*, 76, 1699-1706, 1998.
31. Knorr, D.; "Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management", *Food Technol.*, Jan., 114-120, 1991.

32. Kobelke, D. N.; "Changes in food intake, live weight and body composition as determined by computed tomography, of male fallow deer through the rut" *Food Australia* 42, 18-19, 1990.
33. Kubota, N., "Molecular weight dependence of the properties of chitosan and chitosan hydrogel for use in sustained-release drug". *Bull. Chem. Soc. Jpn*, 66, 1807-1812, 1993.
34. Kurita, K., *et al.*; *Polymer Bulletin*, 30, 429, 433, 1993.
35. Kurita, K., "Chemical modifications of chitin and chitosan". *Chitin in nature and technology. Proceedings of the 3th Conference on Chitin/ Chitosan*. Senigallia, Italy-1985.
36. Lang, G., Clausen, T.; "The use of chitosan in cosmetics". *Proceedings of the 1st International Conference on Chitin/ Chitosan*. Ed., R.A.A. Muzzarelli and E.R. Pariser, 139-147, 1978.
37. Li, Q., "Applications and Properties of Chitosan". *J. Bioact Compat Polym.*, 7, 370-397, 1992.
38. Maghami, G. G.; Roberts, G. A. F., "Evaluation of the viscometric constants for chitosan". *Macromol. Chem.*, 189, 195-200, 1988.
39. Mandravan, P., Nair, R., *Fishery Tecnol.*, 11, 50-53, 1974.
40. Mathur, N. K.; Narang, C. K. "Chitin and Chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. *Journal of Chemical Education*, 67, 11, 938-942, 1990.
41. Monteiro Jr., O. A.C.; "Preparação, Modificação Química e Calorimetria do Biopolímero Quitosana". Tese de Doutorado 1999. Univ. Est. Campinas – Inst. Química. Tese de Doutorado 1999.
42. Moore, G. K., Roberts, G. A. F., "Determination of degree of N-acetylation of chitosan". *Int. J. Biol. Macromol.*, 2, 115-117, 1980.
43. Muzzarelli, R. A. A. ; " Colorimetric determination of chitosan". *Analytical Biochemistry*, 260, 255-257, 1998.
44. Muzzarelli, R. A. A.; Belmont, M. M.; Muzzarelli, B. ; Simonelli, L.; "Polimeri in Medicina". *Convegno-Scuola, Associazione Italiana di Scienza e Tecnologia delle Macromolecole*, 1997, 307–336, 1997.
45. Muzzarelli, R. A. A.; *Chitin*, Pergamon, Oxford 1973.
46. Muzzarelli, R. A. A.; Ilari, P.; Tarsi, R.; Dubini, B.; Xia, W.; "Chitosan from *absidia coerulea*", *Carbohydr. Polym.*, 25, 45-50, 1994.
47. Muzzarelli, R. A. A.; *Natural Chelating polymers: Alginic Acid, Chitin and Chitosan*, Pergamon, New York, 1973.

48. Muzzarelli, R. A. A, Rocchetti, R., "The determination of the degree of acetylation of chitosans by spectrophotometry". *Chitin in nature and Technology*, 583p., 3th Conference on Chitin/ Chitosan. Italy- 1985.
49. Nanjo, F., Katsumi, R., Sakai, K.; "Enzimatic method for determination of degree of deacetylation of chitosan". *Analytical Biochemistry*, 193, 164-167,1991.
50. Nifant'ev, N. E.; Chemetskii, V. N., *Mendeleev Chem. J.*, 41,96-100, 1998.
51. Nishimura, S.I; Kohgo, O.; Ishii, S.; Kurita, K.; Mochida, K.; Kuzuhara, H., "New trends in bioactive chitosan derivates: use of standardized intermediates with excellent solubility in common organic solvents". In: BRINE,C.J.; SANDFORD, P.A.; ZIKAKIS, J.P., editors. *Advances in Chitin and Chitosan*. Elsevier Applied Science, 533-542, 1992.
52. No, H. K.; Meyers, S. P.; *J. Aquatic Food Prod. Technol.*, 4, 27-52, 1995.
53. Ogawa, M., Magalhães Neto, E. O., VI Congresso Brasileiro de Engenharia da Pesca, 91-105, 1989.
54. Omum, J. V.;" Deacetylated chitin used as adsorbent in production of clarified pineapple syrup" *Infofish Int.*, 6, 48-52, 1992.
55. Ottoy, M.H.; Varum, K.M.; Christensen, B.E.; Anthosen, M.W.; Smidsrfd, O; "Preparative and analytical size-exclusion chromatography of chitosans", *Carbohydr.polym.*, 31, 253-261, 1996.
56. Peter, M. G.; J. M. S." Applications and environmental aspects of chitin. and chitosan" *Pure Appl. Chem.*, 4, 629 – 640, 1995.
57. Prashanth, K.V., Kittur, R. N., Tharanathan, R. N., " Solid state structure of chitosan prepared under different n-deacetylating conditions". *Carb.Polymers*, 50, 27-33, 2002.
58. Rees, D. A.; Polysaccharide Shapes, 80p., 1977.
59. Riande, E., "Polymer Viscoelasticity Stress and Strain in Praticce"; Ed. Marcel Dekker, Inc., 2000.
30. Rinaudo, M.; Domard, A. "Solution properties of chitosans", *Chitin and Chitosan*, Elsevier, New York, 71-86, 1989.
31. Rinaudo, M.; Milas, M.; Dung, P. L.; "Abstract, Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion" *Int. J. Biol. Macromol.*;15, 281, 1993.
32. Roberts, G. A. F. ; Chitin Chemistry, 350 p, London 1992.
33. Roberts, G. A. F.; Taylor, K. E. "The formation of gels by reaction of chitosan with glutaraldehyde" *Makromol. Chem.*, 190(5), 951-60,1989.
34. Sandford, P. A. "Chitosan: commercial uses and potencial applications". In: SKJAK-BRAEK, S.; ANTHONSEN, T.; SANDFORD, P.A., editors. *Chitin and Chitosan*:

Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications. New York: Elsevier Applied Science, p. 51-69, 1989.

65. Shields, K. M., Smock, N., McQueen, C. E., Bryant, P. J.; "Chitosan for weight loss and cholesterol management". *Am. J. Health-Syst Pharm.*, 60, 1312-1316, 2003.
66. Shigemasa, Y.; Saimoto, H.; "Evaluation of different absorbance ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of deacetylation in chitin". *Int. Joun. Biol. Macromol.*, 18, 237-242, 1996.
67. Singla, A. K. and Chawla, M. "Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects – an update", *J. of Pharmacy and Pharmacology*, 53, 1047-1067, 2001.
68. Takai, M.; Shimizu, Y.; Hayashi, J., Chitin and Chitosan, Elsevier, New York, 431-436, 1989.
69. Tenuta Filho, A. ; Zucas, S. M., B. SBTA, 21, 163-169, 1987.
70. The Merck Index, 12^a edição. Merck & Co., Inc, 1996.
71. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. New York, A6, 231, 1986.
72. Wang, J.; XU, X.; Yang, Y.; Wang, Q.; "Optimization of the methods for extraction of chitin in crab shell and preparation of chitosan". *J. of Harbin Inst. of Technology*, 8, 2, 199-202, 2001.
73. Wang, W.; Bo, S.; Li, S.; Qin, W.; "Hydrolysis of Chitosan in Lactic Acid" *Int. J. Biol. Macromol.*, 13, 281-285, 1991.
74. Yamaguchi, R., Arai, Y., Itoh, T., Hirano, S.; "Preparation of partially N- succinylated chitosans and their cross-linked gels". *Carbohydrate Research*, 88, 172-175, 1981.
75. Yomota, C.; Miyazaki, T.; Okada, S.; "Determination of the viscosimetric constants for chitosan and the application of universal calibration procedure in its gel permeation chromatography" *Colloidal Polym. Sci.*, 271, 76-82, 1993.
76. Zacour, A. C., Silva, M.E., Cecon, P.R., Bambirra, E. A., Vieira, E. C.; "Effect of dietary on cholesterol abortion and metabolism in rats" *J. Nutr.Sci.Vitaminol.*, 38, 609-613, 1992.