

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

Síntese e avaliações físico-químicas e biológicas de
derivados de quitosana de alta e baixa massa molecular

Adriana Maia Bezerra

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Bronislaw Polakiewicz

São Paulo
2011

Adriana Maia Bezerra

Síntese e avaliações físico-químicas e biológicas de derivados de
quitosana de alta e baixa massa molecular

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dr. Bronislaw Polakiewicz
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Bronislaw Polakiewicz, pela confiança, dedicação, auxílio e orientação durante todo o decorrer do trabalho.

Aos professores do departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutico pelo incentivo e colaboração.

À amiga Rossana Giudice Ribeiro de Araújo por todo companheirismo, paciência, dedicação e incentivos constantes.

Ao amigo Marcos Camargo Knirsch por todo auxílio e amizade.

Aos funcionários do departamento, por toda ajuda.

Aos amigos e companheiros de laboratório, da pós-graduação e iniciação científica pela amizade e companheirismo.

Ao meu namorado Renato, a todos meus familiares e amigos que sempre me apoiaram e acreditaram no meu potencial.

Às agências de fomento Capes e CNPQ pelo apoio financeiro.

E por fim, agradeço a todo que de alguma maneira colaboraram para a realização deste trabalho.

Obrigada!

RESUMO

A quitosana é um polímero natural obtido a partir da desacetilação química da quitina, sendo a quitina o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza. O interesse em pesquisas por novas aplicações da quitosana vem aumentando muito em diversas áreas, como na indústria farmacêutica, na indústria de cosméticos e de alimentos. Isso se deve às importantes características biológicas e físico-químicas inerentes à quitosana, como: biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedade de formação de filmes e fibras, complexação de metais e distintas atividades biológicas. Além disso, a presença de grupos amino na molécula da quitosana permite modificações químicas das mais diversas. No entanto, esta funcionalidade tem mostrado ser dependente, não apenas da sua estrutura química, mas também do seu tamanho molecular. Pois muitas das propriedades físico-químicas, e funcionais de uma cadeia polimérica são definidas pela sua massa molecular. O presente trabalho objetivou a síntese, caracterização e estudo da atividade antibacteriana de derivados de quitosana: quitosanas de baixa massa molecular, utilizando-se o peróxido de hidrogênio como agente oxidante; *N*-succinil-quitosana e 2-carboxibenzamido-quitosana, de alta e baixa massa molecular, em presença de anidridos cíclicos, anidrido succínico e anidrido ftálico, respectivamente. Foram realizadas análises de caracterização dos derivados sintetizados por espectroscopia Raman e Infravermelho e avaliação de propriedades físico-químicas, como viscosidade e solubilidade. A efetividade antimicrobiana da quitosana e de seus derivados sintetizados, de alta e baixa massa molecular, foi avaliada frente à concentração final de 10^6 UFC/mL de *Escherichia coli* através da determinação da concentração mínima inibitória (CMI). Os derivados de baixa massa molecular se mostraram mais solúveis e com menor viscosidade em relação às amostras de alta massa molecular. Em relação à atividade antibacteriana, nenhuma das amostras testadas exibiu ação antibacteriana significativa.

Palavras-chaves: Quitosana. *N*-succinil-quitosana. 2-carboxibenzamido-quitosana. Massa molecular. Atividade antibacteriana.

ABSTRACT

Chitosan is a natural polymer derived from the chemical deacetylation of chitin. Chitin is the second most abundant polysaccharide in nature. The interest in research for new applications of chitosan has been increasing fast in many areas, such as pharmaceuticals, cosmetics and foods industries. This is due to important biological and physical-chemical properties inherent to chitosan, such as biocompatibility, biodegradability, film-forming properties and fiber, metal complexation and distinct biological activities. Moreover, the presence of amino groups in the molecule of chitosan allows a wide range of chemical modifications. However, this feature has shown to be dependent not only on its chemical structure but also on their molecular size. Because many of the physico-chemical and functional characteristics of a polymer chain are defined by their molecular weight. This paper aims at the synthesis, characterization and study of antibacterial activity of chitosan derivatives, low molecular weight chitosan, using hydrogen peroxide as an oxidizing agent, *N*-succinyl-chitosan and 2-carboxybenzamido-chitosan, high and low molecular weight in the presence of cyclic anhydrides, succinic anhydride and phthalic anhydride, respectively. Analyses were performed to characterize the derivatives synthesized by Raman and Infrared spectroscopy and assessment of physicochemical properties such as viscosity and solubility. The antimicrobial effectiveness of chitosan and its derivatives synthesized, high and low molecular weight, was evaluated against the final concentration of *Escherichia coli* 10^6 UFC/mL by determining the minimum inhibitory concentration (MIC). The low molecular weight derivatives were more soluble and less viscous for samples of high molecular weight. Regarding the antibacterial activity, none of the samples tested exhibited significant antibacterial activity.

Keywords: Chitosan. *N*-succinyl-chitosan. 2-carboxybenzamido-chitosan. Molecular weight. Antibacterial activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas químicas de celulose (a) e quitina (b).....	19
Figura 2. Processo de obtenção de quitina.....	21
Figura 3. Estrutura química da quitosana.....	22
Figura 4. Processo de obtenção de quitosana.....	23
Figura 5. Modelo de complexação metal-quitosana.....	31
Figura 6. Estrutura química da <i>N</i> -succinilquitosana.....	34
Figura 7. Estrutura química do anidrido succínico.....	35
Figura 8. Estrutura química do anidrido ftálico.....	35
Figura 9. Estrutura química de 2-carboxibenzamido-quitosana.....	35
Figura 10. Processo de obtenção de quitosana succinilada.....	38
Figura 11. Processo de obtenção de 2-carboxibenzamido-quitosana.....	39
Figura 12. Representação do método de diluição sucessiva.....	43
Figura 13. Representação dos espectros RAMAN das amostra de quitosana de partida (Q) e das quitosanas de massa moleculare reduzida (QL 4, QL 2, QL 40).....	45
Figura 14. Representação dos espectros RAMAN das amostra de quitosana de partida (Q) e de <i>N</i> -succinil-quitosana (SQ).....	47
Figura 15. Representação dos espectros Raman das amostras <i>N</i> -succinil-quitosana de baixa massa molecular (SQL) e <i>N</i> -succinil-quitosana (SQ).....	48
Figura 16. Representação dos espectros Raman das amostras de quitosana de partida (Q) e 2-carboxibenzamido-quitosana (FQ).....	49
Figura 17. Representação dos espectros Raman das amostras de 2-carboxibenzamido-quitosana (FQ) e 2-carboxibenzamido-quitosana de baixa massa molecular (FQL).....	50
Figura 18. Representação dos espectros infravermelho das amostras de quitosana de partida (Q) e das quitosanas de baixa massa molecular (QL 40, QL 2, QL 4).....	51
Figura 19. Representação dos espectros infravermelho das amostras de quitosana de partida (Q) e de <i>N</i> -succinil-quitosana (SQ).....	52
Figura 20. Representação dos espectros infravermelho das amostras -succinil-quitosana de baixa massa molecular (SQL) e <i>N</i> -succinil-quitosana (SQ).....	53
Figura 21. Representação dos espectros infravermelho das amostras de quitosana de partida (Q) e 2-carboxibenzamido-quitosana (FQ).....	54

Figura 22. Representação dos espectros infravermelho das amostras de 2-carboxibenzamido-quitosana (FQ) e 2-carboxibenzamido-quitosana de baixa massa molecular (FQL).....	55
Figura 23. Curva de Viscosidade x Taxa de cisalhamento da amostra de quitosana de partida (Q).....	57
Figura 24. Curva de Viscosidade x Taxa de cisalhamento da amostra QL 40.....	57
Figura 25. Curva de Viscosidade x Taxa de cisalhamento da amostra QL 2.....	58
Figura 26. Curva de Viscosidade x Taxa de cisalhamento da amostra QL 4.....	58
Figura 27. Curva de Viscosidade x Taxa de cisalhamento da amostra SQ.....	59
Figura 28. Curva de Viscosidade x Taxa de cisalhamento da amostra SQL.....	60
Figura 29. Curva de Viscosidade x Taxa de cisalhamento da amostra FQ.....	61
Figura 30. Curva de Viscosidade x Taxa de cisalhamento da amostra FQL.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantidade aproximada de quitina em cada espécie.....	20
Tabela 2. Uso estimado da quitosana no ano 2000 em toneladas.....	28
Tabela 3. Rendimentos das reações de sínteses da amostras.....	45
Tabela 4. Solubilidade das amostras de quitosana de partida (Q 0,5%) e seus derivados de baixa massa molecular (QL40 0,5%, QL2 0,5%, QL4 0,5%) a 20°C.....	55
Tabela 5. Solubilidade das amostras de N-succinil-quitosana (SQ) e 2-carboxibenzamido-quitosana (FQ) e seus derivados de baixa massa molecular.....	56
Tabela 6. Viscosidade aparente das amostras à temperatura ambiente.....	59
Tabela 7. Viscosidade aparente das amostras à temperatura ambiente.....	60
Tabela 8. Viscosidade aparente das amostras à temperatura ambiente.....	61
Tabela 9. Resultados dos CMI's 24 horas das soluções de quitosana 1% e 3,3%; solução de succinil-quitosana 1%; solução de ftaloil-quitosana 1% e do ácido acético 5%.....	62
Tabela 10. Resultados dos CMI's 24 horas das soluções de quitosana de baixa massa molecular QL 40, QL 2, QL 4 a 1%; solução de succinil-quitosana de baixa massa molecular a 1%; solução de 2-arboxibenzamido-quitosana de baixa massa molecular a 1%.....	63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Resultados conflitantes de estudos da ação antimicrobiana da quitosana.....	14
Quadro 2. Propriedades físico-químicas da quitosana.....	24
Quadro 3. Aplicações da quitosana.....	30
Quadro 4. Nomenclatura das amostras sintetizadas.....	39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	16
3. REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1. Polímeros.....	17
3.2. Considerações gerais sobre a quitina.....	18
3.3. Processo de obtenção da quitina.....	20
3.4. Propriedades físico-químicas da quitina.....	21
3.5. Considerações gerais sobre a quitosana.....	22
3.6. Propriedades físico-químicas da quitosana.....	23
3.6.1. Grau de Desacetilação (GD).....	25
3.6.2. Massa molar viscosimétrica média (Mw).....	25
3.7. Aplicações da quitosana.....	27
3.7.1. Aplicações farmacêuticas e biomédicas.....	28
3.7.2. Outras aplicações da quitosana.....	29
3.8. Atividade antimicrobiana da quitosana.....	30
3.9. Papel da quitosana na homeostasia.....	32
3.10. Ação analgésica da quitosana e sua atuação no processo de cicatrização.....	33
3.11. Modificações químicas da quitosana.....	33
3.11.1. Derivado N-succinil-quitosana.....	34
3.11.2. Derivado ftálico de quitosana.....	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1. Materiais.....	36
4.2. Métodos.....	37
4.2.1. Síntese química de quitosanas de baixa massa molecular.....	37
4.2.2. Síntese química de N-succinil-quitosana.....	37
4.2.3. Síntese química de N-succinil-quitosana de baixa massa molecular.....	38
4.2.4. Síntese química de 2-carboxibenzamido-quitosana.....	38
4.2.5. Síntese química de 2-carboxibenzamido-quitosana de baixa massa molecular.....	39
4.2.6. Método de secagem por liofilização.....	39
4.2.7. Análises de espectroscopia Raman.....	40
4.2.8. Análises de espectroscopia Infravermelho (IV).....	41
4.2.9. Análise da viscosidade.....	41

4.2.10. Teste de solubilidade das amostras sintetizadas.....	42
4.2.11. Avaliação da eficácia antimicrobiana.....	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1. Síntese de quitosanas de baixa massa molecular.....	44
5.2. Síntese química de <i>N</i> -succinil-quitosana de alta e baixa massa molecular.....	44
5.3. Síntese química de 2-carboxibenzamido-quitosana de alta e baixa massa molecular.....	45
5.4. Espectroscopia Raman.....	45
5.4.1. Quitosana de partida <i>versus</i> Quitosanas de massa molecular reduzida.....	45
5.4.2. Quitosana de partida <i>versus N</i> -succinil-quitosana.....	47
5.4.3. <i>N</i> -succinil-quitosana <i>versus N</i> -succinil-quitosana de baixa massa molecular.....	47
5.4.4. Quitosana de partida <i>versus</i> 2-carboxibenzamido-quitosana.....	48
5.4.5. 2-carboxibenzamido-quitosana <i>versus</i> 2-carboxibenzamido-quitosana de baixa massa molecular.....	49
5.5. Espectroscopia de Infravermelho.....	50
5.5.1. Quitosana de partida <i>versus</i> Quitosanas de massa molecular reduzida.....	50
5.5.2. Quitosana de partida <i>versus N</i> -succinil-quitosana.....	52
5.5.3. <i>N</i> -succinil-quitosana <i>versus N</i> -succinil-quitosana de baixa massa molecular.....	53
5.5.4. Quitosana de partida <i>versus</i> 2-carboxibenzamido-quitosana.....	54
5.5.5. 2-carboxibenzamido-quitosana <i>versus</i> 2-carboxibenzamido-quitosana de baixa massa molecular.....	54
5.6. Solubilidade das amostras sintetizadas.....	55
5.7. Viscosidade.....	57
5.7.1. Viscosidade das amostras de quitosana de massa molecular reduzida.....	57
5.7.2. Viscosidade das amostras succinil-quitosana (SQ) e succinil-quitosana de baixa massa molecular (SQL).....	59
5.7.3. Viscosidade das amostras 2-carboxibenzamido-quitosana (FQ) e 2-carboxibenzamido-quitosana de baixa massa molecular (FQL).....	60
5.8. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI).....	62
6. CONCLUSÕES	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

1. INTRODUÇÃO

A quitosana é um polímero obtido pela desacetilação química, superior a 40%, da quitina, que é um biopolímero bastante abundante na natureza e é encontrado principalmente em carapaças de crustáceos (especialmente o caranguejo, camarão e lagosta), sendo também encontrada em insetos, moluscos e na parede celular de fungos. (SINGLA, 2001).

A história da quitosana iniciou-se em 1859, quando Rouget relatou sua forma desacetilada. A partir de 1977, o interesse e pesquisas sobre a quitina e quitosana cresceu exponencialmente quando houve a 1ª Conferência Internacional de Quitina e Quitosana em Boston. A quitosana foi produzida industrialmente pela primeira vez no Japão em 1971 e onze anos mais tarde, este país já possuía quinze indústrias produzindo quitina e quitosana em escala comercial (HIRANO, 1989).

Atualmente, esses biopolímeros estão sendo considerados um dos materiais mais promissores para um futuro próximo e vêm tomando destaque considerável nas pesquisas e aplicações. Isto se deve à grande versatilidade de aplicações encontradas nesses polímeros e seus derivados. O Japão elegeu a quitosana como o material do século XXI, investindo, anualmente, gigantesca quantidade de recursos financeiros nos desenvolvimentos científicos e tecnológicos.

O Japão e os EUA são os países que vêm se destacando como os maiores produtores, consumidores e pesquisadores da quitina e quitosana e seus derivados (NIFANT'EV, 1998). Países como a China e a Coreia também se destacam como grandes produtores, assim como, países bálticos (Suécia, Polônia) que vêm trabalhando com a casca do krill (KOBELK, 1990; NIFANT'EV, 1998).

A disponibilidade mundial de quitina é estimada em mais de 39.000 toneladas por ano, a partir de carapaças de crustáceos. Toda a quitina extraída e comercializada é obtida a partir de carapaças de caranguejos e cascas de camarões oriundos de resíduos de processamentos desses crustáceos na indústria pesqueira.

Toneladas de quitina e seus derivados são desperdiçados no Brasil a cada ano, pois as carapaças de crustáceos são resíduos abundantes e rejeitados pela indústria pesqueira. A reutilização da quitina é muito importante do ponto de vista ambiental, pois reduz o impacto ambiental causado pelo acúmulo de resíduos nos locais onde é gerado ou estocado. (GROSSEN, 2009; MATHUR; NARANG, 1990). O descarte destes resíduos orgânicos se constitui um grande agente poluidor. Nas águas, causam

proliferação de organismos patogênicos e no solo, através de aterros sanitários, são responsáveis pela transmissão de doenças através de vetores como ratos, baratas, mosquitos e moscas (IBAMA, 2001).

O Brasil possui uma das áreas costeiras mais extensas do mundo, com cerca de 8.500 quilômetros de extensão em linha contínua e é um dos maiores produtores de crustáceos do mundo, isso justifica a importância do desenvolvimento de tecnologia para a extração da quitina.

A quitosana é um produto de baixo custo, renovável, biodegradável, biocompatível, não-tóxico, cujas propriedades vêm sendo exploradas em aplicações industriais e tecnológicas. Em sua estrutura, a quitosana apresenta grupos funcionais (OH e NH₂) que podem ser quimicamente modificados utilizando-se a diferença de reatividade desses grupos. Nesse contexto, estão sendo realizados estudos de modificação química para aumentar as possibilidades de aplicação.

A presença de grupos amino na quitosana, permite modificações químicas das mais diversas. No entanto, esta funcionalidade tem mostrado ser dependente, não apenas da sua estrutura química, mas também do seu tamanho molecular. Pois muitas das propriedades físico-químicas e funcionais de uma cadeia polimérica são definidas pela sua massa molecular.

A solubilidade da quitosana em pH neutro pode ser melhorada através de modificações químicas, como a introdução de grupos succinil e carboxibenzamido, ou a despolimerização da cadeia polissacarídica. O grau de despolimerização está condicionado a redução da sua massa molecular, alterando sua viscosidade. Evidenciou-se que a massa molecular da quitosana influencia a solubilidade e a atividade antibacteriana dos derivados (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006). Diversos estudos foram realizados para verificar se a quitosana possui ou não atividade antimicrobiana, elucidar em quais microorganismos ela apresenta ação e qual o mecanismo dessa atividade antimicrobiana.

Apesar de diversos estudos relatarem que a quitosana apresenta ação antimicrobiana, os resultados destes estudos são conflitantes (Quadro 1).

Quadro 1. Resultados conflitantes de estudos da ação antimicrobiana da quitosana

RESULTADOS CONFLITANTES DE ESTUDOS	
AUTOR(ES)	RESULTADOS
Xia, 1996	O efeito antimicrobiano em <i>E. coli</i> diminui com o aumento da massa molecular da quitosana.
Naberezhnykh, 2009	Quitosana de alta massa molecular possui maior efeito antibacteriano em Gram-negativas.
Uno <i>et al.</i> , 1997	Quitosanas com massa molecular menor que 2,2KDa tem pouco efeito antimicrobiano.
Jeon e Kim, 2000	Oligossacarídeos em uma concentração de 0,5% inibem completamente o crescimento de <i>E. coli</i> .
Xia, 1996	1,5KDa é a massa molecular de quitosana que apresenta maior efeito antimicrobiano.
Shin <i>et al.</i> , 1997	Quitosana com massa molecular de 180KDa inibe completamente o crescimento de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> .
Liu <i>et al.</i> , 2006	Quitosana com massa molar de 90KDa pode promover o crescimento de <i>E. coli</i> .
Shin <i>et al.</i> , 1997	Quitosana 0,5% com massa molecular de 40KDa inibe 90% do crescimento de <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> .
Hong <i>et al.</i> , 2002	Quitosana 0,1% apresenta maior ação antibacteriana em bactérias gram-positivas que em Gram-negativas.
Guan, Fu, Zhu, 1997	Quitosanas de baixa massa molecular são mais eficazes contra <i>S. aureus</i> .
ZHANG <i>et al.</i> , 2009	Quitosana não apresentou ação antibacteriana contra <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> e <i>P. vulgaris</i> .

Maiores estudos são necessários para explorar a relação entre a atividade antimicrobiana da quitosana e sua massa molecular e concentração.

Devido ao exposto sintetizou-se uma série de derivados de quitosana: três amostras de quitosana com diferentes massas moleculares; dois compostos com dois substituintes anidridos (anidrido succínico e o anidrido ftálico), sendo um alquílico e o outro aromático, *N*-succinil-quitosana e 2-carboxibenzamido-quitosana,

respectivamente; foram sintetizados também, N-succinil-quitosana e 2-carboxibenzamido-quitosana de baixa massa molecular.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivos:

- A obtenção de quitosanas de baixa massa molecular.
- Sintetizar derivados hidrossolúveis da quitosana (*N*-succinil-quitosana e *N*-ftaloil-quitosana) de alta e baixa massa molecular.
- Avaliação de propriedades físico-químicas dos derivados de quitosana obtidos (aparência, estrutura química, solubilidade, viscosidade).
- Avaliação da eficácia antimicrobiana dos derivados da quitosana sintetizados através da determinação da concentração mínima inibitória (CMI).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Polímeros

A palavra polímero tem origem no vocábulo grego *polumeres* que significa “muitas partes”. O polímero é uma macromolécula formada por repetição de várias unidades, constituídas basicamente de carbono e hidrogênio. Estas unidades são chamadas de unidades monoméricas e são unidas por ligações covalentes, originando uma molécula bastante longa, de alta massa molecular, ou seja, uma macromolécula.

Os polímeros podem ser formados por material orgânico ou inorgânico, natural ou sintético. A reação que promove a união dos monômeros para formar um polímero é chamada de polimerização. O monômero une-se à outras moléculas, formando o dímero, trímero e assim por diante, até chegar a aproximadamente cem monômeros quando é então chamado de polímero (RIANDE, 2000).

A alta massa molecular dos polímeros e a diversidade de estruturas que podem ser formados pelo encadeamento dos monômeros conferem a estes materiais propriedades físicas e químicas especiais, como por exemplo, alta viscosidade, elasticidade ou dureza, resistência ao calor, à umidade e à abrasão (LUCAS, 2001).

Os polímeros podem ser lineares, ramificados ou “cross-linked”. Os lineares possuem cadeias lineares com dois grupos terminais. Os polímeros ramificados possuem cadeias laterais ligadas covalentemente à cadeia principal. Já os “cross-linked”, apresentam uma cadeia tridimensional, onde a macromolécula tem ligações em todas as direções do espaço formando uma rede (RIANDE, 2000).

Quando o polímero possui uma cadeia polimérica representada pela repetição de um único tipo de unidade, este é chamado de homopolímero e tem a estrutura química representa por:



A quitina é um exemplo de homopolímero natural formado por monômeros D-glicosamina N-acetilados.

Já o polímero que é constituído por dois ou mais tipos de unidades repetidas é chamado de copolímero. Existem vários tipos de copolímeros dependendo de como as unidades repetidas se organizam ao longo da cadeia polimérica (LUCAS, 2001). Nas definições a seguir letras “A” e “B” são utilizadas para representar os monômeros dos polímeros:

- Copolímeros de sequência aleatória: a sequência dos monômeros se repete ao acaso. Um exemplo deste tipo de polímero é a quitosana, em que apresenta ao longa de sua cadeia, monômeros de D-glicosamina acetilados e desacetilados.



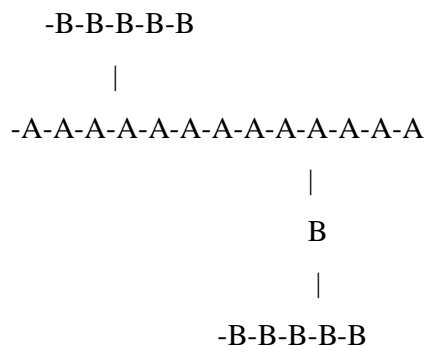
- Copolímeros de sequência alternada: formado por dois tipos de monômeros que se repetem alternadamente.



- Copolímeros de sequência em bloco: polímeros formados por sequência linear em que a repetição das unidades aparecem em grupos ou blocos do mesmo tipo.

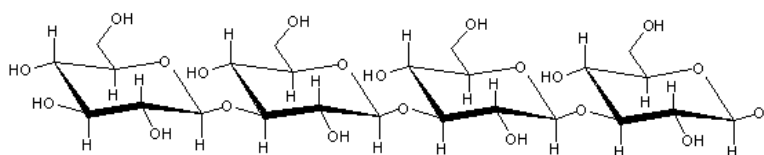


- Copolímeros de sequência ramificada: apresenta a estrutura química das ramificações diferente da cadeia principal.

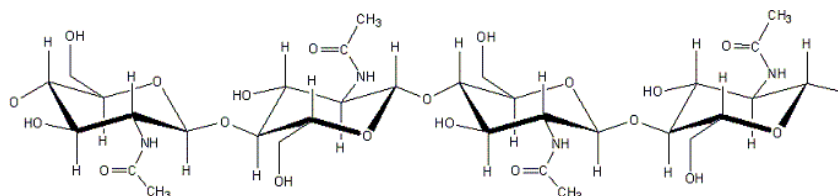


3.2. Considerações gerais sobre a quitina

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, atrás apenas da celulose. É um polissacarídeo de cadeia linear formado por unidades N-acetil-2-deoxi-D-glicopiranosose que são interligadas por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4) que arranjam-se em alfa hélice estabilizadas por pontes de hidrogênio intramoleculares (SINGLA, 2001). A quitina e celulose possuem semelhança funcional, apresentando baixa solubilidade e baixa reatividade química, e semelhança estrutural, porém a quitina apresenta no carbono de posição dois uma substituição da hidroxila por uma acetoamino (Figura 1).



(a) Celulose



(b) Quitina

Figura 1. Estruturas químicas de celulose (a) e quitina (b)

A quitina foi descoberta, em 1811, pelo francês Henri Braconnot, professor de História Natural e Diretor do Jardim Botânico da Academia de Ciências em Nancy. Ele isolou a quitina em algumas espécies de fungos e a nomeou de fungina (KNORR, 1992).

O termo “quitina” deriva da palavra grega “χιτών”, que significa túnica ou cobertura, fazendo referência à sua dureza por funcionar como uma capa protetora de invertebrados.

Em 1823, Odier deu o nome quitina, quando esta foi isolada em insetos e foi o primeiro a relatar a semelhança entre as substâncias presente na armadura dos insetos e nos tecidos vegetais. Observou posteriormente a presença de quitina na carapaça de caranguejo e sugeriu que ela seria o material formador do exoesqueleto de insetos e possivelmente aracnídeos. Ressalta-se, entretanto que apenas em 1843 foi esclarecido, por Payen, a presença de nitrogênio na estrutura da quitina (ROBERTS, 1992).

A quitina é componente do exoesqueleto de crustáceos e de insetos e integra a parede celular de fungos. Ela funciona como um componente fibroso e está quase sempre associada às proteínas, formando oligoproteínas que interagem com constituintes como carbonatos e fosfatos (AZEVEDO et al., 2007; SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006; SINGLA; CHAWLA, 2001; SHI et al., 2006).

A quitina é biologicamente sintetizada em um total aproximado de 1 bilhão de toneladas por ano. Este volume não se acumula na natureza, pois é biodegradado no

ciclo da quitina, através de enzimas hidrolíticas (lisoenzima, quitinase, quitina desacetilada e quitosanase) que estão amplamente distribuídas nos tecidos e fluidos corporais de animais e plantas e também no solo (BRINE, 1991; HIRANO, 1996; CRAVEIRO, 1999).

As proporções de quitina encontradas variam de acordo com a espécie e a região de origem (Tabela 1) (THATTE, 2004).

Tabela 1: Quantidade aproximada de quitina em cada espécie

Espécies	% de Quitina
Fungos	5-20%
Camarão	22%
Polvos/Lulas	3-20%
Escorpiões	30%
Aranhas	38%
Baratas	35%
Besouro d'água	37%
Bicho da seda	44%
Caranguejo Hermit	69%
Caranguejo Edible	70%

Um das causas da resistência da estrutura dos artrópodes é a presença de quitina compondo um esqueleto externo. Os artrópodes possuem o exoesqueleto formado por uma cutícula grossa, responsável pela rigidez do corpo. A porção externa é impermeável e composta por proteínas e cera. Já a porção interna, é mais espessa e é formada por camadas de quitina, carbonato de cálcio e pigmentos. A quitina por ser rígida e impermeável, proporciona sustentação, proteção mecânica e ainda atua contra a desidratação (MELLO, 2006).

3.3. Processo de obtenção da quitina

A produção comercial da quitina é obtida de resíduos da indústria de processamento de crustáceos. Nestes materiais a quitina está associada com proteínas, materiais inorgânicos, lipídeos e pigmentos (MATHUR e NARANG, 1990).

A primeira etapa do processo de obtenção da quitina é a pulverização das cascas de crustáceos. Com a pulverização ocorre o aumento da superfície de contato do material, facilitando e agilizando as etapas seguintes. Em seguida, ocorre a desproteínação por tratamento com hidróxido de sódio 5%, pela dissolução das proteínas, permanecendo a quitina, os lipídeos e os sais de cálcio, principalmente CaCO_3 . Posteriormente, ocorre a desmineralização com HCL 30%, dissolvendo o carbonato de cálcio e outros constituintes inorgânicos. Os pigmentos podem ser eliminados pela extração com etanol ou acetona, depois do tratamento de desmineralização, ou por branqueamento com uso de KMnO_4 , NaCl , SO_2 , NaHSO_3 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ou H_2O_2 (ANTONINO, 2007). O processo de obtenção da quitina está representado na Figura 2.

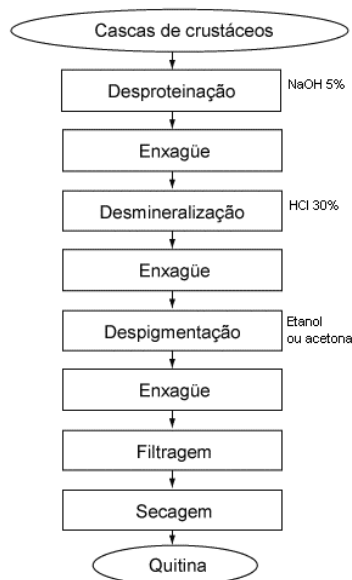


Figura 2. Processo de obtenção de quitina

3.4. Propriedades físico-químicas da quitina

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

Esse polímero natural apresenta características estruturais ópticas e cerca de 6,89% de nitrogênio, o que justifica propriedades apresentadas, como a quelação de íons metálicos e formação de filmes. Além disso, é um polímero natural extremamente

abundante, de baixo custo, atóxico, biocompatível e biodegradável (AZEVEDO et al., 2007; DODANE; VILIVALAM, 1998; KUMAR, 2000; KURITA, 2006).

A quitina é um pó amarelado de estrutura cristalina ou amorfa, altamente hidrofóbica, insolúvel em água, em alguns ácidos e bases diluídas e em vários solventes orgânicos. Ela é solúvel em hexafluorisopropanol, hexafluoracetona, cloroálcoois adicionados a soluções aquosas de ácidos minerais e dimetilacetamida contendo 5% de cloridrato de lítio (KURITA, 1998).

A estrutura da quitina pode ser modificada removendo-se os grupos acetil, por uma reação química em solução alcalina concentrada e elevada temperatura. Quando a desacetilação da quitina é superior a 65%-60%, o co-polímero resultante é a quitosana (AZEVEDO et al., 2007; SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006; SINGLA; CHAWLA, 2001; SHI et al., 2006).

3.5. Considerações gerais sobre a quitosana

A quitosana é um heteropolissacarídeo derivado do processo de desacetilação química da quitina, constituída, predominantemente, por várias unidades *D*-glicosamina e por unidades *N*-acetil-*D*-glicosamina ligadas por ligações β (1 \rightarrow 4) (AZEVEDO et al., 2007; SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

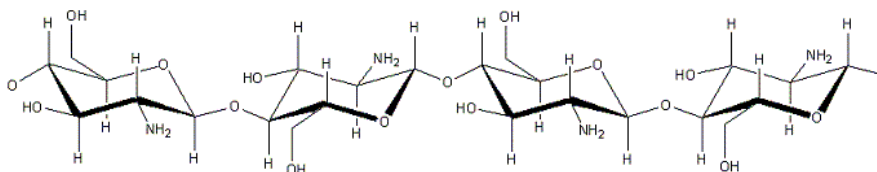


Figura 3. Estrutura química da quitosana

O termo quitosana é usado para descrever uma série de polímeros de quitosana, com diferentes massas moleculares (50KDa a 2000KDa) e grau de desacetilação (40%-98%) (ILLUM, 1998).

A qualidade e as propriedades da quitosana podem variar, dependendo do seu processo de fabricação que influencia nas características do produto final. Assim, a quitosana deve ser caracterizada de acordo com suas propriedades intrínsecas como: pureza, massa molecular, viscosidade e grau de desacetilação, sendo estes fatores determinantes nas características finais do produto e em que será utilizada.

Por ser um polímero natural a massa molecular de diferentes amostras de quitosana é variada. Dependendo da procedência da amostra e dos tipos de tratamento que foram empregados para sua obtenção muitos valores de massa molecular podem ser obtidos (KHAN; PEH; CHENG, 2002).

Os principais fatores que afetam as características das quitosanas obtidas e a eficiência da desacetilação são (ROBERTS, 1992):

- temperatura e tempo de reação;
- concentração de álcali;
- razão quitina/álcali;
- tamanhos das partículas de quitina;
- atmosfera de reação e presença de agentes que evitem a despolimerização.

Quimicamente, a quitosana é uma poliamina. É um polímero natural, de baixa toxicidade, passível de ser manufaturada em forma de filmes, fibras, lâminas e géis. Possui importantes propriedades biológicas, fisiológicas e farmacológicas. É uma molécula bastante funcional, desempenhando atividade cicatrizante, imunoestimulatória, antitumoral, hemostática, anticoagulante, mucoadesiva, hipolipêmica, antimicrobiana, dentre outras. Tem sido proposta também como suporte polimérico para liberação de gene, liberação controlada de fármacos, cultura celular, pele artificial e suturas cirúrgicas (AZEVEDO et al., 2007; DODANE; VILIVALAM, 1998; KURITA, 2006).

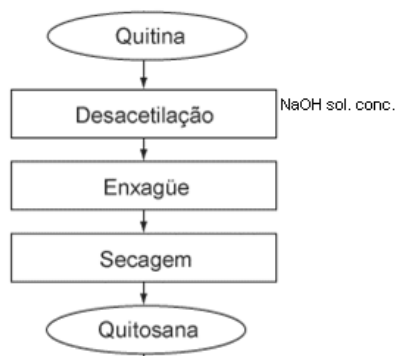


Figura 4. Processo de obtenção de quitosana

3.6. Propriedades físico-químicas da quitosana

A quitosana é encontrada comercialmente em forma de pó. Ainda não existe um padrão internacional dos parâmetros físicos e químicos para este biopolímero

(HIRANO, 1989). Sabe-se que durante o processo de obtenção da quitosana, altas temperaturas, assim como, altas concentrações de reagentes podem acarretar danos irreparáveis à qualidade deste polímero, modificando a grau de desacetilação, massa molecular, viscosidade, etc. (KUBOTA, 1992; KNAUL *et al.*, 1998; RIANDE, 2000).

A caracterização da quitosana pode ser feita levando-se em consideração as propriedades físicas, químicas e biológicas. As propriedades físicas são: tamanho das partículas, densidade, solubilidade, viscosidade e descrição de suas apresentações. Já as propriedades químicas são: distribuição de massa molecular, grau de desacetilação, pH, índice de cristalinidade, valor de retenção de água, níveis de metais pesados e proteínas. E as biológicas são: apirogenicidade, citotoxicidade e biocompatibilidade.

A quitosana é insolúvel em água em pH alcalino e neutro e solúvel em pH ácido (SINGLA; CHAWLA, 2001; SHI *et al.*, 2006). Em ácidos diluídos (pH<5,5), os grupamentos amino livres são protonados e a molécula se torna solúvel (SHI *et al.*, 2006).

No Quadro 2 estão resumidas as propriedades físico-químicas da quitosana (KNAPCZYK, 1989; SANFORD, 1990).

Quadro 2. Propriedades físico-químicas da quitosana

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

3.6.1. Grau de desacetilação (GD)

O grau de desacetilação é um importante parâmetro a ser examinado, já que ele determina a quantidade de grupos amino presentes no biopolímero (KUMAR, 2000).

Com o objetivo de determinar o grau de desacetilação da quitosana muitos métodos analíticos têm sido propostos, como: espectroscopia na região do infravermelho (IV), titulometria com ninhidrina e ressonância nuclear magnética (RMN) (MELLO *et al.*, 2006).

Outros métodos, cromatografia à gás, cromatografia de permeação em gel, titulação, espectroscopia UV, hidrólise ácida, HPLC, entre outros, são citados na literatura (MUZZARELLI, 1985; MUZZARELLI, 1998; KUMAR, 2000).

Na técnica de espectroscopia de infravermelho (IV) os 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. As equações propostas, normalmente, utilizam os valores de absorvância das bandas em 1655 e 3450 cm^{-1} , associadas a carbonila e hidroxila, respectivamente. A primeira banda varia de acordo com o grau de desacetilação da quitina, diminuindo da quitina para a quitosana, e a segunda, está presente tanto no espectro da quitina quanto no da quitosana, então, não sofre alteração (MUZZARELLI, 1985; KIM *et al.*, 1997; CHO; NO; MEYERS, 1998; MUZZARELLI, 1998; MONTEIRO, 2000; MELLO *et al.*, 2006).

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

$$\text{GD} = 100 - [(A_{1665}/A_{3450}) \times 100/1.33] \quad \text{Equação 1}$$

O fator 1,33 corresponde à constante que representa a razão (A_{1665}/A_{3450}) para quitinas completamente acetiladas. É assumido o valor igual a zero para quitosanas totalmente desacetiladas (CANELA; GARCIA, 2001; KHAN, PEH, CHING, 2002).

3.6.2. Massa molar viscosimétrica média (Mw)

A viscosidade das soluções de quitosana aumenta à medida que se aumenta a concentração da amostra, diminui-se a temperatura, aumenta-se o grau de desacetilação.

Por apresentar alta massa molecular e uma estrutura linear, a quitosana em pequenas concentrações (2-3%) confere viscosidade às soluções em meio ácido, e um comportamento pseudoplástico, redução da viscosidade com o aumento da tensão de cisalhamento (SINGLA; CHAWLA, 2001; KUMAR, 2000; HWANG; JUNG; LEE, 2002).

O tamanho da cadeia polimérica e sua massa molecular também interferem na solubilização das amostras. Por ser um biopolímero, a massa molecular de diferentes amostras de quitosana é diferente. Diversos valores podem ser obtidos dependendo da procedência da amostra e de tipos de tratamento que foram empregados na sua obtenção. Com o intuito de reduzir essa discrepância nas faixas de massa molecular obtidas, classificaram-se as amostras de quitosana segundo a distribuição de massa molecular em: alta, média e baixa massa molecular, assim como ocorre com outros polímeros, como o polietilenoglicol (PEG) e carboximetilcelulose (CMC). As quitosanas consideradas de baixa massa molecular estão na faixa de 100.000 g/mol, as de médio peso molecular na faixa de 500.000 g/mol, e as de alto peso, 1.000.000 g/mol (DEE; RHODE; WACHTER, 2001).

Um método simples e rápido para determinar a massa molar viscosimétrica média dos polímeros, é a viscosimetria. A equação mais utilizada que relaciona viscosidade e massa 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 (MAGHAMI; ROBERTS 1988; KUMAR, 2000).

A densidade linear de carga da molécula 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 ”. Os valores de “ a ” dependem diretamente da configuração do polímero. Para polímeros lineares de cadeia aleatória, os valores de “ a ” devem ser

maiores que 0,5, uma vez que valores abaixo de 0,5 são típicos de proteínas globulares em que a cadeia polimérica é hidratada e em configuração de espiral, não sendo estas duas características observadas nas cadeias de quitosana. Valores de “a” em torno de 1,2 são utilizados para cadeias estendidas e muito longas (MAGHAMI; ROBERTS, 1988; ROBERTS, 1992; ANTHOSEN; VARUM; SMIDSRÖD, 1993).

Utilizando-se valores de $K = 1,81 \times 10^{-3}$ e $a = 0,93$, tem-se observado resultados aceitáveis de M_w (MAGHAMI; ROBERTS, 1988).

O grau de polimerização de um polissacarídeo pode ser reduzido rompendo-se suas ligações glicosídicas. Métodos atuais para preparação de oligossacarídeos incluem a hidrólise por ácidos, leveduras, enzimas, radiação e oxidação. A redução da cadeia polimérica catalisada por ácidos é simples, porém não é possível controlar o grau de polimerização e a separação desses polímeros de baixa massa molecular não é um processo fácil, tão pouco simples. Além disso, os resíduos gerados por uma hidrólise ácida são tóxicos. Os métodos enzimáticos e com leveduras são mais pontuais, permitindo um controle do processo e da distribuição da massa molecular. No entanto, estes métodos são mais dispendiosos. Já os métodos que utilizam a radiação, como a irradiação de raios- γ , possibilitam altas taxas de degradação nas cadeias polissacarídeas, entretanto reações entre os oligossacarídeos, como “cross-linking”, são fáceis de ocorrer. No método oxidativo, o agente oxidante mais utilizado é o peróxido de hidrogênio. O processo apresenta uma metodologia simples, barata, sem resíduos tóxicos ao final do processo, além da rápida despolimerização dos biopolímeros (HUANG, 2008).

A solubilidade pode ser alterada através de modificações químicas, como a introdução de grupos, ou a despolimerização da cadeia polissacarídica. O grau de despolimerização está condicionado a redução da sua massa molecular (M_w), alterando sua viscosidade. Um método simples para avaliar essa redução é a verificação da viscosidade em solução (TODOROVIC, 2002).

3.7. Aplicações da quitosana

O emprego da quitosana e a pesquisa por novas aplicações têm aumentado exponencialmente em diversas áreas, como na agricultura, indústria de alimentos, de cosméticos e na indústria farmacêutica (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006; SHI et al., 2006; KUMAR, 2000; DODANE; VILIVALAM, 1998). A produção industrial e as

aplicações da quitosana apresentaram um elevado crescimento a partir da década de 70 (Tabela 2). Atualmente, a tendência de aplicação da quitosana na indústria é em produtos com alto valor técnico agregados, como produtos farmacêuticos e cosméticos (CRAVEIRO, A. A.; CRAVEIRO, A. C.; QUEIROZ, D. C., 1999).

Tabela 2. Uso estimado da quitosana no ano 2000 em toneladas (KURITA, 2006)

Mercado	América do Norte	Europa	Ásia	Outros	Total
Suplementos alimentares	500	125	250	125	1000
Tratamento de água	125	25	200	50	400
Preservação de alimentos	0	0	125	25	150
Oligossacarídeos	0	0	150	0	150
Agricultura	25	0	75	25	125
Cosméticos	25	25	50	0	100
Têxteis de higiene	0	0	50	0	50
Papel	25	0	25	0	50
Alimentos	10	0	25	10	45
Dispositivos médicos	1	1	1	0	3
Total	711	176	951	235	2073

3.7.1. Aplicações farmacêuticas e biomédicas

A quitosana é um material funcional de aplicação em vários campos do conhecimento. Na área farmacêutica ela vem sendo utilizada como excipiente em formulações farmacêuticas, para liberação controlada de medicamentos e encapsulação de materiais. Na área biomédica é usada em suturas cirúrgicas, reconstituição óssea, implantes dentários, e, é utilizada ainda, na confecção de biomateriais, como lentes de contato, membranas renais, pele artificial, entre outros (DODANE, 1998; KUMAR, 2000).

Adicionada à complexos com soluções de polímeros aniônicos, como polifosfatos, alginatos e pectinas, a quitosana é utilizada para formação de biomembranas, encapsulação e imobilização de enzimas e células.

Sua utilização em suturas cirúrgicas se justifica pela biocompatibilidade da quitosana, deste modo, não produz reações alérgicas. Já sua utilização em lentes de contato conta com a maior biocompatibilidade do que as lentes feitas de polímeros sintéticos e ainda, são confortáveis, absorvem água e são permeáveis ao ar, podendo assim ser utilizadas por um período de tempo maior (SANFORD, 1989).

A quitosana, por possuir uma estrutura química muito semelhante à celulose e não sendo digerida pelas enzimas digestivas, é considerada uma fibra de origem animal

(MUZZARELLI, 1996). Portanto, por ser uma fibra, o seu consumo, contribui para o aumento do bolo fecal, diminuindo, assim, o tempo dos alimentos no intestino e dessa maneira, contribuindo também para a redução dos níveis de colesterol (CRAVEIRO, 1999). A quitosana é empregada, ainda, como auxiliar na redução de peso em tratamento de obesidade, através da captura das gorduras contidas nos alimentos. Devido à alta densidade de cargas positivas do polímero, a quitosana se liga aos ânions dos ácidos graxos impedindo sua absorção pelo organismo. No estômago, um ambiente ácido, a quitosana adsorve as gorduras durante a digestão e quando chega ao intestino, que apresenta um ambiente básico, o complexo quitosana-gordura é solificado, sendo então excretados junto com as fezes (DEUCHI, 1994).

Na indústria cosmética, a quitosana é usada como esfoliante, hidratante capilar, creme dental e no tratamento de acne. Por ser um polissacarídeo catiônico em $\text{pH} < 6,0$, a quitosana carregada positivamente irá interagir com as superfícies carregadas negativamente como o cabelo e a pele. E, além disto, é um agente umectante e hidratante. Adicionalmente é utilizada como um doador de viscosidade em xampus não-iônicos (SANFORD, 1989).

3.7.2. Outras aplicações da quitosana

A quitosana vem sendo aplicada no tratamento de água para remoção de íons, como floculante para clarificação e redução de odores; na agricultura, como adubo e fungicida e no revestimento de frutas e sementes; auxiliar de curtimento e acabamento, aumenta a temperatura do encolhimento, penetração e fixação de corantes e ainda melhora a resistência à água (SINGLA, 2001).

No quadro 3 estão resumidas algumas das aplicações de quitosana (BOURIOTIS *et al.*, 2000; CRAVEIRO, A. A.; CRAVEIRO, A. C.; QUEIROZ, D. C., 1999).

Quadro 3. Aplicações da quitosana

Aplicação	Exemplos
Tratamento de água	Absorvente de íons metálicos e pesticidas, remoção de fenóis, proteínas, radioisótopos
Agricultura	Revestimento de frutas e sementes, fertilizante e fungicida
Aditivos alimentares	Clarificação de frutas e bebidas, estabilização da cor, redução de absorção lipídica, agente controlador de textura, conservante e antioxidante, emulsificante, agente espessante e estabilizante, preparação de fibras alimentares
Material biomédico e farmacêutico	Tratamento de queimaduras, preparação de pele artificial, suturas, lentes de contato, membrana de diálise sanguínea, anticoagulante, anti-gástrico, hemostático, agente hipocolesterêmico, sistema de liberação de fármacos, terapia dentária
Cosméticos	Produtos de pele e capilares
Reagentes analíticos	Imobilização de enzimas, substratos enzimáticos
Outros	Fibras sintéticas, revestimento de papel, algodão, filmes e esponjas

As formas de aplicação da quitosana variam de acordo com o seu fim. Na área de medicamentos, a quitosana é encontrada em variadas formas, tais como: gel, pó, membranas, filmes, micro e nanopartículas, esferas, esponjas (GOULART, 2006).

3.8. Atividade antimicrobiana da quitosana

A atividade antimicrobiana da quitosana é investigada contra uma ampla gama de organismos, como algas, bactérias e fungos, em experimentos *in vivo* e *in vitro* e com a quitosana em diferentes formas (soluções, filmes, complexos). Nesses estudos, normalmente, a quitosana é considerada bactericida ou bacteriostática, sem definir exatamente qual dos dois papéis ela exerce. Entretanto, o exato mecanismo de ação antibacteriana da quitosana ainda não é completamente compreendido (GOY, 2009).

Estudos revelaram que o mecanismo da atividade antimicrobiana da quitosana é devido às propriedades físico-químicas do polímero e às características da membrana do microorganismo (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

Três mecanismos de ação antibacteriana foram propostos:

1) Interação iônica na superfície da célula resultando em ruptura da parede celular: forças eletrostáticas entre a molécula de quitosana carregada positivamente (NH_3^+) e resíduos negativos na superfície celular, provavelmente competindo por Ca^{2+} por pontos eletronegativos na superfície da membrana celular. Essa interação pode promover modificação na permeabilidade da parede celular, o qual promove distúrbio no balanço osmótico e/ou hidrolisar peptidoglicanos na membrana do microorganismo, resultando na perda de íons de potássio e constituintes protéicos de baixa massa molecular.

O modelo apresentado é baseado em interação eletrostática, o qual supõe-se que quanto maior for o número de amins catiônicas, maior será a atividade antimicrobiana. Foi também observado que a quantidade de polícatíons disponíveis para interagir na superfície bacteriana é aparentemente reduzida quando aumenta-se a concentração de quitosana, isso deve-se, possivelmente, ao elevado número de pontos carregados que faz com que as cadeias formem aglomerados devido a agregação de moléculas. Atualmente este mecanismo de ação antibacteriana da quitosana é o mais aceito.

2) Inibição da síntese de mRNA e proteínas: a quitosana atravessa a membrana celular da bactéria, entra no núcleo e liga-se ao DNA, impedindo a síntese de mRNA e proteínas (GOY, 2009).

3) Complexação de metais: a quitosana forma uma barreira externa, complexando metais e dessa maneira suprimindo nutrientes essenciais para o crescimento microbiano. A quitosana apresenta uma grande capacidade de se ligar à metais, o grupamento amino presente na molécula de quitosana é responsável pela adsorção de cátions metálicos por quelação (Wang *et al.*, 2005).

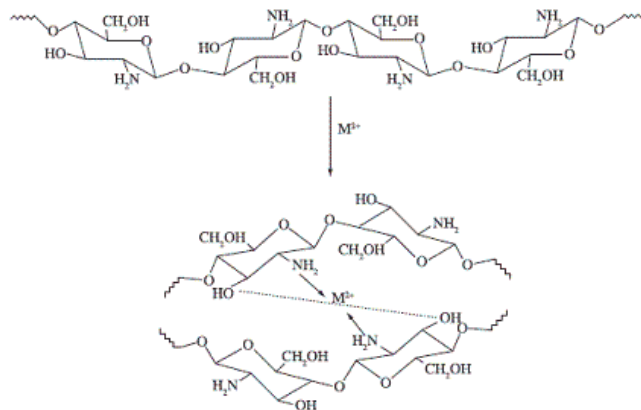


Figura 5. Modelo de complexação metal-quitosana (Wang *et al.*, 2005)

É provável que os três mecanismos ocorram simultaneamente, mas com intensidades diferentes (GOY, 2009).

Segundo Thatte (2004), a quitosana e alguns dos seus derivados têm mostrado excelentes propriedades antimicrobianas. A ação antimicrobiana é rápida e elimina a bactéria dentro de algumas horas. Além disso, a quitosana e seus derivados são biodegradáveis e apresentam baixa toxicidade às células de mamíferos. Sua ação é de amplo espectro, incluindo tanto bactérias Gram-positivas como bactérias Gram-negativas.

3.9. Papel da quitosana na homeostasia

A quitosana desempenha um importante papel na homeostasia, mas de maneira independente ao sistema clássico da cascata de coagulação. Ela reduz o tempo de coagulação sanguínea de forma dose-dependente por possuir a capacidade de agregar plaquetas. A ação da quitosana sobre as plaquetas promove a liberação de fator de crescimento derivado de plaquetas-AB (PDGF-AB) e fator do crescimento- β 1 (TGF- β 1). PDGF-AB e TGF- β 1 são citocinas liberadas pelas plaquetas que desempenham importante papel no processo de cicatrização (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

3.10. Ação analgésica da quitosana e sua atuação no processo de cicatrização

A quitosana também possui potente ação analgésica tópica. Estudos sugerem que este efeito analgésico é decorrente da captura de hidrogênios ácidos liberados no local da inflamação pela ionização do grupo amínico NH_3^+ . A bradicinina, mediador químico liberado pelo cininogênio plasmático e outras citocinas, como Fator de Necrose Tumoral α (FNT α) e as Interleucinas 1 (IL1) e 8 (IL8), parecem ser particularmente importante para a produção da dor no local inflamado. A quitosana teria a propriedade de adsorver a bradicinina liberada no sítio da inflamação.

A quitosana ativa macrófagos e neutrófilos e acelera a migração deles para o local da lesão. (SHI et al., 2006; UENO et al., 1999, 2001). Os macrófagos ativados liberam Interleucina-1, que estimula a proliferação de fibroblastos e influencia a estrutura do colágeno. Há a liberação, também, de N-acetilglicosaminidase, que hidrolisa a quitosana a monômeros de N-acetilglicosamina e glicosamina, unidades de

açúcares necessárias a biossíntese do ácido hialurônico e outros componentes da matriz extracelular pelos fibroblastos.

N-acetilglicosamina é o maior componente do epitélio e sua presença é essencial na reparação tecidual das feridas, ela possui propriedades cicatrizantes, antibacterianas e é totalmente absorvível pelo organismo (SANFORD, 1989). A lisozima é uma enzima responsável pela degradação da quitosana. A quitosana é facilmente despolimerizada pela lisozima que está presente naturalmente no fluido da lesão. Assim, a quitosana funciona como fonte de liberação retardada de monômeros *N*-acetilglicosamina no processo de cicatrização. Além disso, feridas tratadas com quitosana mostraram menor grau de fibroplasia, favorecendo a reepitelização com formação de cicatriz lisa. O fato de a quitosana ser alvo de ataque da lisozima e da NAGase, gerando ao final do processo de despolimerização dois açúcares envolvidos na reepitelização, explica a propriedade biodegradável desse polímero. Essa característica, associada à baixa toxicidade, faz da quitosana um polímero biocompatível (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

Devido a sua capacidade de promover uma rápida regeneração tecidual e acelerar o processo de cicatrização, a aplicação da quitosana como biomaterial para tratamento de feridas vem sendo amplamente explorada (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006; SHI et al., 2006).

3.11. Modificações químicas da quitosana

A presença de grupos amino primário no carbono C2 da cadeia polimérica piranosídica na quitosana a torna extremamente reativa e amplia as possibilidades de modificações químicas seletivas (PETER, 1995). As modificações químicas na estrutura da quitosana viabilizam a síntese de derivados com potenciais usos comerciais e amplia as possibilidades para novas aplicações (RINAUDO, 1993).

Por ser insolúvel em água e em meio neutro, condição em que a maioria das enzimas fisiológicas exercem sua atividade, algumas aplicações da quitosana ficam limitadas (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006). Porém, a quitosana possui três grupos funcionais reativos, um grupamento amino, e dois grupamentos hidroxil e esses grupamentos permitem diversas modificações da quitosana, como acetilação, alquilação e carboximetilação (SHI et al., 2006).

Assim, derivados de quitosana podem ser preparados a fim de melhorar a solubilidade em água, possibilitando, um aumento nas aplicações destes polímeros (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

A funcionalidade da quitosana tem mostrado ser dependente não apenas da sua estrutura química, mas também do seu tamanho molecular. Pois muitas das propriedades físico-químicas, e funcionais de uma cadeia polimérica são definidas pela sua massa molecular (HUANG, 2008), por exemplo, a viscosidade, a solubilidade e a atividade antibacteriana (JIA; SHEN; XU, 2001).

3.11.1. Derivado *N*-succinil-quitosana

A *N*-succinilquitosana é um derivado quimicamente modificado da quitosana, sua estrutura é mostrada na Figura 2. (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006; SHI et al., 2006). Seu registro no CAS é: Chitosan Succinamide [78809-92-04].

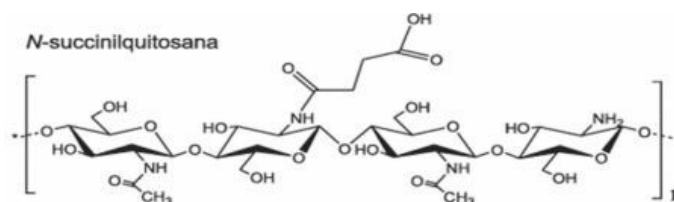


Figura 6. Estrutura química da *N*-succinilquitosana

A obtenção deste derivado dá-se em presença de anidridos cíclicos. A inserção de substituintes de anidrido succínico (Figura 7) nas aminas protonadas presentes ao longo da cadeia do polímero quitosana, conferem diferentes características físico-químicas à molécula da quitosana. Essa modificação torna a molécula hidrossolúvel, solúvel em pHs que variam do ácido (2.0 a 3.0) até alcalino (13 a 14). Estas propriedades se devem ao alongamento da cadeia alquílica, que afasta a parte hidrofílica da cadeia fechada da D-glicosamina, facilitando o acesso à água, que irá estabelecer uma interação mais forte com a molécula de quitosana (MELLO et al., 2006).

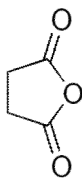


Figura 7. Estrutura química do anidrido succínico

3.11.2. Derivado ftálico de quitosana

A reação de quitosana com anidrido ftálico (Figura 8) na presença de metanol dá origem ao derivado 2-carboxibenzamido-quitosana (Figura 9) (HIRANO, 1971). Este derivado ftálico tem como registro no CAS, [31505-42-7].

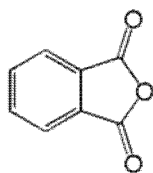


Figura 8. Estrutura química do anidrido ftálico

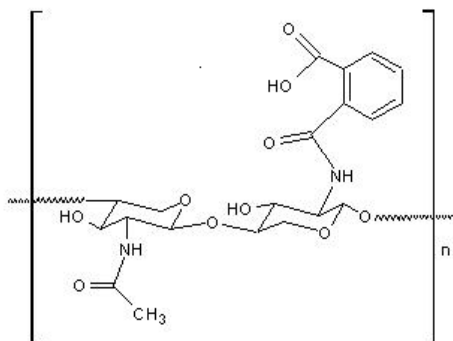


Figura 9. Estrutura química de 2-carboxibenzamido-quitosana

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

Os reagentes como o anidrido succínico (SYNTH), anidrido ftálico (SYNTH), álcool etílico (SYNTH), ácido acético (SYNTH), ácido clorídrico (Reagent), hidróxido de sódio (SYNTH), peróxido de hidrogênio (SYNTH) são de grau técnico. A quitosana obtida da casca de camarão da Farma Service Bioextract (São Paulo, Brasil) com Mw ~700KDa e grau de desacetilação, GD=80%.

Os equipamentos utilizados foram os seguintes:

- Autoclave;
- Liofilizador (LIOTOP, modelo L 101);
- Fluxo laminar;
- Espectômetro Raman (Bruker Optics, modelo FRA106);
- Espectômetro IR (Shimadzu, modelo IR Prestige-21);
- Viscosímetro Brookfield (modelo LV)

As vidrarias, vasos, agitadores, medidores de pH, balanças analíticas, provetas são as disponíveis no Laboratório de Síntese Orgânica Aplicada (FBT, FCF, Universidade de São Paulo, Brasil).

4.2. Métodos

4.2.1. Síntese química de quitosanas de baixa massa molecular

As quitosanas de massa molecular reduzida foram obtidas por processo despolimerização da cadeia de quitosana, ou seja, pelo rompimento das ligações glicosídicas. O processo de despolimerização se deu por hidrólise oxidativa em pH ácido, sendo o peróxido de hidrogênio o agente oxidante e o HCl a substância responsável pelo pH ácido do meio.

Doze gramas de quitosana foram adicionados em 600 ml de HCl 0,1M e agitada por 30 minutos para total solubilização da quitosana, obtendo-se uma solução com pH 2. Depois, foram adicionados 60 ml de H₂O₂ 15% (v/v). A mistura foi agitada e aquecida a 60 °C. O tempo de duração de aquecimento foi diferente para cada amostra. Para a mostra QL 40 o tempo de aquecimento foi de 40 minutos; para amostra QL 2 foi de 2 horas; já para amostra QL 4 foi de 4 horas. A solução foi neutralizada com NaOH, à temperatura ambiente. Adicionou-se etanol em excesso para precipitação da quitosana, que foi deixada em repouso por 24 horas. O precipitado foi filtrado, lavado com água, sendo posteriormente seco em liofilizador.

4.2.2. Síntese química de N-succinil-quitosana

A obtenção do derivado de quitosana N-succinil-quitosana seu deu pela inserção do grupo succinil no amino (NH₂) da cadeia polimérica.

A metodologia utilizada na síntese da succinil-quitosana nesse trabalho, foi a metodologia descrita por Mello, 2005 modificada da original de Yamaguch, 1981.

Suspendeu-se 10 gramas de quitosana na água. Adicionou-se o ácido acético e o sistema foi agitado até completa solubilização da quitosana. Ainda sob agitação, foi adicionado o etanol e depois o anidrido succínico na proporção de 1g de quitosana para 3g de anidrido (1:3 p/p). A agitação foi mantida por 3 horas e depois repouso “overnight”. Retomou-se a agitação e o pH foi elevado até 7,0 por adição de NaOH 50% (v/v). O produto foi filtrado, lavado com bastante água e depois seco por liofilização.

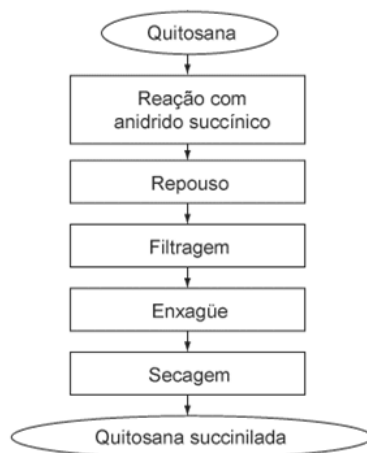


Figura 10. Processo de obtenção de quitosana succinilada

4.2.3. Síntese química de *N*-succinil-quitosana de baixa massa molecular

A succinil-quitosana de menor massa molecular (SQL) foi obtida da mesma maneira da succinil-quitosana (SQ), mas a quitosana utilizada na síntese foi a quitosana de baixa massa molecular sintetizada anteriormente, a QL 40.

4.2.4. Síntese química de 2-carboxibenzamido-quitosana

O método utilizado na síntese de 2-carboxibenzamido-quitosana também foi a descrita por Mello, 2006.

A quitosana foi suspensa na água, agitou-se e depois foi adicionado o ácido acético. Agitou-se o meio até completa solubilização da quitosana. Sob agitação foi adicionado o etanol e depois o anidrido ftálico na proporção de 1g de quitosana para 4,44g do anidrido (1:4,44 p/p). A agitação foi mantida por 3 horas e depois repouso “overnight”. Então o pH da solução foi elevado com NaOH 50% (v/v). O produto foi filtrado, depois lavado com água e colocado em liofilizador.



Figura 11. Processo de obtenção de 2-carboxibenzamido-quitosana

4.2.5. Síntese química de 2-carboxibenzamido-quitosana de baixa massa molecular

A obtenção de 2-carboxibenzamido-quitosana de menor massa molecular (FQL) se deu da mesma maneira da de 2-carboxibenzamido-quitosana (FQ), mas a quitosana utilizada no processo de síntese foi a quitosana de baixa massa molecular sintetizada, a QL 40.

Quadro 4. Nomenclatura das amostras sintetizadas

Amostras	Quitosana de partida	Quitosana de baixa massa molecular	Quitosana de baixa massa molecular	Quitosana de baixa massa molecular
Tempo de aquecimento	-----	40 minutos	2 horas	4 horas
Nomenclatura	Q	QL 40	QL 2	QL 4
Amostras	N-succinil-quitosana	N-succinil-quitosana de baixa massa molecular	2-carboxibenzamid o-quitosana	2-carboxibenzamid o-quitosana de baixa massa molecular
Nomenclatura	SQ	SQL	FQ	FQL

4.2.6. Método de secagem por liofilização

Depois de filtradas as amostras foram submetidas ao processo de secagem por liofilização.

O método consistiu na utilização de baixas temperaturas sob vácuo, para passagem do estado sólido diretamente para o estado gasoso por sublimação. A secagem das amostras sintetizadas foi realizada no Laboratório de Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. O equipamento utilizado foi o liofilizador LIOTOP modelo L 101.

O processo de liofilização é composto por dois estágios: primeiramente o material é congelado e depois o material é levado para o processo de secagem por sublimação.

O material foi previamente congelado em freezer, em uma temperatura de -70 °C. Em seguida foi posto em liofilizador para secagem a temperatura de -47 °C e pressão de operação, aproximada, de 300uHg.

O processo de liofilização durou aproximadamente 24 horas. Este período depende das propriedades (quantidade de água, hidroflicidade das partículas) e quantidade das amostras.

4.2.7. Análises de espectroscopia Raman

A espectroscopia vibracional Raman é uma técnica de caracterização e monitoramento de inúmeras substâncias químicas que vindo sendo apontada como excelente devido a sua resposta rápida e fácil manuseio. É uma ferramenta poderosa na investigação de estruturas e interação de muitas moléculas. Está sendo utilizada em diversas áreas da indústria farmacêutica. Tem como vantagem em relação às outras técnicas vibracionais sua facilidade de identificação do analito em soluções aquosas, por exemplo (Vankeirsbilck *et al*, 2002; Jastrzebska *et al.*, 2005).

A espectroscopia Raman foi utilizada na análise final dos derivados sintetizados. Foram feitas análises a fim de determinar a estrutura das amostras.

As análises foram realizadas no espectrômetro Raman modelo FRA106 (da Bruker Optics) acoplado a um NIR (infravermelho próximo, modelo IFS 28/N) que possui uma ampla faixa espectral de análise ($0-4000$ cm^{-1}) em parceria com o Laboratório de Engenharia Química da Universidade de São Paulo, Escola Politécnica, Departamento de Engenharia Química. Todas as amostras foram analisadas via off-line à temperatura ambiente (20°C) utilizando uma resolução de análise de 4 cm^{-1} , potencia do laser igual a 510 mW e uma varredura de 512 scans. O equipamento foi calibrado utilizando-se um padrão de nylon. A aquisição de dados e tratamento dos espectros foi

desenvolvida através do pacote computacional OPUS 6.5, próprio do equipamento. Para cada amostra analisada foi realizada uma média de três varreduras.

4.2.8. Análises de espectroscopia Infravermelho (IV)

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica instrumental rápida e simples que depende da interação das moléculas ou átomos com a radiação eletromagnética, evidenciando a presença de grupos funcionais. A radiação infravermelha causa aumento da amplitude de vibrações das ligações covalentes entre átomos e grupos funcionais de compostos orgânicos e de insaturações. Nos compostos orgânicos os grupos funcionais possuem átomos ligados por arranjos específicos, então a absorção de energia IV por uma molécula orgânica ocorrerá de modo característico destes grupos funcionais, específicos daquela molécula. Na espectroscopia IV, um feixe de radiação passa através da amostra e a radiação que é transmitida pela amostra é comparada com um feixe de referência. Os compostos absorvem a energia IV em regiões particulares do espectro, as quais são quantificadas. As frequências absorvidas pela amostra serão evidenciadas pela diferença entre os eixos. O espectrômetro registra os resultados na forma de gráfico, mostrando a absorbância versus a frequência ou comprimento de onda (MUZZARELLI, 1985; KIM *et al.*, 1997; CHO; NO; MEYERS, 1998; MUZZARELLI, 1998; MONTEIRO, 2000; MELLO *et al.*, 2006).

A espectroscopia de infravermelho foi utilizada complementarmente à espectroscopia Raman na análise final dos derivados sintetizados. Análises foram feitas para se determinar a estrutura das amostras.

As análises IV foram realizadas no espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier, FTIR, da marca Shimadzu, modelo IR Prestige-21, do Laboratório de Química Verde e Ambiental, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. As amostras foram analisadas em KBr, e os espectros obtidos foram com resolução de 4cm^{-1} , região espectral de 4000 a 400 cm^{-1} e 40 varreduras.

4.2.9. Análise da viscosidade

Com o objetivo de caracterizar as amostras obtidas, foram realizados testes de viscosidade. O viscosímetro Brookfield modelo LV com o spindle 18 foi utilizado para determinar as viscosidades das amostras a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Foi verificada a viscosidade em

diferentes rotações. Porém não foi investigada a influência da temperatura sobre as viscosidades.

Foram preparadas soluções de quitosanas de baixa massa molecular a 10% (p/v) em solução tampão de AcOH 0,1M/NaCl 0,2M. E uma solução de quitosana de partida a 0,5% (p/v), pois a 10% a solução apresentou-se muito viscosa, impossibilitando a utilização do viscosímetro de Brookfield modelo LV para a leitura da viscosidade.

Soluções de succinil-quitosana (SQ) 1,25% (p/v) e succinil-quitosana de baixa massa molecular SQL 2,5% (p/v) foram preparadas em NaOH 4% (v/v). A solução de succinil-quitosana (SQ), assim como a de quitosana (Q), apresentou-se muito viscosa em 2,5% (p/v) sendo necessária sua diluição para 1,25% (p/v).

E soluções de 2-carboxibenzamido-quitosana (FQ) 2,5% (p/v) e 2-carboxibenzamido-quitosana de baixa massa molecular (FQL) 2,5% (p/v) foram preparadas em soluções de ácido acético a 3% (v/v).

4.2.10. Teste de solubilidade das amostras sintetizadas

As amostras dos derivados de quitosana sintetizados (QL 40, QL 2, QL 4, SQ, SQL, FQ, FQL) e a quitosana de partida (Q), foram testadas quanto a solubilidade em diferentes pHs à temperatura ambiente (25°C). Foram preparadas em tubos de ensaio soluções a 0,5% (p/v) de cada amostra em cada meio.

Um primeiro grupo foi testado em água destilada, pH = 7.0; outro grupo em solução de ácido acético 3% (v/v), pH = 3.0; outro em solução de hidróxido de sódio 4% (v/v), pH = 12.0. As amostras foram agitadas a cada 10 minutos por um período de 1 hora, seguidas de um repouso de 12 horas.

4.2.11. Avaliação da eficácia antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana das amostras obtidas foi realizada através da concentração mínima inibitória (CMI).

A concentração mínima inibitória (CMI) é a concentração mínima de ativo necessário para inibir a multiplicação de um isolado bacteriano.

A efetividade antimicrobiana da quitosana e seus derivados foi testada frente à concentração final de 10^6 UFC/mL de *Escherichia coli* ATCC 25922.

O crescimento do microorganismo foi realizado em caldo Luria Bertani (LB, Difco) para *E. coli*. Foram adicionados cerca de 30 mL de meio de cultivo em erlenmeyer estéril de 250 mL e depois foi inoculado o microorganismo. Em seguida, o cultivo foi incubado em agitador rotacional (shaker) a 100 rpm, 37°C por 24 horas. Todos os meios de cultivo foram preparados utilizando água destilada, pH ajustado e autoclavagem à 121 °C por 20 minutos.

Prepararam-se quatro soluções para a realização do CMI: solução de quitosana 1% (p/v) e 3,3% (p/v); solução de succinil-quitosana 1% (p/v); solução de 2-carboxibenzamido-quitosana 1% (p/v). Todas as soluções foram preparadas com ácido acético 5% (v/v).

Diluições sucessivas das soluções foram realizadas em 10 tubos de ensaio (contendo 1 mL de meio de cultivo LB e 100µL de microorganismo na concentração de 10^6 UFC/mL). Foram preparados também dois tubos controles, sendo um o controle negativo (tubo 11, meio de cultivo mais solução de Q, Q40, Q2, Q4, SQ, SQL, FQ ou FQL) e um correspondente ao controle positivo (tubo 12, meio de cultivo mais microorganismo).

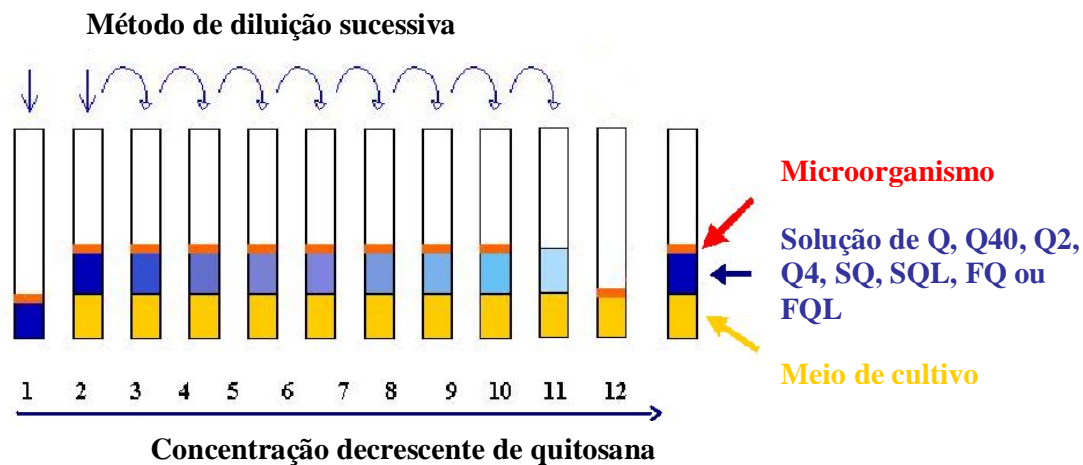


Figura 12. Representação do método de diluição sucessiva

Em seguida, os tubos de ensaios foram colocados em estufa por um período de 24 horas.

Também foi realizado um CMI do o ácido acético 5% (v/v) para se confirmar a ação antibacteriana da solução de amostras e não do ácido.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Síntese de quitosanas de baixa massa molecular

Os produtos finais apresentaram-se como um pó, de granulação heterogênea, mais escura que a de origem, levemente amarelada e com uma textura mais ressecada. Quanto maior foi o tempo de aquecimento, mais amarelada, ressecada e de granulação mais heterogênea se apresentou a amostra.

A reação de síntese da amostra QL 40 apresentou um rendimento de 74,2%; já a reação da amostra QL 2 o rendimento foi de 49,8%. E o rendimento da amostra QL 4 foi de 25,9%.

Esse rendimento relativamente baixo pode ser justificado pela perda do material no processo de filtragem. Além disso, ficou notável que as reações com maior tempo de aquecimento apresentaram um rendimento ainda menor, isso pode ser justificado por provável degradação de material no processo de aquecimento.

5.2. Síntese química de *N*-succinil-quitosana de alta e baixa massa molecular

A amostra de succinil-quitosana (SQ) obtida apresentou-se como um pó, de granulação homogênea e de coloração muito próxima da quitosana de partida (Q), um pó branco discretamente amarelado.

Já a succinil-quitosana de baixa massa molecular (SQL) apresentou-se como um pó levemente amarelado, de granulação heterogênea e com uma textura levemente ressecada. Características estas, bem parecidas com a quitosana QL 40 utilizada na síntese.

A reação de síntese da SQ teve um rendimento de 99,7%. E o rendimento da síntese de SQL foi de 98,4%.

5.3. Síntese química de 2-carboxibenzamido-quitosana de alta e baixa massa molecular

A 2-carboxibenzamido-quitosana (FQ) obtida apresentou-se como um pó de granulação homogênea e de coloração muito próxima à da quitosana de partida (Q), um pó branco discretamente amarelado.

A amostra de 2-carboxibenzamido-quitosana de baixa massa molecular (FQL) apresentou-se como um pó amarelado, de granulação heterogênea e com uma textura levemente ressecada. Sendo estas características, bem parecidas com a quitosana QL 40 utilizada na síntese.

A reação de síntese de 2-carboxibenzamido-quitosana (FQ) apresentou um rendimento de 98,63% e da 2-carboxibenzamido-quitosana de baixa massa molecular (FQL) de 84,4%.

Tabela 3. Rendimentos das reações de sínteses da amostras de quitosana

Amostra	QL 40	QL 2	QL 4	SQ	SQL	FQ	FQL
Rendimento	74,2%	49,8%	25,9%	99,7%	98,4%	98,63%	84,4%

5.4. Espectroscopia Raman

5.4.1. Quitosana de partida *versus* Quitosanas de massa molecular reduzida

Os resultados obtidos por espectroscopia Raman das amostras de quitosana de partida (Q) e de quitosanas de massa molecular reduzida (QL 40, QL 2 e QL 4) estão representados na Figura 13.

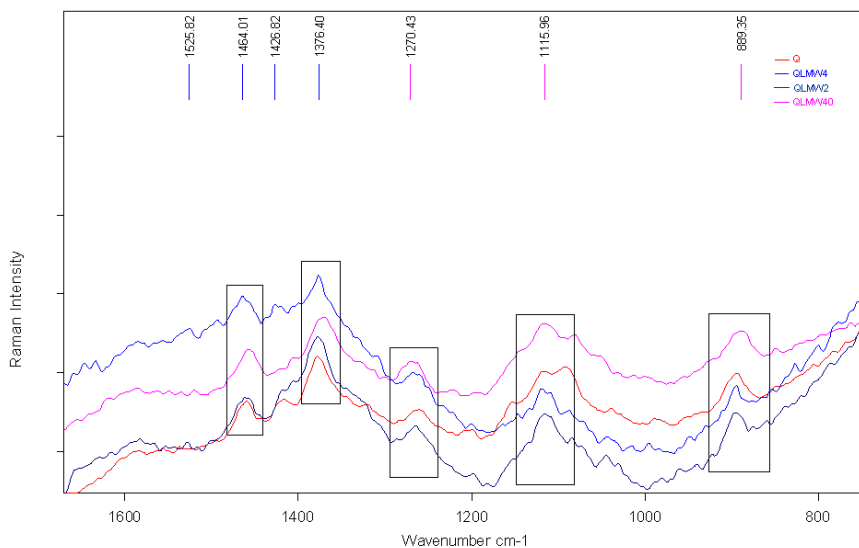


Figura 13. Representação dos espectros RAMAN das amostra de quitosana de partida (Q) e das quitosanas de massa molecular reduzida (QL 4, QL 2, QL 40)

A Figura 13 exibe os espectros das quitosanas através da espectroscopia Raman na região espectral dos 800 cm^{-1} até os 1600 cm^{-1} . Os espectros coletados das amostras de quitosana com massa molar reduzida (QL 40, QL 2, QL 4) foram comparados com espectro da quitosana de partida (Q) onde foi observada uma grande concordância tanto no formato espectral como na intensidade dos picos.

O espectro de Raman resultante da análise da quitosana de partida e das quitosanas de baixa massa molecular apresentou compostos caracterizados por bandas envolvendo principalmente estiramentos ν (C-O) e ν (C-C).

Segundo a Figura, os picos observados devem-se principalmente a estiramentos simétricos da ligação C-O-C na região dos $850\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ (SCHRADER, 1995), estes picos são atribuídos a configuração estrutural alfa e beta da quitosana, assim como também as ligações glicosídicas. Estiramentos antissimétricos da ligação C-O-C foram identificados na região dos $1150\text{-}1060\text{ cm}^{-1}$ (SCHRADER, 1995). Em 1270 cm^{-1} aparece nas amostras de quitosanas o estiramento C-OH, na faixa de 1370 cm^{-1} , CH_3 simétrico. E ainda CH_2 simétrico em 1464 cm^{-1} (KANTI *et al*, 2004).

Observa-se que o espectro de Raman da quitosana de partida é semelhante ao espectro das quitosanas de baixa massa molecular. Isto é esperado uma vez que, o espectro Raman detecta grupos químicos específicos e esses estão na mesma proporção nas amostras de quitosana analisadas, tanto na de quitosana de partida quanto nas quitosanas de baixa massa molecular.

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

5.4.2. Quitosana de partida *versus* *N*-succinil-quitosana

Os resultados dos espectros obtidos por espectroscopia Raman das amostras de quitosana de partida (Q) e de *N*-succinil-quitosana estão representados na Figura 14.

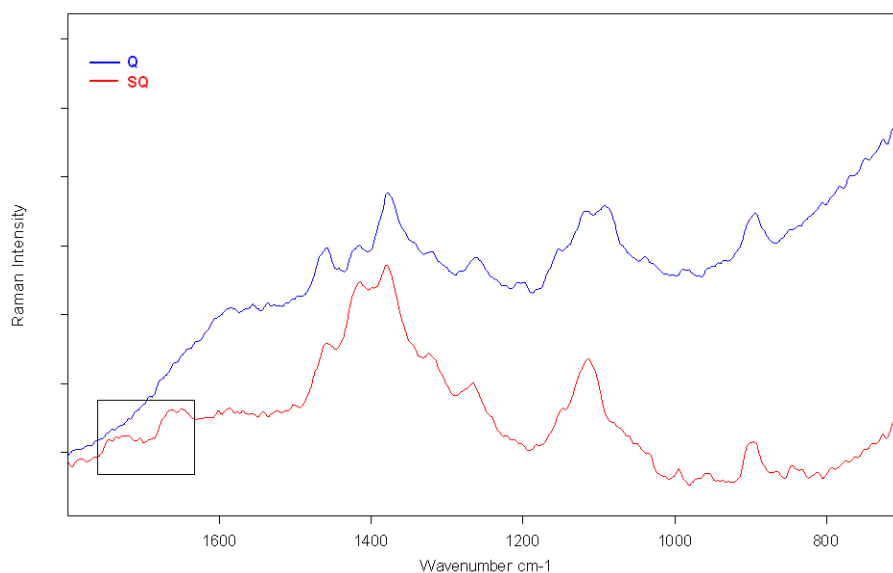


Figura 14. Representação dos espectros RAMAN das amostra de quitosana de partida (Q) e de *N*-succinil-quitosana (SQ)

No espectro de Raman da *N*-succinil-quitosana (Figura 14) observa-se que na região $\sim 1700\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$ aparecem alguns picos correspondentes à grupos carbonilas presentes na amostra de *N*-succinil-quitosana e ausentes na amostra de quitosana de partida, isso mostra que ocorreu a reação de succinilação.

5.4.3. *N*-succinil-quitosana *versus* *N*-succinil-quitosana de baixa massa molecular

Os resultados dos espectros obtidos por espectroscopia Raman das amostras de *N*-succinil-quitosana e *N*-succinil-quitosana de baixa massa molecular estão representados na Figura 15.

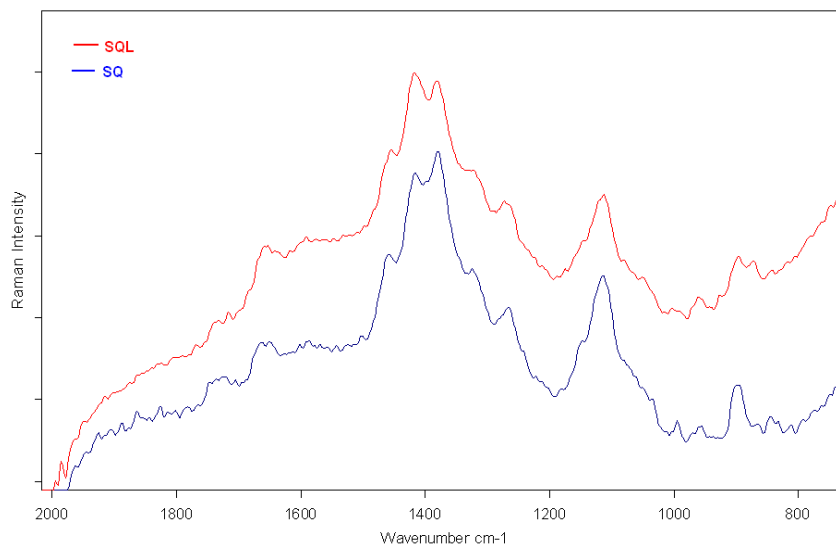


Figura 15. Representação dos espectros Raman das amostras *N*-succinil-quitosana de baixa massa molecular (SQL) e *N*-succinil-quitosana (SQ)

O espectro coletado da amostra de *N*-succinil-quitosana (SQL) com massa molar reduzida foi comparado com espectro da *N*-succinil-quitosana (SQ) onde foi observada uma grande concordância no formato espectral.

Observa-se que o espectro Raman da SQL é semelhante ao espectro da SQ. Estes resultados obtidos mostram que as sínteses dos compostos se comportaram de maneira esperada e o objetivo da obtenção de succinil-quitosana e de succinil-quitosana de baixa massa molecular foi alcançado com sucesso.

5.4.4. Quitosana de partida *versus* 2-carboxibenzamido-quitosana

Os espectros obtidos por espectroscopia Raman das amostras de quitosana de partida e 2-carboxibenzamido-quitosana estão representados na Figura 16.

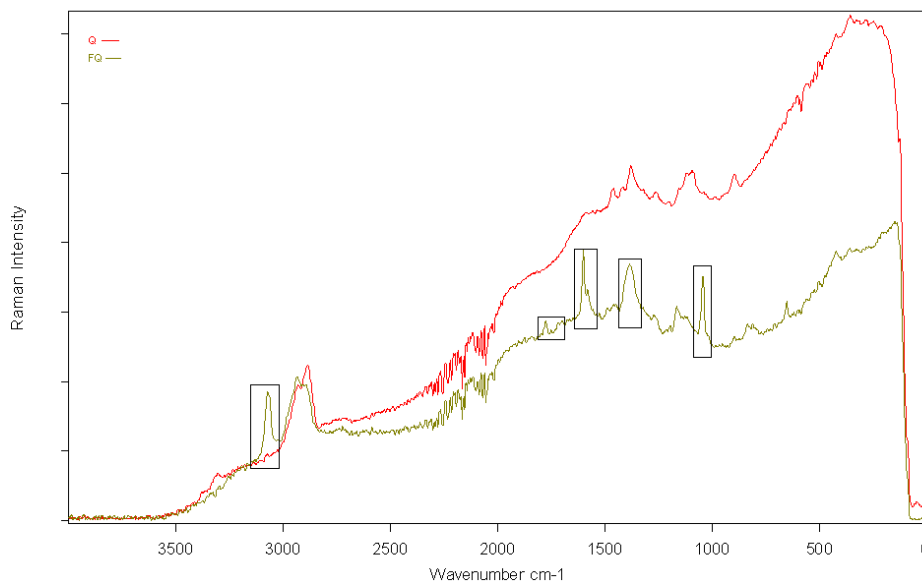


Figura 16. Representação dos espectros Raman das amostras de quitosana de partida (Q) e 2-carboxibenzamido-quitosana (FQ)

No espectro Raman de 2-carboxibenzamido-quitosana observa-se picos nas regiões de $1000\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$, $1450\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$, $1550\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ e em $3000\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$. Estes picos são correspondentes aos CH aromáticos presentes na FQ e ausentes na quitosana. Já na região em torno de ~ 1660 encontram-se os picos característicos da presença de amidas, também presentes em 2-carboxibenzamido-quitosana e ausente em quitosanas, indicando assim que a reação de síntese na presença de anidrido ftálico (descrita no ítem 4.2.4. Síntese química de 2-carboxibenzamido-quitosana) resultou na formação de 2-carboxibenzamido-quitosana.

5.4.5. 2-carboxibenzamido-quitosana versus 2-carboxibenzamido-quitosana de baixa massa molecular

Estão representados na Figura 17 os espectros Raman obtidos das amostras de 2-carboxibenzamido-quitosana (FQ) e 2-carboxibenzamido-quitosana de baixa massa molecular (FQL).

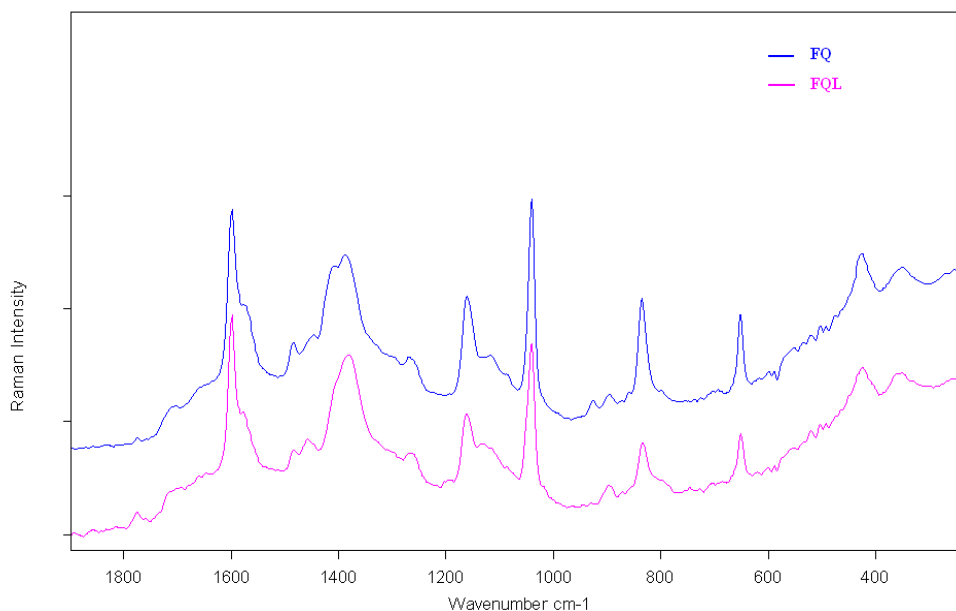


Figura 17. Representação dos espectros Raman das amostras de 2-carboxibenzamido-quitosana (FQ) e 2-carboxibenzamido-quitosana de baixa massa molecular (FQL)

Os espectros das amostras 2-carboxibenzamido-quitosana (FQ) e 2-carboxibenzamido-quitosana de baixa massa molecular (FQL) analisados apresentam grande semelhança no formato espectral, podendo assim concluir que as amostras apresentam os mesmos grupos funcionais e semelhança química.

5.5. Espectroscopia de Infravermelho

O espectro de infravermelho pode ser considerado a impressão digital da molécula, pois como tem muitos picos de absorção, a possibilidade de dois compostos apresentarem o mesmo espectro é praticamente inexistente (SILVERSTEIN, *et al.*, 1994).

5.5.1. Quitosana de partida *versus* Quitosanas de massa molecular reduzida

Os resultados obtidos por espectroscopia de infravermelho das amostras de quitosana de partida (Q) e de quitosanas de massa molecular reduzida (QL 40, QL 2 e QL 4) estão representados na Figura 18.

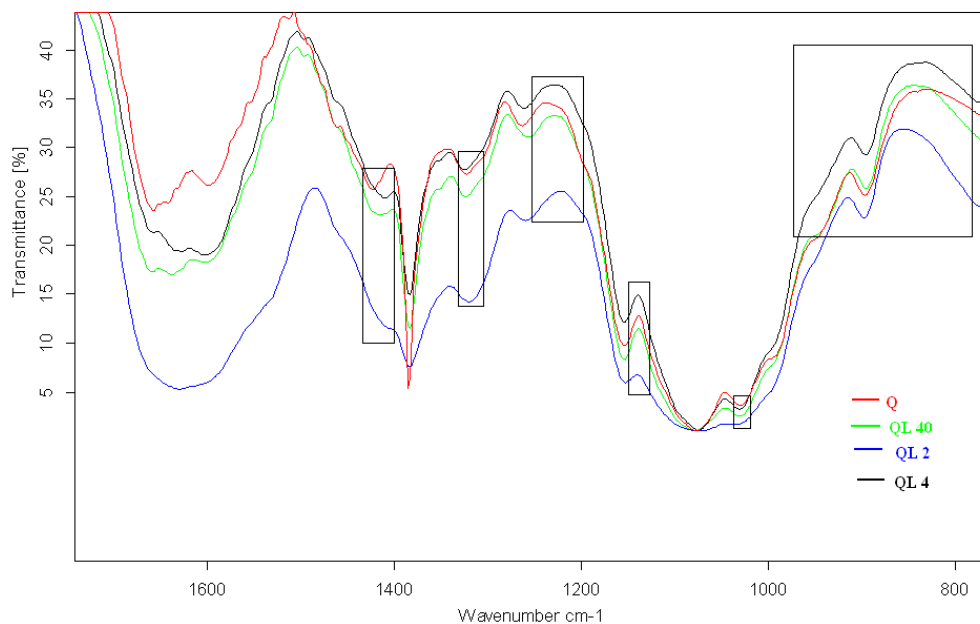


Figura 18. Representação dos espectros infravermelho das amostra de quitosana de partida (Q) e das quitosanas de massa molecular reduzida (QL 40, QL 2, QL 4)

A Figura 18 exibe os espectros das quitosanas através da espectroscopia IV na região espectral dos 800 cm^{-1} até os 1600 cm^{-1} . Os espectros das amostras das quitosanas de baixa massa molecular sintetizadas (QL 40, QL 2, QL, 4) foram comparados com o espectro da quitosana de partida (Q), em que foi observado uma grande semelhança no formato espectral.

Os picos observados na região dos $850\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ devem-se aos estiramentos simétricos da ligação C-O-C. Foi demonstrada deformação angular em 1031 cm^{-1} $\delta(\text{C-O-C})$, deformação em 1381 cm^{-1} $\delta(\text{C=O-NH})$ e grupo CH_2 e em 1422 cm^{-1} deformação simétrica do CH_3 . Estiramentos antissimétricos da ligação C-O-C foram identificados na região dos 1150 cm^{-1} . Em 1270 cm^{-1} aparece no espectro o estiramento C-OH.

Observa-se que os espectros das quitosanas sintetizadas (QL 40, QL 2, QL 4) são semelhantes ao espectro da quitosana de partida (Q), pois por se tratarem de substâncias com os mesmos grupos químicos e semelhança estrutural os picos de absorção na espectroscopia IV são os mesmos.

5.5.2. Quitosana de partida *versus* *N*-succinil-quitosana

Os resultados dos espectros obtidos por espectroscopia IV das amostras de quitosana de partida (Q) e de *N*-succinil-quitosana (SQ) estão representados na Figura 19.

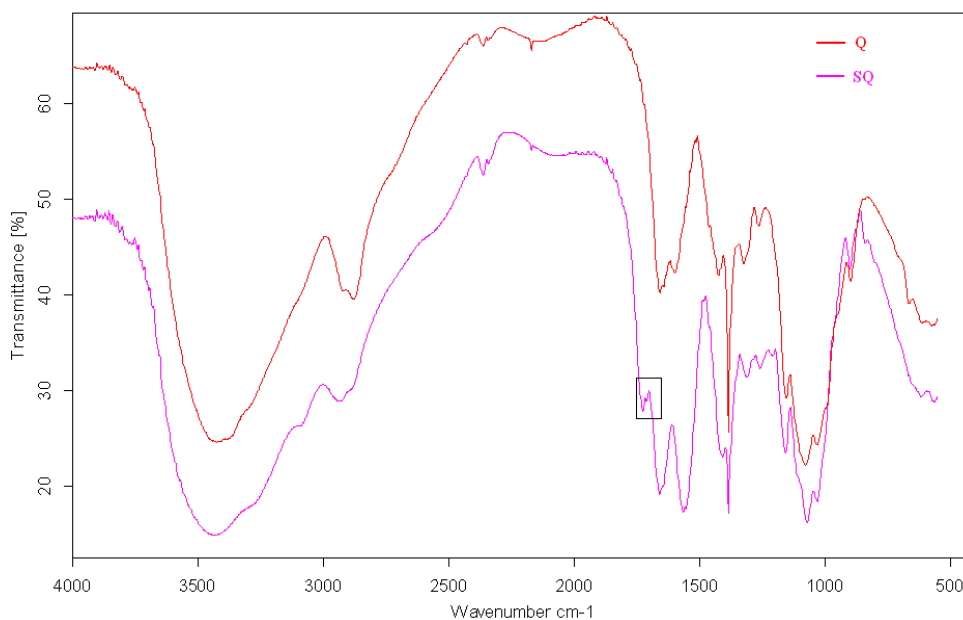


Figura 19. Representação dos espectros infravermelho das amostra de quitosana de partida (Q) e de *N*-succinil-quitosana (SQ)

A Figura 19 exhibe os espectros da quitosana de partida (Q) e da *N*-succinil-quitosana (SQ) através da espectroscopia de infravermelho na região espectral dos 500 cm^{-1} até os 4000 cm^{-1} .

Na região espectral 1750-1700 cm^{-1} observam-se picos correspondentes aos grupos carbonila presentes na *N*-succinil-quitosana e ausentes na quitosana. Isso mostra que ocorreu a reação de síntese de *N*-succinil-quitosana descrita no item 5.2. Síntese química de *N*-succinil-quitosana de alta e baixa massa molecular.

5.5.3. *N*-succinil-quitosana versus *N*-succinil-quitosana de baixa massa molecular

Os espectros obtidos por espectroscopia de infravermelho das amostras de *N*-succinil-quitosana e *N*-succinil-quitosana de baixa massa molecular estão representados na Figura 20.

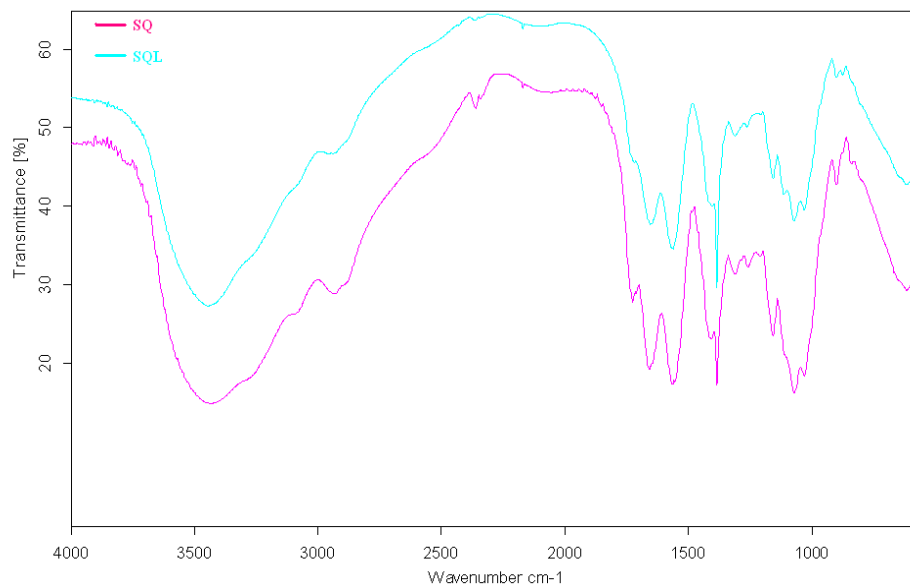


Figura 20. Representação dos espectros infravermelho das amostras *N*-succinil-quitosana (SQ) e *N*-succinil-quitosana de baixa massa molecular (SQL)

No espectro das amostras de *N*-succinil-quitosana (SQ) e *N*-succinil-quitosana de baixa massa molecular (SQL) (Figura 20) observa-se deformação axial em 3412 cm^{-1} , estiramento em 2928 cm^{-1} correspondente aos ν (C-H) de alifáticos, em 1724 cm^{-1} estiramento ν (C=O) de ácido carboxílico e em 1558 cm^{-1} deformação δ (N-H) de amina.

Os espectros das amostras de *N*-succinil-quitosana (SQ) e *N*-succinil-quitosana de baixa massa molecular (SQL) apresentam-se semelhantes. Por serem substâncias que se diferenciam apenas pela massa molecular, os grupos químicos presentes são os mesmos e deste modo, os picos de absorção IV são iguais.

5.5.4. Quitosana de partida *versus* 2-carboxibenzamido-quitosana

Os resultados dos espectros obtidos por espectroscopia IV das amostras de quitosana de partida e 2-carboxibenzamido-quitosana estão representados na Figura 21.

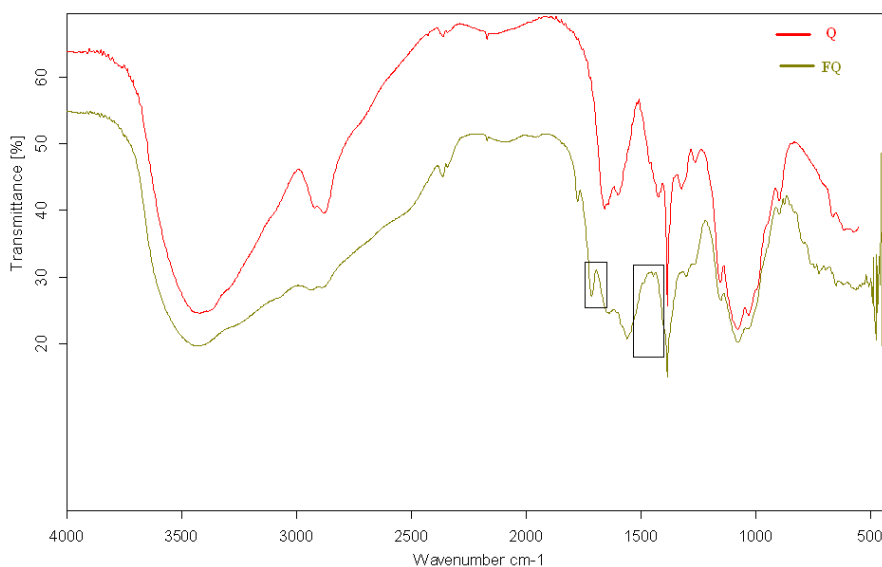


Figura 21. Representação dos espectros infravermelho das amostras de quitosana de partida (Q) e 2-carboxibenzamido-quitosana (FQ)

No espectro infravermelho de 2-carboxibenzamido-quitosana (FQ) (Figura 21) observam-se picos nas regiões de 1660 cm^{-1} correspondentes às amidas, estas são presentes em 2-carboxibenzamido-quitosana (FQ) e ausentes na quitosana (Q). Os CH aromáticos presentes apenas em 2-carboxibenzamido-quitosana (FQ) estão representados no pico na região de $1550\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$.

5.5.5. 2-carboxibenzamido-quitosana *versus* 2-carboxibenzamido-quitosana de baixa massa molecular

Estão representados na Figura 22 os espectros de 2-carboxibenzamido-quitosana (FQ) e de 2-carboxibenzamido-quitosana de baixa massa molecular (FQL) obtidos através da espectroscopia de infravermelho na região espectral dos 500 cm^{-1} até os 4000 cm^{-1} .

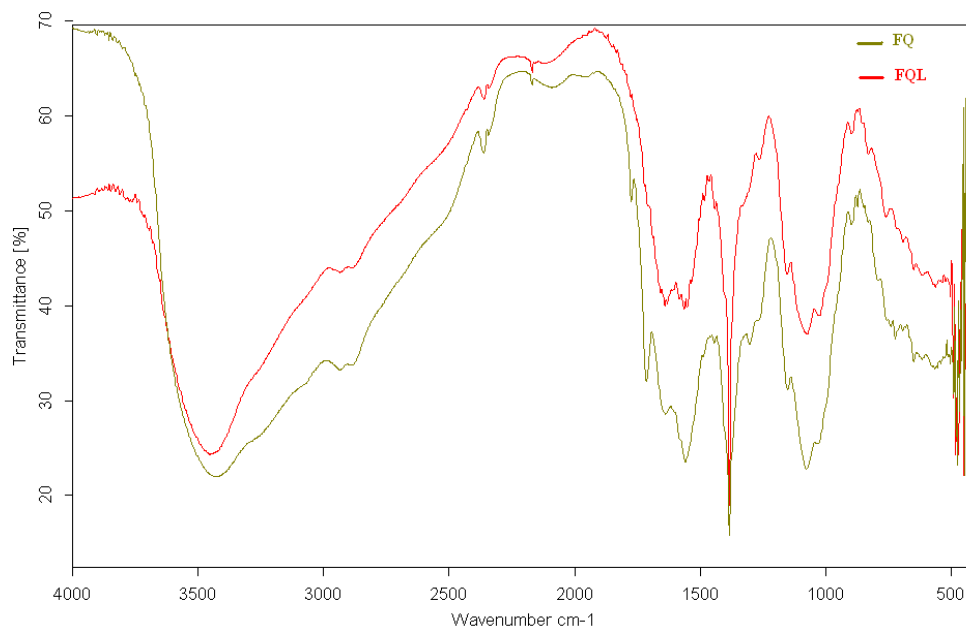


Figura 22. Representação dos espectros infravermelho das amostras de 2-carboxibenzamido-quitosana (FQ) e 2-carboxibenzamido-quitosana de baixa massa molecular (FQL)

As amostras 2-carboxibenzamido-quitosana (FQ) e de 2-carboxibenzamido-quitosana de baixa massa molecular (FQL) apresentam os mesmos grupos funcionais e semelhança estrutural, diferenciando-se apenas pela massa molecular. Portanto, os picos de absorção IV são os mesmos, resultando em espectros semelhantes.

5.6. Solubilidade das amostras sintetizadas

Estão representados na tabela 4 e 5 os resultados dos testes de solubilidade das amostras, à 25 °C.

Tabela 4. Solubilidade das amostras de quitosana de partida (Q 0,5%) e seus derivados de baixa massa molecular (QL40 0,5%, QL2 0,5%, QL4 0,5%) a 20 °C

Solventes	Q 0,5%	QL 40 0,5%	QL 2 0,5%	QL 4 0,5%
Meio neutro	-	-	-	-
Meio ácido	++	+++	+++	+++
Meio básico	+	+	+	++

(-) insolúvel; (+) pouco solúvel; (++) moderadamente solúvel; (+++) solúvel

Tabela 5. Solubilidade das amostras de *N*-succinil-quitosana (SQ) e 2-carboxibenzamido-quitosana (FQ) e seus derivados de baixa massa molecular, *N*-succinil-quitosana (SQL) e 2-carboxibenzamido-quitosana (FQL) a 20 °C

Solventes	SQ 0,5%	SQL 0,5%	FQ 0,5%	FQL 0,5%
Neutro	+	+++	++	++
Ácido	+	+++	+	++
Básico	+++	+++	+++	+++

(-) insolúvel; (+) pouco solúvel; (++) moderadamente solúvel; (+++) solúvel

Todas as amostras de quitosanas sintetizadas e a quitosana de partida se mostraram insolúveis em pH 7,0 (meio neutro). Após o tratamento em solução ácida (AcOH 3%) a amostra de quitosana de partida (Q) apresentou-se pouco solúvel, enquanto as amostras de quitosana de baixa massa molecular apresentaram-se muito solúveis. Já em meio básico, as amostras Q, QL 40, QL 2 foram pouco solúveis, mas a QL 4 se mostrou moderadamente solúvel. A amostra de menor massa molecular, a QL 4, foi a que se apresentou mais solúvel.

A succinil-quitosna de baixa massa molecular (SQL) se mostrou solúvel em todos os meios testados (pH, 7,0; pH 3,0; pH 12,0) e mais solúvel que a succinil-quitosana de alta massa molecular (SQ), pois esta se apresentou pouco solúvel em meio neutro e em meio ácido, só sendo completamente solúvel em meio básico.

A 2-carboxibenzamido-quitosana de baixa massa molecular (FQL) se mostrou mais solúvel que a 2-carboxibenzamido-quitosana (FQ), pois apresentou solubilidade moderada em meio ácido, enquanto a FQ se mostrou pouco solúvel.

As amostras FQ, FQL, SQ e SQL se mostraram mais solúveis que a quitosana de partida (Q).

Em pH 7,0, a cadeia do grupamento succínico e ftálico das amostras SQ, SQL, FQ e FQL interagem com a água, justificando a maior solubilidade dessas amostras em relação à quitosana de partida em meio neutro.

A amostra SQ aparece pouco solubilizada em pH 3,0 devido a presença do anidrido succínico inserido nos grupamentos amino, os quais se encontram protonados e solúveis em pH 3,0, e não estão mais livres para interagir diretamente com o solvente.

Em soluções alcalinas (pH 12,0) as amostras SQ, SQL, FQ e FQL aparecem completamente solubilizadas, isto acontece devido a salificação dos grupos carboxilatos, os quais encontram condições favoráveis de solubilização.

De uma maneira geral, as amostras de baixa massa molecular se mostraram mais solúveis que as amostras de alta massa molecular.

5.7. Viscosidade

5.7.1. Viscosidade das amostras de quitosana de massa molecular reduzida

Estão representadas na Figuras 18, 19, 20 e 21 as curvas de viscosidade *versus* a taxa de cisalhamento das amostras Q, QL 40, QL 2, QL 4, respectivamente.

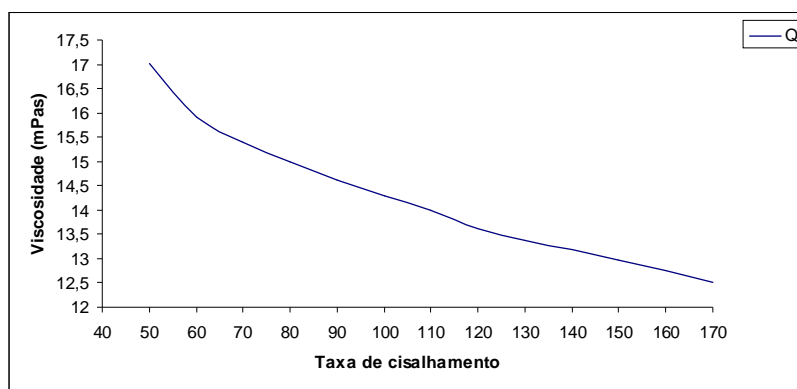


Figura 23. Curva de Viscosidade x Taxa de cisalhamento da amostra de quitosana de partida (Q)

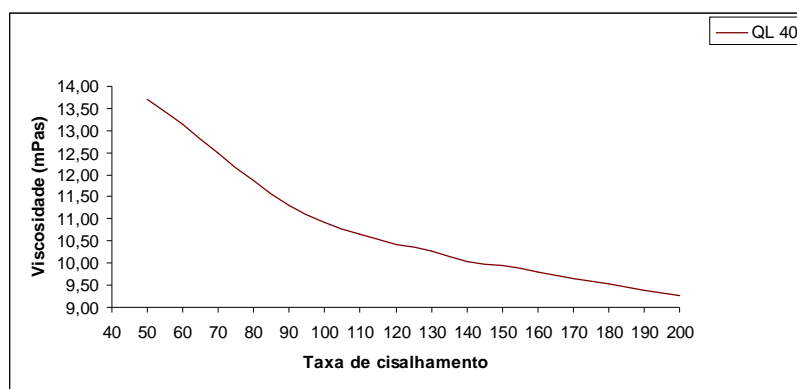


Figura 24. Curva de Viscosidade x Taxa de cisalhamento da amostra QL 40

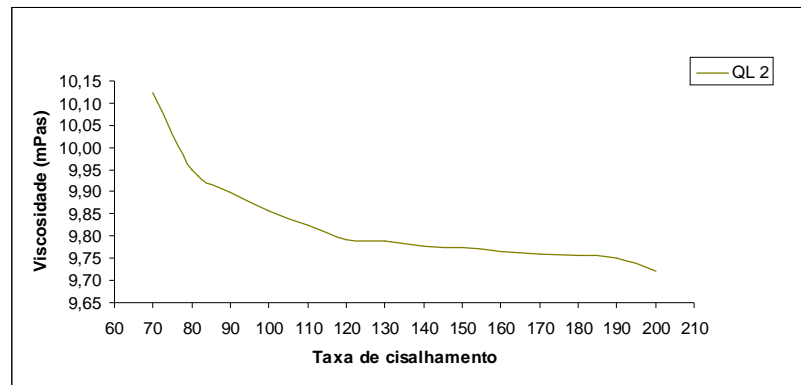


Figura 25. Curva de Viscosidade x Taxa de cisalhamento da amostra QL 2

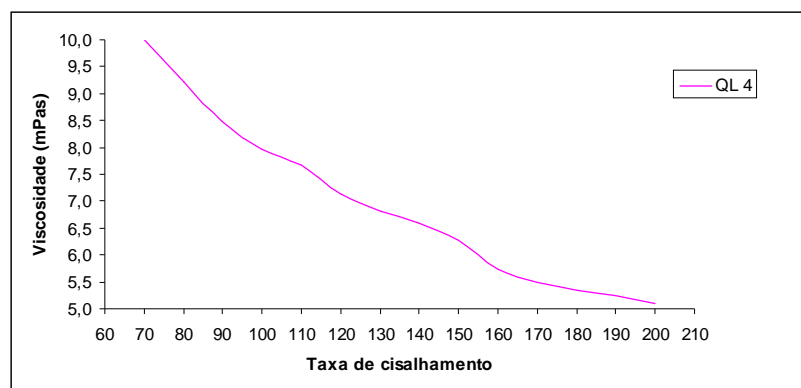


Figura 26. Curva de Viscosidade x Taxa de cisalhamento da amostra QL 4

Todas as amostras, Q, QL 40, QL 2 e QL 4, apresentaram comportamento pseudoplástico, que é caracterizado pela diminuição da viscosidade aparente com o aumento da taxa de cisalhamento.

Na tabela 6 estão representadas algumas viscosidades aparentes das amostras em relação à velocidade de rotação do spindle.

Tabela 6. Viscosidades aparentes (mPas) das amostras à temperatura ambiente (25°C)

Amostra	70 rpm	80 rpm	90 rpm	100 rpm	110 rpm
Q 0,5%					
Viscosidade	15,384	14,995	14,605	14,293	14,001
QL 40 10%					
Viscosidade	12,500	11,877	11,306	10,927	10,654
QL 2 10%					
Viscosidade	10,124	9,947	9,898	9,858	9,826
QL 4 10%					
Viscosidade	10,011	9,205	8,490	7,958	7,666

Analisando a Tabela 6, percebe-se que quanto maior foi o tempo de aquecimento da quitosana em presença de peróxido de hidrogênio, menor a viscosidade da amostra. A amostra QL 4 obteve a menor viscosidade em qualquer rotação, em seguida a QL 2 e depois a QL 40.

5.7.2. Viscosidade das amostras succinil-quitosana (SQ) e succinil-quitosana de baixa massa molecular (SQL)

Nas Figuras 22 e 23 estão representadas as curvas de viscosidade *versus* a taxa de cisalhamento das amostras SQ e SQL, respectivamente.

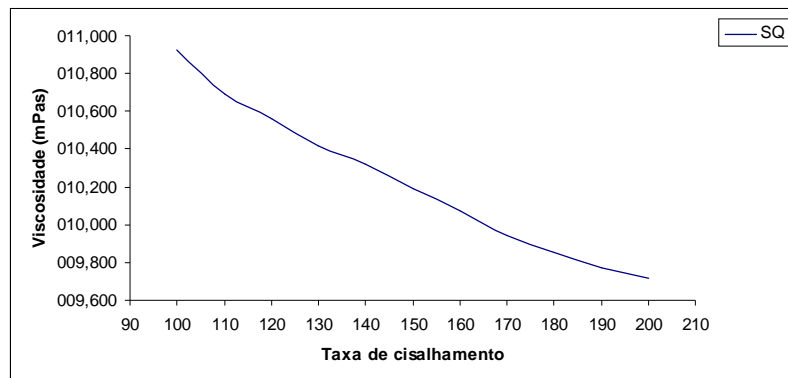


Figura 27. Curva de Viscosidade x Taxa de cisalhamento da amostra SQ

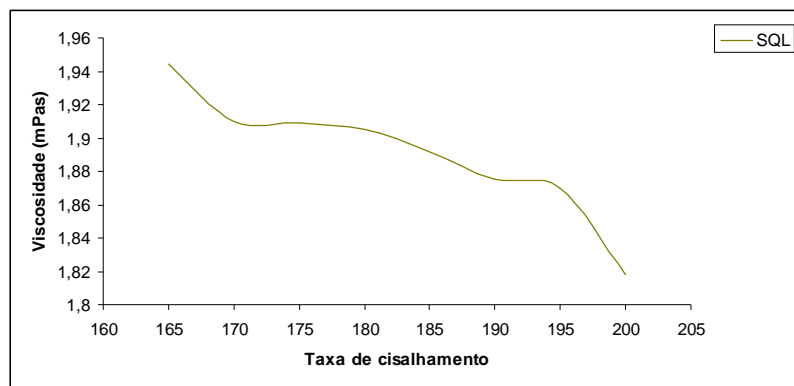


Figura 28. Curva de Viscosidade x Taxa de cisalhamento da amostra SQL

Ambas as amostras, SQ e SQL, apresentaram uma diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, característico do comportamento pseudoplástico.

Na tabela 7 estão representadas algumas viscosidades aparentes das amostras SQ e SQL em relação à velocidade de rotação do spindle.

Tabela 7. Viscosidades aparentes (mPas) das amostras à temperatura ambiente (25°C)

Amostra	170 rpm	180 rpm	190 rpm	200 rpm
SQ 1,25%				
Viscosidade	9,944	9,854	9,773	9,720
SQL 2,5%				
Viscosidade	1,910	1,905	1,875	1,818

Apesar da solução de SQ está em concentração menor que a SQL, sua viscosidade ainda é bem maior que a viscosidade da SQL em qualquer ponto de rotação da Tabela 7. Daí, tem-se que a amostra SQL apresenta uma viscosidade menor do que a da amostra SQ, sendo este resultado de acordo com o esperado já que a síntese da SQL foi obtida com quitosana de baixa massa molecular.

5.7.3. Viscosidade das amostras 2-carboxibenzamido-quitosana (FQ) e 2-carboxibenzamido-quitosana de baixa massa molecular (FQL)

Nas Figuras 24 e 25 estão representadas as curvas de viscosidade *versus* a taxa de cisalhamento das amostras FQ e FQL, respectivamente.

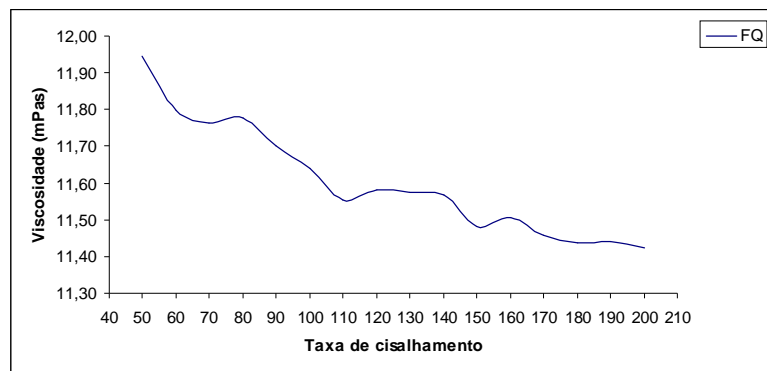


Figura 29. Curva de Viscosidade x Taxa de cisalhamento da amostra FQ

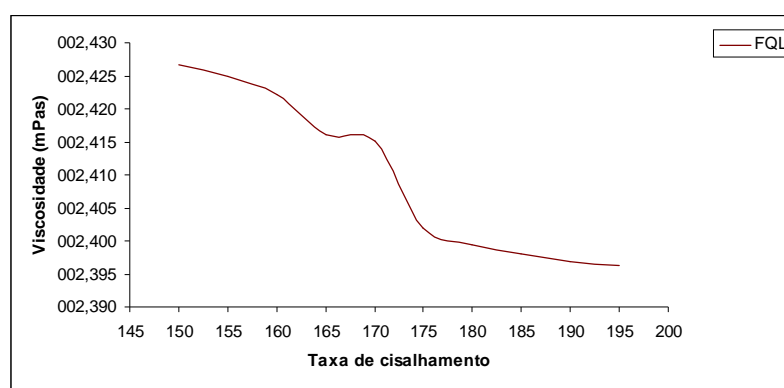


Figura 30. Curva de Viscosidade x Taxa de cisalhamento da amostra FQL

As amostras FQ e FQL também apresentaram comportamento pseudoplástico, com o aumento da taxa de cisalhamento houve uma diminuição da viscosidade aparente.

Na tabela 8 estão representadas algumas viscosidades aparentes das amostras FQ e FQL em relação à velocidade de rotação do spindle.

Tabela 8. Viscosidades aparentes (mPas) das amostras à temperatura ambiente (25°C)

Amostra	150 rpm	160 rpm	170 rpm	180 rpm
FQ 2,5%				
Viscosidade	11,506	11,482	11,458	11,438
FQL 2,5%				
Viscosidade	2,427	2,422	2,415	2,399

A solução de FQL apresentou menor viscosidade, em todas as velocidades de rotação, em relação à solução da amostra FQ. A amostra FQL apresenta uma viscosidade menor do que a da amostra FQ. Este resultado está de acordo com o

esperado já que a síntese da FQL foi obtida com quitosana de baixa massa molecular, assim como a amostra SQL.

5.8. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

Foi verificado a atividade antibacteriana das soluções de quitosana e seus derivados frente à bactéria *Escherichia coli* ATCC 25922, através do método de determinação da concentração mínima inibitória (CMI).

Estão representados na Tabela 9 os resultados do CMIs 24 horas das soluções das amostras de quitosana de partida (Q) a 1% (p/v), quitosana de partida (Q) a 3,3% (p/v), succinil-quitosana de alta massa molecular (SQ) 1% (p/v), 2-carboxibenzamido-quitosana de alta massa molecular (FQ) a 1% (p/v) e ácido acético 5% (v/v).

Tabela 9. Resultados dos CMIs 24 horas das soluções de quitosana 1% e 3,3%; solução de succinil-quitosana (SQ) 1%; solução de 2-carboxibenzamido-quitosana (FQ) 1% e do ácido acético 5%

Verificação da atividade antibacteriana de quitosanas e derivados frente à <i>E. coli</i>					
Tubos	Q 1%	Q 3,3%	SQ 1%	FQ 1%	AcOH 5%
1	-	-	+	+	-
2	-	-	+	+	-
3	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+
Controle +	+	+	+	+	+
Controle -	-	-	-	-	+

(+) crescimento da bactéria *E. coli*; (-) inibição do crescimento bacteriano

De acordo com a Tabela 9, houve crescimento bacteriano em todos os tubos e para todas as amostras testadas. Com exceção do tubo 1 e 2 das soluções de quitosana 1% e 3,3%, porém também não houve crescimento nos tubos 1 e 2 do ácido acético, assim, é provável que a ação antibacteriano nesses tubos 1 e 2 das soluções de quitosana seja causada pelo ácido acético e não pela quitosana.

Na Tabela 10 estão representados os resultados do CMIs 24 horas das soluções das amostras de quitosana de baixa massa molecular QL40, QL 2 e QL 4 a 1% (p/v),

succinil-quitosana de baixa massa molecular (SQL) 1% (p/v) e 2-carboxibenzamido-quitosana de baixa massa molecular (FQL) a 1% (p/v).

Tabela 10. Resultados dos CMI's 24 horas das soluções de quitosanas de baixa massa molecular QL 40, QL 2 e QL4 a 1%; solução de succinil-quitosana de baixa massa molecular (SQL) 1%; solução de 2-carboxibenzamido-quitosana de baixa massa molecular (FQL) 1%

Verificação da atividade antibacteriana de quitosanas e derivados frente à <i>E. coli</i>					
Tubos	QL 40 1%	QL 2 1%	QL 4 1%	SQL 1%	FQL 1%
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+
Controle +	+	+	+	+	+
Controle -	-	-	-	-	-

(+) crescimento da bactéria *E. coli*; (-) inibição do crescimento bacteriano

De acordo com a Tabela 10, só não houve crescimento bacteriano nos tubos 1 e 2, mas esse efeito antibacteriano é provavelmente obtido pela ação do ácido acético.

Inicialmente, a quitosana foi utilizada na área da veterinária em feridas de animais e foi observada uma rápida cicatrização em feridas pequenas, limpas e recentes (OKAMOTO *et al.*, 1992; MINAMI *et al.*, 1992). Vários estudos avaliando o potencial da quitosana em aplicações como revestimento curativo ou como suporte para crescimento de células e recuperação tecidual animal vem sendo realizados (KHAN; PEH; CHING., 2000; KHAN; PEH, 2003; ASSIS; LEONI; NOVAES, 2007). Em seu estudo, Maciej (1992) mostrou a eficiência da quitosana no processo de cicatrização em feridas. Neste estudo foram conduzidos ensaios com 68 animais com feridas recentes, onde 95% obtiveram total cicatrização e em 18 animais com feridas mais avançadas, em que apenas 3 se curaram. Goulart (2006) realizou um estudo com 60 hamsters, onde estes foram submetidos a lesões operatórias nos tecidos epiteliais e depois foi aplicado um curativo de quitosana. Foi observada a cicatrização das feridas, sem nenhum tipo de quadro inflamatório e sem formação de quelóides.

A quitosana possui a propriedade de acelerar a cicatrização das lesões cutâneas, atuando no processo de reparação do tecido por estimular a proliferação de fibroblastos

e angiogênese, além de promover uma maior contração da ferida e reepitelização sem formação de quelóides (BIAGINI *et al.*, 1992; ASSIS; LEONI; NOVAES, 2007). Essa capacidade da quitosana de reparação tecidual de maneira ordenada e sem formação de cicatriz pode ser justificada por suas características moleculares e similaridade biológica com os glicosaminoglicanos.

A cicatrização eficiente, sem contaminação bacteriana e/ou fúngica levou os pesquisadores a testarem a eficácia da quitosana como antimicrobiano. Porém, os ensaios realizados da quitosana como antimicrobiano apresentam resultados conflitantes, como mostrado no item Introdução no Quadro 1.

Além de atuar no suporte de crescimento celular, agindo como indutor da cicatrização, a quitosana possui ainda a característica de ser filmogênica. A quitosana, quando aplicada na pele dos animais, forma um filme protetor impedindo a entrada de microorganismos, sendo sua ação, desta forma, primordialmente mecânica, apesar da possibilidade de atuação química sobre micróbios invasores.

Assim, é possível notar que a utilização de quitosana sobre feridas tende a prevenir infecções, porém a afirmação de que a quitosana apresenta propriedades antimicrobianas é ainda duvidosa. Isso porque existem relatos contraditórios sobre a eficácia da ação contra os mesmos microorganismos e não se estabeleceu valores exatos de concentração e massa molecular de quitosana necessários para que ela haja como agente antimicrobiano.

Existem relatos em que a quitosana apresentou alguma ação antimicrobiana (JEON; KIM, 2000; HONG *et al.*, 2002; ZHENG, L. Y.; ZHU, J. F., 2003), porém maiores estudos e melhor compreensão sobre a ação da quitosana sobre os microorganismos são necessários.

Foi observado no presente estudo que as características físico-químicas da quitosana (especialmente sua baixa solubilidade em pH neutro e básico e sua solubilidade em pH ácido) interferem nos resultados obtidos quando investigada sua ação sobre microorganismos. Desta forma, faz-se necessária a avaliação criteriosa dos resultados obtidos a fim de confirma ou refutar sua ação.

Verificou-se que a presença de ácido nos meios de cultivo durante as análises pode vir a interferir nos resultados alcançados podendo induzir a conclusões não acertadas, logo deve ser verificada a influência do pH na atividade antimicrobiana da quitosana. Outros fatores, como a formação de clusters e concentração da quitosana coloidal no meio, fator esse que é diretamente influenciado pelo pH no qual a quitosana

se encontra, devem ser criteriosamente avaliados para a determinação de uma real concentração mínima inibitória. De forma similar, nutrientes presentes no meio de cultivo podem ter sua concentração modificada devido à variação de pH induzida pela presença de ácido na solução de quitosana adicionada, podendo assim interferir na capacidade de multiplicação dos microorganismos estudados.

Observa-se dessa forma que a verificação da ação antimicrobiana da quitosana não é uma análise trivial, sendo necessários critério e rigor científico para seu estudo, conhecimento e avaliação da influência de todas as variáveis nas propriedades biológicas da quitosana.

6. CONCLUSÕES

As amostras de quitosanas de baixa massa molecular obtidas (QL 40, QL 2 e QL 4) apresentaram configuração química semelhante à quitosana de partida e viscosidade reduzida quanto maior o tempo de aquecimento.

As sínteses das amostras de *N*-succinil-quitosna (SQ) e *N*-succinil-quitosana de baixa massa molecular (SQL) também apresentaram semelhança estrutural química entre elas, semelhança esta demonstrada pela espectroscopia Raman e de infravermelho (FTIR). A menor viscosidade da *N*-succinil-quitosana de baixa massa molecular (SQL) em relação à *N*-succinil-quitosana (SQ) comprovou que se utilizando quitosana de baixa massa molecular, se origina um derivado com massa molecular também reduzida. Estas mesmas conclusões podem ser atribuídas às amostras 2-carboxibenzamido-quitosana (FQ) e 2-carboxibenzamido-quitosana de baixa massa molecular (FQL).

Outro resultado que deve ser destacado, é que as amostras com menor massa molecular se mostraram mais solúveis que seus similares de alta massa molecular. E ainda, os derivados ftálicos e succínicos da quitosana também apresentaram melhor solubilidade que a quitosana de partida.

Em relação à atividade antibacteriana, nenhuma das amostras testadas (quitosana de partida, quitosanas de baixa massa molecular, succinil-quitosana de alta e baixa massa molecular, 2-carboxibenzamido-quitosana de alta e baixa massa molecular) exibiu ação antibacteriana significativa.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- ANTONINO, N. A. **Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundos da indústria pesqueira paraibana**. 88 f. Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica) Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2007.
- ASSIS, O. B. G.; LEONI, A. M.; NOVAES, A.P. Avaliação do efeito cicatrizante da quitosana por aplicação tópicas em ratos. Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, SP, 2007.
- AZEVEDO, V. V. C., et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2.3, p. 27-34, 2007.
- BIAGINI, G. et al. Biological materials for wound healing. **Advances in Chitin and Chitosan**, Elsevier Science Publishers, p. 685, 1992.
- BOURIOTIS, V. et al. **Trends Biotechnol.** 2000, 18, 305.
- BRINE, C. J. **Chitin, Chitosan and Related Enzymes**, J.P. Zikakis, Academic Press Inc. p. 17-23, 1984.
- 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.
- 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.
- CRAVEIRO, A. A.. **Quitosana a Fibra do Futuro**. Ceará, PADETC, 124p. 1999.
- 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 interactions. **Biomacromolecules**, v. 3, p. 342-349, 2002.
- DEUCHI, K. Decreasing effect of chitosan on the apparent fat digestibility by rats fed on a high-fat diet. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**; v. 58, n. 9, p. 1613-1616, 1994.

DODANE, V.; VILIVALAM, V.D. Pharmaceutical applications of chitosan. **PSTT**, v. 1, n. 6, set. 1998.

FERREIRA, A.M., et al. Revisão de estudos clínicos de enfermagem: utilização de papaína para o tratamento de feridas. **R. Enfer.**, v. 13, p. 382-389, 2005.

GOULART, G.A.S. **Obtenção e caracterização de micropartículas de quitosana contendo papaína**. Campinas, 2006. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

GOY, R. C.; BRITO, D.; ODILLIO, B. G. A review of the antimicrobial activity of chitosan. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, n. 3, p. 241-247, 2009.

GROSSEN, D. W. Review of alternative treatment processes for metal bearing hazardous waste streams. **J. Air Pollut. Control Assoc.**, v.36, n. 5, 2009.

GUAN, Y.; FU, Q.; ZHU, L. **Application and Explore**, v.2, n. 35, 1997.

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

HIRANO, S. Some phthaloyl derivates of 2-amino-2-deoxi-D-glucopyranose. **Carbohydrate Research**, v. 16, p. 229-231, 1971.

HONG, K. N. *et al.* **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, n. 65, 2002.

HUANG, K.-S., et al. Application of low-molecular-weight chitosan in durable press finishing. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, n. 2, p. 254-260, 2008.

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.

ILLUM, L. Chitosan and its uses as pharmaceutical excipient. **Pharm. Res.**, v.15, p.1326-1331, 1998.

JASTRZEBSKA, M., ZALEWSKA-REJDAK, J., WRZALIK, R., KOCOT, A., BARWIN´SKI, B., MRÓZ, I., CWALINA, B. **Journal of Molecular Structure**, v. 744-747, p. 789-795, 2005.

JEON, Y.; KIM, S. **Carbohydrate Polymers**, v. 41, p. 133, 2000.

JIA, Z.; SHEN, D.; XU, W. Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan. **Carbohydrate Research**, v. 333, n. 1, p. 1-6, 2001.

KANTI, P.*et al.* Dehydration of ethanol through blend membranes of chitosan and sodium alginate by pervaporation. **Separation and Purification Technology**, v. 40, p. 259–266, 2004.

KHAN, T.A.; PEH, K.K.; CHING, S.H. Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 3, p. 303-311, 2000.

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.

KHAN, T. A.; PEH, K.K. A preliminary investigation of chitosan film as dressing for punch biopsy wound in rats. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 1, p. 20-26, 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.

KNAPCZYK, J. et al. **Chitin and chitosan sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications**. London and New York: Elsevier Applied Science; p. 605-616, 1989.

KNAUL, et al. Characterization of deacetylated chitosan and chitosanmolecular weight review. **Canada Journal of Chemistry**, v.76, p. 1699-1706, 1988.

KNORR, D. **Food Technol.** January, p. 114-120, 1991.

KOBELK, D. N. **Food Australia**, v. 42, p. 18-19, 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, 1992.

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

KURITA, K. Chitin and Chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. **Marine Biotechnology**, v. 8, p. 203-226, 2006.

KURITA, K. Chemistry and application of chitin and chitosan. **Polym Degradation and Stability**, v. 59, p. 117-120. 1998.

KURITA, K. et al.Reactivity characteristics of a new form of chitosan: facile N-phthaloylation of chitosan prepared from squid chitin for effective solubilization. **Polymer Bulletin**, v. 30, n. 4, p. 429-433, 1993.

LIU, N. *et al.* Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of Escherichia coli. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p. 60-65, 2006.

- LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. E. C. **Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica**. Rio de Janeiro: E-papers, 366p. 2001.
- MAGHAMI, G.G.; ROBERTS, G.A.F. Evaluation of the viscometric constants for chitosan. **Makromolekulare Chemie**, v.189, n.1, p.195-200, 1988.
- MATHUR, N. K.; NARANG, K. Chitin and Chitosan, Versatile Polyssaccharides from Marine Animals. **J. Chem. Educ.**, v. 67, p. 11, 1990.
- MELLO, K.G.P.C., et al. Synthesis and physicochemical characterization of chemically modified chitosan by succinic anhydride. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n.4, p. 665-668, jul. 2006.
- MELLO, K.G.P.C. **Síntese e avaliações físico-químicas de quitosanas quimicamente modificadas pela inserção de radicais de anidrido succínico**. 89 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2005.
- MINAMI, S. *et al.* Application of chitin and chitosan in large animal practice. **Advances in Chitin and Chitosan**, Elsevier Science Publishers, p. 685, 1992.
- MONTEIRO Jr., O.A. **Preparação, modificação química e calorimetria do biopolímero quitosana**. 113 f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2000.
- MOURA, C.E.M.; SILVA, L.L.M.; GODOY, J.R.P. Úlceras de pressão: prevenção e tratamento. **Univ. Ci. Saúde**, Brasília, v. 3, n.2, p. 275-286, jul./dez. 2005.
- 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, p.385-388. 1986. [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*, p.307-336. 1997.
- MUZZARELLI, R.A.A. Colorimetric determination of chitosan. **Analytical Biochemistry**, v.260, p.255-257, 1998.
- 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).
- NABEREZHNYKH, S. I. *et al.* New chitosan derivatives with potential antimicrobial activity. **Russian Journal of Marine Biology**, v. 35, n. 6, p. 498-503, 2009.

- NIFANT'EV, N. E.; CHERNETSKII, V. N. **Mendeleev Chemi. J.** 1998.
- OKOMOTO, Y. *et al.* Application of chitin and chitosan in small animals. **Advances in Chitin and Chitosan**, Elsevier Science Publishers, p. 685, 1992.
- PETER, M. G.; J. M. S.; Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. **Pure Applied Chemistry**. v. 4, p. 629-640, 1995.
- 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.
- RAHAL, S. C., et al. Utilização de própolis ou mel no tratamento de feridas limpas induzidas em ratos. **Archives of Veterinary Science**, v. 8, n. 1, p. 61-67, 2003.
- RAMOS, A. F. N.; MIRANDA, J. L. Própolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. **J. Venom. Toxins incl. Trop. Dis.**, v. 13, n. 4, p. 697-710, 2007.
- RIANDE, R. **Polymer viscoelasticity stress and strain in practice**. New York: Marcel Dekker, 2000. 879p.
- RINAUDO, M.; MILAS, M.; DUNG, P. L.; Characterization of chitosan. Influence of Ionic Strength and Degree of Acetylation on Chain Expansion. **International Journal of Macromolecules**, v. 15, p. 281, 1993.
- ROBERTS, G.A.F. **Chitin chemistry**. London: Macmillan, 1992. 350p.
- ROCHA, R. P. A.; GURJÃO, W. S.; BRITO, L. C. Avaliação morfológica da cicatrização de lesões ulcerativas assépticas tratadas com soluções de papaína. *VII Congresso Virtual Hispanoamericano de Anatomia Patológica y I Congreso de Preparaciones Virtuales por Internet*, v. 7, 2005. Disponível em <www.conganat.org/7congreso/PDF/494.pdf>. Acesso em: 20 out. 2008.
- SANCHEZ, N. R, et al. Aspectos morfológicos e morfométricos da reparação tecidual de feridas cutâneas de ratos com e sem tratamento com solução de papaína a 2%. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.8, n.1, p. 18-23, 1993.
- SANFORD, P. A. Chitosan: commercial uses and potencial applications. In: SKJAKBRAEK, G.; ANTHOMSENT, T.; SANFORD, P. A., (eds). **Chitin and Chitosan-sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications**. New York: Elsevier; London: Applied Science, 1989, p. 51-70.
- SCHRADER, B. **Infrared and Raman Spectroscopy, Methods and Applications**. VCH Publishers. Inc., New York, N Y, 1995.
- SEGUNDO, A. S., et al. Influência do Aloe vera e própolis na contração de feridas em dorso de ratos. **Periodontia**, v. 17, n. 1, mar. 2007.

- SHI, C., et al. Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine. **Journal of Surgical Research**, v. 133, p. 185-192, 2006.
- SHIN, Y. *et al.* **Advances in Chitin Science**, v. 2, n. 156, 1997.
- SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Quim. Nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.
- SILVERSTEIN, R. M. *et al.* Identificação Espectrofotométrica de Compostos Orgânicos, 5ª ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p.387, 1994.
- SINGLA, A. K.; CHAWLA, M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects – an update. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, p. 1047-1067, 2001.
- THATTE, M. R. **Synthesis and antibacterial assessment of water-soluble hydrophobic chitosan derivatives bearing quaternary ammonium functionality.** Dissertação (Mestrado em Química) Louisiana State University. Louisiana, LA. 2001.
- TODOROVIC, Z.; GRIGOLON, L. B.; FRANCO, T. T. Viscosidade e massa molar de quitosanas modificadas enzimaticamente. 08/2003, XIV Simpósio Nacional de Fermentações - SINAFERM, Vol. 1, pp.1-10, Florianópolis, SC, Brasil, 2002.
- UENO, H., et al. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. **Biomaterials**, v. 20, p. 1407-1414, 1999.
- UENO, H.; MORI, T.; FUJINAGA, T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 52, p. 105-115, 2001.
- UENO, K. *et al.* **Advance in Chitin Science**, v. 2, n. 156, 1997.
- VANKEIRSBILCK, T., VERCAUTEREN, A., BAEYENS, W., VAN der WEKEN G., VERPOORT, F., VERGOTE, G., REMON, J.P. Applications of Raman spectroscopy in pharmaceutical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 21, p. 869-877, 2002.
- WANG, X. *et al.* **Polymer Bulletin**, v. 55, p. 105-113, 2005.
- XIA, W. Journal of Wixi University of Light Industry, v.15, n. 4, p. 297, 1996.
- YAMAGUCHI, R. *et al.* Preparation of partially N-succinylated chitosans and their cross-linked gels. **Carbohydrate Research**, v. 88, p. 172-175, 1981.
- ZHANG, H. *et al.* The comparison of antibacterial activities of different types of chitosan. **Journal of Hebei Normal University (Natural Science Edition)**, v. 1, 2009.
- ZHENG, L.-Y.; ZHU, J.-F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, p. 527-530, 2003.