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

Imobilização de pepsina em membranas liofilizadas de quitosana e
O-carboximetilquitosana

Karine Gargioni Pereira Correa de Mello

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Bronislaw Polakiewicz

São Paulo
2009

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

Imobilização de pepsina em membranas liofilizadas de quitosana e
O-carboximetilquitosana

Karine Gargioni Pereira Correa de Mello

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Bronislaw Polakiewicz

São Paulo
2009

*"Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim como em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive."
Fernando Pessoa*

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Alicir e Irene,
que sempre priorizaram minha educação e formação.*

*A meu esposo, Alexssandro Augusto,
pela paciência, estímulo e incentivo durante a
realização deste trabalho e no curso de nossas vidas.*

*As minhas filhas, Catarina e Ana Rosa,
motivos de minhas maiores alegrias e felicidade.*

Aos pesquisadores que utilizarão as informações compiladas neste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Bronislaw Polakiewicz pela orientação, conhecimentos e conversas informais sempre muito alegres e descontraídas.

Aos professores: Ronaldo Nogueira Moraes Pitombo, Marina Franco Maggi Tavares, Marisa Masumi Beppu, Adalberto Pessoa Jr. e Marco Antônio Stephano pela atenção e auxílio na realização de etapas deste trabalho.

Aos colaboradores Denis Chicoma Lara do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP da que gentilmente participou das análises de espectroscopia Raman e Virgílio Tattini pela análise de temperatura de colapso.

Às amigas Milena Nakagawa, Roberta Polak e mais recentemente, Tatiana Ferreira e Janaína Barros que de alguma forma participaram deste trabalho.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Tecnologia Bioquímica Farmacêutica da FCF/USP: Elza, Miriam e Juarez e as auxiliares Sônia e Ivani, por sempre terem sido muito gentis e disponíveis.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação: Elaine e Jorge, sempre alegres e prestativos.

À bibliotecária Adriana de Almeida Barreiros minha total admiração por suas realizações junto a Biblioteca do Instituto de Química/USP.

À Comissão de Apoio a Pesquisa do Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado e apoio financeiro.

E por fim, a todos que de alguma forma participaram deste trabalho.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS PRINCIPAIS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	13
LISTA DE QUADROS	13
LISTA DE EQUAÇÕES.....	13
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. Enzimas.....	16
1. 2. Pepsina.....	18
1. 3. Imobilização de enzimas.....	20
1.4. Suportes para imobilização.....	22
1.5. Quitina e Quitosana.....	24
1. 6. Características das amostras de quitina e quitosana.....	32
1.6. 1. Grau de desacetilação (GD).....	33
1.6. 2. Massa Molecular - Massa molar viscosimétrica média	35
1.7. Estrutura de hidrogéis de quitosana.....	37
1.8. Modificações químicas da quitosana.....	38
1.9. Reticulação da quitosana com glutaraldeído.....	41
1.10. Carboximetilquitosana (CMQ)	43
1.11. Quitosana como suporte para imobilização da enzima pepsina.....	45
1. 12. Membranas liofilizadas de quitosana e O-carboximetilquitosana....	45
1.13. Pepsina imobilizada em membranas reticuladas e liofilizadas de quitosana (MQPG) e O-carboximetilquitosana (MCMQ+P+G).....	46
2. OBJETIVO PRINCIPAL.....	50
2.1. Objetivos Intermediários.....	50
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
3.1. Pepsina.....	51
3.2. Quitosana.....	51
3.3. Demais reagentes.....	51
3.4. Síntese da O-carboximetilquitosana (pó).....	51

3.5. Solução de quitosana 3%.....	51
3.6. Solução de O-carboximetilquitosana 3%.....	51
3.7. Solução reticulante de glutaraldeído.....	52
3.8. Solução de pepsina	52
3.9. Preparo das membranas.....	52
3.9.1. Membranas de quitosana (MQ)	53
3.9.2. Membranas de O-carboximetilquitosana (MCMQ).....	53
3.10. Caracterização das amostras de quitosana e O-carboximetil quitosana (pó)	60
3.10.1. Espectroscopia infravermelho (IV)	54
3.10.2. Espectroscopia Raman.....	54
3.10.3. Solubilidade em água em diferentes pHs.....	54
3.11. Caracterização das membranas de quitosana e O-carboximetil quitosana.....	55
3.11.1. Espectroscopia Raman	55
3.11.2. Análise de microscopia óptica acoplada à liofilização.....	55
3.11.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	56
3.12. Determinação da atividade enzimática da pepsina livre e imobilizada nas membranas de quitosana e O-carboximetil quitosana.....	56
3.12.1. Atividade enzimática da pepsina livre e imobilizada nas membranas por hidrólise da hemoglobina.....	56
3.12.2. Cinética enzimática da pepsina livre e imobilizada nas Membranas.....	57
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
5. CONCLUSÕES.....	87
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
7. ANEXOS.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS

Q	Quitosana (pó)
CMQ	O-carboximetilquitosana (pó)
GD	Grau de Desacetilação
Mw	Massa Molar Viscosimétrica Média
TCA	Ácido Tricloroacético
MQ	Membrana de Quitosana
MCMQ	Membrana de Carboximetilquitosana
P	Pepsina
G	Glutaraldeído
MQPG	Membrana de Quitosana adicionada de pepsina e reticulada com glutaraldeído
MCMQ+P+G	Membrana de O-carboximetilquitosana adicionada de pepsina e reticulada com glutaraldeído

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação da estrutura tridimensional da enzima pepsina.....
- Figura 2.** Representação esquemática das fontes de obtenção da quitina e das possibilidades de aplicação em processos de alta tecnologia.....
- Figura 3.** Representação detalhada de aplicações de quitina/ quitosana em processos tecnológicos.....
- Figura 4.** Representação estrutural da Quitina/Quitosana.....
- Figura 5.** Representação da distribuição da massa molar média das amostras de quitosana em faixas.....
- Figura 6.** Representação esquemática das possibilidades de modificações químicas da quitina/quitosana.....
- Figura 7.** Representação dos sítios de reação da quitina/ quitosana.....
- Figura 8.** Representação da estrutura química do glutaraldeído...
- Figura 9.** Representação estrutural do crosslinking entre a quitosana e o glutaraldeído.....
- Figura 10.** Possibilidades de substituição dos grupamentos da quitosana quando em reação com o ácido monoclórico acético.....
- Figura 11.** Possibilidades de ligação da pepsina e do glutaraldeído a cadeia polimérica da quitosana.....
- Figura 12.** Possibilidades de ligação da pepsina e do glutaraldeído a cadeia polimérica da O-carboximetilquitosana.....
- Figura 13.** Representação gráfica do ganho de massa (g) da amostra de quitosana após a carboximetilação.....
- Figura 14.** Representação do espectro da amostra de Quitosana na região do infravermelho.....
- Figura 15.** Representação do espectro da amostra de O-carboxi metilquitosana na região do infravermelho.....

- Figura 16.** Representação dos espectros RAMAN das amostras quitosana (Q) e O-carboximetilquitosana (CMQ).....
- Figura 17.** Solubilidade da amostra de quitosana em diferentes pHs.....
- Figura 18.** Solubilidade da amostra de O-carboximetilquitosana em diferentes pHs.....
- Figura 19.** Fotografias das etapas de liofilização obtidas pelo Lyostat para amostra de quitosana.....
- Figura 20.** Fotografias das etapas de liofilização obtidas pelo Lyostat para amostra de Quitosana + Pepsina + Glutaraldeído.....
- Figura 21.** Fotografias das etapas de liofilização obtidas pelo Lyostat para amostra de O-carboximetilquitosana.....
- Figura 22.** Fotografias das etapas de liofilização obtidas pelo Lyostat para amostra de O-carboximetilquitosana + Pepsina + Glutaraldeído.....
- Figura 23.** Fotos das membranas de quitosana e O-carboximetil quitosana liofilizadas.....
- Figura 24.** Micrografias da membrana de quitosana em diferentes aumentos obtidas da superfície e de corte lateral da membrana.....
- Figura 25.** Micrografias da membrana de quitosana adicionada de pepsina e glutaraldeído em diferentes aumentos obtidas da superfície e de corte lateral da membrana....
- Figura 26.** Micrografias da membrana de O-carboximetilquitosana em diferentes aumentos obtidas da superfície e de corte lateral da membrana.....
- Figura 27.** Micrografias da membrana de O-carboximetilquitosana adicionada de pepsina e glutaraldeído em diferentes aumentos obtidas da superfície e de corte lateral da membrana.....
- Figura 28.** Resultados da espectroscopia Raman das amostras MQ, MQP, MQG e MQPG.....
- Figura 29.** Resultados da espectroscopia Raman das amostras MCMQ, MCMQ+P, MCMQ+G e MCMQ+P+G.....

- Figura 30.** Fotos dos fragmentos das membranas de quitosana e O-carboximetilquitosana após agitação mecânica em pH=2,0.....
- Figura 31.** Representação gráfica da perda de massa dos fragmentos das membranas MQ e MCMQ após agitação mecânica em pH=2,0.....
- Figura 32.** Curva padrão de tirosina (mM) para determinação de atividade de enzima em mMol de Tirosina.....
- Figura 33.** Curva obtida da determinação de atividade da pepsina livre nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL.....
- Figura 34.** Resultados do perfil de atividade da pepsina 1,0 mg/mL Livre e Imobilizada nas Membranas MQ e MCMQ.....
- Figura 35.** Resultados do perfil de atividade da pepsina 5,0 mg/mL Livre e Imobilizada nas Membranas MQ e MCMQ.....
- Figura 36.** Gráficos de Lineweaver-Burk. Em 36.A) Pepsina Livre, 36.B) Pepsina Imobilizada em MQPG e em 36.C) Pepsina Imobilizada em MCMQ+P+G.....

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Resultados obtidos pelo Lyostat.....
- Tabela 2.** Parâmetros cinéticos da pepsina livre e imobilizada nas membranas.....

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Classes em que as enzimas são divididas.....
- Quadro 2.** Parâmetros a serem considerados na escolha do suporte para imobilização de enzima.....
- Quadro 3.** Nomenclatura das membranas sintetizadas e analisadas.....
- Quadro 4.** Abreviaturas adotadas para citação das amostras de quitosana e quitosana modificada.....

LISTA DE EQUAÇÕES

- Equação 1.** Equação proposta por Domszy e Roberts.....
- Equação 2.** Equação de Mark-Houwink-Sakurada.....

MELLO, K.G.P.C. **Imobilização de pepsina em membranas liofilizadas de quitosana e carboximetilquitosana.** 2009. 101p.Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 2009.

RESUMO

Enzimas são proteínas utilizadas em processos tecnológicos diversos. Estas enzimas dependendo do tipo e grau de pureza são geralmente caras. Comumente as enzimas exigem controle contínuo do processo no que se refere à temperatura, pH, agitação, entre outros, e após o uso são descartadas, o que torna o custo do processo mais elevado. Em decorrência disto, a imobilização de enzimas em suportes insolúveis e inertes, vem sendo proposta com resultados promissores de manutenção e até mesmo aumento da atividade enzimática, resistência mecânica, térmica e de pH, bem como por apresentar maior facilidade de remoção da enzima do sistema e possibilitar sua reutilização. Por causa disto, diferentes tipos de suportes vêm sendo estudados, dentre estes, os materiais poliméricos, tem recebido atenção especial. A quitosana é um polímero natural, biocompatível, biodegradável e atóxico. É obtida de fontes renováveis provenientes do descarte de cascas de crustáceos da indústria de alimentos, o que constitui um fator ambiental importante atualmente. Neste trabalho a enzima pepsina foi imobilizada em membranas liofilizadas de quitosana e O-carboximetilquitosana reticuladas ou não com glutaraldeído. A pepsina imobilizada na membrana de quitosana reticulada com glutaraldeído manteve sua atividade enzimática e o suporte apresentou propriedades físico-químicas de resistência a solubilização em pH ácido, o qual é necessário para atividade da pepsina. O processo de liofilização preservou a estrutura do suporte e não comprometeu a atividade enzimática. Demonstrando que o processo de liofilização é viável para secagem e incorporação de enzimas.

Palavras chave: Quitosana. Imobilização. Pepsina. Liofilização.

MELLO, K.G.P.C. **Pepsin immobilization into lyophilized chitosan and carboxymethylchitosan membranes.** 2009. 101 p.Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 2009.

ABSTRACT

Enzymes are proteins used in a wide variety of biotechnological processes. Commonly, enzymes require stringent conditions, such as a particular pH, temperature, stirring, etc. In chemical and biochemical reactions, purified enzymes can be rather costly and additionally, must be discarded after each use, which is still less economical. As a result of this, enzyme immobilization on insoluble and inert supports has been studied as a manner to overcome these problems and optimize enzymes use. Promising results of greater immobilized enzyme activity and stability over a broader range of pH and temperature have been reported. As well, immobilized enzymes can be easily removed from the system and reused. Various materials have been employed as enzymes supports, among then, the polymers have received special attention. Chitosan is a natural polymer that presents biocompatibility, biodegradability and non-toxicity. Chitosan is obtained from crustacean shell wastes discarded by the food industry, and recover this material constitutes an important environmental factor nowadays. In this work the enzyme pepsin was immobilized on freeze-dried chitosan and O-Carboxymethylchitosan membranes crosslinked or not with glutaraldehyde. Pepsin immobilized on chitosan membrane crosslinked with glutaraldehyde maintained its enzymatic activity and the polymer support provided physicochemical properties such resistance to dissolution in acid pH. Acid pH is required for pepsin activity. The freeze-drying process preserved the support structure and did not compromise the enzymatic activity. Demonstrating that, freeze drying process, is viable for drying and enzymes incorporation.

Keywords: Chitosan. Immobilization. Pepsin. Freeze-drying.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Enzimas

As enzimas são biocatalizadores de origem protéica que apresentam a capacidade de reagir com substratos, formando complexos ou formando compostos através de ligações do tipo covalente, iônicas, entre outras. A especificidade de ligação da enzima a um substrato é quem caracteriza sua atividade biológica particular. Além de apresentarem alta especificidade pelo substrato, as enzimas apresentam atividade máxima quando em condições de temperatura, pH e estequiometria ideais para cada enzima. Assim, se dá a reação enzima-substrato ou “chave-fechadura”, como também é chamada (MARZZOCO & TORRES, 2006).

Figura 1. Representação da estrutura tridimensional da enzima pepsina.
Fonte: www.hepcentro.com.br/defa1at.htm, consulta em 20/07/2009.

As enzimas convertem o substrato em produto sem serem consumidas na reação e sem alterarem seu equilíbrio químico.

Conforme representado na **Figura 1**, as enzimas por apresentarem estrutura terciária ou quaternária, são dotadas de dobramentos tridimensionais em suas cadeias polipeptídicas, o que lhes confere uma forma característica e exclusiva. Assim, diferentes enzimas têm diferentes formas e, portanto, diferentes papéis biológicos. Para que uma enzima atue, é necessário que o substrato "se encaixe" na enzima, obedecendo o modelo da "chave fechadura". Após a reação, a enzima desliga-se do substrato e permanece intacta (MARZZOCO & TORRES, 2006).

Pelos critérios de classificação e nomenclatura, as enzimas são divididas em seis grupos de acordo com o tipo de reações que catalisam. Cada um desses grupos ainda é subdividido em classes e subclasses, numeradas de tal forma que cada enzima possa ser identificada sem ambiguidade (MARZZOCO & TORRES, 2006).

No **Quadro 1** está representado a classificação geral das enzimas segundo sua atividade.

Quadro 1. Classes em que as enzimas são divididas segundo Marzzoco e Torres, 2006.

Classe 1	Oxirredutases	Catalisam reações de oxi-redução. Exemplo: desidrogenases e oxidases.
Classe 2	Transferases	Transferem grupos químicos entre moléculas. Exemplo: transaminases.
Classe 3	Hidrolases	Utilizam a água como receptor de grupos funcionais de outras moléculas. Exemplo: peptidases.
Classe 4	Liasas	Formam ou destroem ligações duplas, respectivamente retirando ou adicionando grupos funcionais. Exemplo: descarboxilases.
Classe 5	Isomerases	Transformam uma molécula em seu respectivo isômero. Exemplo: epimerases.
Classe 6	Ligases	Formam ligações químicas por reações de condensação, consumindo energia sob a forma de ATP. Exemplo: sintetases.

A partir destas categorias principais as enzimas ainda são identificadas pelo seu número EC; por exemplo, EC 3.4.23 é a Pepsina.

As enzimas apresentam um leque de possibilidades de aplicações químicas, biotecnológicas, biomédicas e farmacêuticas. A capacidade de ligação e especificidade enzimática ao substrato determinam suas possíveis aplicações industriais e biotecnológicas. Atualmente, são utilizadas em diferentes processos como: bio-sensores em bioengenharia, clinicamente em agentes terapêuticos, em modernos kits de diagnóstico e como catalisadores em reações químicas e bioquímicas (BETIGERI; NEAU, 2002; ALTUN; CETINUS, 2007).

Como mencionado anteriormente, o uso de enzimas em processos tecnológicos necessita de condições específicas para que se tenha atividade ótima da enzima, as quais são estreitamente dependentes de condições particulares de pH, temperatura e estequiometria. Por causa disto, muitas técnicas estão sendo propostas a fim de superar estes problemas e melhorar as aplicações enzimáticas. Além disso, nas reações químicas e bioquímicas, são utilizadas enzimas purificadas, as quais apresentam alto custo e ainda tem que ser descartadas após cada reação, o que não torna o processo econômico (ALTUN; CETINUS, 2007).

1.2 Pepsina

A pepsina segundo a Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil é uma enzima proteolítica, obtida principalmente da mucosa do estômago fresco de porco e eventualmente de outras fontes. A pepsina apresenta-se como um pó fino de cor branca, odor fraco e característico e sabor levemente ácido e salino. É higroscópica e quando em solução tem sua atividade inativada por álcalis ou por temperaturas excedendo a 70° C. É facilmente solúvel em água, sendo que a sua solução é mais ou menos opalescente e ácida. É quase insolúvel no álcool, no clorofórmio e no éter (FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL, 1959; FARMACOPÉIA PORTUGUESA, 1997).

A pepsina é uma endopepsidase encontrada na mucosa do estômago juntamente com outras três enzimas proteolíticas do sistema digestivo. As outras duas são: a quimotripsina e a tripsina. Durante o processo de digestão cada uma destas enzimas é responsável em clivar tipos particulares de aminoácidos, digerindo as proteínas da dieta em seus componentes: peptídeos e aminoácidos, os quais serão absorvidos pela mucosa intestinal (ALTUN; CETINUS, 2007).

A pepsina é secretada junto com o suco gástrico pela mucosa estomacal. O pepsinogênio é transformado em pepsina (forma ativa) pela ação do meio ácido (pH~2,0) do estômago, em virtude do ácido clorídico presente no suco gástrico. A pepsina é eficiente em clivar pontes envolvendo aminoácidos aromáticos, fenilalanina, triptofano e tirosina (ALTUN; CETINUS, 2007).

A pepsina é utilizada na purificação de soros antipeçonhentos aplicados a soroterapia de humanos picados por animais venenosos. O tratamento pela pepsina dos soros hiperimunes heterólogos, para tratamento humano, é exigido no sentido de reduzir os efeitos colaterais eventualmente provocados pelas proteínas heterólogas (soro eqüino) as quais podem produzir alergias, além de choques anafiláticos que podem levar o indivíduo à mortal. A pepsina digere os fragmentos indesejáveis dos anticorpos do soro do animal deixando apenas o fragmento $F(ab')_2$, responsável pela neutralização do veneno. O tamanho reduzido do fragmento, diminui muito a possibilidade de o paciente produzir anticorpos para combater o soro (HONG; OSTERHAUS, 1994; GUIDOLIN, *et al.*, 1998; JONES, 2003; BOUSHABA; KUMPALUME; SLATER, 2003).

A pepsina é uma das enzimas utilizadas para análise de outras proteínas devido a sua eficiência em quebrar pontes envolvendo aminoácidos aromáticos, fenilalanina, triptofano e tripsina. Na indústria de alimentos, é utilizada como coagulante de leite para produção de queijos (ALTUN; CETINUS, 2007).

1.3 Imobilização de enzimas

Desde a segunda metade do século passado (XX), esforços foram aplicados no sentido de desenvolver suportes para a imobilização de enzimas a fim de possibilitar a utilização das mesmas em processos contínuos. Através da imobilização, detectou-se redução de custos através da separação da enzima do meio reacional mais eficiente por meio de filtração, além de possibilitar a reutilização da enzima e proporcionar um controle mais eficiente de processos em grande escala. Também foi possível melhorar o desempenho da enzima como: manutenção ou aumento de atividade, aumentar a estabilidade térmica e operacional em maiores faixas de pH e de temperatura além de aumentar a seletividade da enzima pelo substrato (MOSBACH, 1987; HAYASHI; IKADA, 1991; CLARK, 2004; BETIGERI; NEAU, 2002; CAO; LANGEN; SHELDON, 2003; LI; HU; LIU, 2004; PRASHANTH; THARANATHAN, 2007).

Por estas razões, atualmente, um grande número de materiais têm sido propostos como suportes para imobilização de enzimas, sejam eles sintéticos ou naturais, com diferentes formatos e tamanhos, porosos e não porosos, com diferentes graus de hidrofiliicidade (ALTUN; CETINUS, 2007).

Segundo Cao, Langen e Sheldon (2003), O critério de seleção do suporte e seus parâmetros geométricos são especialmente dependentes do desenho e da configuração do reator (batelada, tanque com agitação, coluna, etc.). Deve-se considerar o meio reacional (aquoso, ácido ou alcalino, solvente orgânico ou em duas fases) e ainda o sistema reacional (suspensão, líquido-líquido, sólido-líquido ou sólido-sólido), bem como as condições de pH e temperatura do processo. Além de atender os quesitos funcionais, um suporte ideal deve ser aplicável, de custo razoável e seguro para o uso.

Ainda segundo Cao, Langen e Sheldon (2003), devem ser considerados os parâmetros relacionados no **Quadro 2**, para escolha do suporte adequado ao tipo de reação, a fim de se obter um resultado mais eficiente:

Quadro 2. Parâmetros a serem considerados na escolha do suporte para imobilização de enzima segundo Cao, Langen e Sheldon (2003):

Parâmetros	Requisitos	Benefícios
Suporte	Partícula de tamanho e formato adequados	Facilitam separação e controle melhor controle da reação
	Fácil de preparar	Rapidez, disponibilidade, custo/benefício
	Alta estabilidade mecânica	Sem alterações significantes em sua estrutura interna
	Alta estabilidade química	Não se decompor, não contaminar
Enzima	Alta atividade por volume (U/g)	Alta produtividade em menor volume e menor tempo de reação
	Seletividade pelo substrato	Controle de reações secundárias em paralelo a reação principal, facilidade de separação do produto final
	Estabilidade térmica	Redução do tempo reacional por aumento da temperatura
	Estabilidade operacional	Apresentar custo/benefício
	Estabilidade conformacional	Modulação das propriedades enzimáticas
Enzima imobilizada	Reutilização	Baixar custo
	Aplicabilidade	Tolerância de variações dentro do processo
	Reprodutibilidade	Garantia da qualidade do produto
	Facilidade de uso e manuseio	Facilitar
Considerações econômicas e ecológicas	Volume pequeno	Facilitar manuseio, armazenamento, e descarte
	Descarte fácil	Comprometimento ambiental
	Segurança para o uso	Atender as normas de segurança

Os métodos disponíveis para imobilização de enzimas são divididos em duas classes gerais segundo KRAJEWSKA; LESZKO; ZABORSKA, (1990):

- ✓ Métodos químicos: a enzima faz ligações covalentes com o suporte;
- ✓ Métodos físicos: quando há interação física da enzima com o suporte.

No caso das ligações covalentes com o suporte pode haver necessidade de tratamento da superfície dos materiais com glutaraldeído ou outros produtos químicos a fim de favorecer as ligações químicas envolvidas (KRAJEWSKA; LESZKO; ZABORSKA, 1990).

Encontrou-se na literatura a imobilização da pepsina em diferentes suportes, por exemplo:

Kurimoto (2001), imobilizou a pepsina em esferas de agarose. Li (2004), imobilizou quimicamente a pepsina em microesferas de polimetilacrilato (PPMA) e investigou as constantes cinéticas K_m e $V_{m\acute{a}x}$ em comparação com a enzima livre. Frydlova (2004), relatou a imobilização da pepsina em Sepharose 4B ativada por adsorção a coluna cromatográfica. Ticu (2005), imobilizou a pepsina em complexos de alumina modificada a ser utilizada em processos contínuos e sob agitação em reatores para produção de hidrolisados bioativos. Altun (2007), procedeu a imobilização da pepsina em esferas de quitosana para aplicação na indústria de alimentos.

1.4 Suportes para imobilização

Dentre os diferentes tipos de suporte, os biomateriais têm recebido atenção especial devido suas características químicas e funcionais. Dentro da classificação de biomateriais encontram-se os biopolímeros, que são, macromoléculas derivadas de seres vivos e que apresentam unidades repetidas em sua cadeia. Têm-se relatos da aplicação de biopolímeros para

fins biomédicos desde o início da civilização humana, destacando-se o algodão, a seda e a celulose (BRANT, 2008).

Os biopolímeros do tipo polissacarídeo têm sua origem em plantas, animais invertebrados, fungos e microrganismos, embora também estejam presentes em mamíferos, porém, em menor proporção. Os biopolímeros são constituídos por carboidratos, em geral, de alto peso molecular. São complexos coloidais que se hidrolisam em monossacarídeos contendo cinco ou seis átomos de carbono. Considera-se que os polissacarídeos são polímeros nos quais os monômeros foram unidos por ligações glicosídicas com eliminação da água. Suas cadeias podem conter cargas ou serem neutras, sendo denominados de polieletrólitos no primeiro caso, termo que se refere a polímeros que em solvente polar adequado, apresentam cargas positivas e negativas, como na quitosana e negativas em carboximetilcelulose, ou cargas positivas e negativas na carboximetilquitosana (YALPANI, 1988; KHOR, 1991; MILAS, 1991; ABREU; CAMPANA, 2005; ORREGO et al, 2009).

É difícil a caracterização da relação estrutura/propriedades em polissacarídeos polieletrólíticos devido a sua natureza complexa. Por serem de origem natural, esses polímeros são geralmente heterogêneos no que diz respeito a massa molar e a composição elementar. Na verdade estes polímeros devem ser classificados como não uniformes, uma vez que embora tenham massa molar e composição elementar idênticas, podem ocorrer heterogeneidades em relação a distribuição das diferentes unidades repetidas (DOMARD, 1997).

Os biopolímeros apresentam uma série de propriedades e características funcionais próprias que possibilitam uma pluralidade de aplicações. Em sua forma original ou modificada apresentam boas propriedades mecânicas para aplicações como fibras, filmes, espessantes, hidrogéis, emulsificantes, carreadores de drogas, suporte para imobilização de drogas e enzimas entre outras (KHOR; LIM, 2003; PRASHANTH; THARANATHAN, 2007; ORREGO et al, 2009).

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 constitui fontes de poluição, causando muitos problemas ambientais (KUMAR, 2000).

Alguns exemplos de polissacarídeos produzidos comercialmente incluem: agar, goma xantana, celulose e seus derivados (acetato de celulose, carboximetilcelulose, metilcelulose), amido e seus derivados, alginato de sódio, dextrana, carragena, ácido hialurônico, quitina e quitosana (MUZZARELLI, 1980; GONZALES; ALEA, 1995, MUZZARELLI et al., 1997; KUMAR, 2000).

1.5 Quitina e Quitosana

Quitina significa caixa de proteção. O termo é de origem grega e deriva de khiton. Este polissacarídeo foi isolado pela primeira vez em 1811 por Braconnot, quando ele trabalhava com fungos (BRAEK; ANTHONSEN; SANDFORD, 1989; ROBERTS, 1992; MONTEIRO, 1999; KHOR, 2002; KHOR; LIM, 2003; ABREU; CAMPANA, 2005; MELLO *et al.*, 2006).

A quitina é um polissacarídeo de sustentação de crustáceos e insetos. A quitina é constituída por unidades 2-acetamido-2-Deise- β -D-glicose unidas por ligações glicosídicas $\beta(1-4)$. É facilmente obtida a partir de cascas de camarão e caranguejo associados a produção da indústria alimentícia. Há também a produção de quitina a partir de fungos associados a processos de fermentação similares àqueles para produção de ácido cítrico (MATHUR; NARANG, 1990; BRINE, 1992; KUMAR, 2000; KHOR, 2002; KHOR; LIM, 2003; PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009).

A quitina pode ser degradada pela enzima quitinase. Apresenta imunogenicidade relativamente baixa. A quitina em sua estrutura molecular é muito parecida à celulose, que também é um polissacarídeo estrutural natural. As características físico-químicas também são semelhantes como: baixa solubilidade e baixa reatividade química. A diferença estrutural entre a celulose e a quitina está no C2 em que na celulose aparece um grupo hidroxila (OH), enquanto na quitina, este grupo é substituído por um grupo acetamido (NH), que apresenta-se acetilado (OCH₃) (KUMAR, 2000; WANG *et al.*, 2001; MELLO *et al.*, 2006).

Na biomassa a quitina é encontrada combinada a sais inorgânicos (carbonato de cálcio), pigmentos e proteínas e, desta forma, somente é obtida isoladamente após processo de purificação. O processamento das cascas de crustáceos envolve basicamente a remoção da proteína e a solubilização do carbonato de cálcio que está presente nas cascas em alta concentração. Processos de purificação com hidróxido de sódio concentrado (50%) removem a proteína e desacetilam a quitina simultaneamente, enquanto o carbonato de cálcio é removido com soluções de ácido clorídrico. O tratamento da quitina com solução aquosa hidróxido de sódio (50%) à temperatura de aproximadamente 120°C por 1 até 3 horas, dá origem a quitosana aproximadamente 70% desacetiladas (BRINE, 1992; WANG *et al.*, 2001; KUMAR, 2000).

A Quitosana é uma poli(β -1-4)-D-glicosamina, derivada da desacetilação da quitina em suspensões alcalinas concentradas, embora esta desacetilação nunca ocorra completamente em todos os grupamentos (DOMARD, 1997; CHEN; WANG; HO, 1998; KUMAR, 2000; KHOR, 2002; KHOR; LIM, 2003; MELLO *et al.*, 2006; PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009).

ORIGEM E APLICAÇÕES

Figura 2. Representação esquemática das fontes de obtenção da quitina e das possibilidades de aplicação em processos de alta tecnologia.

Fonte: Trends in Food Science & Technology 18(2007)117-131. Com adaptações da autora.

Atualmente a grande maioria dos polímeros é de origem sintética, sua compatibilidade e degradabilidade são mais limitadas do que a dos polímeros naturais, como por exemplo: a celulose, a quitina, a quitosana e seus derivados (KUMAR, 2000).

Embora a quitosana seja um polissacarídeo muito versátil, apresenta a limitação físico-química de solubilidade. A quitosana apresenta-se solúvel apenas em pH menor que 6,4. Usualmente é solubilizada em ácido orgânicos fracos como ácido acético pouco concentrado (<3%). Por causa desta limitação de solubilidade em pH>6,4, modificações químicas na estrutura da quitosana vêm sendo propostas a fim de melhorar a solubilidade em outros solventes, bem como em faixas de pH maiores que vão desde o ácido até o alcalino (SANFORD, 1984; SANFORD, 1989; ENCYCLOPEDIA, 1988; KURITA *et al.*, 1993).

CARACTERÍSTICAS E POSSIBILIDADES DE APLICAÇÃO

Figura 3. Representação das aplicações de quitina/quitosana em processos tecnológicos. Fonte: Trends in Food Science & Technology 18 (2007) 117-131.

Conforme as **Figuras 2 e 3**, a quitina, a quitosana e seus derivados apresentam grande potencial de desenvolvimento. São considerados polímeros muito versáteis e com larga faixa de aplicabilidade, gerando diferentes tipos de materiais como: hidrogéis, membranas, filmes, esferas que podem ser usadas em variados campos de aplicação e com diferentes funções, incluindo a imobilização de enzimas com atividades específicas (ORNUM, 1992 *apud* NOOMHORM; KUPONGSAK; CHANDRKRACHANG, 1998; KHOR, 2002; MADIHALLY; MATTHEW, 1999; ALTUN; CETINUS, 2007; PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009).

Fonte: Progress in Polymer Science 34 (2009) 641-678

Figura 4. Representação estrutural da Quitina/Quitosana.

Entretanto, a quitosana não é uma entidade química uniforme, e sim, um copolímero constituído tanto de monômeros acetilados como monômeros desacetilados em sua cadeia. Conforme representado na Figura 4, amostras de quitina que apresentam grau de desacetilação acima de 50% até 98% e peso molecular entre 50 kDa até 2.000 kDa, (o maior polímero existente), 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; RHODE; WACHTER, 2001; SINGLA; CHAWLA, 2001).

A desacetilação da quitina produz quitosana 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 (DOMARD, 1987; BATISTA; ROBERTS, 1990; ORNUM, 1992; CUROTTO; AROS, 1993; OTTOY *et al.*, 1996; PRASHANTH; THARANATHAN, 2007).

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; VARUM; SMIDSROD, 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 (DUNG; MILAS; RINAUDO, 1994).

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 (FILAR; WIRICK, 1978; LI, 1992).

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 (>50%) distribuídos na cadeia polimérica, ele é normalmente insolúvel, sendo denominado de quitina. Quando o teor dos mesmos grupos é menor que 50%, este polissacarídeo passa a ser solúvel em solução aquosa de ácido, e então, é denominado quitosana (FILAR; WIRICK, 1978; PETER, 1995).

A presença de grupos acetoamino na quitina, e amino na quitosana, as tornam mais interessantes do ponto de vista químico do que a celulose, pois a presença destes grupamentos, amplia as possibilidades de modificações químicas destes biopolímeros (GRANT; BLAIR; McKAY, 1989; PETER, 1995).

Outra vantagem relevante no que diz respeito a economia e sustentabilidade é que a produção de quitina e quitosana são baseadas no descarte da indústria alimentícia. Este descarte é captado no Oregon, Washington, Virgínia, Japão e portos pesqueiros da Antártica. Também é produzida na Índia, Japão, Polônia, Austrália. Outros países, que embora apresentem atividade pesqueira industrial ativa e intensa, ainda não se dedicam a recuperação deste material, entre os quais podemos citar: México, Chile e Brasil (MUZZARELLI, 1984; KUMAR, 2000; MELLO *et al.*, 2006).

A produção de quitina, a partir de cascas de crustáceos, obtidas do descarte da indústria pesqueira é interessante se incluirmos a recuperação de carotenóides. As cascas contêm quantidades consideráveis de astaxantina. Um carotenóide que não é sintetizado e é comercializado com alto valor agregado como um aditivo de alimentos provindos do mar, especialmente o salmão (KUMAR, 2000).

O Brasil possui um vasto litoral e potencial hídrico, com várias bacias hidrográficas, além de uma biodiversidade de fauna marinha, e um grande potencial pesqueiro de camarões. Porém, seguindo a tendência mundial, a produção de camarão por captura está em declínio no Brasil, enquanto a produção do camarão em cativeiro (carcinicultura) tem aumentado. A principal razão do crescimento da criação destes animais (aqüicultura) foi gerada pela dificuldade de abastecer a demanda mundial de pescados apenas com a pesca extrativista (OLIVEIRA, *et al.*, 2002; ASSIS; STAMFORD, 2008).

As indústrias de processamento de crustáceos gera toneladas de resíduos diariamente no meio ambiente. Estes resíduos são biodegradáveis, por isso não provocam acúmulo excessivo na natureza, apesar de causarem grande problema de ordem social por serem desagradáveis no cheiro e atraírem insetos, podendo acarretar danos a saúde humana. A geração de

resíduos da indústria de pescado é um grande desafio para os empresários do setor que precisam destinar esses resíduos e não poluírem o ambiente. Por outro lado, a comunidade científica especializada está recebendo essa fonte de resíduos e buscando alternativas para o aproveitamento destes e assim tornar uma atividade aquícola sustentável e viável ecologicamente (OLIVEIRA, *et al.*, 2002; ASSIS; STAMFORD, 2008).

Tendo em vista que o resíduo proveniente do beneficiamento de camarão é constituído por quitina, proteína e carbonato de cálcio, tem havido grande interesse em seu reaproveitamento, buscando alternativas ao desenvolvimento de produtos de valor agregado, aumentando a produtividade do setor e garantindo a preservação ambiental. Estudos têm sido realizados no sentido de encontrar um destino adequado para esses resíduos de modo que as agressões ao meio ambiente sejam cada vez mais reduzidas (OLIVEIRA, *et al.*, 2002; ASSIS; STAMFORD, 2008).

Recentemente a quitosana tem chamado muita atenção por tratar-se de uma fonte em potencial de polissacarídeos. Por esta razão, muitos estudos têm sido realizados a fim de sintetizar derivados funcionais de quitosana através de modificações químicas (KUMAR, 2000; KHOR; LIM, 2003; MELLO *et al.*, 2006; JAYAKUMAR *et al.*, 2007; PRASHANTH; THARANATHAN, 2007; PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009).

1.6 Características das amostras de quitina e 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; PENISTON, 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, para citar alguns. 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 (MANDHAVAN; NAIR; 1974, AUSTIN *et al.*, 1981; HIRANO, 1989; RINAUDO; DOMARD, 1989; KUBOTA, 1993; NO; MEYERS, 1995; KNAUL *et al.*, 1998, RIANDE, 2000).

A maioria dos polissacarídeos naturais como: celulose, dextrana, pectina, agar, agarose e carragena são de natureza ácida ou neutra, enquanto a quitina e quitosana são exemplos de polissacarídeos básicos (LARRY, 1998).

A quitina é muito hidrofóbica e praticamente insolúvel em água e solventes orgânicos. É solúvel em hexafluor-propanol, hexafluor-acetona, cloroálcoois quando conjugados com soluções aquosas de ácidos minerais e dimetilacetamida contendo 5% de cloreto de lítio (KUMAR, 2000).

A hidrólise ácida da quitina em condições drásticas produz monômeros de D-glicosamina relativamente puros (KUMAR, 2000).

1.6.1 Grau de desacetilação (GD)

O grau de desacetilação é um parâmetro importante a ser examinado quanto a razão de 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose em 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose. Esta razão tem efeito significativo quanto a solubilidade da quitina (KUMAR, 2000).

A fim de definir o grau de desacetilação da quitina muitos métodos analíticos têm sido propostos, como: titulometria com ninhidrina, espectroscopia na região do infravermelho (IV) e ressonância nuclear magnética (RMN) (MELLO *et al.*, 2006; CUROTTO; AROS, 1993).

A grande maioria dos trabalhos publicados sobre a determinação do grau de desacetilação da quitina, o faz, pela técnica de espectroscopia de infravermelho (IV), 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 (MOORE; ROBERTS, 1980; MUZZARELLI, 1985; SHIGEMASA; MATSURA; SAIMOTO, 1996; KIM *et al.*, 1997; CHO; NO; MEYERS, 1998; MUZZARELLI, 1998; ARCIDIACONO; KAPLAN, 1992; MONTEIRO, 2000; MELLO *et al.*, 2006).

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

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

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; ROBERTS, 1985; CANELA; GARCIA, 2001; KHAN; PEH; CHING, 2002).

Outros métodos citados na literatura incluem: cromatografia a gás, cromatografia de permeação em gel, espectroscopia UV, esquemas de titulação, hidrólise ácida, HPLC e espectroscopia por IV próximo (MUZZARELLI, 1985; NANJO; KATSUMI; SAKAI, 1991; MUZZARELLI, 1998; KUMAR, 2000; HWANG; JUNG; LEE, 2002).

1.6.2 Massa Molecular – Massa molar viscosimétrica média (Mw)

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 à medida que aumenta a tensão de cisalhamento. A viscosidade de soluções de quitosana aumenta à medida que: aumenta-se a concentração da amostra, diminui-se a temperatura e aumenta-se o grau de desacetilação (KUBOTA, 1993; OTTOY *et al.*, 1996; SINGLA; CHAWLA, 2001; KUMAR, 2000; HWANG; JUNG; LEE, 2002).

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 Dalton, 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, classificaram-se as amostras de quitosana segundo a distribuição de peso molecular em: baixo, médio e alto peso molecular, a exemplo de outros polímeros como carboximetilcelulose (CMC) e polietilenoglicol (PEG). 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 5** (DEE; RHODE; WACHTER, 2001).

Figura 5. Representação da distribuição da massa molar média das amostras de quitosana em faixas.

A 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

As constantes viscosimétricas são independentes da massa molecular, porém são dependentes do solvente, temperatura e da estrutura química do polímero (KUMAR, 2000; MAGHAMI; 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; ROBERTS, 1988; ROBERTS, 1992).

Os valores de α dependem diretamente da configuração do polímero. Para polímeros lineares de cadeia aleatória, os valores de α , 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 α em torno de 1.2 são utilizados para cadeias estendidas e muito longas (ANTHONSEN; VARUM; SMIDSRØD, 1993).

Segundo Maghami e Roberts (1988), utilizando-se os valores, $K=1.81 \times 10^{-3}$ e $a = 0.93$, tem-se observado resultados aceitáveis de M_w .

1.7 Estrutura de Hidrogéis de Quitosana

Hidrogéis são redes de polímeros tridimensionais que absorvem quantidades variáveis de água enquanto permanecem insolúveis devido a interligações entre as cadeias individuais do polímero (CONTRI; SIQUEIRA; GUTERRES, 2008).

Estas ligações podem ser devido à união covalente ou podem ser formadas por forças físicas entre os segmentos do polímero, como força iônica ou ligações de hidrogênio (DESBRIERES, 2002; CONTRI; SIQUEIRA; GUTERRES, 2008).

Diferentemente de redes poliméricas hidrofóbicas, que apresentam pequena capacidade de absorção de água, os géis hidrofílicos podem apresentar propriedades físico-químicas, como sensibilidade a variações de pH e ausência de interações hidrofóbicas que os tornam vantajosos para diversas aplicações, como: liberação controlada de fármacos e outros ativos, bem como incorporação de enzimas e biomacromoléculas. Além disso, o preparo dos hidrogéis pode ser realizado à temperatura ambiente sem a necessidade de adição de solventes orgânicos (CONTRI; SIQUEIRA; GUTERRES, 2008).

Os mais importantes e conhecidos formadores de hidrogéis são derivados do ácido poliacrílico como os carbômeros e diferentes derivados da celulose, como a hidroxietilcelulose. Os hidrogéis também podem ser preparados a partir de polímeros naturais ou sintéticos ou ainda podem ser a combinação de ambos (CONTRI; SIQUEIRA; GUTERRES, 2008).

Entre os polímeros naturais mais usados na preparação de hidrogéis, pode-se citar a própria celulose, o alginato, o colágeno, a gelatina, o ácido hialurônico, a goma xantana e a quitosana (CONTRI; SIQUEIRA; GUTERRES, 2008).

Os hidrogéis de quitosana podem ser classificados segundo o tipo de ligação entre as cadeias poliméricas (química ou física) e a necessidade de interligante entre as cadeias do polímero (CONTRI; SIQUEIRA; GUTERRES, 2008).

Os hidrogéis químicos são formados por ligações covalentes irreversíveis e os físicos são formados por interações iônicas ou interações secundárias. Nos hidrogéis de quitosana obtidos por solubilização da quitosana em meio aquoso ácido, e posterior agitação, interações secundárias são estabelecidas entre as cadeias do polímero. Esta maneira, que é a mais simples de preparar um hidrogel de quitosana, determinam a formação de géis caracterizados pela falta de resistência mecânica, tendência a dissolução e ausência de sensibilidade a variações de pH e temperatura. Em decorrência destas limitações de hidrogéis de quitosana, outras maneiras de preparo estão sendo pesquisadas (LANG; CLAUSEN, 1978; ROBERTS; TAYLOR, 1989; CONTRI; SIQUEIRA; GUTERRES, 2008).

1.8 Modificações Químicas da Quitosana

É possível observar na Figura 6, as modificações químicas possíveis de serem realizadas na estrutura da quitosana, as quais abrem novas possibilidades de aplicações da quitosana e suas derivações (PRASHANTH; THARANATHAN, 2007; PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009).

POSSIBILIDADES DE MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DA QUITOSANA

Figura 6. Representação esquemática das possibilidades de modificações químicas da quitina/quitosana.

Fonte: Trends in Food Science & Technology 18(2007)117-131.

Conforme representado na **Figura 7**, a presença de grupos amino primário no carbono C2 da cadeia polimérica piranosídica da quitosana e um grupo hidroxila no C6, permitem modificações químicas seletivas através de reações destes grupos funcionais, viabilizando a síntese de derivados químicos de quitosana com potenciais usos comerciais (KURITA, 1985; KURITA, 1991; NISHIMURA *et al.*, 1992; PETER, 1995; MELLO *et al.*, 2006; PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009).

Na quitosana, devido à presença do grupo amino, reações típicas deste grupo funcional tornam-se possíveis como *N*-acilação e formações de base de Schiff que são as mais importantes, incluindo a reação de entrecruzamento do glutaraldeído ao grupo amino da quitosana (KURITA, 1985; KUMAR, 2000; PRASHANTH; THARANATHAN, 2007; PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009).

Fonte: Polymer Science 34(2009) 641-678

Figura 7. Representação dos sítios de reação da quitina/quitosana.

Fonte: Progress in Polymer Science 34(2009)641-678.

Os grupos amino da quitosana só são protonados quando $\text{pH} < \text{pK}_0 \sim 6,5$, o que leva a solubilização da quitosana somente em soluções diluídas de ácido. Assim, em soluções com $\text{pH} > 6,5$, a quitosana não é solúvel. No sentido de superar esta limitação quanto à solubilidade, diferentes derivados de quitosana têm sido sintetizados e estudados (XIE *et al.*, 2002).

Modificações químicas resultantes de reações de carboximetilação permitem a preparação de derivados solúveis em ampla faixa de pH e a introdução de novas e interessantes propriedades (ABREU; CAMPANA, 2005; ABREU; CAMPANA, 2009; PRASHANTH; THARANATHAN, 2007; PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009).

1.9 Reticulação da Quitosana com Glutaraldeído

O glutaraldeído, **Figura 8**, é uma molécula bifuncional que interage fortemente com compostos que possuem grupos amino em sua estrutura. Funciona como agente formador de ligações cruzadas (*crosslinking*) (PRASHANTH; THARANATHAN, 2007; PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009).

Figura 8- Representação da estrutura química do glutaraldeído

A reação do glutaraldeído com a quitosana, **Figura 9**, se dá pelos grupos aldeídos do glutaraldeído e os grupos amino primários disponíveis na quitosana. O mecanismo dessa reação se dá pela formação de base de Schiff ($-\text{CH}=\text{N}-$) e perda de uma molécula de água (MONTEIRO, 1999; PRASHANTH; THARANATHAN, 2007).

Além do mecanismo de reação, a estrutura resultante da interação glutaraldeído/quitosana é motivo de questionamentos. Em trabalhos publicados, os autores sugerem três estruturas (ISHII, *et al.*1995):

- ✓ formação de apenas uma base de Schiff com um dos grupos aldeídos do glutaraldeído, o outro grupo aldeído permanece livre e é utilizado para uma reação subsequente;
- ✓ os dois grupos aldeído de uma única molécula de glutaraldeído reagem com duas aminas formando uma ligação cruzada;
- ✓ a ligação cruzada é formada por mais de uma molécula de glutaraldeído.

Figura 9- Representação estrutural do *crosslinking* entre a quitosana e o glutaraldeído.

A reação desejável entre o glutaraldeído e a quitosana é aquela na qual o grupo funcional do glutaraldeído reagisse com o grupo amino da quitosana formando ligações cruzadas tipo base de Schiff. Além disso, a utilização de

glutaraldeído como agente reticulante altera as propriedades mecânicas da quitosana (YAMAGUSHI, *et al.* 1981; ABREU; CAMPANA, 2005).

1.10 Carboximetilquitosana (CMQ)

A carboximetilação da quitosana leva a síntese de derivados O-, N- ou N,O- substituídos, sendo que a di-substituição nos grupos amino também pode ocorrer, gerando derivados N,N-substituídos. Entretanto a escolha adequada das condições e dos reagentes a serem empregadas nessas reações permite que sejam obtidos derivados O-, ou N-, ou N,O- substituídos (CHEN, 2003; ABREU; CAMPANA, 2005).

O derivado carboximetilado da quitosana vêm sendo estudado quanto a efeitos fungicidas e bactericidas para aplicações na agricultura, inibindo o crescimento de fungos e bactérias na estocagem de alimentos como: frutas, legumes e hortaliças. Outras aplicações também são relatadas como: tratamento de água para remoção de íons metálicos (Cu, Cd, Pb, Ni, Co e Ca). A carboximetilquitosana também é potencialmente útil nas indústrias farmacêuticas e biotecnológicas, como mostram estudos de liberação controlada de drogas e a elaboração de dispositivos ortopédicos e curativos cutâneos (ABREU; CAMPANA, 2005; ABREU; CAMPANA, 2009; PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009).

A carboximetilquitosana, **Figura 10**, é um derivado quimicamente modificado da quitosana obtido através da carboximetilação com ácido monocloraacético da hidroxila na posição C6. E para que haja seletividade da reação nesta posição da cadeia o meio reacional é constituído por álcool isopropílico e solução aquosa de NaOH 50% e o ácido monocloraacético é o agente carboxilante (ABREU; CAMPANA, 2005; SINI; SANTHOSH, MATHEW, 2005; PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009).

(A) Ilustração das possibilidades de reação da quitina/quitosana com o ácido monocloroacético

(B) Ilustração das possibilidades de reação da quitina/quitosana com o ácido monocloroacético favorecida pelo uso de álcool isopropílico em meio fortemente alcalino

Figura 10. Em (A) e (B), possibilidades de substituição dos grupamentos da quitosana quando em reação com o ácido monocloroacético.

Após a obtenção da O-carboximetilquitosana ocorre a neutralização do derivado com ácido e o produto é lavado com etanol (ABREU; CAMPANA, 2009; SINI; SANTHOSH, MATHEW, 2005; PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009).

A modificação da quitosana em O-carboximetilquitosana foi realizada pelo fato de que os processos reacionais que envolvem o uso de pepsina se dão em $\text{pH} < 3,5$. Sendo o $\text{pH} = 1,5$, o pH ótimo de atividade para esta enzima. Situação de pH na qual a quitosana sem modificação é solúvel. Enquanto as modificações químicas resultantes de reações de carboximetilação e reticulação (*crosslinking*) permitem a preparação de derivados insolúveis em pH ácido, além da introdução de novas e interessantes propriedades físico-químicas (ABREU; CAMPANA, 2005).

1.11 Quitosana como Suporte para Imobilização da Enzima Pepsina

O emprego de quitosana como suporte mecânico para imobilização de enzimas vem sendo pesquisado (PRASHANTH; THARANATHAN, 2007).

Para permitir o emprego de quitosana com a finalidade mencionada é necessário que o material proposto seja insolúvel em meios ácidos em amplo intervalo ($\text{pH} < 6,4$), o que pode ser alcançado através das modificações químicas da estrutura da quitosana.

1.12 Membranas liofilizadas de quitosana e O-carboximetilquitosana

A liofilização é o método mais comumente utilizado para a preparação de proteínas desidratadas, as quais devem apresentar estabilidade adequada por longo período de armazenagem em temperaturas ambientes (TATTINI; PARRA; PITOMBO, 2006).

A liofilização é um processo de secagem constituído de três etapas: congelamento, secagem primária e secagem secundária. A finalidade do congelamento dentro do processo de liofilização consiste na imobilização do produto a ser liofilizado, interrompendo reações químicas e atividades

biológicas. O material, previamente congelado, é desidratado por sublimação seguida pela dessorção, utilizando-se baixas temperaturas de secagem a pressões reduzidas. A estrutura não deve ser alterada durante o processo de liofilização para se evitar a ocorrência de danos irreversíveis ou a perda do produto. O congelamento é uma das etapas mais críticas do processo de liofilização (MURGATROYD *et. al.*, 1997).

Estudos revelam que a liofilização pode causar diversas mudanças estruturais nos espectros de proteínas. Estudos recentes com espectroscopia no infravermelho têm documentado que os problemas relacionados com o congelamento e a desidratação induzidos pela liofilização podem levar ao desdobramento molecular das proteínas (TATTINI; PARRA; PITOMBO, 2006).

Neste trabalho analisamos as possíveis modificações estruturais da quitosana e da pepsina, através de espectroscopia Raman, após, terem sido submetidas ao processo de liofilização. Analisamos também a atividade da pepsina após imobilização e liofilização.

1.13 Pepsina imobilizada em membranas reticuladas e liofilizadas de quitosana (MQ+P+G) e O-carboximetilquitosana (CMQ+P+G)

A pepsina é uma enzima que apresenta sua atividade biológica ótima em pH ácido, por outro lado, sabe-se que a quitosana apresenta-se muito solúvel em pH>6,0, o que representa uma restrição do uso de suportes a base de quitosana para a imobilização de enzimas ativas em pH ácido. Para contornar esta dificuldade, utiliza-se a reticulação da quitosana com glutaraldeído. Desta forma, confere-se resistência da quitosana à solubilidade quando em reação em meios ácido. Além disto, a reticulação do suporte de quitosana com glutaraldeído favorece quimicamente a ligação da enzima ao suporte através de ligações covalentes (ALTUN & CETINUS, 2007).

Conforme representados na **Figura 11**, acontece uma distribuição aleatória das ligações dos monômeros da cadeia polimérica da quitosana, ora com o glutaraldeído, ora diretamente ligados à pepsina, ora glutaraldeído e

pepsina, bem como, alguns monômeros acetilados (quitina) ou até mesmo monômeros de quitosana livres que não reagiram com nenhum componente da formulação. Esta distribuição randômica totalmente aleatória é característica dos copolímeros de quitosana.

Figura 11- Possibilidades de ligação da pepsina e do glutaraldeído a cadeia polimérica da quitosana.

Com a finalidade de se ter um suporte mecânico alternativo a quitosana, sintetizamos a amostra O-carboximetilquitosana. Na **Figura 12** esta demonstrado, esquematicamente, a estrutura química da O-carboximetilquitosana, que é insolúvel em pH ácido e que apresenta as aminas livres para reticulação e ou imobilização da pepsina ou ainda reticulação e imobilização simultânea.

Figura 12- Possibilidades de ligação da pepsina e do glutaraldeído a cadeia polimérica da O-carboximetilquitosana.

A utilização da quitosana e de quitosanas modificadas com a finalidade de imobilizar enzimas é conhecido, porém, através do preparo de esferas coaguladas em solução reticulante de glutaraldeído e posterior ligação dos monômeros expostos presentes na superfície das esferas de quitosana com a enzima. Para se obter a imobilização do conteúdo total da solução enzimática,

preparamos o hidrogel composto pelo polímero adicionado da solução enzimática mais o agente reticulante, e por fim, procedemos a liofilização do hidrogel obtido, não havendo perda das soluções, pois todo o conteúdo dos componentes da formulação foram misturados, plaqueados e liofilizados formando uma membrana.

2. OBJETIVO PRINCIPAL

Imobilizar a enzima proteolítica pepsina em membranas liofilizadas de quitosana e de O-carboximetilquitosana reticuladas com glutaraldeído.

2.1 OBJETIVOS INTERMEDIÁRIOS

Sintetizar e caracterizar a amostra de O-carboximetilquitosana;

Liofilizar as membranas preparadas;

Testar a atividade enzimática da pepsina livre e imobilizada nas membranas;

Determinar a cinética enzimática da pepsina livre e imobilizada nas membranas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Pepsina: Pepsina Sigma 1:10.000 (E.C. 3.4.23.1). A amostra foi gentilmente cedida pelo Instituto Butantan.

3.2 Quitosana: Mw ~600KDa e grau de desacetilação, GD=80%. A amostra foi fornecida pela FarmaService-Bioextract, São Paulo, Brasil.

3.3 Demais reagentes: glutaraldeído Vetec, hemoglobina bovina Sigma, hidróxido de sódio, ácido acético glacial, TCA (ácido tricloroacético), ácido monocloroacético, álcool isopropílico e demais reagentes utilizados foram de grau analítico Synth.

3.4 Síntese da O-carboximetilquitosana (pó): a síntese da O-carboximetilquitosana foi realizada segundo Abreu e Campana, 2005, 2009. Foram suspensos 30g de quitosana 80% desacetilada em 650 mL de isopropanol. A suspensão foi deixada em temperatura ambiente (~25°C) sob agitação por 20 minutos. Feito isto, foram adicionados lentamente 200g de solução NaOH 40% e em seguida 140g de ácido monocloroacético em solução isopropanol (1:1m/m). A reação ficou sob agitação mecânica por 5 horas em temperatura ambiente (~25°C). Após a reação, o precipitado resultante foi filtrado e suspenso em etanol e então neutralizado com ácido acético. O resíduo foi filtrado novamente e lavado várias vezes com etanol 80%, por fim, com etanol absoluto, e seco à temperatura ambiente (~25°C).

3.5 Solução de quitosana 3%: dissolvendo-se a quitosana em solução de ácido acético 1%, sob agitação magnética por 3 horas a temperatura ambiente (~25°C) seguido de repouso por uma noite. No dia seguinte a amostra foi homogeneizada e filtrada utilizando-se uma gaze. Esta solução foi estocada em geladeira e utilizada durante a semana de preparação das membranas.

3.6 Solução de O-carboximetilquitosana 3%: foi preparada uma solução de O-carboximetilquitosana 3% solubilizada em água ultra pura, sob agitação magnética por 3 horas a temperatura ambiente (~25°C) seguido de repouso

por uma noite. Então a amostra foi homogeneizada e filtrada utilizando-se uma gaze. Esta solução foi estocada em geladeira e utilizada durante a semana de preparação das membranas.

3.7 Solução reticulante de glutaraldeído: a solução de glutaraldeído 1% foi preparada em água destilada sob agitação magnética por 30 minutos. Esta solução foi utilizada no mesmo dia de preparação.

3.8 Solução de pepsina: uma solução de pepsina na concentração de 1,0 mg/mL foi preparada utilizando-se uma solução aquosa de HCl 0,01M a temperatura ambiente (~25°C) sob agitação magnética lenta por 30 minutos. Esta solução foi utilizada no mesmo dia de preparação.

3.9 Preparo das membranas: conforme representado no **Quadro 3**, foram preparadas oito tipos de membranas, a partir das soluções de concentração 3% das amostras de quitosana e de O-carboximetilquitosana. Foram preparadas membranas a cada componente adicionado com a finalidade de controlar os parâmetros físico-químicos que cada componente agregado ao sistema viesse apresentar. Após a preparação as membranas foram acondicionadas em placas de Petri, congeladas à -70°C e liofilizadas. Após a liofilização as membranas ainda dentro das placas de Petri (para evitar compressão das membranas) foram embaladas em saco plástico e seladas a vácuo.

Quadro 3- Nomenclatura das membranas sintetizadas e analisadas

Amostras	MQ	MQP	MQG	MQPG
Composição	30,0 mL Sol. Quitosana 3% (Q)	25,0 mL Sol. Quitosana 3% + 5,0 mL Pepsina 1mg/mL	25,0mL Sol. Quitosana 3% + 5,0 mL Glutaraldeído	25,0mL Sol. Quitosana 3% + 5,0 mL Pepsina + 5,0 mL Glutaraldeído
Amostras	MCMQ	MCMQ + P	MCMQ + G	MCMQ + P + G
Composição	30,0mL Sol. O-carboxi metilquitosana 3% (CMQ)	25,0mL Sol. CMQ + 5,0 mL Pepsina	25,0mL Sol. CMQ + 5,0 mL Glutaraldeído	25,0mL Sol. CMQ + 5,0 mL Pepsina + 5,0 mL Glutaraldeído

3.9.1 Membranas de quitosana (MQ): a 25,0 mL de solução de quitosana 3% solubilizada em ácido acético 2%, adicionou-se sob agitação constante e moderada 5,0 mL de solução de pepsina 1mg/mL. Após 20 minutos, foi adicionado 5,0 mL de solução de glutaraldeído 1% seguido de mais 20 minutos de agitação. Esta solução foi acondicionada em placas de Petri e congelada a -70°C para posterior liofilização em equipamento FTS Systems TDS-00209A. Para os testes de atividade enzimática foi também preparada uma membrana de quitosana adicionada de 5,0 mL de solução de pepsina 5mg/mL reticulada com glutaraldeído 1%, a fim de analisar o efeito da concentração da pepsina sobre a atividade enzimática.

3.9.2 Membrana de O-carboximetilquitosana (MQMC): para o preparo da membrana de O-carboximetilquitosana seguiu-se o protocolo mencionado acima (3.9.1), substituindo-se pelo pó de O-carboximetilquitosana que foi solubilizado em água ultra pura. Esta solução foi acondicionada em placas de Petri e congelada a -70°C para posterior liofilização em equipamento FTS

Systems TDS-00209A. Do mesmo modo que a membrana de quitosana, uma amostra de O-carboximetilquitosana adicionada de 5,0 mL de solução de pepsina 5mg/mL reticulada com glutaraldeído 1% foi preparada, a fim de analisar o efeito comparativo da concentração da pepsina sobre a atividade enzimática.

3.10 Caracterização das amostras de quitosana e O-carboximetilquitosana (pó)

3.10.1 Espectroscopia por Infravermelho (IV): As análises de espectroscopia na região do infravermelho foram realizadas a fim de determinar o grau de desacetilação da amostra de quitosana e detectar as mudanças estruturais ocorridas na quitosana após a carboximetilação. As análises foram feitas em pastilhas de KBr em parceria com a Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

3.10.2. Espectroscopia Raman: análises de espectroscopia Raman foram utilizadas a fim de determinar a estrutura das amostras. Embora a espectroscopia Raman seja uma técnica comumente aplicada às proteínas, muito poucas referências foram encontradas de sua utilização para análise de polissacarídeos incluindo-se aí a quitosana.

Análise de *light scattering* por laser através de espectroscopia Raman foi realizada em equipamento Modelo IFS 28/N FT Raman FRA 106/S – Bruker Optics em parceria com o laboratório de engenharia química da Universidade de São Paulo, Escola Politécnica, Departamento de Engenharia Química, nas seguintes condições: varredura de 512 scans, potencia do laser 400mW, resolução de 4 cm⁻¹. O equipamento foi calibrado utilizando-se um padrão de nylon.

3.10.3 Solubilidade em água em diferentes pHs: A amostra O-carboximetilquitosana foi testada quanto a solubilidade em diferentes pHs e comparada a quitosana de partida. Em tubos de ensaio foram preparadas baterias de soluções 1% das amostras de quitosana (Q), bem como da amostra

modificada de O-carboximetilquitosana (CMQ). Os intervalos de pH medidos para as amostras em pó foram: 2,0- 4,0- 5,0- 6,0- 7,0- 9,0- 11,0 e 14,0 para amostra de quitosana (Q) e 2,0- 4,0- 5,0- 7,0- 9,0- 11,0 e 14,0 para amostra de O-carboximetilquitosana (CMQ).

A solução acidificante foi o ácido acético 3% e a solução alcalinizante foi NaOH. As amostras foram agitadas de 15 em 15 minutos durante um intervalo de 1 hora, seguidas de um repouso de 10 horas em que foram novamente avaliadas.

3.11 Caracterização das membranas de quitosana e O-carboximetilquitosana

3.11.1 Espectroscopia Raman: ver 3.10.2.

3.11.2 Análise de microscopia ótica acoplada à liofilização: as soluções de quitosana e O-carboximetilquitosana foram previamente analisados quanto à temperatura de colapso das soluções por representar um parâmetro crítico pré liofilização. A temperatura de colapso dos hidrogéis foi determinada através de um microscópio acoplado a um módulo de liofilização, Lyostat 2, modelo FDCS 196, Linkam Instruments, Surrey, UK, equipado com sistema de congelamento por nitrogênio líquido (LNP94/2) e controlador de temperatura programável (TMS94, Linkam). A pressão utilizada durante as análises foi de 100 mTorr através de uma bomba de vácuo (Edwards E2M1.5, Linkam) e monitorada através de uma válvula Pirani. As amostras foram colocadas em uma placa de quartzo de 16 mm, coberta também por quartzo (Linkam) para minimizar gradientes térmicos. A observação direta do congelamento e liofilização foi realizada utilizando-se um microscópio de luz polarizada Nikon, modelo Elipse E600 (Nikon, Japão).

3.11.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV): a morfologia da superfície e porosidade das membranas de quitosana e O-carboximetilquitosana foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. As imagens foram captadas através de um equipamento de microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo da marca Jeol, modelo JSM 7401-F, utilizando-se aumentos de 50, 300, 1.000 e 10.000 vezes. As amostras foram previamente recobertas com ouro por 40 segundos.

3.11.4 Ensaio de resistência à solubilização de fragmentos das membranas em pH ácido sob agitação: a análise de resistência à solubilização dos fragmentos (g) das membranas em pH ácido (2,0), foi realizada em 20,0 mL de solução aquosa de ácido cítrico 2% (condição de trabalho geralmente empregada para ativação da pepsina), sob agitação magnética moderada por 60 minutos a temperatura ambiente (~25° C).

3.12 Determinação da atividade enzimática da pepsina livre e imobilizada nas membranas de quitosana e O-carboximetilquitosana

3.12.1 Atividade enzimática da pepsina livre e imobilizada nas membranas por hidrólise da hemoglobina: a atividade proteolítica da pepsina foi medida pelo método proposto por BERGKVIT (1963) e depois por HASEM (1999 e 2000) através da hidrólise de solução de hemoglobina pela pepsina livre e imobilizada após a reação de 10 minutos à 37°C. A cada unidade de atividade enzimática da pepsina (U) corresponde a 1 micromol de tirosina liberado no produto filtrado (min/mL).

A reação foi iniciada pela adição de 0,2 mL da solução de enzima livre e massas (g) conhecidas dos fragmentos das membranas contendo a enzima imobilizada à 2,5 mL de solução 5% de hemoglobina desnaturada preparada em solução HCl 0,01M (pH=2,0). O ensaio foi realizado em tubos de centrifuga que foram encubados por 10 minutos à 37°C e posteriormente centrifugados para separação do sobrenadante. Durante a incubação, em intervalos de

tempo de 2 minutos os tubos eram agitados com cuidado. Ao término dos 10 minutos de incubação das soluções de enzima livre, a reação foi interrompida pela adição de 5,0 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 5%. Já os fragmentos das membranas foram analisados nos intervalos de 10, 30, 60 e 90 minutos. Todas as amostras foram centrifugadas. A atividade enzimática da pepsina foi medida por absorbância UV em comprimento de onda de 280 nm.

3.12.2 Cinética enzimática da pepsina livre e imobilizada nas membranas: a cinética enzimática da pepsina livre e imobilizada nas membranas de quitosana e O-carboximetilquitosana foi analisada utilizando-se várias concentrações de hemoglobina (5,0 a 30,0 gL⁻¹) como substrato. Os dados obtidos foram plotados segundo método de Lineweaver-Burk e os parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x.}$, foram calculados a partir do gráfico.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para maior facilidade de leitura e interpretação dos resultados e das conclusões deste trabalho, nas seções que seguem, as amostras serão expressas conforme as abreviações constantes no **Quadro 4**:

Quadro 4- Abreviaturas utilizadas para citação das amostras de quitosana e quitosana modificada:

Quitosana em pó	Q
O-carboximetilquitosana em pó	CMQ
Membranas de quitosana liofilizadas	MQ
Membranas de O-carboximetilquitosana liofilizadas	MCMQ
Membranas de quitosana adicionadas de pepsina e glutaraldeído liofilizada	MQPG
Membranas de O-carboximetilquitosana adicionadas de pepsina e glutaraldeído liofilizada	MCMQ+P+G

Síntese da O-carboximetilquitosana

A amostra carboximetilada, CMQ, apresentou-se como pó fino de coloração clara. Observou-se aumento de massa na ordem de aproximadamente 50% em decorrência da adição do ácido monocloroacético, na proporção de (5:1 massa / massa ou 0,08:0,006 moles/moles) de ácido monocloroacético/quitosana, confirmando dados da literatura (CAMPANA & ABREU, 2006).

Figura 13. Representação gráfica do ganho de massa (g) da amostra de quitosana após a carboximetilação.

Segundo dados de literatura (HACKMAN & COLDBERG; NISHIA & AHMED, 1990; ABREU & CAMPANA, 2005), cujos trabalhos serviram de base para rota de síntese da amostra carboximetilada deste estudo, sugeriram a adição de excesso de ácido monocloroacético e tempo reação de 5 horas para garantir maior substituição dos grupamentos álcool primário do carbono C6 da cadeia da quitosana.

A modificação química através do emprego de ácido monocloroacético aumentou a solubilidade da quitosana em água, bem como aumentou a massa final da amostra, o que pode estar relacionado com maior grau de substituição dos grupamentos (OH primários) livres da quitosana. Sendo que as condições e o meio reacional, álcool isopropílico, invés de etanol, em meio fortemente alcalino, utilizados na síntese favorecem a substituição praticamente exclusiva dos grupamentos OH primários, ao invés dos grupamentos NH_2 (C2) e OH (C3) secundários também presentes na cadeia polimérica da quitosana.

Caracterização das amostras de Quitosana e O-carboximetil quitosana em pó

As amostras de Q e CMQ em pó foram caracterizadas por espectroscopia na região do infravermelho, por espectroscopia Raman. A solubilidade das amostras também foi analisada em soluções de diferentes pHs (ácido-neutro-alcálico).

Infravermelho

Na espectroscopia por infravermelho (IV) a intensidade das bandas foi maior do que as bandas apresentadas pela espectroscopia Raman.

Na **Figura 14**, estão representados os espectros na região do infravermelho das amostras Q e CMQ, nos quais é possível verificar as mudanças estruturais ocorridas na molécula de quitosana após sua carboximetilação.

Analisando os espectros de infravermelho da amostra Q, pode-se observar as bandas características do estiramento axial OH em $\sim 3400 \text{ cm}^{-1}$ a qual está sobreposta a banda de estiramento NH_2 . A banda (C=O) em $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ e as bandas do estiramento (C-H) em $\sim 3000 \text{ cm}^{-1}$.

Os resultados de infravermelho das absorvâncias nos comprimentos de onda 1650 cm^{-1} e 3450 cm^{-1} , associados respectivamente a carbonila e a hidroxila, foram utilizadas na equação proposta por Domszy e Roberts:

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

em que foi possível determinar o grau de desacetilação, $\text{GD}=80\%$ da quitosana. Demonstrando assim, a disponibilidade de 80% de grupos amino livres para reação com a pepsina e reticulação com o glutaraldeído.

Figura 14. Representação do espectro da amostra de Quitosana na região do infravermelho.

Na **Figura 15**, observa-se o espectro da quitosana após a reação de carboximetilação. Nas regiões entre 950 e 1200 cm⁻¹ aparecem grupamentos individuais como (C-O), (C-C), anel da glicosamina e o grupamento (CH₂OH), este último presente em grande quantidade na amostra de quitosana sem modificação.

Figura 15. Representação do espectro da amostra de O-carboximetilquitosana na região do infravermelho.

Os grupamentos polares como o (COO⁻) causam bandas intensas no infravermelho, sua introdução é facilmente identificada pela presença de intensa banda próxima a 1420 e 1605 cm^{-1} . Na região $\sim 1230 \text{ cm}^{-1}$ a banda é afetada pela vibração do estiramento (C-O-C), bem como em ~ 1300 e 1400 cm^{-1} as bandas são influenciadas pela vibração dos estiramentos (C-H) da conformação estrutural própria da molécula, o que dificulta encontrar no infravermelho picos exclusivos da carboximetilação.

Em 1420 cm^{-1} o aumento desta banda na amostra CMQ esta relacionada ao grupamento (COO⁻) confirmando dados da literatura reportados por YEUN & CHOI, 2009. Conforme relatado por estes autores, esta banda na quitosana sem modificação está relacionada aos grupamentos (CH), (CH₂) e (CH₃) presentes no anel de glicosamina.

Em $\sim 3400 \text{ cm}^{-1}$ a diferença de intensidade dos dois picos são atribuídos a substituição dos grupamentos (OH) na CMQ carregada negativamente, ou seja em sua forma iônica.

Espectroscopia Raman

Os resultados obtidos por espectroscopia Raman da amostra Q e da amostra derivada CMQ estão representadas na **Figura 16**. Ambas amostras apresentaram um perfil fluorescente intenso que possibilitou o uso da excitação visível da espectroscopia Raman.

Uma das aplicações mais importantes desta espectroscopia é a identificação de grupos característicos onde um número relativamente grande de moléculas estão envolvidas. Além disso, é possível analisar amostras aquosas o que é inviável na espectroscopia por infravermelho.

Figura 16. Representação dos espectros RAMAN das amostras quitosana (Q) e O-carboximetilquitosana (CMQ)

O espectro de Raman resultante da análise da amostra Q é composto por bandas envolvendo principalmente estiramentos $\nu(\text{C-O})$ e $\nu(\text{C-C})$. Os picos presentes entre $850\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ são atribuídos a configuração estrutural alfa e beta da quitina/quitosana, bem como às ligações glicosídicas típicas destes polissacarídeos. Esta região não sofre alteração após a carboximetilação. Em 1253 cm^{-1} aparece na amostra de quitosana o estiramento (C-OH) disponíveis para carboximetilação.

O estiramento $\nu(\text{C=O})$ em $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ típico das amostras de quitina está ausente ou diminuído nas amostras desacetiladas de quitosana.

Na amostra modificada, CMQ, é possível verificar o pico da amostra na região de 1496 cm^{-1} que demonstram as modificações estruturais da molécula devido a carboximetilação, bem como nas regiões $\sim 951\text{ cm}^{-1}$ onde aparece o estiramento (C-O-C) aumentados para CMQ.

Em 1258 cm^{-1} expressa-se a inserção dos grupamentos carboxílicos nas hidroxilas da quitosana. Na região entre 1550 e 1900 cm^{-1} são observadas as carbonílas (C=O).

Solubilidade

Estão representados nas **Figuras 17 e 18** os resultados do teste de solubilidade à $T \sim 25^\circ\text{C}$ das amostras Q e CMQ.

A amostra Q como era esperado, apresentou solubilidade nos pHs ácidos 2,0; 4,0 e 5,0, passando por uma fase de transição em $\text{pH} \sim 6,0$ e em $\text{pH} = 7,0$ apresenta-se totalmente precipitada.

Figura 17. Solubilidade da amostra de quitosana em diferentes pHs.

Figura 18. Solubilidade da amostra de O-carboximetil quitosana em diferentes pHs.

A amostra modificada CMQ, adicionada de grupamentos carboxílicos, aparece insolúvel em pH=2,0 e parcialmente solubilizada em pH=4,0. A partir deste pH os grupos carboxílicos são desprotonados e livres para interagirem diretamente com o solvente.

Quando as amostras foram solubilizadas em água, pH=7,0, a amostra Q permaneceu insolúvel, bem como em pHs mais alcalinos (8,0 à 14,0). Já a amostra CMQ aparece parcialmente solubilizada em pH=4,0 e totalmente solubilizada a partir de pH=5,0, devido a interação da cadeia do grupamento carboxílico com as moléculas do solvente por causa da desprotonação do polieletrólito de O-carboximetilquitosana.

As floculações que apareceram nas primeiras 5 horas de solubilização 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.

Caracterização das membranas de Quitosana e O-carboximetilquitosana

Antes de serem liofilizados os hidrogéis de Q e CMQ, bem como Q e CMQ adicionados de pepsina e glutaraldeído, foram analisados quanto a temperatura de colapso.

Após a liofilização as membranas obtidas de MQ e MCMQ juntamente com as formulações MQPG e MCMQ+P+G foram analisadas por espectroscopia Raman, MEV, resistência a solubilidade sob agitação em pH ácido e quanto atividade enzimática.

Ensaio da Temperatura de Colapso das Membranas

Para determinar a temperatura de liofilização dos hidrogéis de Q e CMQ, análises de temperatura de colapso das amostras foram realizadas. Para tanto, utilizou-se microscopia óptica acoplada ao módulo de liofilização.

A temperatura de colapso é um parâmetro importante que deve ser levado em consideração durante o processo de liofilização. Se o produto é liofilizado em temperatura acima da temperatura de colapso, podem ocorrer danos em sua estrutura, comprometendo sua estabilidade e em alguns casos sua atividade. Portanto, conhecendo-se a temperatura de colapso é possível determinar uma faixa de temperatura segura de liofilização de um determinado produto.

As **Figuras 19 a 22** mostram quadro a quadro as imagens obtidas durante o processo que se inicia no congelamento até a liofilização dos hidrogéis de Q e CMQ e suas variações MQPG e MCMQ+P+G.

As amostras foram congeladas até uma temperatura de -50 °C, utilizando-se uma taxa de resfriamento de 10 °C/min e após 5 minutos nesta temperatura iniciou-se o processo de liofilização, acionando-se a bomba a vácuo e aumentando-se a temperatura na taxa de aquecimento de 5 °C/min.

A partir das imagens é possível observarmos o congelamento, em que se obtêm a temperatura de cristalização, o início da liofilização onde se observa a interface do hidrogel ainda congelado e da superfície já liofilizada, o aparecimento dos primeiros microcolápsos e dos colápsos propriamente ditos.

De acordo com os resultados obtidos pela microscopia ótica acoplada ao módulo de liofilização podemos verificar a temperatura segura de liofilização para cada solução. A temperatura segura de liofilização é calculada subtraindo-se 3 a 5°C da temperatura em que apareceram os primeiros sinais de colapso da amostra.

Obedecendo-se as condições de temperatura segura durante o processo de liofilização a amostra não sofrerá alterações em suas propriedades, principalmente mecânicas, após a secagem.

Na **Figura 19**, no quadro 1, é possível visualizar a amostra Q ainda na forma de hidrogel, no quadro 2 a amostra já está completamente congelada. No quadro 3 e 4 é possível visualizar a interface entre o hidrogel congelado e a superfície liofilizada. No quadro 6, indicado pela seta, começa o aparecimento dos microcolapsos e nos quadros 7 e 8, também indicados pelas setas, os colapsos formados após a temperatura de -8,1 °C.

ETAPAS DE LIOFILIZAÇÃO DA QUITOSANA

Figura 19. Fotografias das etapas de liofilização obtidas pelo Lyostat para amostra de quitosana. Onde:

1. Amostra ainda na forma de hidrogel;
2. Congelamento da amostra;
- 3, 4 e 5. Interface do hidrogel congelado x liofilizado;
- 6 e 7. Aparecimento dos primeiros microcolapsos;
8. Colapso da amostra.

Nas **Figuras 20, 21 e 22** estão representadas as etapas de liofilização obtidas pelo Lyostat das amostras: QPG adicionada de pepsina e glutaraldeído, CMQ e CMQ+P+G respectivamente. Os fenômenos de congelamento, liofilização, microcolapso e colapso foram representados quadro a quadro dentro de cada figura.

ETAPAS DE LIOFILIZAÇÃO DA Q+P+G

Figura 20. Fotografias das etapas de liofilização obtidas pelo Lyostat para amostra de Quitosana + Pepsina + Glutaraldeído.

Onde:

1. Amostra ainda na forma de hidrogel;
2. Congelamento da amostra;
- 3, 4, 5, 6 e 7. Interface do hidrogel congelado x liofilizado;
8. Aparecimento dos primeiros microcolapsos e colapso da amostra.

ETAPAS DE LIOFILIZAÇÃO DA CMQ

Figura 21. Fotografias das etapas de liofilização obtidas pelo Lyostat para amostra de O-carboximetilquitosana.

Onde:

1. Amostra ainda na forma de hidrogel;
2. Congelamento da amostra;
- 3, 4, 5 e 6. Interface do hidrogel congelado x liofilizado;
7. Aparecimento dos primeiros microcolapsos
8. Colapso da amostra.

ETAPAS DE LIOFILIZAÇÃO DA CMQ + P + G

Figura 22. Fotografias das etapas de liofilização obtidas pelo Lyostat para amostra de O-carboximetilquitosana + Pepsina + Glutaraldeído.

Onde:

1. Amostra ainda na forma de hidrogel;
2. Congelamento da amostra;
- 3, 4, 5, 6 e 7. Interface do hidrogel congelado x liofilizado;
8. Aparecimento dos primeiros microcolapsos e colapso da amostra.

A **Tabela 1** mostra os valores referentes a temperatura de congelamento, temperatura de microcolapso, colapso e a temperatura segura sugerida para a liofilização.

Tabela 1. Resultados obtidos pelo Lyostat.

Material	Temperatura de Congelamento (°C)	Temperatura de Microcolapso (°C)*	Temperatura de Colapso / (°C)*	Temperatura Segura de Liofilização (°C)
Q	-18,6	-11,4	-8,1	-13,1
QPG	-18,2	-10,3	-8,0	-13,0
CMQ	-23,1	-16,3	-13,5	-18,5
CMQ + P + G	-20,5	-17,3	-16,1	-21,1

*Sempre considerando a temperatura mais baixa.

De acordo com os resultados obtidos pelo Lyostat, não houveram variações significativas na temperatura de colapso entre as amostras Q e QPG, bem como entre as amostras CMQ e CMQ+P+G analisadas.

Na **Figura 23** está representada a fotografia das membranas MQ, MCMQ, bem como as membranas de MQPG e MCMQ+P+G obtidas após o processo de liofilização.

Figura 23. Fotografias das membranas de quitosana e carboximetil-quitosana liofilizadas.

Onde: (1)MQ (2)MCMQ (3)MQPG (4)MCMQ+P+G

As membranas apresentaram coloração palha, sendo que com o passar do tempo as amostras reticuladas com glutaraldeído, tornaram-se amareladas. As amostras apresentaram-se uniformes, aeradas e flexíveis.

Microscopia Eletrônica de Varredura

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) permite a obtenção de imagens de superfícies lisas ou rugosas de materiais sólidos, com alta resolução e de aparência tridimensional. Portanto, esta é uma ferramenta muito importante para o estudo da microestrutura do material analisado.

Nas **Figuras 24 a 27** pode-se observar as imagens captadas por MEV referentes a superfície e cortes laterais das membranas MQ, MCMQ, bem como as membranas de MQPG e MCMQ+P+G MQ nos aumentos de 50x, 300x, 1000x e 10.000x.

Figura 24. Micrografias da membrana de quitosana em diferentes aumentos obtidas da superfície e de corte lateral da membrana.

Na **Figura 24** estão representadas as micrografias da membrana MQ. A superfície desta membrana apresenta-se lisa e disposta em camadas sobrepostas e com ausência de poros. Na imagem obtida de um corte lateral da amostra MQ, é melhor observado a disposição das camadas, que se apresentam sobrepostas e com espaços entre elas. Estes espaços possibilitam a permeação de fluidos.

Figura 25. Micrografias da membrana de quitosana adicionada de pepsina e glutaraldeído em diferentes aumentos obtidas da superfície e de corte lateral da membrana.

Na **Figura 25** aparecem as micrografias obtidas da amostra MQ adicionada de pepsina e do agente reticulante, em que é possível observar uma aproximação entre as camadas formadoras da membrana por decorrência do *crosslinking* das aminas livres da quitosana com o glutaraldeído que foi adicionado a formulação.

Figura 26. Micrografias da membrana de O-carboximetilquitosana em diferentes aumentos obtidas da superfície e de corte lateral da membrana.

Na **Figura 26** estão representadas as micrografias da membrana MCMQ em que se observam irregularidades na superfície da membrana a qual apresenta-se rugosa, com presença de estruturas granulares e ausência de poros. Em aumentos maiores a partir de 1000x aparecem estruturas cilíndricas saindo do plano que podem estar associadas à presença de sais.

Figura 27. Micrografias da membrana de O-carboximetilquitosana adicionada de pepsina e glutaraldeído em diferentes aumentos obtidas da superfície e de corte lateral da membrana.

Na **Figura 27** estão representadas as micrografias da membrana MCMQ adicionada de pepsina e glutaraldeído em que verifica-se a ocorrência de selamento das estruturas antes rugosas e irregulares que agora aparecem de forma mais lisa e homogênea com ausência de grumos e ausência de estruturas tridimensionais quando comparadas com a figura 26 da amostra sem a reticulação com glutaraldeído.

Através das micrografias observa-se que a morfologia das membranas MQ e MCMQ é diferente.

Espectroscopia Raman das membranas

Nas **Figuras 28 e 29** estão representados os resultados da espectroscopia Raman das amostras MQ e MCMQ, bem como, os espectros das formulações intermediárias: MQP, MQG, MQPG, MCMQ, MCMQ+P, MCMQ+G e MCMQ+P+G. As formulações intermediárias, adicionadas apenas de pepsina ou glutaraldeído, foram sintetizadas e analisadas por espectroscopia Raman para poder-se determinar possíveis interações químicas entre os componentes da formulação e o suporte e também, para analisarmos possíveis perdas estruturais após o processo de liofilização, no que diz respeito a desnaturação protéica da enzima pepsina por consequência do processo de secagem.

Figura 28. Resultados da espectroscopia Raman das amostras MQ, MQP, MQG e MQPG

Figura 29. Resultados da espectroscopia Raman das amostras MCMQ, MCMQ+P, MCMQ+G e MCMQ+P+G

Os resultados obtidos nas **Figuras 28 e 29** não demonstram interação química da pepsina com o suporte de quitosana, sugerindo que a imobilização se deu de forma física. As ligações do tipo Base de Schiff, entre a amina primária da quitosana e o agente reticulante glutaraldeído, também não foram identificadas através desta metodologia. É necessário considerar que as concentrações do agente reticulante (1% de uma solução 25%) é muito pequena e que estas ligações acontecem de forma totalmente aleatória ao longo da cadeia polimérica da quitosana, podendo ter sido analisado partes não representativas dos fragmentos para estas ligações. A espectroscopia Raman utilizada isoladamente demonstrou não ser uma ferramenta adequada para se estabelecer os fenômenos químicos de *crosslinking* envolvidos entre os componentes das formulações. Por outro lado, esta ferramenta, demonstrou-se eficiente para demonstrar que não houve desnaturação no suporte ou na enzima decorrente do processo de secagem por liofilização, o que também pôde ser observado pelos resultados de microscopia eletrônica de varredura.

Ensaio de resistência à solubilização sob agitação em pH ácido dos fragmentos das membranas sob agitação

O teste de solubilidade das membranas em pH ácido foi realizado devido a condição prévia de que o pH ideal de atividade da pepsina é pH=1,5-3,5, sendo geralmente utilizada em soluções de ácido cítrico diluído. Por outro lado, sabe-se que a quitosana é muito solúvel em soluções diluídas de ácidos orgânicos fracos. Em decorrência disso, propusemos as modificações químicas deste trabalho, a fim de tornar a quitosana insolúvel nesta faixa de pH.

Na **Figura 30**, fragmentos recortados das membranas de MQ, MQPG, MCMQ e MCMQ+P+G liofilizadas, foram pesados e submetidos a análise de solubilidade em solução ácido cítrico 2% (pH=2,0). As amostras foram submetidas a agitação magnética moderada à temperatura ambiente (~25°C) por 5 horas, a fim de se observar o comportamento das membranas no pH ótimo de atividade da pepsina. Sabe-se que a mostra de quitosana é totalmente solúvel em pH<6,0, mas que amostras quimicamente modificadas tornam-se insolúveis nesta faixa de pH, sejam estas modificações por inserção de certos grupamentos ou por reticulação com agentes como o glutaraldeído. Através destas modificações as características físico-químicas da quitosana são alteradas proporcionando a solubilização da mesma em pH do neutro ao alcalino e precipitação em pH ácido. O que foi representado anteriormente neste documento nas **Figuras 17 e 18**.

É possível verificar na **Figura 30** no becker número 1, o fragmento da membrana liofilizada MQ. Na ausência do agente reticulante a amostra não apresentou resistência à solubilidade. Como era esperado, solubilizou-se completamente por estar em pH ácido (pH=2,0). No becker número 2 o fragmento da MQPG, suportou as condições adversas de pH e agitação e não solubilizou-se, tão pouco perdeu a forma, confirmando a expectativa da ocorrência do *crosslinking* da amina livre com o glutaraldeído através da formação de bases de Schiff. A amostra contida no Becker número 3, MCMQ sem agente reticulante, apresentou-se parcialmente solúvel neste pH em conformidade com a solubilidade da amostra em pó como pode ser visto na **Figura 18**.

A amostra do becker número 4, MCMQ+P+G, não se solubilizou, porém, se desintegrou permanecendo em solução um precipitado em flocos dispersos no meio reacional. Estes resultados demonstram que a disponibilidade de aminas livres na amostra modificada não estavam viáveis em sua totalidade para a reticulação com o glutaraldeído, por também terem reagido parte com o ácido monocloroacético e parte com a pepsina, ambos presentes no meio reacional.

Figura 30. Fotografia dos fragmentos das membranas de quitosana e O-carboximetilquitosana após agitação mecânica em pH=3,5.

Onde: (1)MQ, (2)MQPG, (3)MCMQ (4)MCMQ+P+G

Após o ensaio de resistência a solubilidade, o conteúdo contido nos beckers foi filtrado por gravimetria através de papel filtro. O precipitado recuperado de cada amostra foi novamente liofilizado e pesado para se determinar a perda de massa dos fragmentos após o teste de resistência a solubilização. Os resultados estão expressos no gráfico da **Figura 31**, onde é possível observar a perda de massa da membrana MQ por ter se solubilizado no meio ácido. Já a membrana MQ reticulada com glutaraldeído não houve

solubilização e praticamente a massa total foi recuperada, além disso, houve preservação do fragmento em sua estrutura.

Os fragmentos da membrana de MCMQ além de desintegrarem-se perderam parte da massa por solubilização. Enquanto a amostra MCMQ adicionada de glutaraldeído perdeu a forma, porém, não solubilizou-se, por conseguinte, não houve perda significativa de massa desta amostra.

Figura 31. Representação gráfica da perda de massa dos fragmentos das membranas MQ e MCMQ após agitação mecânica em pH=3,5.

Estes resultados confirmam que as amostras de quitosana e a amostra modificada, tornaram-se mais resistentes a solubilização mesmo quando expostas a condições adversas de pH e agitação, sendo que em pH ácido não se solubilizaram.

Já os resultados obtidos para amostra CMQ e CMQ+G corroboram com resultados de solubilidade da CMQ representados na **Figura 18**.

Determinação atividade enzimática da pepsina livre e imobilizada nas membranas por hidrólise da hemoglobina

Estão representados na **Figura 32** os resultados obtidos da curva padrão de tirosina. Os pontos determinados foram medidos nas concentrações de 0,25–10 mM de tirosina. A equação da reta foi posteriormente utilizada para determinação da atividade enzimática da pepsina livre e imobilizada nas membranas. O substrato utilizado foi a hemoglobina desnaturada.

Figura 32. Curva padrão de tirosina (mM) para determinação de atividade de enzima em mMol de Tirosina .

Na **Figura 33**, estão representados os resultados do perfil de atividade enzimática da pepsina livre. A pepsina livre foi analisada nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL em um intervalo de tempo de 10 minutos de reação.

Atividade da Pepsina Livre (mM Tirosina)

Figura 33. Curva obtida da determinação de atividade da pepsina livre nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL.

As análises de atividade da pepsina imobilizada na membranas MQ e MCMQ foram realizadas em intervalos de tempos de 10, 30, 60 e 90 minutos à 37°C.

Na **Figura 34**, pode-se observar os resultados do perfil de atividade da pepsina 1,0 mg/mL imobilizada na membrana MQ e MCMQ.

Na **Figura 35**, os resultados do perfil de atividade da pepsina 5,0 mg/mL imobilizada na membranas MQ e MCMQ. As membranas formuladas com pepsina na concentrações de 5,0 mg/mL, foram preparadas a fim de analisar o efeito da concentração de enzima imobilizada sobre a atividade da pepsina na digestão da hemoglobina (substrato).

Figura 34. Resultados do perfil de atividade da pepsina 1,0 mg/mL Livre e Imobilizada nas membranas MQ e MCMQ

Figura 35. Resultados do perfil de atividade da pepsina 5,0 mg/mL Livre e Imobilizada nas Membranas MQ e MCMQ

Os resultados obtidos do ensaio da pepsina 1mg/mL livre na hidrólise da hemoglobina após 10 minutos de reação foi de 0,38 mMol de tirosina. A amostras da pepsina imobilizada na membrana de quitosana (MQ 1mg/mL), apresentou um perfil semelhante ao da enzima livre quando próxima aos 60 minutos de reação (0,33 mM Tirosina), a amostra de quitosana (MQ 5 mg/mL), **Figura 35**, apresentou resultado superior a enzima livre já nos primeiros 10 minutos de reação.

As amostra de pepsina imobilizada nas membranas de O-carboximetil quitosana (MCMQ) nas concentrações de 1 e 5 mg/mL apresentaram resultados inferiores a enzima livre durante todo o intervalo de tempo analisado, demonstrando que a imobilização da pepsina na membrana MCMQ sofreu alteração em sua atividade. Isto pode ser devido a presença de resíduos de sal presentes na amostra carboximetilada decorrentes da modificação química.

Determinação da cinética enzimática da pepsina livre e imobilizada nas membranas por hidrólise de diferentes concentrações de hemoglobina

A cinética enzimática da pepsina livre e imobilizada nas membranas, foi analisada em várias concentrações de hemoglobina desnaturada (5,0-30,0 g/L) como substrato. Os dados obtidos estão representados na **Figura 36** de acordo com o gráfico de Lineweaver-Burk e os parâmetros cinéticos, K_m e $V_{m\acute{a}x}$, foram calculados por regressão não linear e estão representados na **Tabela 2**.

Lineweaver-Burk Pepsina Livre

Lineweaver-Burk Pepsina Imobilizada na MQ

Lineweaver-Burk da Pepsina Imobilizada na MCMC

Figura 36. Gráficos de Lineweaver-Burk. Em 36.A) Pepsina Livre, 36.B) Pepsina Imobilizada em MQPG e em 36.C) Pepsina Imobilizada em MCMQ+P+G

Tabela 2. Parâmetros cinéticos da pepsina livre e imobilizada nas membranas.

	K_m (g L ⁻¹)	$V_{m\acute{a}x}$ (U/g)
Pepsina Livre	12,0	6170
MQPG	25,0	1298
CMQ + P + G	18,0	1023

O valor aparente de K_m da pepsina livre foi menor do que as amostras imobilizadas. Este aumento no valor aparente de K_m pode ser devido a mudanças nos sítios da enzima provocados pela imobilização ou devido a diminuição do acesso dos sítios ativos da enzima sobre o substrato. Os valores de $V_{m\acute{a}x}$ encontrados para a enzima imobilizada tanto na quitosana como na O-carboximetilquitosana apresentaram valores menores que a pepsina livre. Resultados similares envolvendo mudanças nos valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ têm sido reportados na literatura (ALTUN & CETINUS, 2007). Os resultados encontrados nesta análise, estão de acordo com o que está sendo reportado na literatura.

5. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho permitiram estabelecer as seguintes conclusões:

- ✓ as análises de espectroscopia por infravermelho e Raman mostraram que ocorreram mudanças na estrutura da quitosana após a carboximetilação;
- ✓ a amostra Q apresentou solubilidade em pH ácido e a amostra derivada de CMQ apresentou solubilidade em pH > 5,0 até pH alcalino, confirmando a modificação da quitosana em carboximetilquitosana. Característica esta não apresentada pela quitosana sem a modificação;
- ✓ a amostra liofilizada que apresentou maior resistência a solubilização no pH de interesse (pH de 1,5 à 3,5) foi a membrana MQ reticulada com glutaraldeído, demonstrando a eficiência da reticulação nas aminas livres da quitosana;
- ✓ a liofilização dos hidrogéis de Q demonstrou ser um processo que permite a incorporação de enzima pepsina sem perda de atividade enzimática;
- ✓ a enzima pepsina apresentou maior índice de conversão do substrato quando imobilizada na membrana de quitosana reticulada com glutaraldeído conforme os resultados de atividade enzimática.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, F.R.; CAMPANA FILHO, S.P. Characteristics and properties of carboxymethylchitosan. **Carbohydrate Polymers**, v.75, p.214-221, 2009.

ABREU, F.R.; CAMPANA FILHO, S.P. Preparation and characterization of carboxymethylchitosan. **Polímeros**, v.15, n.2, p.79-83, 2005.

ABREU, F.R. **Estudos de obtenção e caracterização de esferas entrecruzadas de carboximetil-quitosana**. São Carlos, 2006. 168p. Tese de Doutorado – Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo.

ALTUN, G.D.; CETINUS, S.A. Immobilization of pepsin on chitosan beads. **Food Chemistry**, v.100, p.964-971, 2007.

ANTHONSEN, M.W.; VARUM, K.M.; SMIDSRØD, O. Solution properties of chitosans: conformation and chain stiffness of chitosans with different degrees of N-acetylation. **Carbohydrate Polymers**, v.22, p.193-201, 1993.

ARCIDIACONO, S.; KAPLAN, D.L. Molecular weight distribution of chitosan isolated from *Mucor rouxii* under different culture and processing conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, v.39, p.281-286, 1992.

ASSIS, A.S.; STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, T.L.M. Bioconversão de resíduos de camarão *litopenaeus vannamei* (booner, 1931) para produção de biofilme de quitosana. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v.9, n.5, p.480-499, 2008.

AUSTIN, P.R.; BRINE, C.J.; CASTLE J.E.; ZIKAKIS, J.P. Chitin: new facets of research. **Science**, v.212, p.749-753, 1981.

BATISTA, I.; ROBERTS, G.A.F. A novel facile technique for deacetylating chitin. **Makromolekulare Chemie**, v.191, p.429-434, 1990.

BETIGERI, S.S.; NEAU, S.H. Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads. **Biomaterials**, v.23, p.3627-3636, 2002.

BOUSHABA, R.; KUMPALUME, P.; SLATER, N.K.H. Kinetics of whole serum and prepurified IgG digestion by pepsin for F(ab')₂ manufacture. **Biotechnology Progress**, v.19, p.1176-1182, 2003.

BRAEK, S.; ANTHONSEN, T.; SANDFORD, P.A., eds. **Chitin and chitosan**: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications. New York: Elsevier Applied Science, 1989. p.51-69. [Proceedings of the 4th. International Conference on Chitin and Chitosan, 1988, Trondheim, Norway].

BRANT, A.J.C. **Preparação e caracterização de hidrogéis a partir de misturas de soluções de quitosana e poli(N-vinil-2-pirrolidona)**. São Paulo, 2008. 169p. Tese de Doutorado - Instituto de Química – Universidade de São Paulo.

BRINE, C.J.; SANDFORD, P.A.; KIKAKIS, J.P., eds. **Advances in chitin chitosan**. New York: Elsevier Applied Science, 1992. 685p. [Proceedings of 5th. Conference of Chitin and Chitosan, held in Princeton, 1991].

CANELLA, K.M.N.; GARCIA, R.B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel: influência do método de preparação e do solvente. **Química Nova**, v.24, n.1, p.13-17, 2001.

CAO, L.; LANGEN, L.; SHELDON, R. Immobilized enzymes: carrier-bound or carrier-free? **Current Opinion in Biotechnology**, v.14, p.387-394, 2003.

CHEN, J.; WANG, M.; HO, C.J. Volatile compounds generated from thermal degradation of N-acetylglucosamine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, n.8, p.3207–3209, 1998.

CHEN, X.G.; PARK, H.J. Chemical characteristics of o-carboxymethyl chitosans related to the preparation conditions. **Carbohydrate Polymers**, v.53, p.355-359, 2003.

CHO, I.Y.; NO, H.K.; MEYERS, S.P.J. Physicochemical characteristics and functional properties of various commercial chitin and chitosan products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, n.9, p.3839-3843, 1998.

CLARK, D.S. Can immobilization be exploited to modify enzyme activity? **Trends in Biotechnology**, v.12, p.439-443, 1994.

CONTRI, R.V.; SIQUEIRA, N.M.; GUTERRES, S.S. Hidrogéis de quitosana: estrutura e aplicações tópicas. **Cosmetics & Toiletries**, v.20, n.3, p.62-74, 2008.

CUROTTO, E.; AROS, F. Quantitative determination of chitosan and the percentage of free amino groups. **Analytical Biochemistry**, v.211, p.240-241, 1993.

DEE, G.J.; RHODE, O.; WACHTER, R. Chitosan- multi-functional marine polymer. **Cosmetics & Toiletries**, v.116, n.2, p.39-42, 2001.

DESBRIERES, J. Viscosity of semiflexible chitosan solutions: influence of concentration, temperature and role of intermolecular interaction. **Biomacromolecules**, v.3, p.342-349, 2002.

DOMARD, A. pH and c.d. measurements on a fully deacetylated chitosan: application to copper(II)-polymer interactions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.9, n.2, p.98-104, 1987.

DOMARD, A.; ROBERTS, G.A.F.; VARUM, K.M., eds. **Advances in chitin science**. Lion: Jacques Andre Publisher, 1997. 410p. (Advances in chitin science; v.2). [Proceedings of 7th International Conference on Chitin Chitosan and Euchis'97].

DOMSZY, J.G. AND ROBETS, G.A .F, Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analyzing chitosan. **Makromolekulare Chemie**, v.186, p.1671-1685, 1985.

DUNG, P.; MILAS, M.; RINAUDO, M.; DESBRIÈRES, J. Water soluble derivatives by controlled chemical modifications of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v.24, p.209–214, 1994.

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2.ed. São Paulo: Siqueira, 1959. p.644. (Código Farmacêutico Brasileiro, v.1).

FARMACOPÉIA Portuguesa, 1997. p. 1296.

FILAR, L.J. AND WIRICK, M.G. Bulk and solution properties of chitosan. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON CHITIN AND CHITOSAN, 1, Boston, 1977. **Proceedings**. Springfield: National Technical Information Service, 1978. p.169-181. (MIT sea grant report, MITSG 78-7).

FRYDLOVA, J. KUCEROVA, Z.; TICHA, M. Affinity chromatography of porcine pepsin and pepsinogen using immobilized ligands derived from the specific substrate for this enzyme. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.800, n.1/2, p.109-114, 2004.

GALVÃO, M.S.N.; YAMANAKA, N.; FENERICH,V.N.; PIMENTEL, C.M.M., Estudos preliminares sobre enzimas digestivas protolíticas da tainha *Mugil platanus* durante as fases larval e juvenil. **B. Inst. Pesca**, v. 24, n. (único), p. 101-110, 1997.

GONZALES, G.; ALEA, J. Pepsin immobilization by covalent binding to a chitosan derivative. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v.63, n.3, p.247-248, 1995.

GRANT, S.; BLAIR, H.S.; MCKAY, G. Structural studies on chitosan and other chitin derivatives. **Makromolekulare Chemie**, v.190, n.9, p.2279-2286, 1989.

GUIDOLIN, R.; STEPHANO, M.A.; MORAIS, J.F.; SAKAGUTI, E.H.; PRADO, S.M.A. Production of an anti-bothers-tetanus mixed hyperimmune serum of equine origin. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v.4, n.1, p.70-78, 1998.

HAYASHI, T.; IKADA, I. Protease immobilization onto porous chitosan beads. **Journal of Applied Polymer Science**, v.42, p.85-92, 1991.

HIRANO, S. Production and application of chitin and chitosan in Japan. In: BRAEK, S.; ANTHONSEN, T.; SANDFORD, P.A., eds. **Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications**. New York: Elsevier Applied Science, 1989. p.37-43. [Proceedings of the 4th. International Conference on Chitin and Chitosan, 1988, Trondheim, Norway].

HONG, H.A.; OSTERHAUS, A.D.M.E. Methods for the purification of equine rabies immunoglobulin: effects on yield and biological activity. **Biologicals**, v.22, p.1-6, 1994.

HWANG, K.T.; JUNG, S.T.; LEE, G.D.L. Controlling molecular weight and degree of deacetylation of chitosan by response surface methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.1876-1882, 2002.

ISHII, H.; MINEGISHI, M.; LAVITPICHAYAWONG, B.; MITANI, T. Synthesis of chitosan amino acid conjugates and their use in heavy metal uptake. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.17, n.1, p.21-23, 1995

ISMAIL, A.; AASSAR, S.; FATTAH, A. Production of milk-clotting and proteolytic enzymes by fungi. **Agricultural Wastes**, v.10, p.95-102, 1984.

JAYAKUMAR, R.; NWE, N.; TOKURA, S.; TAMURA, H. Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.40, n.3, p.175-181, 2007.

JENNINGS, T.A., **Lyophilization – Introduction and Basic Principles**, Interpharm Press, CO, USA, 1999, 621 p.

JONES, R.G.A.; LANDON, J. A protocol for enhanced pepsin digestion: a step by step method for obtaining pure antibody fragments in high yield from serum. **Journal of Immunological Methods**, v.275, p.239-250, 2003.

JONSON, E.L.; PENISTON, Q.P. Utilization of shellfish waste for chitin and chitosan production. In: MARTIN, R.E.; FLICK, G.J.; HEBARD, C.E.; WARD,

D.R., eds. **Chemistry and biochemistry of marine food products**. Westport: AVI Publishing, 1982. p.415-422.

KHAN, T.A.; PEH, K.K.; CHING, S.H. Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v.5, n.3, p.205-212, 2002.

KHOR, D. Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. **Food Technology**, v.45, n.1, p.114-120, 1991.

KHOR, E. Chitin: a biomaterial in waiting. **Current Opinion in Solid State & Materials Science**, v.6, p.313-317, 2002.

KHOR, E.; LIM, L.Y. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**, v.24, p.2339-2349, 2003.

KIM, C.Y.; CHOIN, H.-M.; CHO, H.T. Effect of deacetylation on sorption of dyes and chromium of chitin. **Journal of Applied Polymer Science**, v.63, n.6, p.725-736, 1997.

KNAUL, J.Z.; KASAI, M.R.; TAM BUI, V.; CREBER, K.A.M. Characterization of deacetylated chitosan and chitosan molecular weight review. **Canadian Journal of Chemistry**, v.76, p.1699-1706, 1998.

KRAJEWSKA, B.; LESZKO, M.; ZABORSKA, W. Urease immobilized on chitosan membrane, preparation and properties. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.48, 337-350, 1990.

KUBOTA, N. Molecular weight dependence of the properties of chitosan and chitosan hydrogel for use in sustained-release drug. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v.66, p.1807-1812, 1993.

KUMAR, M.N.V.R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers**, v.46, p.1-27, 2000

KURIMOTO, E.; HARADA, T.; AKIYAMA, A.; SAKAI, T.; KATO, K. *In vitro* refolding porcine pepsin immobilized on agarose beads. **Journal of Biochemistry**, v.130, p.295-297, 2001.

KURITA, K.; TOMITA, K.; TADA, T.; NISHIMURA, I.; ISHII, S. Reactivity characteristics of a new form of chitosan: facile N-phthaloylation of chitosan prepared from squid β -chitin for effective solubilization. **Polymer Bulletin**, v.30, n.4, p.429-433, 1993.

KURITA, K. Chemical modifications of chitin and chitosan. In: MUZZARELLI, R.A.A.; JEUNIAUS, C.; GOODAY, G.W., eds. **Chitin in nature and technology**. New York, London: Plenum, 1985. [Proceedings of the 3th. International Conference on Chitin and Chitosan, held April 1-4, 1985, in Sinigallia, Italy].

KURITA, K.; INOUE, S.; NISHIMURA, S. Preparation of soluble chitin derivatives as reactive precursors for controlled modifications: tosyl and iodo chitins. **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry**, v.29, n.6, p.937-939, 1991.

LANG, G.; CLAUSEN, T. The use of chitosan in cosmetics. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON CHITIN/ CHITOSAN, 1, Boston, 1977. **Proceedings**. Springfield: National Technical Information Service, 1978. p.139-147. (MIT sea grant report, MITSG 78-7).

LARRY, L.H. Biomaterials: a forecast for the future. **Biomaterials**, v.19, n.16, p.1419-1423, 1998.

LI, Q. Applications and properties of chitosan. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v.7, p.370-397, 1992.

LI, S.; HU, J.; LIU, B. Use of chemically modified PMMA microspheres for enzyme immobilization. **BioSystems**, v.77, p.25-32, 2004.

MADIHALLY, S.V.; MATTHEW, H.W.T. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials**, v.20, n.12, p.1133-1142, 1999.

MAGHAMI, G.G.; ROBERTS, G.A.F. Evaluation of the viscometric constants for chitosan. **Makromolekulare Chemie**, v.189, n.1, p.195-200, 1988.

ENCYCLOPEDIA of Polymer Science and Engineering. 2.ed. New York: John Wiley, 1988. v.11, p.739-829.

MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. **Bioquímica básica**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 386p.

MATHUR, N.K.; NARANG, C.K. Chitin and Chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. **Journal of Chemical Education**, v.67, n.11, p.938-942, 1990.

MADHAVAN, P.; NAIR, K.G.R. Utilization of prawn waste: isolation of chitin and its conversion to chitosan. **Fishery Technology**, v.11, n.1, p.50-53, 1974.

MELLO, K.G.P.C.; BERNUSO, L.C.; PITOMBO, R.N.M.; POLAKIEWICZ, B. Synthesis and physicochemical characteriation of chemically modified chitosan by succinic anhydride. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, n.4, p.665-668, 2006.

MELLO, K.G.P.C. **Síntese e avaliações físico-químicas de quitosanas quimicamente modificadas pela inserção de radicais de anidrido succínico**. São Paulo, 2005. 89p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

MILAS, M.; RINAUDO, M. **Polieletrolitos**. São Carlos: Instituto de Física e Química de São Carlos, 1991. 84p.

MONTEIRO Jr., O.A. **Preparação, modificação química e calorimetria do biopolímero quitosana**. Campinas, 2000. 113p. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas.

MOORE, G.K.; ROBERTS, G.A.F. Determination of degree of N-acetylation of chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.2, p.115-117, 1980.

MOSBACH, K., ed. **Methods Enzymology**: immobilised enzymes and cells: part B.. Orlando: Academic Press, 1987. v.135, 675p.

MURGATROYD, K. In: CAMERON, P., ed. **Good pharmaceutical freeze-drying practice**. Buffalo Grove: Interpharm, 1997. 303p. Disponível em:

MUZZARELLI, R.A.A. Colorimetric determination of chitosan. **Analytical Biochemistry**, v.260, p.255-257, 1998.

MUZZARELLI, R.A.A.; ROCCHETTI, R. The determination of the degree of acetylation of chitosans by spectrophotometry. In: MUZZARELLI, R.A.A.; JEUNIAUX, C.; GOODAY, G.W., eds. **Chitin in nature and technology**. New York, London: Plenum, 1986. p.385-388. [Proceedings of the 3th. International Conference on Chitin and Chitosan, held in April 1-4, 1985 in Senigalia, Italy].

MUZZARELLI, R.A.A.; BELMONTE, M.M.; MUZZARELLI, B.; SIMONELLI, L. Materiali da medicazione a base di chitosani. In: CONVEGNO-SCUOLA, ASSOCIAZIONE ITALIANA DI SCIENZA E TECNOLOGIA DELLE MACROMOLECOLE "POLIMERI IN MEDICINA", 19, Gargnano, 1997. **Atti**. Gargnano, 1997. p.307-336.

MUZZARELLI, R.A.A. **Natural chelating polymers**: alginic acid, chitin and chitosan. Oxford, New York: Pergamon Press, 1973. 252p. (International series of monographs in analytical chemistry, v.55).

MUZZARELLI, R.A.A. Immobilization of enzymes on chitin and chitosan. **Enzyme and Microbial Technology**, v.2, p.177-184, 1980.

NANJO, F.; KATSUMI, R.; SAKAI, K. Enzymatic method for determination of degree of deacetylation of chitosan. **Analytical Biochemistry**, v.193, p.164-167, 1991.

NISHIMURA, S.I.; KOHGO, O.; ISHII, S.; KURITA, K.; MOCHIDA, K.; KUZUHARA, H. New trends in bioactive chitosan derivatives: use of standardized intermediates with excellent solubility in common organic solvents. In: BRINE, C.J.; SANDFORD, P.A.; ZIKAKIS, J.P. eds. **Advances in chitin and chitosan**. London, New York: Elsevier Applied Science, 1992. p.533-542. [Proceedings from the 5th. International Conference on Chitin and Chitosan, held in Princeton, New Jersey, USA, 17-20 October 1991].

NO, H.K.; MEYERS, S.P. Preparation and characterization of chitin and chitosan: a review. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v.4, p.27-52, 1995.

OGAWA, M.; MAGALHÃES NETO, E.O. Anais do VI Congresso Brasileiro de Engenharia da Pesca, 91-105, 1989.

OLIVEIRA, V.G.; JERÔNIMO, C.E.M.; CEZAR, G.M.; SANTIAGO Jr., A.F.; MELO, H.N.S. Proposta para minimização do impacto causado pela carcinicultura nos manguezais do Rio Grande do Norte. In: CONGRESO INTERAMERICANO DE INGENIERÍA SANITARIA Y AMBIENTAL, 28, Cancun, 2002. **Anais**. México: AIDIS, FEMISCA, 2002. p.1-4.

ORREGO, C.E.; SALGADO, N.; VALENCIA, J.S.; GIRALDO, O.H., GIRALDO, G.I.; CARDONA, C.A. Novel chitosan membranes as support for lípases immobilization: Characterization aspects. Article in press: **Carbohydrate Polymers**, (2009), doi:10.1016/j.carbpol.2009.06.015.

ORNUM, J.V. 1992 Shrimp waste must it be waste: INFOFISH Int., 6 48-52. *apud* NOOMHORM, A.; KUPONGSAK, S.; CHANDRKRACHANG, S. Deacetylated chitin used as adsorbent in production of clarified pineapple syrup. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.76, n.2, p.226-232, 1998.

OTTOY, M.H.; VARUM, K.M.; CHRISTENSEN, B.E.; ANTHOSEN, M.W.; SMIDSRFD, O. Preparative and analytical size-exclusion chromatography of chitosans. **Carbohydrate Polymers**, v.31, p.253-261, 1996.

PETER, M.G. Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. **Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry**, v.A32, n.4, p.629–640, 1995.

PILLAI, C.K.S.; PAUL, W.; SHARMA, C.P. Chitin and chitosan polymers: chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science**, v.34, p.641-678, 2009.

PRASHANTH, K.V.; KITTUR, R.N.; THARANATHAN, R.N. Solid state structure of chitosan prepared under different n-deacetylation conditions. **Carbohydrate Polymers**, v.50, p.27-33, 2002.

PRASHANTH, K.V.H.; THARANATHAN, R.N. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential: an overview. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, n.3, p.117-131, 2007.

RIANDE, E. **Polymer viscoelasticity stress and strain in practice**. New York: Marcel Dekker, 2000. 879p. (Plastics engineering, 55).

RINAUDO, M.; DOMARD, A. Solution properties of chitosans. In: SKJAK-BRAEK, G.; ANTHONSEN, T.; SANDFORD, P., eds. **Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications**. New York, London: Elsevier Applied Science, 1989. p.71-86. [International Conference on Chitin and Chitosan, 4th. Trondheim, Norway, 1988].

RINAUDO, M.; MILAS, M.; LE DUNG, P. Characterization of chitosan: influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.15, n.5, p.281-285, 1993.

ROBERTS, G.A.F. **Chitin chemistry**. London: Macmillan, 1992. 350p.

ROBERTS, G.A.F.; TAYLOR, K.E. The formation of gels by reaction of chitosan with glutaraldehyde. **Makromolekulare Chemie**, v.190, n.5, p.951-960, 1989.

SANDFORD, P.A. New products and their commercial applications. **Pure and Applied Chemistry**, v.56, n.7, p.879-892, 1984.

SANDFORD, P.A. Chitosan: commercial uses and potential applications. In: BRAEK, S.; ANTHONSEN, T.; SANDFORD, P.A., eds. **Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications**. New York: Elsevier Applied Science, 1989. p.51-69. [Proceedings of the 4th. International Conference on Chitin and Chitosan, 1988, Trondheim, Norway].

SHIGEMASA, Y.; MATSURA, H.; SAIMOTO, H. Evaluation of different absorbance ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of

deacetylation in chitin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.18, n.3, p.237-242, 1996.

SINGLA, A.K.; CHAWLA, M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects – an update. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.53, p.1047-1067, 2001.

SINI, T.K.; SANTHOSH, S.; MATHEW, P.T. Study of the influence of processing parameters on the production of carboxymethylchitin. **Polymer**, v.46, p.3128-3131, 2005.

TATTINI Jr., V.; PARRA, D.F.; PITOMBO, R.N.M. Influência da taxa de congelamento no comportamento físico-químico e estrutural durante a liofilização da albumina bovina. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.42, n.1, p.127-136, 2006.

TICU, E.L.; MARKO, D.V.; FROIDEVAUX, R.; HUMA, A.; ARTENIE, V.; GUILLOCHON, D. Use of protease-modified-alumina complex to design a continuous stirred tank reactor for producing bioactive hydrolysates. **Process Biochemistry**, v.40, n.8, p.2841–2848, 2005.

WANG, J.; XU, X.; YANG, Y.; WANG, Q. Optimization of the methods for extraction of chitin in crab shell and preparation of chitosan. **Journal of Harbin Institute of Technology**, v.8, n.2, p.199-202, 2001.

XIE, W.; XU, P.; WANG, W.; LIU, Q. Preparation of water-soluble chitosan derivatives and their antibacterial activity. **Journal of Applied Polymer Science**, v.85, p.1357-1361, 2002.

YALPANI, M. **Polyssaccharides, syntheses, modifications and structure, property relations**. Amsterdam: Elsevier, 1988. 499p.

YAMAGUCHI, R.; ARAI, Y.; ITOH, T.; HIRANO, S. Preparation of partially N-succinylated chitosans and their cross-linked gels. **Carbohydrate Research**, v.88, n.1, p.172-175, 1981.