

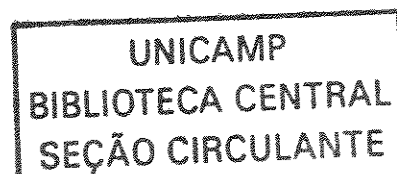
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
LABORATÓRIO DE ENGENHARIA BIOQUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS QUÍMICOS

Avaliação da viscosidade e massa molar de quitosanas modificadas enzimaticamente

Autor: Zoran Todorovic
Orientadora: Profa. Dra. Telma Teixeira Franco

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Campinas - São Paulo
Outubro -2002



UNIDADE BC
 1ª CHAMADA I/UNICAMP
T569a
 ✓ EX
 TOMBO BC/ 52201
 PROC. 124103
 C ☐ D ☒
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA 13/02/03
 Nº CPD.

BIBID - 283795

CM001B00B1-5

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

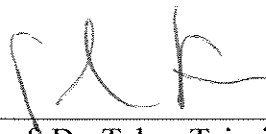
T569a Todorovic, Zoran
Avaliação da viscosidade e massa molar de
quitosanas modificadas enzimaticamente / Zoran
Todorovic.--Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientador: Telma Teixeira Franco.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

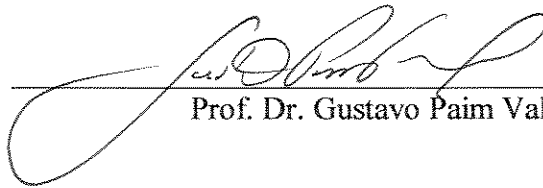
1. Quitina. 2. Quitosana. 3. Papaína. 4. Hidrolise.
5. Cromatografia em gel. 6. Luz – Espalhamento. 7.
Viscosidade. I. Franco, Telma Teixeira. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Química. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

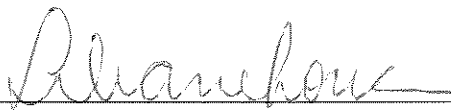
Dissertação de Mestrado defendida por Zoran Todorovic e aprovada em 30 de outubro de 2002 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof. Dr. Telma Teixeira Franco - Orientadora



Prof. Dr. Gustavo Paim Valença



Prof. Dr. Liliane Maria Ferrareso Lona

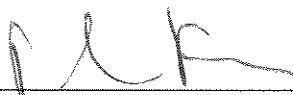


Prof. Dr. Carlos Raimundo F. Grosso

200304827

FOLHA DE VERSÃO FINAL

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida em 30 de outubro de 2002 e aprovada pela Comissão Julgadora.



Prof. Dr. Telma Teixeira Franco

AGRADECIMENTOS

À professora Dr^a Telma Teixeira Franco pela sua orientação e amizade.

Aos meus pais e meu irmão, que mesmo ficando longe, sempre acreditaram em mim e apoiaram tudo que eu quis fazer.

À Carol por ficar sempre do meu lado.

À Vera pela amizade e a disposição em ajudar em qualquer situação ou momento.

Aos meus colegas de laboratório pela amizade crescente e toda ajuda e apoio: Gicela, Ana Paula, Juliana, Luciana, Joseane, Eliana, Mariana, Adriana, Aline, Teresa, Junko, Eden, Lucio, Enio e Everaldo.

À Lisanne pelas dicas na continuidade do trabalho desenvolvido por ela.

Aos professores que mostraram a paciência e ajudaram esclarecer minhas dúvidas a respeito deste trabalho: Prof. Gustavo Paim Valença (FEQ), Prof. Carlos Raimundo Ferreira Grosso (FEA), Prof. Fabio Augusto (IQ), Prof. Alain Domard (ISTIL-França).

A todos os amigos e parentes que ficam bem longe, literalmente no outro lado do mundo, mas que nunca me esqueceram, sempre acreditaram em mim e por um lado sempre estiveram presentes.

Aos amigos da “minha terra” que estão morando neste lado do mundo.

A todos os amigos que não foram mencionados especificamente, só por serem amigos.

Ao CNPq pela ajuda financeira.

Ao Brasil, que me deu esta oportunidade.

RESUMO

A biocompatibilidade, biodegradabilidade e o fato de ser um polímero catiônico bioadesivo fazem a quitosana um material atrativo para inúmeras aplicações na área biotecnológica, agrícola, farmacêutica e médica. As quitosanas com massas molares baixas e os oligômeros têm maiores perspectivas nas últimas duas áreas.

O objetivo deste projeto de pesquisa foi a obtenção de polímeros com massa molar média reduzida devido à ação da enzima papaína. Empregando papaína livre e em forma imobilizada a redução da massa molar da quitosana foi estudada. Quitina foi utilizada como suporte para imobilização da papaína e para imobilização da proteína modelo albumina de soro bovino. Experimentos com todos estes materiais foram realizados para estudar os efeitos da modificação da quitosana. Os experimentos foram conduzidos em reatores batelada com pH e temperatura controlados. Soluções da quitosana (1%) foram preparadas utilizando ácido láctico ou ácido acético para solubilização. Duas técnicas para determinação da massa molar da quitosana foram utilizadas. Em primeiro lugar, a viscosimetria foi empregada sendo esta a técnica mais comum para investigação de redução da massa molar. Redução da viscosidade de soluções de quitosana foi associada à diminuição da massa molar média. Outro método utilizado para a determinação de massas molares foi a cromatografia de permeação em gel, que é considerado um método relativo de determinação de massa molar, pois necessita de padrões dos polímeros para a construção de uma curva padrão. A massa molar determinada por estes dois métodos é dependente do tamanho da molécula (diâmetro). O método absoluto de determinação da massa molar com detector de espalhamento de luz também foi utilizado. Este detector conectado *on-line* com cromatografia de permeação em gel fornece dados absolutos da massa molar média. Luz espalhada de diferentes partes da molécula do polímero em diferentes ângulos geram o valor correto da massa molar sem utilização dos padrões. Os resultados mostraram o efeito superior na redução da massa molar utilizando papaína em comparação com outros

materiais utilizados. Esta redução da massa molar média é rápida e acentuada nos primeiros minutos da reação, em comparação com a continuação do processo.

Palavras chave: quitina; quitosana; papaína; hidrólise enzimática; hidrólise química; cromatografia de permeação em gel; viscosimetria; espalhamento de luz; redução da massa molar

ABSTRACT

Biocompatibility, biodegradability and the fact of being bioadhesive polycationic polymer make chitosan an attractive material for various applications in agricultural and biotechnological, pharmaceutical and medical fields. Chitosans with lower molecular weights and oligomers have major perspectives in the last two fields.

An objective of this project of research was the production of polymers with reduced molecular weight due to the action of enzyme papain. Applying papain in the free and immobilized form the reduction of molecular weight of chitosan was studied. Chitin was used as a support for the immobilization of papain and for the immobilization of model protein bovine serum albumin. Experiments with all these materials were realized to study the effects of modification of chitosan. Experiments were run using batch reactors at controlled pH and temperature. Chitosan solutions (1%) were prepared using lactic acid or acetic acid for solubilization. Two different techniques were used for determination of molecular weight of chitosan. First viscosimetry was applied as the most common technique used for investigation of reduction of molecular weights. Reduction of viscosity of chitosan solutions is associated with the reduction of molecular weight. The other method used for determination of molecular weights is gel permeation chromatography that is considered a relative method of determination of molecular weights as it requires polymeric standards for the construction of the standard curve. Molecular weight determined by these two methods is dependant of the molecular size (diameter). Absolute method of determination of molecular weights through measurements with detector of light scattering was also applied in this studies. This detector connected on-line with gel permeation chromatography provides us with the absolute molecular weights. This method does not require standards measuring the light scattered from different parts of the polymeric molecule in different angles generating in this way the correct value of molecular weight. Results show the superior effect of papain on the reduction of molecular weight compared to the other materials used. This reduction of molecular weight is fast,

pronounced in the first minutes of the reaction in comparison with the continuation of the process.

Keywords: *chitin; chitosan; papain; enzymatic hydrolysis; chemical hydrolysis; gel permeation chromatography; viscosimetry; light scattering; reduction of molecular weight*

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	<i>i</i>
RESUMO	<i>ii</i>
ABSTRACT	<i>iv</i>
ÍNDICE	<i>vi</i>
LISTA DE TABELAS	<i>ix</i>
LISTA DE FIGURAS	<i>xi</i>
NOMENCLATURA	<i>xiii</i>
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	2
CAPÍTULO 1	
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1. POLISSACARÍDEOS	3
2. QUITINA	4
2.1. Produção da Quitina	6
3. QUITOSANA	7
3.1. Produção da Quitosana	9
3.2. Propriedades da Quitosana	10
4. BREVE HISTÓRICO DA QUITINA E QUITOSANA	11
5. APLICAÇÕES DA QUITINA E QUITOSANA	12

6. HIDRÓLISE QUÍMICA OU ENZIMÁTICA DA QUITOSANA	16
6.1. Papaína	23
6.2. Imobilização de enzimas	23
6.3. Quitina como suporte de imobilização de enzimas	24
7. MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLAR	25
7.1. Viscosimetria	26
7.2. Cromatografia de permeação em gel (CPG)	27
7.3. Espalhamento de luz (EL)	29

CAPÍTULO 2	
CHITOSAN HYDROLYSIS EVALUATED BY MOLECULAR WEIGHT AND VISCOSITY DECREASE	31

ABSTRACT	31
NOMENCLATURE	32
1. INTRODUCTION	32
2. MATERIALS & METHODS	35
2.1. Immobilization procedure	36
2.2. Protein determination	36
2.3. Hydrolysis experiments	37
2.4. Viscosimetry	37
2.5. GPC with RI detector (GPC-RI)	37
2.6. GPC with RI and MALLS detector coupled on-line (GPC-RI-MALLS)	38
3. RESULTS	39
4. DISCUSSION AND CONCLUSIONS	49

	<i>Índice</i>
5. REFERENCES	52
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	54
SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 1:

Tabela 1:	Resumo das principais aplicações da quitina e da quitosana	15
Tabela 2:	Resumo dos trabalhos publicados com várias enzimas aplicadas em hidrólise enzimática das quitinas e quitosanas	19

CAPITULO 2:

Table 1:	List of experiments and their abbreviation	40
Table 2:	Viscosity variation (cSt) and viscosity reduction (%) of 1% chitosan-acetic acid solutions treated with IC _P	40
Table 3:	Relative molecular weight variation by GPC-RI and M _w reduction (%) of 1% chitosan-acetic acid solutions treated with IC _P	41
Table 4:	Viscosity variation (cSt) of 1% chitosan-lactic acid solutions treated with IC _P , IC _B , IC _C and free papain	43
Table 5:	Viscosity reduction (%) of 1% chitosan-lactic acid solutions treated with IC _P , IC _B , IC _C and free papain	43
Table 6:	Relative molecular weight variation by GPC-RI and M _w reduction (%) of 1% chitosan-lactic acid solutions treated with IC _P	44

Table 7:	Absolute molecular weight variation by GPC-RI-MALLS and M_w reduction (%) of 1% chitosan-lactic acid solutions treated with IC _P , IC _B , IC _C and free papain	46
Table 8:	Parameters of the model equation (1) and coefficients of correlation for all the treatments with papain	49

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1:

Figura 1:	Fórmula química da celulose	5
Figura 2:	Fórmula química da quitina	5
Figura 3:	Fluxograma simplificado da obtenção de quitina e quitosana	7
Figura 4:	Fórmula química da quitosana	9
Figura 5:	Representação gráfica do princípio de cromatografia por exclusão	28

CAPÍTULO 2:

Figure 1:	Viscosity reduction (model and experimental) of 1% chitosan-acetic acid solutions along the treatment with IC _P	41
Figure 2:	Elution curves (GPC-RI) of 1% chitosan-acetic acid treated samples	42
Figure 3:	Viscosity reduction (model and experimental) of 1% chitosan-lactic acid solutions along the treatments with IC _P , IC _B , IC _C and free papain	44
Figure 4:	Elution curves (GPC-RI) of 1% chitosan-lactic acid treated samples	45

Figure 5:	Absolute molecular weight reduction (model and experimental) of 1% chitosan-lactic acid solutions along the treatments with IC _P , IC _B , IC _C and free papain	45
Figure 6:	GPC-RI-MALLS elution curves of 1% chitosan-lactic acid (control)	47
Figure 7:	GPC-RI-MALLS elution curves of 1% chitosan-lactic acid treated with IC _C	47
Figure 8:	GPC-RI-MALLS elution curves of 1% chitosan-lactic acid treated with IC _B	48
Figure 9:	GPC-RI-MALLS elution curves of 1% chitosan-lactic acid treated with IC _P	48

NOMENCLATURA

BSA	Albumina do Soro Bovino
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CPG	Cromatografia de Permeação em Gel
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CPG-IR	Cromatografia de Permeação em Gel com Detector de Índice de Refração
dn/dc	Incremento de Índice de Refração Específico do Solutu
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético
EL	Espalhamento de Luz
GA	Grau de Acetilação
GD	Grau de Dasacetilação
GlcN	D-glicosamina
GlcNAc	N-acetil-D-glicosamina
GP	Grau de Polimerização
MALLS	Ângulo Múltiplo de Espalhamento de Luz Laser
MM	Massa Molar
RMN	Ressonância Molecular Nuclear
t_r	Tempo de Retenção
V_r	Volume de Retenção
θ	Ângulo de Luz Espalhada

INTRODUÇÃO

A quitina é um polissacarídeo encontrado em abundância na natureza. Carapaças e cabeças de crustáceos são as fontes mais importantes de quitina, donde é normalmente extraída por via química ou enzimática. Resíduos da indústria pesqueira, normalmente devolvidos para o mar, podem ser processados para obtenção da quitina. Estes representam assim fontes renováveis de materiais de importância significativa na perspectiva atual.

Vários derivados da quitina estão sendo criados e estudados. Um dos mais importantes, devido às características únicas e à maior solubilidade, é a quitosana, obtida através do processo de desacetilação da quitina.

Quitina e quitosana, como matérias primas, são biopolímeros com altas massas molares, alto grau de polimerização da cadeia e elevada polidispersão. Muitas aplicações destes biopolímeros foram desenvolvidas e já são utilizados em diversas áreas industriais e na agricultura. Ultimamente estes biopolímeros estão atraindo atenção na área biotecnológica, biomédica e farmacológica. Oligômeros da quitosana e quitina apresentam grande interesse nestas áreas e podem ser obtidos por processos de modificação química ou enzimática. Por exemplo, os oligômeros da quitosana apresentam uma grande diversidade de efeitos farmacológicos devido à facilidade de penetração nas células.

Despolimerização da cadeia polimérica pode ser realizada por hidrólise química, usando ácidos inorgânicos fortes, ácidos orgânicos, temperaturas elevadas ou por hidrólise enzimática. Oligômeros também são obtidos pela ação de enzimas específicas que agem em

pontos determinados da cadeia polimérica (ligações glicosídicas). Enzimas inespecíficas também são muito estudadas devido às atividades hidrolíticas e ao custo menor.

OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo verificar o efeito da papaína na hidrólise da quitosana, com enfoque específico de investigar os tempos iniciais da ação hidrolítica da papaína sobre as moléculas da quitosana. Testes comparativos foram realizados com ácidos orgânicos usados para solubilização da quitosana, na ausência de papaína e com proteína não catalítica.

CAPÍTULO 1:

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. POLISSACARÍDEOS

Polissacarídeos são biopolímeros constituídos de monossacarídeos os quais são unidos por ligações glicosídicas (formada por ligações entre o grupo hidroxila de um açúcar e carbono anomérico de outro). Estas ligações são facilmente hidrolisadas por ácidos fracos (assim seus monossacarídeos podem ser separados), mas são resistentes às ações de agentes alcalinos. Na natureza possuem diversas funções, podendo comportar-se como material de reserva de energia (amido e glicogênio) ou podendo contribuir como material estrutural aumentando a resistência mecânica dos tecidos das plantas. Celulose e pectinas exercem este papel em plantas terrestres, agar e alginatos têm mesma função em plantas aquáticas. Polissacarídeos como celulose, quitina, xilana e mananas são estruturas sólidas de proteção e sustentação [LEHNINGER *et al.*, 1995].

Os monossacarídeos mais comuns em polissacarídeos são: D-glicose, D-manose, D-galactose, D-arabinose, D-xilose, D-ramanose, D-ácido glucarônico, D-ácido galacturônico, 2-acetomido-2-deoxi-D-glicose, 2-amina 2-dioxi-D-glicose [PETER, 2001].

2. QUITINA

A quitina é um biopolímero de cadeia linear formado por ligações entre resíduos de N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc) através de ligações β . A fórmula da quitina (1,4)-2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucano está representada na Figura 2. Este polissacarídeo natural é um dos mais abundantes na natureza perdendo apenas para a celulose. É facilmente encontrada e naturalmente renovável [TSIGOS *et al.*, 2000]. A estrutura química da quitina é muito semelhante à da celulose. A principal diferença entre elas se encontra no tipo de grupamento situado na posição axial do carbono 2 do anel de piranose. No carbono 2 da celulose encontra-se uma hidroxila, enquanto na quitina tem-se um grupamento mais volumoso que é uma acetamida (NHCOCH_3), esta diferença pode ser melhor visualizada nas Figuras 1 e 2. A quitina é conhecida em três formas estruturais cristalinas diferentes, α -, β - e γ -, dos quais α - e β -quitinas são as mais freqüentes, sendo a α -quitina a mais comum e por isso também a mais estudada [PETER & FRANCO, 2001].

A quitina é encontrada em grande abundância na natureza como o principal componente do exoesqueleto duro de aproximadamente um milhão de artrópodes e nas carapaças de crustáceos (caranguejos, camarões, lagosta, krill) [PETER, 2002b]. Entretanto é também encontrada em insetos, na cutícula dos invertebrados (formigas, besouros, aranhas, escorpiões), nos moluscos, na parede celular da maioria dos fungos como também em outros microrganismos (esporos, leveduras, algas verdes, algas marrons). A quitina constitui 1,4% da massa de insetos, e 15-20% da massa de carapaças de crustáceos [KORDESTANI & KENNEDY, 1999, TSIGOS *et al.*, 2000].

A quitina é biodegradável, não-tóxica, e por ser altamente cristalizável é insolúvel em água e em muitos solventes orgânicos sendo solúvel em soluções de ácido clorídrico 12 N ou em solução de dimetilacetamida com 5% cloreto de lítio (DMAc-LiCl) [TSIGOS *et al.*, 2000, PETER & FRANCO, 2001]. A produção anual global da quitina por biossíntese é estimada em aproximadamente 10^{11} toneladas, sendo biodegradada sem acúmulo excessivo na natureza. A massa molar média da quitina natural presente na cutícula de insetos e crustáceos pode ser estimada, a partir das dimensões das microfibrilas, na ordem de 1×10^6 a

2×10^6 Da. Na presença de ácidos minerais fortes a quitina é despolimerizada e, por exemplo, a hidrólise da quitina com HCl fervente resulta em glicosamina e ácido acético [PETER 2002a, 2002b].

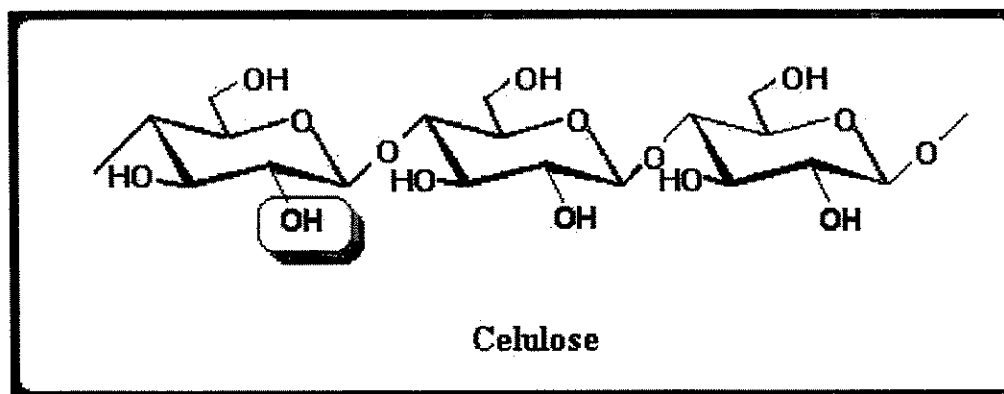


Figura 1: Fórmula química da celulose

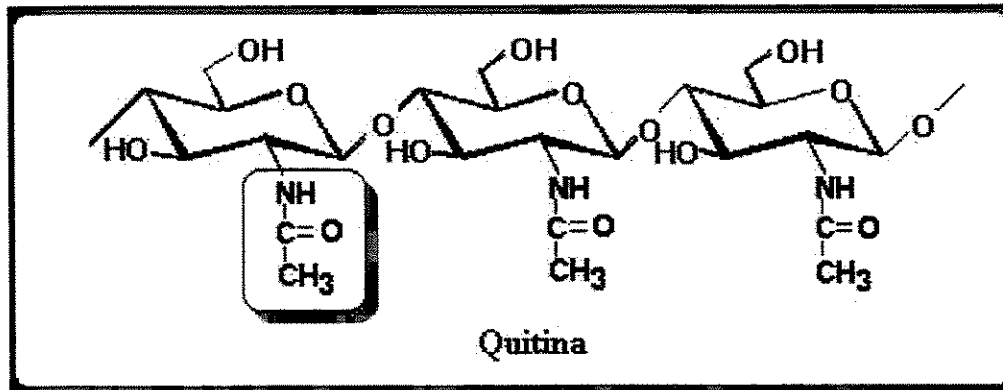


Figura 2: Fórmula química da quitina

2.1. Produção da Quitina

A quitina é obtida principalmente a partir de crustáceos devido à grande quantidade de exoesqueleto de crustáceos disponível. As cascas de crustáceos contêm entre 15 a 20% de quitina, 25 a 40% de proteínas e 40 a 55% de carbonato de cálcio. Em crustáceos a quitina encontra-se firmemente associada aos demais constituintes do exoesqueleto. Portanto, para este polissacarídeo ser isolado, três etapas são requeridas: desmineralização, desproteinação e despigmentação. Inicialmente, as cascas de camarão são moídas e peneiradas e a seguir o material é suspenso em uma solução aquosa de HCl 0,1M, sob agitação por algumas horas a temperatura ambiente (para dissolver e extrair o carbonato de cálcio). Pode-se adicionar 1-octanol para diminuir o efeito do gás carbônico gerado durante a desmineralização, evitando-se assim, o transbordamento do material. Depois desta reação, o material obtido é filtrado e lavado diversas vezes com água destilada. A extração dos componentes protéicos ligados covalentemente à matriz polimérica pode ser feita por tratamento com uma solução aquosa de NaOH 3%, com agitação à 70°C, durante 3 horas. Em alguns casos a proteína extraída pode ser aproveitada em rações para animais. O material desproteinado é lavado com água destilada até a neutralidade. Ao final, este produto passa por uma etapa de despigmentação (retirando pigmentos como carotenóides) em solução de NaOCl (3% de cloro ativo) por 2 horas [CANELLA & GARCIA, 2001]. Os pigmentos podem ser retirados também com solventes orgânicos. Assim, uma quitina de aspecto flocular e insolúvel na maioria dos solventes orgânicos é obtida. Quitina de maior pureza pode ser obtida adicionando ácido clorídrico 12N à uma suspensão desta quitina bruta, com agitação lenta a vigorosa e com grande volume de água [PETER & FRANCO, 2001]. O fluxograma deste processo simplificado está representado na Figura 3.

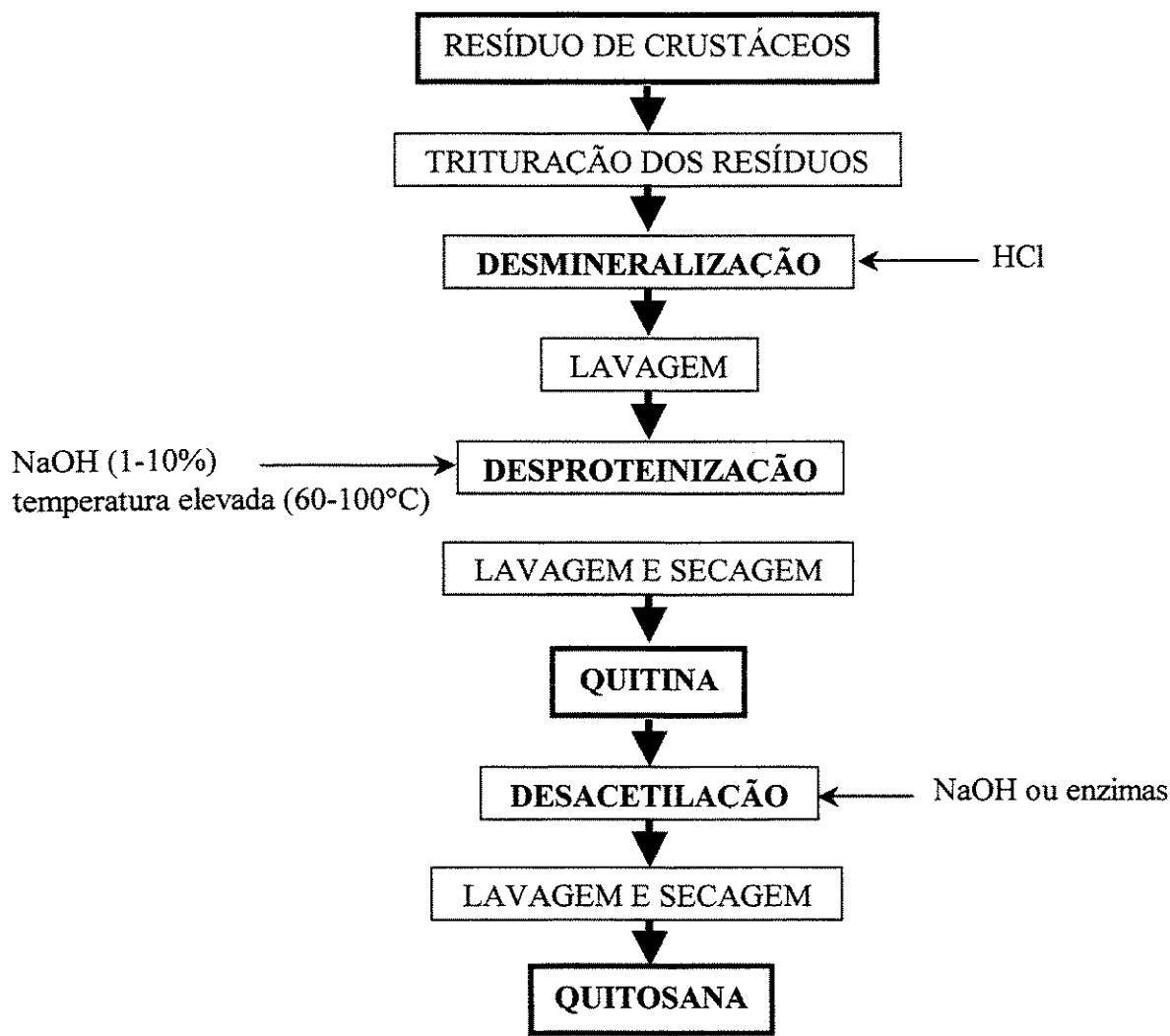


Figura 3: Fluxograma simplificado da obtenção de quitina e quitosana [MONTEIRO, 2000].

3. QUITOSANA

A quitosana (biopolímero policatiônico) é um dos vários derivados da quitina. Quimicamente, a quitina é um polissacarídeo com ramificações de grupos de acetamina e quando estes grupos são desacetilados a quitina é transformada em quitosana. Quitosana é

total ou parcialmente desacetilada, constituída então de grupos D-glicosamina (GlcN) e N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc) resultando em um copolímero de β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glicosamina e β -(1 $\rightarrow$ 4)-N-acetil-D-glicosamina. Durante o processo de obtenção da quitosana o grupo acetila pode ser recuperado com o acetato de sódio [SANFORD *et al.*, 1989].

A quitina e a quitosana são consideradas polímeros heterogêneos, pois possuem na cadeia polimérica tanto monômeros acetilados quanto desacetilados, isto porque, as formas totalmente acetiladas ou totalmente desacetiladas não ocorrem normalmente na natureza e são de difícil preparação em laboratório. Para diferenciar um polímero do outro usa-se uma regra comum: se o grau de desacetilação do polímero for igual ou maior que 60% ($GD \geq 0,60$) o polímero é denominado quitosana, caso contrário, é denominado quitina [PETER & FRANCO, 2001]. A fórmula da quitosana 100% desacetilada ($GD 1,00$) está representada na Figura 4. De um modo prático, a quitina e a quitosana podem ser distinguidas pelo critério de solubilidade em solução aquosa de ácido diluído, sendo a quitosana solúvel e a quitina insolúvel.

A presença de grupo amina primária ($-NH_2$) confere certas características químicas e físicas à quitina diferentes às da celulose. O grupo amina presente na quitosana possui um pK_a em torno de 6,2 a 7,0, o que a torna um polieletrólito quando dissolvida em meio com pH inferior ao pK_a mencionado [MONTEIRO, 2000]. Grupos amina reagem com certa facilidade e permitem a obtenção de diversos compostos derivados. A quitosana é um dos poucos polieletrólitos catiônicos naturais, diferente dos outros polissacarídeos, que são neutros ou negativamente carregados.

A quitosana pode ser quimicamente despolimerizada por diferentes mecanismos, tais como hidrólise ácida, redução oxidativa e despolimerização com ácido nítrico. Enquanto a quitina é inerte e insolúvel, a quitosana é reativa e solúvel em ácidos fracos, tais como os encontrados no estômago. É biodegradável [ONISHI & MACHIDA, 2000], biocompatível com os órgãos, tecidos e células de animais e vegetais [DODANE *et al.*, 1999], não tóxica em administração oral, serve de implante em animais, fornece soluções de viscosidade elevada [TSIGOS *et al.*, 2000], age como quelante de metais e exibe ação antimicrobiana [REDDY *et al.*, 2000]. Um amplo leque de produtos industrializados estão disponíveis no mercado, os quais podem ser apresentados em diferentes formas físicas:

flocos, pó fino, grãos, membranas, esponjas, algodões, fibras, fios e géis, oferecendo propriedades com elevado potencial para aplicações industriais, tais como na indústria cosmética, farmacêutica e agricultura [SYNOWIECKI & AL-KHATEEB, 1997].

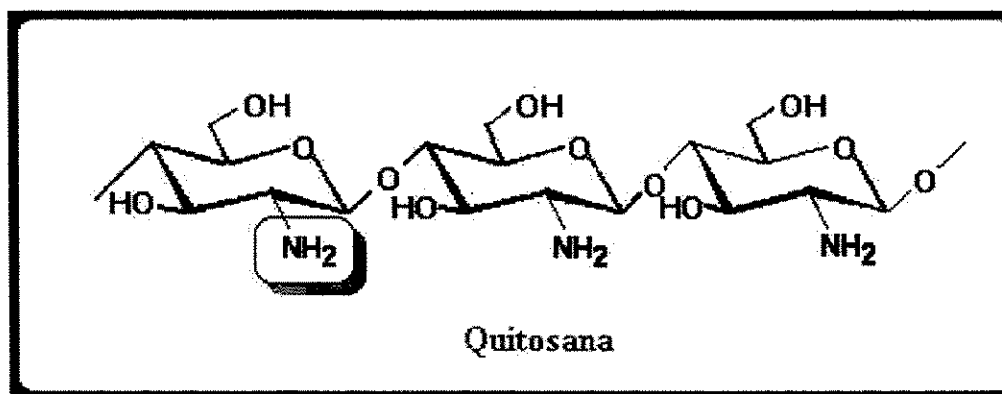


Figura 4: Fórmula química da quitosana

3.1. Produção da Quitosana

Atualmente as indústrias produzem quitina e quitosana em escala comercial, a maioria delas está localizada no Japão, onde 100 bilhões de toneladas de quitosana são manufaturadas por ano a partir dos artrópodes [TSIGOS *et al.*, 2000]. Nestas indústrias, a quitosana é produzida a partir da quitina via processo termoquímico por hidrólise alcalina que promove a desacetilação de quitinas, normalmente com 40-50% de hidróxido de sódio a 110-115°C (Figura 3) [PETER & FRANCO, 2001]. As vezes alguns aditivos como dodecil-sulfato de sódio (SDS) e boroidreto de sódio (NaBH₄) são utilizados no processo. A adição de NaBH₄, um agente redutor ao meio reacional minimiza a ocorrência de despolimerização durante a reação de desacetilação de quitina em meio aquoso alcalino. A adição de antraquinona e o borbulhamento de nitrogênio (ou argônio), que retiram oxigênio do meio reacional, não impedem a despolimerização, sugerindo que a presença do oxigênio não é uma pré-condição para a sua ocorrência [CAMPANA & SIGNINI, 2001]. Durante a

desacetilação alcalina, parte das ligações N-acetil do polímero é rompida com formação de unidades D-glicosamina que contêm um grupo amínico livre. Devido às diferentes origens da quitina (variando GA), não se pode definir uma condição padronizada para a realização dessa reação. Entretanto, acredita-se que os principais fatores que afetam a eficiência da desacetilação e as características das quitosanas obtidas são: temperatura e tempo de reação, concentração da solução de álcali e adição de diluente (álcoois de cadeia curta e cetonas são empregados), razão quitina/álcali, tamanho das partículas de quitina, atmosfera da reação e presença de agentes que evitem a despolimerização [CAMPANA & SIGNINI, 2001]. Elas podem ser purificadas com a preparação de solução de quitosanas em ácido acético (0,05M) sob agitação por 12 horas, filtragem e neutralização com NaOH (10%) até pH 8,5. O polímero precipitado é lavado exaustivamente com água destilada. Utilizando misturas de água-etanol nas lavagens e secagem à pressão reduzida as quitosanas com grande purificação podem ser obtidas [CANELLA & GARCIA, 2001].

3.2. Propriedades da Quitosana

Quimicamente a quitosana é um polímero de alta massa molar, sendo uma poliamina na qual os grupos amina estão disponíveis para reações químicas (preparação de derivados) e formação de sais com ácidos. Os grupos hidroxila C-6 (primário) e C-3 (secundário) também podem ser utilizados na preparação de derivados.

A quitosana é um excelente ligante de metais (quelante) e essa importante propriedade pode ser aplicada nas áreas farmacêutica, de saúde, de purificação de água e alimentícia. Os grupos amina livres presentes no polímero podem adquirir uma carga positiva, em presença de soluções ácidas diluídas, formando um sal solúvel que confere à quitosana suas propriedades específicas. Uma propriedade importante da quitosana é a sua capacidade de formar complexos com vários íons metálicos, sendo, desse modo útil na quelação de ferro, cobre e magnésio, possibilitando sua utilização para remover íons de metais pesados tóxicos tais como prata, cádmio, mercúrio, chumbo, níquel e cromo.

A quitosana pode se ligar seletivamente a outros compostos como colesterol, gorduras, proteínas e células tumorais, como também com outros materiais como, polissacarídeos aniônicos, ácidos nucleicos, ácidos graxos etc que, por sua superfície negativa, interagem fortemente com a quitosana, em razão da carga positiva desta. A quitosana é um excelente agente coagulante ou floculante devido a alta densidade de grupos NH_3^+ que podem interagir com colóides, proteínas, corantes e polímeros carregados negativamente. Por exemplo, a quitosana adere facilmente a polímeros naturais como cabelo e pele, constituídos por proteínas e mucopolissacarídeos com cargas negativas [CRAVEIRO *et al.*, 1999].

Alguns parâmetros são importantes para garantir a qualidade da quitosana: grau de desacetilação (GD), solubilidade em solução 1% de ácido acético, pH, viscosidade, turbidez, tamanho das partículas, fonte ou origem, massa molecular, conteúdo residual de proteínas e aminoácidos. O grau de desacetilação é também considerado um dos principais parâmetros na caracterização da quitosana e é determinado por inúmeros métodos propostos na literatura, tais como, espectroscopia de infravermelho, de ultravioleta, de RMN, análises térmicas, CLAE e titulometria. Em grande parte dos trabalhos publicados a técnica de espectroscopia na região de infravermelho é a mais utilizada [MONTEIRO, 2000].

4. BREVE HISTÓRICO DA QUITINA E QUITOSANA

A quitina foi isolada pela primeira vez em 1811 pelo professor francês Henri Braconnot. Ele a descobriu em cogumelos, recebendo então a denominação inicial de fungina. O nome quitina foi dado por Odier, em 1823, que isolou esta substância insolúvel da armadura/carapaças dos insetos [SANDFORD *et al.*, 1989]. Em grego, quitina quer dizer túnica, envelope ou cobertura. Ele falhou em não detectar a presença de nitrogênio na quitina e errou em afirmar que se tratava de uma mesma substância anteriormente encontrada em plantas. Posteriormente, Odier também observou a presença da quitina na carapaça de caranguejo e sugeriu que ela seria o material básico na formação do

exoesqueleto de todos os insetos e possivelmente dos aracnídeos. Somente em 1843, Payen descobriu que a quitina continha nitrogênio em sua estrutura [CRAVEIRO *et al.*, 1999, MONTEIRO, 2000].

A quitosana foi descoberta em 1859, pelo professor C. Rouget, quando este pesquisador colocou em ebulição uma solução de hidróxido de potássio com quitina. O nome quitosana foi proposto em 1894 por Hoppe-Seyler pelo fato desta substância possuir mesma quantidade de nitrogênio que a quitina original.

Apesar da quitina ter sido descoberta há dois séculos, pesquisas e estudo de aplicações foram intensificados por volta de 1970, quando se percebeu o grande potencial de aplicação que apresentavam tanto a quitina quanto a própria quitosana. A quitosana foi produzida industrialmente pela primeira vez em 1971 no Japão e em 1986 quinze indústrias produzindo quitina e quitosana, em escala comercial, existiam naquele país. Atualmente, estes polissacarídeos têm sido consideravelmente pesquisados e suas aplicações são consideradas de elevado potencial para o século XXI. Acredita-se que num futuro bem próximo muitos materiais atualmente em uso vão perder seu lugar para estes biopolímeros por apresentarem certas vantagens tais como: custo baixo, quantidades abundantes na natureza e biodegradabilidade [MONTEIRO, 2000].

5. APLICAÇÕES DA QUITINA E QUITOSANA

Aplicações e características dos dois polímeros, quitina e quitosana, dependem fundamentalmente do grau de desacetilação e do tamanho da cadeia do polímero. Estes podem ser melhor controlados pelo processo enzimático de desacetilação utilizando enzimas específicas (desacetilases) ou microorganismos. Esta última seria uma opção muito atrativa de produção industrial da quitosana [MUZZARELLI, 2001].

Esses dois polímeros nativos ou quimicamente modificados ocupam uma extensa área de aplicação em vários tipos de indústrias, tecnologia e também na medicina devido às características físico-químicas significativas e convenientes.

Atualmente, as maiores aplicações da quitosana estão centralizadas na purificação de água, no processamento de alimentos e na quelação de íons metálicos. A tendência atual de aplicações industriais é para produtos com alto valor agregado, como cosméticos, agentes de liberação de fármacos no organismo, aditivos alimentares, membranas semipermeáveis e outros produtos farmacêuticos. Quitosana pode ser utilizada potencialmente em biotecnologia, podendo ser usada na forma de flocos, gel ou membrana na imobilização de células em meios de cultura [GOOSEN, 1997]. Membranas densas e porosas de quitosana foram obtidas por coagulação (neutralização com NaOH) das soluções de quitosana. As características das membranas podem variar dependendo do processo de obtenção e assim podem ser melhoradas. Bloqueando os grupos amina da membrana da quitosana com solução de glutaraldeído, pode-se mudar características mecânicas da membrana, tornando-as mais frágeis e sensíveis, mais hidrofóbicas e também restringindo a permeação de íons [BEPPU, 1999].

Em tratamentos de efluentes industriais a quitosana age como quelante para remoção de metais pesados e resíduos, podendo remover corantes e como clarificante de sucos. Em cosméticos, a quitosana faz parte da composição de pastas de dente, cremes para mãos e corpo, xampus, condicionadores e protetores solares [SYNOWIECKI & AL-KHATEEB, 1997]. Na agricultura, a quitosana pode ser usada como protetora de sementes e como estimulante do crescimento de microrganismos produtores de quitinases destruidoras de nematóides patogênicos e seus ovos [PETER, 2001]. Ela potencializa a germinação de sementes, além de ser um agente de encapsulamento para liberação lenta de nutrientes e adubos. A quitosana pode ser usada como um filme protetor biodegradável para embalagens de frutas e verduras para melhorar a sua conservação [SYNOWIECKI & AL-KHATEEB, 1997]. Neste caso, é um conservante ideal por suas características antifúngicas, também por induzir a produção de quitinase (enzima de defesa contra agentes agressores) e apresenta segurança para uso humano evidenciada por estudos toxicológicos [HIRANO & ITAKURA, 1990].

Formando um filme semipermeável sobre o fruto e modificando a atmosfera interna do tecido, a quitosana pode retardar o amadurecimento de frutas. Na indústria papelreira, a quitosana potencialmente poderia ser utilizada devido a capacidade de formar

filmes, aumentando a resistência mecânica e a impermeabilidade do papel. Ela também pode ser usada na curtição e no acabamento na fabricação de artefatos de couro. A quitosana é adicionada às rações de animais, promovendo melhor funcionamento intestinal e uma redução do colesterol total. A quitosana reduz o colesterol plasmático e triglicerídeos devido à habilidade de se ligar a eles e também reduzindo a absorção intestinal destes lipídeos [KOIDE, 1998].

Foi verificada a eficiência para confecção de biomateriais como membranas renais, pele artificial, lentes de contato e outros produtos. No tratamento e regeneração de ferimentos (hemostáticos), a quitosana é aplicada na forma de bandagens, que, além de oferecer mais rápida cicatrização de ferimentos e abscessos, protege contra infecções por *Staphylococcus* [GOOSEN, 1997]. Quitosana, como agente antiácido natural, solubiliza-se na presença do ácido gástrico estomacal, capturando íons H^+ do meio e assim retirando o excesso de ácido gástrico do estômago elevando o pH. Devido à sua ação antiácida também eleva o pH da região bucal, onde atua ligando-se às bactérias que causam a placa dentária e, conseqüentemente, a cárie e assim prevenindo ambos [GOOSEN, 1997]. O resumo das aplicações está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Resumo das principais aplicações da quitina e da quitosana

ÁREA DE APLICAÇÃO	DESCRIÇÃO / EXEMPLO / EFEITO
Tratamento de água	➤ Quelante de metais pesados ➤ Floculante/Coagulante na remoção de corantes, proteínas, pesticidas, fenóis e PCB's de efluentes ➤ Filtração
Aditivos de cosméticos	➤ Produtos dentários (inibe a formação de placas dentárias) ➤ Xampus e condicionadores ➤ Loções e cremes protetores
Agricultura	➤ Proteção bactericida de sementes ➤ Liberação agroquímica controlada ➤ Estabilizante de frutas e verduras perecíveis (pós colheita)
Indústrias de filmes	➤ Controle de temperatura e taxa de respiração das frutas (permeabilidade controlada) ➤ Controle de liberação de substâncias antimicrobianas ➤ Controle de liberação de antioxidantes ➤ Controle de liberação de nutrientes, condimentos e drogas
Medicina / Farmácia	➤ Efeito bactericida/antiviral ➤ Regeneração de ferimentos e lesões ➤ Agente cicatrizante ➤ Liberação controlada de drogas ➤ Materiais anticoagulantes de sangue (heparinoides) ➤ Regenerador de estrutura óssea ➤ Antiácido, redução do nível de ácido úrico ➤ Agente antigástrico ➤ Efeito hipocolesterolêmico ➤ Auxiliar no controle da pressão arterial (hipotensor) ➤ Pele artificial, lentes de contato
Alimentícia / Nutricional	➤ Estabilizante de aromas e cores ➤ Estabilizante (absorvedor) de gorduras em preparações de alimentos ➤ Conservante e espessante natural ➤ Aditivos em alimentos para peixes e animais domésticos ➤ Fibra dietética ➤ Redução de absorção de lipídios e de colesterol LDL
Biotecnologia	➤ Agente imobilizante de microrganismos, enzimas, células ➤ Meio de troca iônica ➤ Cromatografia ➤ Membranas artificiais ➤ Agente antimicrobiano (bactericida, fungicida)

Fontes: GOOSEN 1997, MUZZARELLI *et al.*, 2001

6. HIDRÓLISE QUÍMICA E ENZIMÁTICA DA QUITOSANA

A hidrólise da quitosana resulta em despolimerização da cadeia polimérica pela clivagem das ligações β -(1-4)-glicosídicas. A despolimerização da quitosana aumenta a sua solubilidade em água e também reduz a viscosidade da solução [SHIN-YA *et al.*, 2001], facilitando a aplicação dos materiais da quitosana em várias áreas.

A hidrólise pode ser conduzida pelo uso de ácidos inorgânicos ou orgânicos (hidrólise química) ou pela utilização de enzimas hidrolíticas específicas ou não específicas (hidrólise enzimática). A hidrólise química apresenta algumas desvantagens tais como baixo rendimento no produto, condições severas da hidrólise e modificações químicas do anel da glicose e outros. A hidrólise enzimática não apresenta estas desvantagens pois permite a quebra da quitosana em condições brandas [ILYINA *et al.*, 1999].

A hidrólise com ácidos inorgânicos normalmente é realizada com ácido clorídrico concentrado e aumento da temperatura na reação produzindo oligômeros de menor cadeia [HOROWITZ *et al.*, 1957, LEE *et al.*, 1999]. Foram também descritos na literatura a utilização de ácido fluorídrico [BOSSO *et al.*, 1986] e ácido fosfórico [HASEGAWA *et al.*, 1993].

Em contraste com a hidrólise ácida, a hidrólise enzimática da quitina e quitosana por quitinases e quitosanases, tem maior possibilidade de controle das variáveis de produção. Quitinases (3.2.1.14) e quitosanases (3.2.1.132) pertencem ao grupo das hidrolases, atuantes sobre a ligação β -(1-4)-glicosídica dos polímeros, originando oligossacarídeos de menor massa molar [DIXON & WEBB, 1979]. Um tipo catalisa ruptura de final redutor da cadeia de glicosamina (tipo quitosanase) e outro catalisa a ruptura de final redutor de N-acetil glicosamina (tipo quitinase). Portanto, o grau de desacetilação é fundamental para o tipo de ação da enzima no polímero da quitosana [SHIN-YA, 2001]. O complexo de enzimas quitinolíticas pode ser observado em microrganismos marinhos e terrestres, plantas e animais. A produção e isolamento de enzimas quitosanólíticas foi observada para várias bactérias especialmente da espécie *Bacillus*.

A ação hidrolítica não específica sobre a quitosana tem sido descrita na literatura como uma alternativa efetiva com respeito a obtenção de oligossacarídeos e de polímeros de menor massa molar e, ao mesmo tempo, de custo relativo menor em comparação às enzimas específicas. Foi evidenciada a atividade hidrolítica sobre a quitosana para as enzimas papaína (de origem vegetal), lipase, celulase, pectinase, glucanase e protease (de origem microbiana) [PANTALEONE *et al.*, 1992; MUZZARELLI *et al.*, 1994, 1995; IZUME *et al.*, 1992]. A atividade hidrolítica sobre a quitina foi evidenciada somente para lisozima [KURITA *et al.*, 1992, 2000] e celulase [SASHIWA *et al.*, 2001]. A tabela 2 descreve os principais trabalhos relacionados a hidrólise enzimática destes dois polímeros.

A potencialidade da lisozima com respeito a degradação de quitinas e quitosanas foi apresentado por KURITA *et al.* [2000]. O ataque enzimático parece ser mais efetivo para quitinas com GD 0,57, apresentando baixa atividade para quitinas (GD 0,11) e quitosanas (GD 0,97).

ZHANG *et al.* [1999] descreveram a degradação da quitosana via utilização de uma mistura complexa de enzimas constituída de celulase, α -amilase e proteinase. Os resultados sugeriram que a mistura teria potencial de hidrolisar quitosanas e obter oligômeros com grau de polimerização até dezessete unidades monoméricas ($M_w \approx 3400$ Da).

A atividade da papaína sobre a quitosana em forma de lactato (10g/l) a 50°C e pH ácido promoveu o decréscimo de 94% da viscosidade da solução submetida ao ataque enzimático [MUZZARELLI *et al.*, 1994]. Este grupo sugeriu que a clivagem do polímero produzia frações poliméricas menores pela ação da papaína. Não foi descrita na literatura a potencialidade da papaína para a produção de quito oligômeros.

TERBOJEVICH *et al.* [1996] indicaram que a ruptura polimérica no sistema descrito anteriormente acontece entre ligações heterogêneas do tipo GlcNAc-GlcN, denotando uma forma de ataque seletivo à cadeia polimérica. Apoio a essa hipótese advém da indiferença da papaína frente à quitina, material no qual a papaína pode ser imobilizada [FINLEY *et al.*, 1977] e pela indiferença também frente às quitosanas totalmente desacetiladas [YALPANI & PANTALEONE, 1994].

GRIGOLON [2001] mostrou que a papaína livre tem a maior atividade sobre a quitosana nas condições de pH 5,3 e temperatura 54°C, próximas às suas condições ótimas de atividade proteolítica. Nestas condições, a quitosana apresenta decréscimo de 64% da viscosidade depois de 4 horas de tratamento comparando com solução controle. Com papaína imobilizada o decréscimo da viscosidade foi de 55% nas mesmas condições. Para tratamentos com papaína imobilizada a melhor condição observada foi em pH 3,2 e temperatura 50°C onde o decréscimo de 72% da viscosidade foi observado depois de 4 horas. Utilizando três cargas diferentes de papaína imobilizada em quitina (13, 54, 64 mg proteína/g quitina), foi observado que utilização da menor carga foi mais eficiente na redução da viscosidade das soluções da quitosana. Foi sugerido que as cargas maiores das enzimas imobilizadas compõem camadas múltiplas na superfície do suporte impossibilitando a ação da enzima.

Tabela 2: Resumo dos trabalhos publicados com várias enzimas aplicadas em hidrólise enzimática das quitinas e quitosanas.

Enzima	Fonte	Substrato	Solvente	Resultados obtidos (qualitativos e quantitativos)	Referência
Papaína	<i>Carica papaya</i>	Quitosana GD 0,85 (5 g/l)	Ácido acético 5%	Redução de viscosidade: 98% (T=25°C, pH 3,6, 18h)	Pantaleone, 1992
Papaína (0,45g/l)	<i>Carica papaya</i>	Quitosana GD 0,85 (19 g/l)	Ácido lático 1%	Redução de viscosidade a) 48,7% (T=25°C, pH 3,2, 60 min) b) 75,7% (T=50°C, pH 3,2, 60 min) (* velocidade inicial independente da variação da temperatura, mas altamente dependente da concentração inicial do substrato)	Muzzarelli, 1994
Papaína (c=0,5g/l)	-	Quitosana GD 0,49 e 0,80 (reacetilada)	Ácido lático 1%	Redução da MM: 80,2% (T=20°C, pH 4,7, 10min); GD 0,49 68,7% (T=20°C, pH 4,7, 10min); GD 0,80	Terbojevich, 1996
Papaína (0,45g/l)	<i>Carica papaya</i>	Quitosana GD 0,80 (10 g/l)	Ácido lático 1%	a) Redução da viscosidade: 64% (T=54°C, pH 5,3, 4h) b) Redução de MM: 32% (controle 2%) (T=50°C, pH 3,2, 4h)	Grigolon, 2001
Papaína	-	Quitosana GD 0,80	HCl	Cinética da hidrólise (T=25°C, pH 3,2, 10 min). a) Velocidade inicial aumenta com aumento da concentração do substrato. b) Em comparação à outras enzimas a papaína mostra velocidade inicial muito maior (25 vezes maior do que da lisozima).	Muzzarelli, 2001
Papaína	<i>Carica papaya</i>	Quitosana GD 0,80 e 0,40-0,50 (30 g/l)	Ácido lático	Redução da viscosidade: 35% (T=25°C, pH 3,2, 60 min); GD 0,80 94% (T=25°C, pH 3,2, 60 min); GD 0,40-0,50	Muzzarelli, 2002

Enzima	Fonte	Substrato	Solvente	Resultados obtidos (qualitativos e quantitativos)	Referência
Papaína imobilizada	<i>Carica papaya</i>	Quitosana GD 0,85 (10 g/l)	Ácido láctico 1%	Redução de viscosidade a) 32 % (T=25°C, pH 3,2, 10min) b) 72 % (T=50°C, pH 3,2, 10min) (Papaína imobilizada não perdeu atividade em 168h de uso)	Muzzarelli, 1994
Papaína imobilizada	<i>Carica papaya</i>	Quitosana GD 0,80 (10 g/l)	Ácido láctico 1%	a) Redução da viscosidade: - 55% (T=54°C, pH 5,3, 4h) - 72% (T=50°C, pH 3,2, 4h) b) Redução de MM: 25% (controle 2%) (T=50°C, pH 3,2, 4h)	Grigolon, 2001
Lipase	<i>Aspergillus niger</i>	Quitosana GD 0,85	Ácido acético 5%	Redução de viscosidade: 100% (T=25°C, pH 3,6, 18h)	Pantaleone, 1992
Lipase (c=0,5g/l)	-	Quitosana GD 0,49 e 0,80 (5 g/l)	Ácido láctico 1%	Redução de MM: 71,0% (T=20°C, pH 4,7, 10min); GD 0,49 (reacetilada) 56,5% (T=20°C, pH 4,7, 10min); GD 0,80	Terbojevich, 1996
Lipase (c=0,45 g/l)	<i>Gérmen de Trigo</i>	Quitosana GD 0,85 (12 g/l)	Ácido láctico (1%)	Redução de viscosidade: a) 48% (T=25°C, pH5,8, 10min) b) 71% (T=37°C, pH5,8, 10min) c) 93% (T=50°C, pH5,8, 10min)	Muzzarelli, 1995, 1997
Lisozima (c=0,45 g/l)	<i>Gema de ovo</i>	Quitosana-metil pirolidinona (23,5 g/l)	-	Redução da viscosidade: 18% (T=25°C, pH5,3, 10min) 67% (T=50°C, pH5,8, 10min)	Muzzarelli, 1992
Lisozima	<i>Gema de ovo</i>	Mercapto-Quitina	Tampão acetato	Os dois mercapto derivados da quitina mostraram-se mais suscetíveis a hidrólise do que a própria quitina (T=36°C, pH 4,5, 24h).	Kurita, 1992

Enzima	Fonte	Substrato	Solvente	Resultados obtidos (qualitativos e quantitativos)	Referência
Lisozima	<i>Gema de ovo</i>	Quitosana GD 0,40 e 0,58	Tampão acetato 1%	Taxa de degradação inicial foi 5 vezes maior em pH 4,5 comparado ao pH 7,0	Nordtveit, 1996
Lisozima	<i>Gema de ovo</i>	β -quitina, α -quitina GD 0,11-0,97	Tampão acetato	Forma β é mais suscetível a degradação do que a forma α (T=36°C, pH 4,5) e a degradação se mostra máxima com GD 0,50	Kurita, 2000
Pectinase	<i>Aspergillus niger</i>	Quitosana GD 0,85 (5 g/l)	Ácido acético 5%	Redução de viscosidade: 99% (T=25°C, pH 3,6, 18h)	Pantaleone, 1992
Pectinase	<i>Comercial - Merck</i>	Quitosana GD 0,46-0,98 (10 g/l)	Tampão acetato	Aumento na velocidade inicial da hidrólise com diminuição de GD da quitosana (T=40°C, pH 5,9, 2h)	Shin-ya, 2001
Celulase	<i>Trichoderma viride</i>	Quitosana GD 0,85 (5 g/l)	Ácido acético 5%	Redução de viscosidade: 99% (T=25°C, pH 3,6, 18h)	Pantaleone, 1992
Celulase	<i>Trichoderma viride</i>	Quitosana GD 0,95 (30 g/l)	Tampão acetato	Rendimento na obtenção de oligômeros (T=50°C, pH 5,6, 6h): 26% (GP 2-4), 63% (GP 5-8), 11% (GP > 8)	Muraki, 1993
Celulase	<i>Trichoderma viride e Acremonium</i>	β -quitina (10 g/l)	Tampão acetato 0,1M	Hidrolisa quitina devido a presença de endo- e exo-quitinases. Produção de GlcNAc com rendimento de 26-29% (T=37°C, pH ,8, 4dias) em comparação as outras enzimas (papaína, lipase, pectinase, hemicelulase) mostrando rendimento de 2-7%.	Sashiwa, 2001
Hemicelulase	<i>Aspergillus oryzae</i>	Quitosana GD 0,85 (5 g/l)	Ácido acético 5%	Redução de viscosidade: 99% (T=25°C, pH 3,6, 18h)	Pantaleone, 1992

Enzima	Fonte	Substrato	Solvente	Resultados obtidos (qualitativos e quantitativos)	Referência
Quitinase	<i>Serratia marcescens</i>	Quitosana GD 0,85 (5 g/l)	Ácido acético 5%	Redução de viscosidade: 95% (T=25°C, pH 3,6, 18h)	Pantaleone, 1992
Misturas: Cellulase, α -amilase e proteínase	<i>Oriental Reagent Co. (China)</i>	Quitosana GD 0,76	Ácido acético 2%	Taxa de decréscimo da viscosidade da solução foi rápida e redução na MM foi de $1,5 \times 10^6$ para 1×10^4 (99%), obtendo oligômeros com GP até 17, (T=40°C, pH 5,6, 40min).	Zhang, 1999
β -glucosidase	-	Quitosana GD 0,76-0,92 (7 g/l)	Tampão acetato 0,1M	Preparação enzimática de β -glucosidase é efetiva devido a quitinase presente na mistura. Menor MM e GD da quitosana - mais suscetível a hidrólise com a maior velocidade inicial. Aumento na concentração do substrato aumenta velocidade inicial. Redução de viscosidade 63% (10% controle), (T=30°C, pH 5,0, 5h).	Zhang, 2001
Quitina-desacetilase	<i>Mucor rouxii</i>	Quitosana GD 0,68 (12 g/l)	Tris-HCl 0,1M	Quitina-desacetilase com atividade quitosanólítica. Redução da viscosidade: 95% (13% controle, 68% adição de 10mM Zn(II)-inibidor) (T=50°C, pH 5,8, 5h) 100% (T=25°C, pH 5,8, 250h); em tampão acetato 0,1M	Rzodkiewicz 2001
Quitinases	<i>Streptomyces kurssanovi</i>	Quitosana GD 0,85 (10 g/l)	Tampão acetato de sódio 0,2M	Redução da viscosidade: a) 83% (25°C, pH 5,0, 40min) b) 86% (37°C, pH 5,0, 40min) c) 98% (45°C, pH 5,0, 40min)	Ilyina, 1999

6.1. Papaína

A papaína é uma cisteína protease extraída do látex de frutos não maduros de *Carica papaya*. É classificada como uma hidrolase e tem aplicação vasta na indústria de alimentos devido à sua forte ação proteolítica, tendo como principais aplicações a clarificação da cerveja, o amaciamento de carnes e o processamento de couro em curtumes.

A papaína, na sua forma cristalina, apresenta grande estabilidade, sendo estável na faixa de temperatura de 30 a 75°C, com temperatura ótima em 60°C, e pH de estabilidade entre 3,0 a 9,5 com pH ótimo em torno de 6,5. O ponto isoeletrico da papaína é 8,75 [ARNON, 1970].

A enzima pode ser mantida em solução de NaCl a 4°C por meses sem perda de atividade detectável. A propriedade mais surpreendente desta enzima é a sua estabilidade frente a altas temperaturas e quando em contato com solventes orgânicos [ARNON, 1970]. Como uma enzima sulfidrílica, a papaína necessita de um grupo sulfidrílica livre para a sua atividade catalítica. Ela é reversivelmente inativada na presença do ar e metais pesados. A ativação ótima da papaína ocorre pela adição simultânea de agentes redutores fracos, como a cisteína, sulfetos e cianida, e de um agente sequestrante de metais, como EDTA. Alternativamente pode ser utilizado o 2,3-dimercaptopropanol, agente que combina as duas propriedades necessárias para a ativação da enzima [SLUYTERMAN, 1967].

6.2. Imobilização de enzimas

O termo “imobilização” não quer dizer que a enzima perde completamente sua mobilidade molecular, mas que parte desta está fixada em um suporte insolúvel [CHAPLIN & BUCKE, 1992]. É necessário que a enzima, quando imobilizada, mantenha máxima atividade catalítica, uma vez que a ligação com o suporte pode ocasionar o comprometimento do sítio ativo por ligação intra-sítio ou deformação deste, promovendo conformações não ativas.

De acordo com CHAPLIN & BUCKE [1992] existem cinco principais métodos de imobilização de enzimas em suportes: 1) por adsorção, 2) por ligação iônica, 3) por ligação covalente, 4) por aprisionamento e 5) compartimentalização por membranas.

Imobilização por ligação covalente pode envolver a ativação química do suporte (acoplamento de um grupo funcional reativo através de reação química) bem como o comprometimento de parte da cadeia lateral das enzimas. Neste método, as enzimas estão fortemente ligadas ao suporte e há pequena possibilidade de dissociação. Como as interações enzima/suporte são muito intensas, há a possibilidade da enzima sofrer mudança em sua conformação espacial, ocasionando a conseqüente diminuição ou perda total da atividade enzimática. As propriedades das enzimas imobilizadas são governadas pela interação das propriedades da enzima e do material usado como suporte para imobilização.

6.3. Quitina como suporte de imobilização de enzimas

A quitina e seus derivados têm sido utilizados como suporte de várias enzimas, por preencherem a maioria dos quesitos necessários para utilização como suporte. É um polissacarídeo inerte, hidrofílico, resistente, insolúvel em água e em praticamente todos os solventes. Sua estrutura apresenta grupos hidroxila e amina livre, que podem ser utilizados para a adsorção física de proteínas. Associada a um agente promotor de ligações cruzadas, como o glutaraldeído em concentrações entre 0,1 a 2%, a quitina se torna um suporte para ligação covalente de proteínas com alta capacidade e baixa taxa de dessorção.

Papaína foi inicialmente imobilizada em quitina para a utilização na indústria cervejeira, com o objetivo de clarificar a cerveja pós-fermentação [FINLEY *et al.*, 1977]. A turbidez da cerveja foi reduzida 70% em relação a inicial pelo tratamento com papaína livre e com complexo quitina-papaína em batelada.

GRIGOLON [2001] determinou área superficial da quitina, com granulometria entre 0,35 e 0,50 mm, utilizando equipamento de fisiossorção de N₂, obtendo um valor de 11,5 m² g⁻¹. Quitina foi utilizada como suporte para imobilização da papaína com ligações

cruzadas promovidas pelo glutaraldeído. A imobilização da papaína na superfície da quitina (13 mg proteína/g quitina) reduz a área superficial a $3,2 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. Em termos do volume dos poros foi observada uma redução de $56,3 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ para $19,1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$. Pela análise da superfície da quitina por microscopia eletrônica de varredura, GRIGOLON [2001] observou que a mesma em estado natural apresenta-se como uma rede fibrosa e que após a imobilização da papaína na quitina a superfície torna-se mais compactada e homogênea com poros bem definidos da ordem de $0,01 \text{ }\mu\text{m}$.

7. MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR

A massa molecular (MM) da quitina encontrada em crustáceos é normalmente acima de $1 \times 10^6 \text{ Da}$, nos fungos não foi avaliada e nas leveduras é estimada entre $2,4 \times 10^4$ e $3,5 \times 10^4 \text{ Da}$ (correspondendo a 120-170 GlcNAc unidades monoméricas) [PETER, 2002a]. A MM da quitosana comercializada (obtida com desacetilação da quitina) varia entre 1×10^5 a $12 \times 10^5 \text{ Da}$ e é na mesma faixa para quitosanas isoladas de *Mucoraceae* [PETER, 2002a], entretanto, MM é um parâmetro difícil de ser determinado com precisão.

As dimensões das cadeias dos polímeros podem ser expressas de várias maneiras: massa molar, grau de polimerização, raio de giro, volume hidrodinâmico, etc. Além disso, devido à existência de cadeias poliméricas de tamanhos diferentes (polidispersão), pode-se gerar MM médias ponderadas por massa (M_w) e por número (M_n) [BEPPU *et al.*, 1999].

Na presença de soluções aquosas diluídas de ácidos, a quitosana comporta-se como polieletrólito, causando o surgimento de interações repulsivas eletrostáticas entre os grupos amina ionizados ao longo da cadeia polimérica. Assim, para caracterizar o comportamento desse polímero em solução é importante selecionar o sistema de solvente mais apropriado [CANELLA & GARCIA, 2001]. A MM pode ser determinada por osmometria de membrana, medidas de espalhamento de luz (EL), cromatografia de permeação em gel (CPG) ou cromatografia por exclusão e através da medida de viscosidade.

7.1. Viscosimetria

O método mais comum e mais usado para determinação da MM relativa é por medida da viscosidade, devido a simplicidade do método e rapidez.

Segundo PETER & FRANCO, [2001] a viscosidade intrínseca é medida utilizando-se o viscosímetro Ubbelohde ou Cannon-Fenske. Medindo-se o tempo de escoamento das soluções e depois utilizando a equação (1), calcula-se viscosidade intrínseca:

$$\eta_i = \frac{(t - t_0)/t_0}{C} \quad (1)$$

η_i – viscosidade intrínseca

t – tempo de escoamento da solução da quitosana

t_0 – tempo de escoamento do solvente

C – concentração da quitosana

Medindo a viscosidade intrínseca das soluções pode-se determinar a MM dos polímeros. Utilizando-se a equação de Mark-Houwink-Sakurada (2) calcula-se a massa molar [PETER & FRANCO, 2001]:

$$\bar{M}_w = \sqrt[a]{\frac{\eta_L}{K}} \quad (2)$$

$\bar{M}_w$ – massa molar ponderada

η_L – número de viscosidade limitante ($C=0$)

K, a – constantes de Mark-Houwink

Este método pode ser utilizado no controle da hidrólise da quitosana para observação da variação dos valores de viscosidade. A hidrólise enzimática ou química promove a diminuição da viscosidade de soluções da quitosana pela ruptura da cadeia polimérica [MUZZARELLI *et al.*, 1994]. Avaliando a viscosidade das soluções antes e

depois dos experimentos de hidrólise pode-se determinar o efeito da hidrólise. De acordo com a redução da viscosidade, a diminuição do tamanho das moléculas pode ser calculada. Assim, com um método simples, o efeito viscosimétrico é observado pela diminuição do tempo de escoamento livre da solução polimérica antes e após hidrólise [GRIGOLON, 2001].

7.2. Cromatografia de permeação em gel (CPG)

A cromatografia de permeação em gel, um tipo de cromatografia líquida, é predominantemente usada para análises de compostos de alta MM, incluindo polímeros orgânicos e biopolímeros. Devido à dificuldade em se determinar MM de polímeros aquosos, principalmente os de elevada MM, a CPG apresenta propriedades desejáveis, tais como simplicidade da técnica e possibilidade de separar a substância com MM menor que 1000 Da ou maior que 10^6 Da, variando a matriz do gel [COLLINS *et al.*, 1997, RODRIGUES, 1997]. Esta técnica é baseada na separação de componentes de variada massa molar presentes na amostra de polímero conforme o tamanho de cada molécula, o qual é determinado pelo seu volume hidrodinâmico. A solução de polímero é introduzida em uma coluna contendo partículas porosas de estrutura rígida ou semi-rígida como recheio (ou fase estacionária). O soluto é o polímero a ter MM determinada, o solvente constitui a fase móvel que preenche o interior dos poros do recheio. As macromoléculas maiores não entram nos poros, passando por fora dos mesmos e atravessam a coluna mais rapidamente. As macromoléculas menores penetram nos poros e percorrem a coluna mais lentamente. Por esse motivo, o processo é também conhecido como cromatografia de exclusão por tamanho, sendo a única cromatografia com retenção mecânica e cuja coluna é recheada com material inerte com poros de tamanho controlado. Moléculas grandes emergem da coluna mais cedo do que as pequenas (Figura 5) [COLLINS *et al.*, 1997].

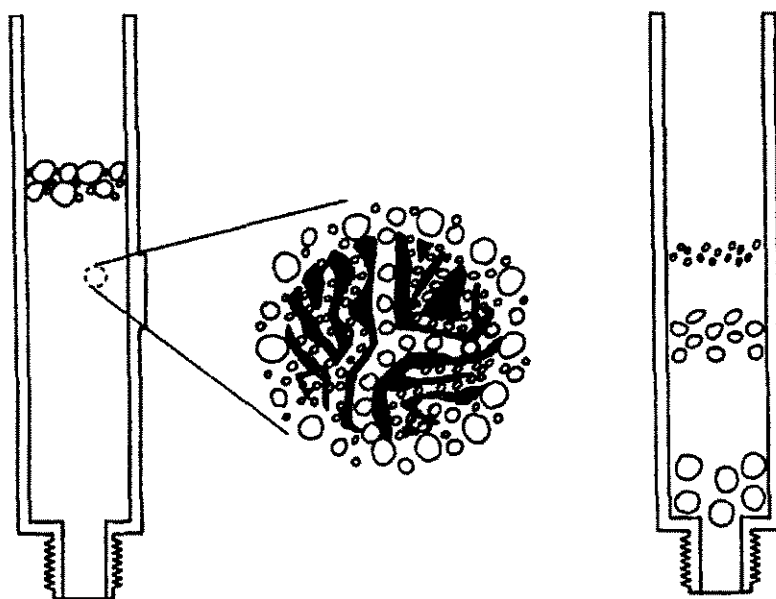


Figura 5: Representação gráfica do princípio de cromatografia por exclusão.

A fase estacionária pode ser um gel hidrofílico na forma de partículas porosas (como o polímero de dextrana) e a fase móvel, um solvente aquoso salino. Géis hidrofóbicos como o estireno-divinilbenzeno com ligação cruzada e um solvente orgânico podem ser utilizados para análise de polímeros sintéticos. O líquido na superfície (a fase móvel) e no interior das partículas são os mesmos neste caso [Cecchi, 1999].

Para polímeros aquosos a polaridade do solvente (utilizado também como fase móvel) na determinação da massa molar média por CPG, deve ser suficientemente alta para [CANELLA & GARCIA, 2001]:

- eliminar interações eletrostáticas entre o polieletrólito e a fase estacionária, evitando os efeitos de exclusão e inclusão iônica, troca iônica e adsorção;
- reduzir ao máximo as repulsões eletrostáticas intermoleculares estabilizando o volume hidrodinâmico do polímero.

A massa molar não pode ser determinada diretamente usando esta técnica pois o sistema precisa ser calibrado para diferentes tempos de retenção (t_r) e massas molares. A calibração do CPG para um sistema polímero-solvente precisa estabelecer a relação entre volume de retenção (V_r) e massa molar de fração monodispersa de polímero [TERBOJEVICH & COSANI, 1997]. Recentemente, o efeito da natureza química dos padrões de calibração sobre a determinação de MM por CPG foi estudado. No caso da quitosana, alguns trabalhos mostram que os melhores resultados são obtidos através do uso de padrões de quitosanas para calibração. Entretanto, a maior dificuldade surge pela inexistência desses padrões comerciais [CANELLA & GARCIA, 2001].

7.3. Espalhamento de luz (EL)

A técnica de EL consiste em atravessar um feixe de raio laser através de uma solução polimérica previamente filtrada para eliminação de poeiras ou materiais que interfiram na medida. A luz será então espalhada e detectada em diferentes ângulos. Amostras com baixa MM necessitam de um sistema composto de somente três detectores e amostras com elevada MM necessitam medidas simultâneas ou em série com 15 a 18 ângulos. Uma vantagem da técnica de EL em relação à CPG com detector de índice de refração (CPG-IR) é que qualquer solvente puro pode ser utilizado para calibração de EL. Padrões previamente calibrados por EL são necessários para CPG rigorosa [Rodrigues, 1997].

Com este método determina-se o valor absoluto da massa molar de um polímero, ao contrário do CPG-IR onde a massa molar é determinada empiricamente com relação ao volume hidrodinâmico da molécula. A intensidade de luz espalhada da solução polimérica é uma função do ângulo de espalhamento (θ), da concentração do polímero e da MM.

A determinação da MM usando EL é realizada em três etapas [RODRIGUES, 1997]:

- calibração do equipamento (arranjo experimental) com solvente puro;
- normalização da amostra, dn/dc (é necessário conhecer a variação do índice de refração (dn) em relação a variação da concentração (dc) da solução polimérica cuja MM absoluta será determinada). No caso da inexistência dos dados na literatura, o dn/dc deve ser determinado experimentalmente;
- Preparo da amostra com precisão e ausência de interferentes.

A CPG conectada ao detector EL *on-line* é considerada a melhor técnica para avaliação rápida e precisa de massa molar de polímero e distribuição da mesma [BERI *et al.*, 1993].

CAPITULO 2:

CHITOSAN HYDROLYSIS EVALUATED BY MOLECULAR WEIGHT AND VISCOSITY REDUCTION

ABSTRACT

Chitosan is obtained by deacetylation of chitin which is extracted from shells of shrimp, lobster, etc. It is being used in various fields due to its properties. Lately chitosans with a wide range of low molecular weights are being used in the fields of medicine and pharmaceuticals. The use of papain to obtain chitosans with reduced molecular weight was studied. Free and immobilized papain were used for the enzymatic hydrolysis of chitosan. Chitin was used as a support for papain immobilization. Experiments were done using batch reactors at controlled pH and temperature. By using viscosity measurements, gel permeation chromatography and light scattering techniques the progression of hydrolysis was studied.

NOMENCLATURE

BSA	Bovine serum albumin
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetate
GlcN	Glucosamine
GlcNAc	N-acetyl-glucosamine
GPC	Gel Permeation Chromatography
GPC-RI	Gel Permeation Chromatography with Refractive Index detector
GPC-RI- MALLS	Gel Permeation Chromatography with Refractive Index detector and Multiple Angle Laser Light Scattering detector
IC	Immobilized Complex
IC _B	BSA Immobilized Complex
IC _C	Chitin Immobilized Complex
IC _P	Papain Immobilized Complex
MALLS	Multiple Angle Laser Light Scattering
M _w	Molecular Weight
R _G	Gyration Ray (beam)
θ	Angle of the Scattered Light
RI	Refractive Index

1. INTRODUCTION

Chitin is a structural polysaccharide found in the exoskeleton of marine crustaceans (crab shell, shrimp) and insects. It is also widely found in fungi, occurring in

Basidiomycetes, *Ascomycetes*, and *Phycomycetes*, where it is a component of cell walls and structural membranes of mycelia, stalks, and spores [PETER, 2002a]. It is insoluble in water. It is the second most abundant polysaccharide in nature, right after cellulose and is made of β -(1-4)-linked GlcNAc units. Chitosan, chitin's derivative obtained commercially by (partial) N-deacetylation, is a linear polysaccharide made of GlcN and GlcNAc units that are linked through β -(1-4) glycoside bonds. Chitosan is soluble in weak organic and mineral acids. It is positively charged at low pH values and precipitates from the solution at pH higher than 6.0.

Chitin and chitosan are the most attractive biopolymers because of their unique physicochemical and biological properties and were extensively studied over the last decade. Much attention has been paid recently to their potential applications in various fields [KURITA *et al.*, 2000]. Chitosan plays a regulatory role in eucaryotic organisms, in which it can either activate or suppress specific genes. Oligomers from chitosan exhibit also immunoactivity and bacteriostatic activities. Chitosan derivatives are believed to have potential applications in biomedical and food industries and currently have attracted growing interest. The development of viable controlled process for the hydrolysis of chitosan is also of major interest [PANTALEONE *et al.*, 1992].

Chitin and chitosan can be specifically depolymerized by enzymes, such as chitinase and chitosanase [SANTOS *et al.*, 2001, CHENG *et al.*, 2000]. Because of present unavailability of such enzymes in bulk quantities and high costs, other nonspecific enzymes [MUZZARELLI *et al.*, 1999] including lipase, lysozyme, cellulase, pectinase and papain [GRIGOLON, 2001, GRIGOLON *et al.*, 2001, MUZZARELLI, 1997, MUZZARELLI *et al.*, 1994, 1995, 2002, PANTALEONE *et al.*, 1992, TERBOJEVICH *et al.*, 1996, ZHANG *et al.*, 1999, 2001] were already tested for their hydrolytic activities on chitosan. They were used in free solution and also in immobilized form, that allows reuse of the enzyme and easier application in the process.

Papain is one of the most attractive enzymes because of its wide acceptance and low cost. It is already used in food industry on a large scale and has well known characteristics. Its isoelectric point is at pH 8.75 and the active site includes histidine 159,

tryptophan 177 and cysteine 25. Its molecular weight is in the range of 21,000 Da [ARNON, 1970].

The extent of hydrolysis of chitosans and also of other polysaccharides can be measured using various techniques. Depolymerization of biomolecules is determined by molecular weight changes. This can be done directly or indirectly using relative and absolute methods. In size exclusion chromatography (SEC) or gel permeation chromatography (GPC), molecules are separated according to their size. The separation takes place in chromatographic columns filled with porous gels. A sample of dilute polymer solution is introduced into a solvent stream flowing through the columns and the polymer molecules can diffuse into the internal pore structure of the gel to an extent depending on their size. Larger molecules can enter only in a small fraction of the internal portion of the gel or are completely excluded. Therefore they spend less time in the column and flow faster along the column. However smaller molecules enter into the internal gel pore structure and are delayed in the column. An elution curve is obtained by plotting intensity of the detected electric signal (mV) against the retention time for different molecular sizes [TERBOJEVICH *et al.*, 1997]. The molecular weight can not be determined directly, but only after calibration of the system in terms of the retention times. A particular molecular weight range of standards has to be chosen in order to suit the separation target. Molecular weight of polymers obtained with this measurements is relative as it is proportional to the molecular diameter. The same goes for viscosimetric measuring technique. Viscosity measurements are simple and sometimes there is no need to calculate molecular weight if the aim is to evaluate the progress of polymer hydrolysis. Viscosity reduction (%) in the hydrolysis process indirectly indicates the reaction progress.

When a MALLS detector is used in GPC analysis, an absolute value of molecular weight can be measured. The intensity of light scattered from a polymer solution is a function of scattering angle and polymer concentration. The angular dependence of the scattered light arises from interference of light rays with different parts of the same polymer molecule. Light interference gives information on the molecular size and is expressed as R_G and is independent on the molecular weight. As the angle θ approaches zero this effect

disappears. After extrapolation to $\theta=0$ the correct value of molecular weight is obtained regardless of molecular size [TERBOJEVICH *et al.*, 1997].

According to PETER [2002b], calibration of the chromatographic system with dextrans may provide erroneous data as the M_w of chitosan is overestimated, especially when small quantities of the polymers are injected. GPC in combination with MALLS, an absolute molecular-weight determining detector, provides more reliable values of polydispersity and is regarded as an accurate technique for determination of polymer molecular weights and their size distribution.

Papain immobilized on chitin was already used by various authors who observed hydrolytic effect on chitosan and rapid initial kinetics [MUZZARELLI *et al.*, 1994, 2002, TERBOJEVICH *et al.*, 1996 and GRIGOLON 2001]. They focused mainly on long treatments of chitosan solutions with papain (hours, days). The aim of this present work was to obtain a more detailed insight into the hydrolytic process of chitosan using papain as an nonspecific enzyme analyzing more specifically the initial step of chitosan modification.

2. MATERIALS & METHODS

Chitin (Batch n°: 68H-7014) used as support was purchased from Sigma (St Louis, MO, USA) and only particles with size between 0.35 and 0.50 mm were used. Chitosan (Batch n°: TM 388, Food Grade 80, 60 mesh powder) with degree of deacetylation of 80% (DD 0.80) was kindly supplied by PRIMEX, Norway.

Papain from *Carica papaya* was supplied by Prozyn (São Paulo, Brazil). Papain samples (Batch n°: B-80091700 and J-007452401) used in experiments had proteolytic activity of 45,900 USP/mg, according to the manufacturer.

BSA – Bovine serum albumin, fraction V, 96% protein, from Sigma (St Louis, MO, USA) was employed as a model protein without any hydrolytic activity.

Dextran standards of molecular weights 2×10^6 ; 473,000; 65,282; 9,400 Da, used for GPC calibration were from Sigma (St Louis, MO, USA).

Software Millennium 32[®] GPC from Waters was used for processing data with GPC-RI method and software Astra 4.70.07. from Dawn-Wyatt with GPC-RI-MALLS method.

2.1. Immobilization procedure

Immobilizations were carried out according to the method described by FINLEY *et al.* [1977], modified by GRIGOLON [2001].

Seven and a half grams of chitin powder were suspended in 100 ml of 0.1 M phosphate buffer pH 7.6 and incubated at 4°C for 2 hours under constant stirring for fiber hydration. Separately 330 mg of papain were dissolved in 7.5 ml of activating solution (consisting of 50 mM cysteine, 5 mM EDTA and 1 μ M mercaptoethanol). Papain solution was then added to the chitin suspension and kept at 4°C for 30 minutes before adding 1 ml of 10% glutaraldehyde. Glutaraldehyde is the promoter of cross linking and therefore papain is covalently bound to chitin. The mixture was kept overnight (12 hours) under the same conditions. The papain immobilized complex (IC_P) was then filtered and suspended in a 3 M NaCl solution for 2 hours under stirring and then repeatedly washed with distilled water. The IC_P was stored in 0.08 M cysteine and 2 mM EDTA solution at 4°C [CHIOU *et al.*, 1987]. Other immobilized complexes were prepared by using the same method replacing papain with BSA (IC_B) and also by omitting it completely (IC_C).

2.2. Protein determination

Protein contents were analyzed using the Coomassie Brilliant Blue G250 colorimetric method [SEDMAK *et al.*, 1977]. Protein determination depends on the conversion between free and binded dye form, due to interaction of dye with the NH₃⁺ groups of proteins. A standard curve with BSA was used to quantify the amount of protein.

2.3. Hydrolysis experiments

A 1% (w/v) solution of chitosan was prepared by dissolving 400 mg of chitosan (DD 0.80) in 40 ml of 0.15 M lactic acid solution ($pK_a=3.86$) or 0.15 M acetic acid solution ($pK_a=4.76$). Experiments were carried out in jacketed glass reactors ($V=40$ ml) in batch mode, at 50°C and $\text{pH } 3.2 (\pm 0.1)$ when using lactic acid and $\text{pH } 4.0 (\pm 0.1)$ when using acetic acid. The condition of 50°C and $\text{pH } 3.2$ with lactic acid represented the maximum activity for both free and immobilized papain as determined by GRIGOLON [2001]. After the equilibrium temperature (50°C) was reached, the first sample (0 minutes) was collected and then 3.3 g of filtered immobilized complex (IC_P , IC_B or IC_C) was added to the reactor containing 33 ml of 1% (w/v) chitosan solution. Samples of 7 ml were collected after 1, 30 and 60 minutes, cooled down to 8°C and centrifuged ($15,000g$ for 1 minute). The viscosity of the samples were measured immediately after sampling.

2.4. Viscosimetry

Cannon-Fenske (No.200) viscosimeter was used for determination of the viscosity of samples at 25°C . Ten measurements of the same sample were made to evaluate the error of viscosimeter. Each different chitosan treatment (described in Table 1) was repeated at least twice and the average value was calculated.

2.5. GPC with RI detector (GPC-RI)

The chromatography system consisted of the following parts: two HPLC pumps model 515, auto sampler model 717, differential refractometer model 410 and an oven, all from Waters. A set of two columns, with inner-diameter of 7.8 mm and 300 mm length were attached in series (Ultrasphere 1000 and Ultrasphere 500 columns, with exclusion volumes of 1×10^6 and 8×10^4 , respectively). These columns are packed with hydroxylated poly-methylmethacrylate beads, according to the manufacturers. Dextran standards (Sigma,

St Louis, MO, USA), of molecular weights 2×10^6 ; 473,000; 65,282; 9,400 Da, were used for GPC calibration. Filtered and degassed acetate buffer (AcOH 0.33 M/ NaOH 0.1 M, pH 4.2) was used as a solvent for dextran standards (2.5 mg ml^{-1}) and as mobile phase in the columns. Samples collected during the hydrolysis experiments were diluted (10-fold) in this solvent and filtered through Millipore membranes ($0.45 \text{ }\mu\text{m}$) before injection. Injected volumes were $200 \text{ }\mu\text{l}$ and flow rate was 0.8 ml min^{-1} . Data was then processed using software Millennium 32[®] GPC also from Waters. The results of M_w presented are the average of two measurements.

2.6. GPC with RI and MALLS detector coupled on-line (GPC-RI-MALLS)

A set of two columns TSK-gel G3000 PW_{XL} and G6000 PW_{XL} (packed with cross-linked hydroxylated polyethers according to the manufacturers), attached in series, were used in the chromatographic system. On-line double detection included differential refractometer model 410 from Waters and MALLS photometer from Dawn-Wyatt (equipped with He-Ne laser, $\lambda_0=632.8 \text{ nm}$). The intensity of scattered light was measured at 11 different angles from 35 to 132° and the dn/dc -value used in all experiments was 0.172, according to Domard (unpublished work). Filtered and degassed ammonium acetate buffer (0.2 M, pH 4.5) was used as solvent and mobile phase in the columns. Samples collected along the experiments were diluted (10-fold) in the solvent and filtered through Millipore membranes ($0.45 \text{ }\mu\text{m}$) before injection in the column. Injected volumes were $100 \text{ }\mu\text{l}$ and flow rate was 0.5 ml min^{-1} . Data was then processed using software Astra 4.70.07. The results of M_w presented are of one measurement, but the number of repetition of treatments is shown in the table.

3. RESULTS

Various experiments were run in order to evaluate the modification of chitosan. Papain was immobilized on solid chitin (IC_P) by immobilization technique described earlier. Plain chitin (IC_C) which was also treated with the same immobilization procedure (without papain), and the model protein BSA (IC_B), which does not have any enzymatic activity, was also immobilized on solid chitin. They were prepared exactly according to the same procedure for the immobilization of papain, in order to evaluate other effects. The amount of immobilized protein on solid chitin was also determined in order to standardize the reagents concentration in each experiment. It was found that the amount of immobilized papain was 13 mg per 1 g of chitin and the amount of model immobilized BSA was 5 mg per 1 g of chitin. The experiments were grouped and numbered: 1-control, 2-immobilized papain, 3-free papain, 4-chitin and 5-immobilized BSA (Table 1). Immobilized complexes (IC) were filtered before using and 3.3 g of IC (35% ± 1% dry weight) were added to 33 ml of 1% chitosan solution. Protein concentration (papain) was 0.45 g l⁻¹. The dilution effect for adding wet IC was considered by subtracting 15% of initial viscosity.

Experimental viscosity data of extra papain treatment (8 experimental points) was analyzed and modeled using Microsoft Origin 6.0 software. Equation 1 showed the best agreement and was used for all experimental data. Models are presented in graphs together with experimental data for easier evaluation. At the end of this section Table 8 represents the correlation coefficients and parameters of equation 1 for each case studied.

$$reduction[\%] = a - b \times \ln(t[\text{min}] + c) \quad (1)$$

Table 1: List of experiments and their abbreviation

Type	Experiment description
1A	Control – 1% chitosan-lactic acid
1B	Control – 1% chitosan-acetic acid
2A	Papain immobilized on chitin (IC _P) and 1% chitosan-lactic acid
2B	Papain immobilized on chitin (IC _P) and 1% chitosan-acetic acid
3A	free papain ($c_{\text{final}} = 0.45$ g/l) and 1% chitosan-lactic acid
3AA	free papain ($c_{\text{final}} = 0.2$ g/l) and 1% chitosan-lactic acid
4A	chitin (IC _C) and 1% chitosan-lactic acid solution
5A	BSA immobilized on chitin (IC _B) and 1% chitosan-lactic acid solution

When acetic acid was used for solubilization of chitosan a gradual polymer viscosity reduction (up to 19.1 %) and relative molecular weight reduction, detected by GPC-RI (up to 11.3 %), were observed (Table 2 and 3). The viscosity of samples treated with IC_P showed a drastic reduction and reached a value of 61.3 % after one hour (Table 2, Figure 1). Similar effect was observed by GPC-RI analysis when relative molecular weight reduction (up to 58.0 %) was also observed in IC_P treatments (Table 3).

Table 2: Viscosity variation (cSt) and viscosity reduction (%) of 1% chitosan-acetic acid solutions treated with IC_P.

t(min)	viscosity (cSt)		reduction of viscosity (%)	
	1B (control)	2B (im. pap.)	1B (control)	2B (im. pap.)
0	39,6	38,1		
0*	34,1	32,8	0	0
1	33,4	15,1	2,1	54,0
30	30,3	13,4	11,1	59,1
60	27,6	12,7	19,1	61,3

* considering dilution effect (15% viscosity reduction)

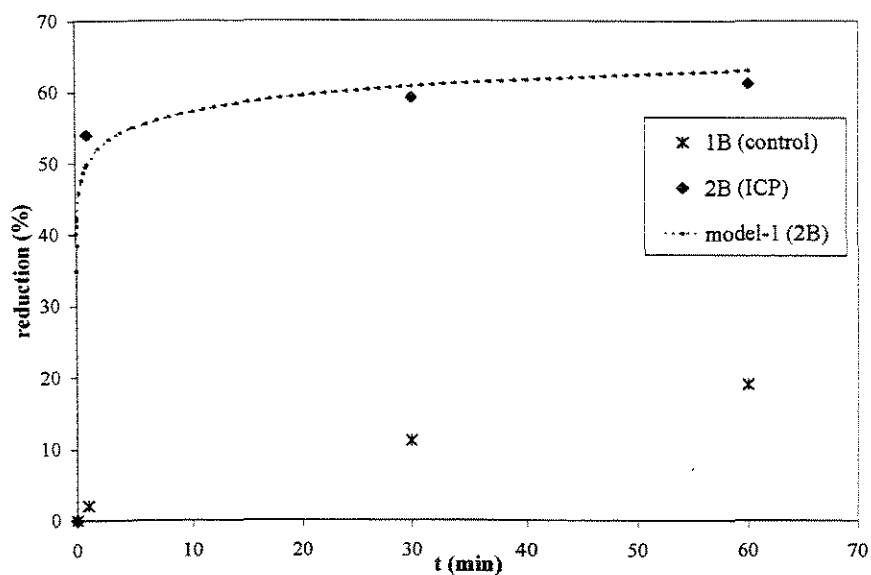


Figure 1: Viscosity reduction (model and experimental) of 1% chitosan-acetic acid solutions along the treatment with IC_P .

Table 3: Relative molecular weight variation by GPC-RI and M_w reduction (%) of 1% chitosan-acetic acid solutions treated with IC_P .

t(min)	M_w (kDa)		M_w reduction (%)	
		2B (IC_P)	1B (control)	2B (IC_P)
0	248.8	248.8	0	0
1		137.9	-	44.6
30	232.3	111.5	6.6	55.2
60	220.6	104.6	11.3	58.0

GPC elution curves for samples collected during these two treatments showed the hydrolytic effect, which is well represented by the shift of the elution curve to the right, towards longer retention times (Figure 2). This shift represents that the size of the chitosan chains have decreased and therefore, they were delayed inside the GPC columns.

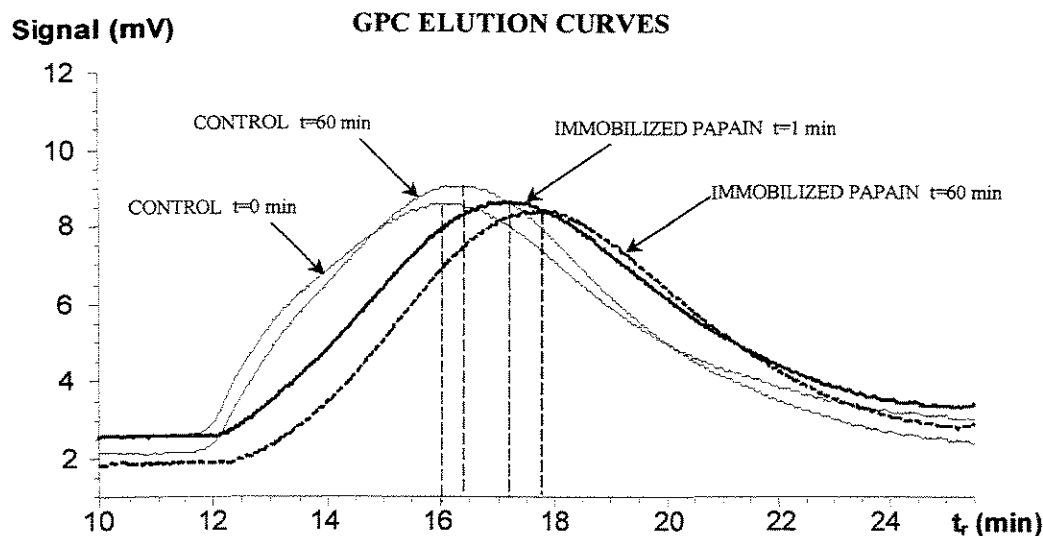


Figure 2: Elution curves (GPC-RI) of 1% chitosan-acetic acid treated samples

Viscosity reduction and relative molecular weight reduction only due to acid hydrolysis by acetic acid is important and should not be neglected. For this reason chitosan was preferably solubilized in lactic acid, which reduced only 2.4 % of the viscosity of chitosan solution (Table 5). All treatments and further analysis were therefore proceeded on chitosan-lactic acid solutions. Observing the variation in viscosity (Table 4) along the different treatments, it was observed approximately 60 % viscosity reduction for the samples treated with IC_P and free papain (Table 5). Viscosity reductions (experimental and modeled) for these as well as for IC_C and IC_B treatments are graphically compared (Figure 3).

Table 4: Viscosity variation (cSt) of 1% chitosan-lactic acid solutions treated with IC_P, IC_B, IC_C and free papain.

t(min)	viscosity (cSt)					
	1A (control)	2A (im.pap.)	3A (free pap.)	3AA (free pap.)	4A (chitin)	5A (BSA)
0	39,5	39,9	38,1	37,5	37,8	38,1
0*	33,6	33,9	32,4	31,9	32,1	32,4
1	33,4	18,6	13,4	14,7	31,9	27,6
30	33,0	15,3	12,6	13,9	33,9	32,1
60	32,8	13,7	12,9	13,3	30,8	29,1

* considering dilution effect (15% viscosity reduction)

Table 5: Viscosity reduction (%) of 1% chitosan-lactic acid solutions treated with IC_P, IC_B, IC_C and free papain.

t(min)	reduction of viscosity (%)					
	1A (control)	2A (im.pap.)	3A (free pap.)	3AA (free pap.)	4A (chitin)	5A (BSA)
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1	0,7	45,1	58,6	53,9	0,7	14,8
30	1,9	54,9	61,1	56,4	-5,5	0,9
60	2,4	59,6	60,2	58,3	4,1	10,1

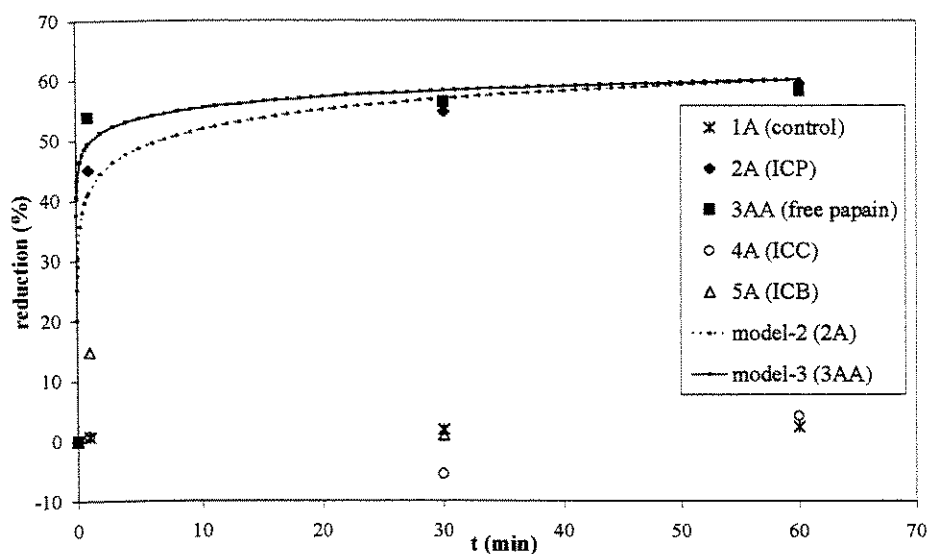


Figure 3: Viscosity reduction (model and experimental) of 1% chitosan-lactic acid solutions along the treatments with IC_P, IC_B, IC_C and free papain.

Table 6: Relative molecular weight variation by GPC-RI and M_w reduction (%) of 1% chitosan-lactic acid solutions treated with IC_P.

t(min)	M_w (kDa)		M_w reduction (%)	
	1A (control)	2A (IC _P)	1A (control)	2A (IC _P)
0	266.1	266.1	0	0
1	-	149.3	-	43.9
30	254.3	123.8	4.4	53.5
60	250.5	120.3	5.9	54.8

GPC-RI analysis for determination of relative molecular weight was done only for the control and for IC_P treatment (Table 6). Elution curves depict a shift to the right (Figure 4). The hydrolytic effect shown also by the shift of the elution curve in IC_P treatment was more pronounced compared to control sample as the M_w reduction was 54.8 % in IC_P treatment and 5.9 % in control.

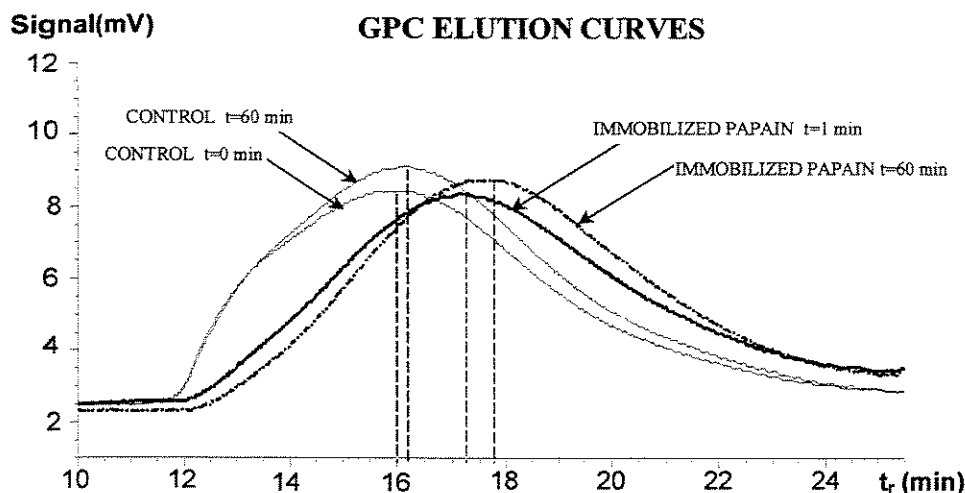


Figure 4: Elution curves (GPC-RI) of 1% chitosan-lactic acid treated samples.

Using GPC-IR-MALLS analysis, for evaluation of hydrolysis by absolute molecular weight variation, the results obtained before were confirmed. Treatments using IC_P, IC_B and IC_C were compared to control (Table 7). Treatments with IC_P showed an absolute molecular weight reduction of 40.9 % in average and treatments with IC_B and IC_C as well as control oscillated around 20 % in average (Table 7, Figure 5).

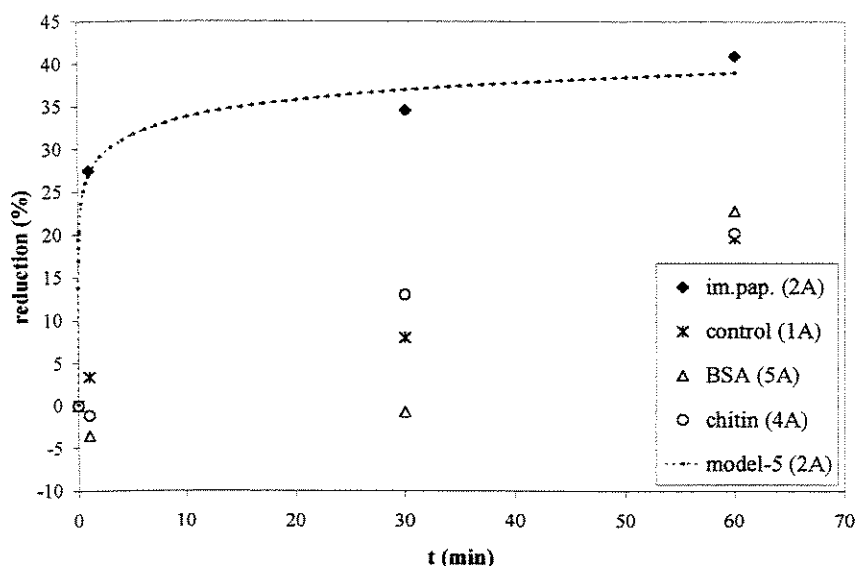


Figure 5: Absolute molecular weight reduction (model and experimental) of 1% chitosan-lactic acid solutions along the treatments with IC_P, IC_B, IC_C and free papain.

Table 7: Absolute molecular weight variation by GPC-RI-MALLS and M_w reduction (%) of 1% chitosan-lactic acid solutions treated with IC_P , IC_B , IC_C and free papain.

Mw (kDa)					average	M _w reduction (%)				average
t(min)	2A (IC _P)				2A (IC _P)					
0	151.9	158.8	150.5	158.4	154.9	0	0	0	0	0
1	108.9	120.6	106.7	113.4	112.4	28.3	24.1	29.1	28.4	27.5
30	104.6	95.9	96.9	107.9	101.3	31.1	39.6	35.6	31.9	34.6
60	94.3	92.9	84.5	94.4	91.5	37.9	41.5	43.9	40.4	40.9
1A (control)					1A (control)					
0	172.1	162.5	185.6		173.4	0	0	0		0
1	166.2	143.3	167.1		158.8	3.4	11.8	10.0		3.4
30	158.3	139.7	154.9		151.0	8.0	14.0	16.5		8.0
60	138.1	143.0	154.5		145.2	19.8	12.0	16.8		19.7
5A (IC _B)					5A (IC _B)					
0	156.6	154.4			155.5	0	0			0
1	156.8	165.1			160.9	- 0.1	- 6.9			- 3.5
30	174.0	139.5			156.7	- 11.1	9.7			- 0.7
60	125.3	114.8			120.1	20.0	25.6			22.8
4A (IC _C)					4A (IC _C)					
0	165.6				165.6	0				0
1	167.5				167.5	- 1.1				- 1.1
30	144.1				144.1	13.0				13.0
60	132.1				132.1	20.2				20.2

The elution curves represented for all experiments (Figure 6-9) show a large shift in samples treated with IC_P when compared with the control treatment. The other two treatments (IC_B and IC_C) also presented a shift of the elution curve compared to control sample. The possibility of interaction between chitosan and BSA and chitosan and chitin was checked by using GPC-RI-MALLS. It was observed that the polymer concentration in the solution was not reduced during the treatments.

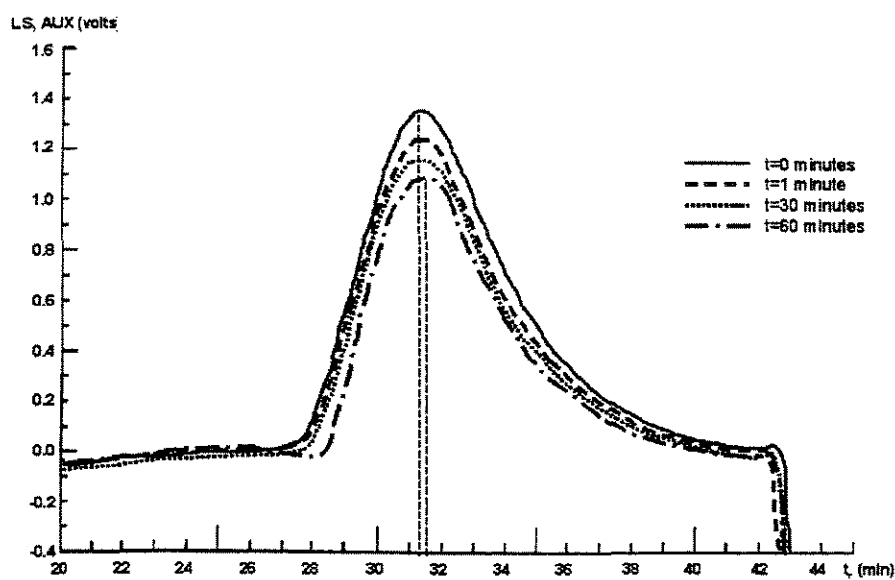


Figure 6: GPC-RI-MALLS elution curves of 1% chitosan-lactic acid (control).

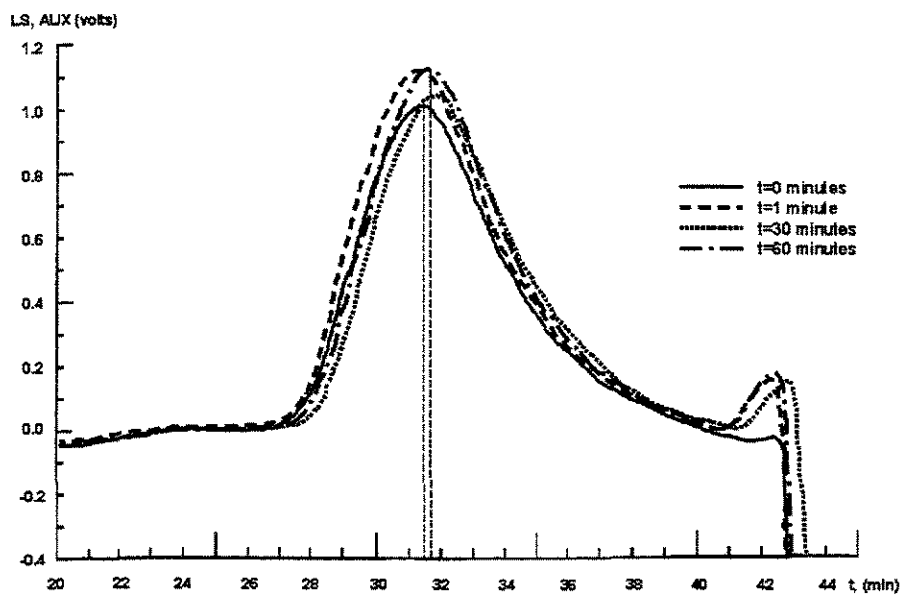


Figure 7: GPC-RI-MALLS elution curves of 1% chitosan-lactic acid treated with IC_c.

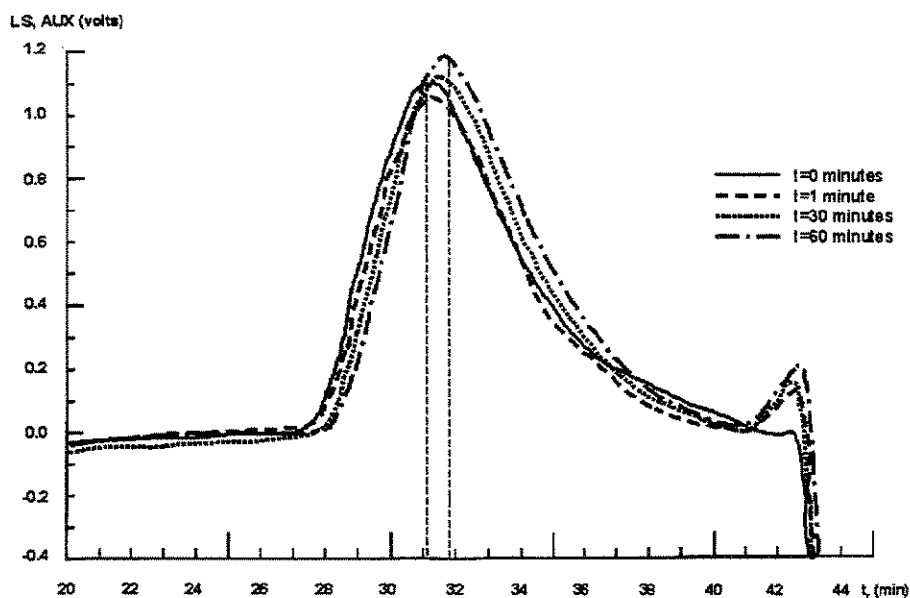


Figure 8: GPC-RI-MALLS elution curves of 1% chitosan-lactic acid treated with

IC_B.

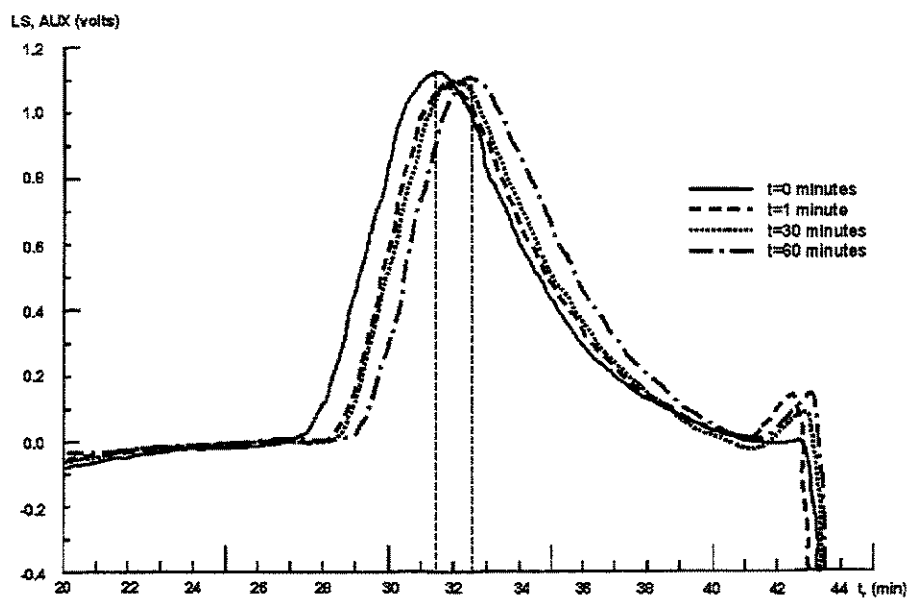


Figure 9: GPC-RI-MALLS elution curves of 1% chitosan-lactic acid treated with

IC_P.

As it was well represented in graphs and explained before all papain treatments were modeled and experimental data is compared to the model in each graph. Table 8 below represents well each model that was used.

Table 8: Parameters for model equation (1) and correlation coefficients for all the treatments with papain.

coeff.	IC _P			free papain	
	model-1 (2B)	model-2 (2A)	model-5 (2A)	model-3 (3AA)	model-4 (3A)
a	49.83	41.31	27.10	49.51	52.69
b	-3.23	-4.61	-2.89	-2.60	-2.80
c	$2.26 \cdot 10^{-7}$	$1.40 \cdot 10^{-4}$	$9.00 \cdot 10^{-5}$	$6.18 \cdot 10^{-9}$	$8.11 \cdot 10^{-9}$
R²	0.99	0.99	0.99	0.99	0.98

4. DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Acid hydrolysis, a water splitting reaction, which in the case of chitosan results in the rupture of glycosidic bonds, decreases the degree of polymerization of chitosan. This molecular weight reduction can be measured by the viscosity changes. The comparison between the control treatments using acetic or lactic acid shows different changes in the viscosity and molecular weight reduction for each acid. Acetic acid showed a stronger effect on chitosan hydrolysis (up to 19.1 % viscosity reduction) than lactic acid (2.4 % viscosity reduction). Observing the dissociation constants and acidity of these acids, the difference of effects can not be easily explained. As the pKa of lactic acid (3.86) is lower than the pKa of acetic acid (4.76), the first should promote a stronger effect on chitosan hydrolysis than acetic acid, which has never been observed. This behavior of lactic acid could be probably due to the extra hydroxyl group (compared to acetic acid), which is more available for hydrogen bonds with water, decreasing its mobility. Therefore, hydrogen bonds would be formed between the lactic acid and water and also between lactic acid and

chitosan thus reducing the real contact between the acid and the glycosidic bonds. In this sense, acetic acid could be considered as more mobile than lactic acid. An extra control experiment was run with lactic acid at pH 5.2, which did not show different results than those at pH 3.2. Therefore, lactic acid was found to be less able to hydrolyze glycosidic bonds than acetic acid.

It was observed that papain catalyses the hydrolysis of chitosans. This was confirmed by the viscosity and molecular weight reductions, which were observed for all cases of chitosan treated with immobilized and with free papain. Different papain concentrations used, 0.2 and 0.45 g/l, did not show proportional hydrolytic response, since 58.3 % and 60.2 % viscosity reduction were observed, respectively (Table 5). However, this result can also indicate that much lower concentrations of papain would need to be used in order to better quantify papain's catalytic activity.

It was observed that during the treatment with IC_B and IC_C both M_w and viscosity also varied. It was previously observed that just by preparing different 1 % chitosan solutions the viscosity values varied 11.7 %. This significant variation could be due to polydispersity of samples, mechanical stress (agitation) and experimental errors. The error of the viscosimeter (same samples measured 10 times) was 3.5 %. Therefore, it is wise to assume that viscosity differences of treatments smaller than 11 % should not be considered. Considering the sources of errors, the samples treated with IC_B and IC_C have not had their molecular weight affected when determined by viscosity reduction (Table 5). When M_w was measured by GPC-RI-MALLS, the control samples and the ones treated with IC_B and IC_C had approximately the same M_w changes, reductions of 19.7 %, 22.8 % and 20.2 %, respectively (Table 7). However, molecular weight reduction in treatment with IC_P is higher (40.9 %) confirming again the catalytic effect of papain (Table 7).

A drastic viscosity drop at the beginning of the reaction with IC_P and the sudden stagnation after approximately 10 minutes of treatment could be due two different reasons. 1.) Rapid kinetics of hydrolysis at the beginning of the process and a change of bulk concentration as chitosan molecules are hydrolyzed. Therefore, concentration gradient can be formed between bulk and the papain surroundings. In this way mass transfer would be a limiting factor and the hydrolysis rate would be reduced at this region. This phenomena

would need to be better studied by lowering the concentrations of chitosan and also by lowering the concentrations of IC_P. Grigolon (2001) also suggested that mass transfer on biopolymer enzymatic treatment could limit the rate of hydrolysis. 2.) The second reason of this sudden stabilization of the hydrolysis of chitosan could be due to the lack of substrate since the glycosidic bonds between GlcNAc and GlcN units could have finished. According to Terbojevich et al., (1995), papain is only able to hydrolyze glycosidic bonds between GlcNAc and GlcN units. Since only one DD (0.80) was used, it was not possible to further investigate this variable.

Papain preferentially acts on the high degree of polymerization chains as the corresponding fractions are progressively disappearing with time, presented in the elution curve shifts (Fig. 2, 4 and 9).

We would like to calculate the cost of production of modified chitosan by immobilized papain, as it is generally claimed that enzymatic processes are rather expensive. The cost of native chitosan is R\$ 90.00 / kg (US\$ 30 / kg, if US\$ 1.00 = R\$ 3.00) and the total cost of the IC_P is R\$ 130.00 / kg (US\$ 43 / kg), including the cost of reagents used in preparation. As Grigolon (2001), recycled IC_P five times, therefore the final cost of our product calculated using her data would be R\$ 191.00 / kg (US\$ 64 / kg). However, Muzzarelli et al., (1994), used the same sort of IC_P for 170 hours of continuous operation without any loss of activity. Considering that our enzymatic process takes 10 minutes, the IC_P could potentially be re-used for more than 1000 cycles. Therefore, the cost of our product would be reduced drastically to R\$ 105.00 / kg (US\$ 35 / kg), IC_P costs representing only R\$ 0.40 (US\$ 0.13).

6. REFERENCES

ARNON, R. **Papain** (vol. XIX). In: Methods of Enzymology. Eds. Perlmann, G., Lorand, L. Academic Press, NY, 1970. Cap. 14: p.226-244.

CHIOU, R. Y. Y e BEUCHAT, L. R. Immobilization of papain on an anion exchange resin by physical adsorption followed by cross linking with glutaraldehyde. **Journal of Food Biochemistry**, v.11, p.163-176, 1987.

FINLEY, J. W., STANLEY, W. L., WATTERS, G. G. Removal of Chill Haze from Beer with Papain Immobilized on Chitin. **Biotechnology and Bioengineering**, v.19, p.1895- 1897, 1977.

GRIGOLON, L. B., AZEVEDO, A., SANTOS, R. R., FRANCO, T. T. Modification of chitosan with free and immobilized papain. In: **Chitin Enzymology 2001**, ed. Atec, Italy, p.415-422, 2001.

GRIGOLON, L. B. Modificação de quitina e quitosana por via enzimática. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas 2001. 86 p, **Tese** (Mestrado).

KURITA, K., KAJI, Y., MORI, T., NISHIYAMA, Y. Enzymatic degradation of β -chitin: susceptibility and the influence of deacetylation. **Carbohydrate Polymers**, v.42, p.19-21, 2000.

MUZZARELLI, R. A. A., TOMASETTI, M., ILARI, P. Depolymerization of chitosan with the aid of papain. **Enzyme and Microbial Technology**, v.16, p.110-114, 1994.

MUZZARELLI, R. A. A., XIA, W., TOMASETTI, M., ILARI, P. Depolymerization of chitosan and substituted chitosans with the aid of wheat germ lipase preparation. **Enzyme and Microbial Technology**, v.17, p.541-545, 1995.

MUZARELLI, R. A. A. Depolymerization of chitins and chitosans with hemicellulase, lysozyme, papain and lipases. In: **Chitin Handbook**, R. A. A. Muzzarelli and M. G. Peter, eds. European Chitin Society, p.153-163, **1997**.

MUZARELLI, R. A. A., STANIC, V., RAMOS, V. Enzymatic depolymerization of chitins and chitosans. In C. Bucke, **Methods in biotechnology: Carbohydrate biotechnology protocols**. Totowa: Humana Press, **1999**.

PANTALEONE, D., YALPANI, M., SCOLLAR, M. Unusual susceptibility of chitosan to enzymic hydrolysis. **Carbohydrate Research**, v.237, p.325-332, **1992**.

PETER, M.G. Chitin and Chitosan from Fungi. In: **Biopolymers**, Vol. 6: Polysaccharides II (A. Steinbüchel, Ed.), Weinheim: Wiley-VCH, **2002a**, p.123-157.

PETER, M.G. Chitin and Chitosan from Animal Sources. In: **Biopolymers**, Vol. 6: Polysaccharides II (A. Steinbüchel, Ed.), Weinheim: Wiley-VCH, **2002b**, p.481-574.

SEDMAN, J. J., GROSSBERG, S. E. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G250. **Analytical Biochemistry**, v.79, p.544-552, **1977**.

TERBOJEVICH, M., COSANI, A., MUZZARELLI, R. A. A. Molecular parameters of chitosans depolymerized with the aid of papain. **Carbohydrate Polymers**, v.29, p.63-68, **1996**.

TERBOJEVICH, M., COSANI, A. Molecular weight determination of chitin and chitosan. In: **Chitin Handbook**, R. A. A. Muzzarelli and M. G. Peter, eds. European Chitin Society, p.87-101, **1997**.

ZHANG, H., NEAU, S. H. In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation. **Biomaterials**, v.22, p.1653-1658, **2001**.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A hidrólise ácida da quitosana resulta em ruptura da ligação glicosídica reduzindo assim grau de polimerização da quitosana. Comparando redução da viscosidade em tratamentos de controle utilizando ácido acético ou ácido láctico nota-se a grande diferença. Ácido acético promove efeito maior na hidrólise da quitosana (redução da viscosidade 19,1 %) em comparação ao ácido láctico (redução da viscosidade 2,4 %). Ácido acético com pKa (4,76) maior do ácido láctico (3,86) não deveria mostrar este tipo de comportamento. Analisando estrutura (? Ou? Observando formula) química do ácido láctico podemos observar um grupo hidroxila extra em comparação ao ácido acético que pode ser a razão do menor efeito na hidrólise da quitosana. Este grupo hidroxila é capaz de formar pontes de hidrogênio com água ou com a própria quitosana impossibilitando (ou –reduzindo) assim o contato entre ácido e ligação glicosídica, no caso de ácido láctico.

Reduções da viscosidade e MM confirmaram que a papaína (livre e imobilizada) catalisa hidrólise da quitosana. Utilizando duas concentrações diferentes da papaína livre, 0,2 e 0,45 g/l, não foram observados os efeitos proporcionais na hidrólise, sendo redução da viscosidade 58,3 % e 60,2 %, respectivamente. Esta observação indica que concentrações menores da papaína deviam ser utilizadas nos tratamentos.

Preparação de soluções 1 % da quitosana mostrou a variação na viscosidade de 11,7 % que pode ser explicada devido a polidispersidade das amostras da quitosana, tensão mecânica (agitação na preparação) e erros experimentais. Erro do viscosímetro foi de 3,5 %. Consideração destes fontes de erros e a grandeza assumiu-se que a MM das amostras tratadas com IC_B ou IC_C não foi afetada, quando determinado pela redução da viscosidade (Tabela 5). Quando a MM foi determinada utilizando CPG-IR-MALLS as amostras de controle ou tratadas com IC_B ou IC_C mostraram reduções de MM bem parecidas 19,7 %.

22,8 % e 20,2 %, respectivamente, e quando tratadas com IC_P redução foi de 40,9 %, confirmando assim efeito da papaína (Tabela 7).

Foram propostos dois razões diferentes para redução drástica da viscosidade no início do tratamento com IC_P e estabilização rápida 10 minutos depois:

- A cinética rápida de hidrólise no início do tratamento causa a mudança na concentração “bulk” da quitosana. Por isso forma-se um gradiente entre concentração “bulk” e em volta da papaína, efeito chamado efeito gel. A transferência da massa é o fator limitante neste processo diminuindo assim velocidade da hidrólise. Isso deve ser investigado mais profundamente utilizando concentrações menores da quitosana e também da IC_P.
- Falta de substrato pode ser a outra razão. Devido Terbojevich *et al.*, [1995], papaína é capaz de hidrolisar somente ligações glicosídicas entre unidades GlcNAc e GlcN. Utilizando somente GD (0,80) não foi possível verificar esta hipótese.

Visualizando as curvas de eluição observa-se que a papaína age preferencialmente nas cadeias com alto grau de polimerização, as frações correspondentes estão progressivamente desaparecendo ao longo do tempo (Figuras 2, 4 e 9).

Utilizando três métodos diferentes para avaliar o efeito da hidrólise foi concluído, que todos os métodos podem ser empregados para este tipo de análise. Dependendo do resultado desejado o método mais apropriado deve ser escolhido. Se o objetivo é somente avaliar a grandeza do efeito da hidrólise ou comparação do efeito, a viscosimetria é um método bastante exato e fácil de utilizar. Quando os valores de MM são desejados para verificação de MM absoluta do produto da hidrólise, o método CPG-IR-MALLS deve ser utilizado.

SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

Como próximas etapas do projeto, pode-se apontar:

- Estudo das aplicações com menores concentrações de ácidos orgânicos para solubilização da quitosana que não promovam hidrólise do polímero.
- Imobilização das cargas menores da papaína para o processo de hidrólise.
- Concentrações menores da papaína livre.
- Concentrações menores das soluções da quitosana para diminuir o efeito limitante da transferência de massa.
- Utilização das quitosanas com diferentes graus de desacetilação.
- Solubilizar quitosana a temperatura controlável e filtrar solução antes de medir viscosidade.
- Fazer outro tipo de experimento para verificar a velocidade inicial da hidrólise: Após o primeiro contato de IC_P com solução 1 % de quitosana (10 minutos) separar IC_P da solução da quitosana modificada. Em seguida aplicar o novo IC_P a esta solução da quitosana modificada.
- Determinar os parâmetros cinéticos da papaína com o substrato quitosana (K_m , v_{max} , possíveis inibidores).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNON, R. **Papain** (vol. XIX). In: Methods of Enzymology. Eds. Perlmann, G., Lorand, L. Academic Press, NY, **1970**. Cap. 14: p.226-244.
- BERI, R. G., WALKER, J., REESE, E. T., ROLLINGS, J. E. Characterization of chitosans via coupled size exclusion chromatography and multiple-angle laser light-scattering technique. **Carbohydrate Research**, v.238, p.11-26, **1993**.
- BOSSO, C., DEFAYE, J., DOMARD, A., GADELLE, A. The behavior of chitin towards anhydrous hydrogen fluoride. Preparation of β -(1,4)-linked 2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosyl oligossacharides. **Carbohydrate Research**, v.156, p.57-68, **1986**.
- BEPPU, M. M. Estudo da classificação *in vitro* de quitosana. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas **1999**. 125 p, **Tese** (Doutorado).
- CAMPANA, S. P., SIGNINI, R. Efeito de aditivos na desacetilação de quitina. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.11, n.4, p.169-173, **2001**.

- CANELLA, K. N. C., 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**.
- CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. Campinas: Editora Unicamp, **1999**, 212 p.
- CHAPLIN, M. F. e BUCKE C. **Enzyme Technology**. Cambridge University Press, Cambridge, **1992**, 264 p.
- CHIOU, R. Y. Y e BEUCHAT, L. R. Immobilizationn of papain on an anion exchange resin by physical adsorption followed by cross linking with glutaraldehyde. **Journal of Food Biochemistry**, v.11, p.163-176, **1987**.
- COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Editora Unicamp, 6º edição, 1997, 279 p.
- CRAVEIRO, A. A., CRAVEIRO, A. C., QUEIROZ, D. C. **Quitosana – a fibra do futuro**. PADETEC, Fortaleza, Ceará, Brasil, 1999, 122 p.
- DIXON, M., WEBB, E. C. **Enzymes**. Longman Group Ltd, New York, 1979, 1116 p.
- DODANE, V., KHAN, M. A., MERWIN, J. R. Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. **International Journal of Pharmaceutics**, v.182, p.21-32, **1999**.

FINLEY, J. W., STANLEY, W. L., WATTERS, G. G. Removal of Chill Haze from Beer with Papain Immobilized on Chitin. **Biotechnology and Bioengineering**, v.19, p.1895- 1897, 1977.

GRIGOLON, L. B. Modificação de quitana e quitosana por via enzimática. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas 2001. 86 p, **Tese (Mestrado)**.

GRIGOLON, L. B., AZEVEDO, A., SANTOS, R. R., FRANCO, T. T. Modification of chitosan with free and immobilized papain. In: **Chitin Enzimology 2001**, ed. Atec, Italy, p.415-422, 2001.

GOOSEN, M. F. A. **Aplications of chitin and chitosan**. Lancaster: Technomic, 1997, 336 p.

HASEGAWA, M., ISOGAI, A., ONABE, F. Preparation of low-molecular-wieght chitosan using phosphoric acid. **Carbohydrate Polymers**, v.20, p.279-283, 1993.

HIRANO, S., ITAKURA, C. Chitosan as an ingredient for domestic animal feeds. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v.38, p.1214-1217, 1990.

HOROWITZ, S. T., ROSEMAN, S., BLUMENTHAL, H. J. The Preparation of Glucosamine Oligossacharides. I - Separation. **Journal of American Chemistry Society**, v.79, p.5046-5049, 1957.

- ILYINA, A. V., TATARINOVA, N. Y., VARLAMOV, V. P. The preparation of low-molecular-weight chitosan using chitinolytic complex from *Streptomyces kurssanovii*. **Process Biochemistry**, v.34, p.875-878, **1999**.
- IZUME, M., NAGAE, S. I., KAWAGISHI, H., OHTAKARA A. Preparation of N-acetylchitooligosaccharides from enzymatic hidrolysates of chitosan. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.56, n.8, p.1327-1328, **1992**.
- KOIDE, S. S. Chitin-Chitosan: Properties, Benefits and Risks. **Nutrition Research**. v.18, p.1091-1101, **1998**.
- KORDESTANI, S. S., KENNEDY, J. F. Book Reviews. **Carbohydrate Polymers**, v.39, p.381-383, **1999**.
- KURITA, K., HITOSHI, Y., NISHIMURA, S. I., ISHII, S. Preparation and biodegradability of chitin derivatives having mercapto groups. **Carbohydrate Polymers**, v.20, p.239-245, **1992**.
- KURITA, K., KAJI, Y., MORI, T., NISHIYAMA, Y. Enzymatic degradation of β -chitin: susceptibility and the influence of deacetylation. **Carbohydrate Polymers**, v.42, p.19-21, **2000**.
- LEE, M. Y., VAR, F., SHIN-YA, Y., KAJIUCHI, T., YANG, J.W. Optimum conditions for the precipitation of chitosan oligomers with DP- 5-7 in concentrated hydrochloric acid at low temperature. **Process Biochemistry**, v.34, p.493-500, **1999**.

LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**, traduzido por Simões A. A., Lodi W. R. São Paulo: Editora Sarvier, **1995**, 839 p.

MONTEIRO, J.O.A. Preparação, modificação química e calorimetria do biopolímero quitosana. Campinas: Instituto da Química, Universidade Estadual de Campinas **2000**. 113 p, Tese (Doutorado).

MURAKI, E., YAKU, F., KOJIMA, H. Preparation and crystalization of D-glucosamine oligosaccharides with dp 6-8. **Carbohydrate Research**, v.239, p.209-226, **1993**.

MUZZARELLI, R. A. A. Depolymerization of methyl pyrrolidinone chitosan by lysozyme. **Carbohydrate Polymers**, v.19, p.29-34, **1992**.

MUZZARELLI, R. A. A., TOMASETTI, M., ILARI, P. Depolymerization of chitosan with the aid of papain. **Enzyme and Microbial Technology**, v.16, p.110-114, **1994**.

MUZZARELLI, R. A. A., XIA, W., TOMASETTI, M., ILARI, P. Depolymerization of chitosan and substituted chitosans with the aid of wheat germ lipase preparation. **Enzyme and Microbial Technology**, v.17, p.541-545, **1995**.

MUZZARELLI, R. A. A. Depolymerization of chitins and chitosans with hemicellulase, lysozyme, papain and lipases. In: **Chitin Handbook**, R. A. A. Muzzarelli and M. G. Peter, eds. European Chitin Society, p.153-163, **1997**.

MUZARELLI, R. A. A., TERBOJEVICH, M., MUZZARELLI, C., MILIANI, M., FRANCESCANGELI, O. Partial depolymerization of chitosans with the aid of papain. In: **Chitin Enzimology 2001**, ed. Atec, Italy, p.404-413, **2001**.

MUZARELLI, R. A. A. **Chitin Enzimology 2001**, ed. Atec, Italy, 2001, 614 p.

MUZARELLI, R. A. A., TERBOJEVICH, M., MUZZARELLI, C., FRANCESCANGELI, O. Chitosans depolymerized with the aid of papain and stabilized as glycosylamines. **Carbohydrate Polymers**, v.50, p.69-78, **2002**.

NORDTVEIT, R. J., VARUM, K. M., SMIDSRØD, O. Degradation of partially N-acetylated chitosans with hen egg white and human lysozyme. **Carbohydrate Polymers**, v.29, p.163-167, **1996**.

ONISHI, H., MACHIDA, Y. Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. **Biomaterials**, v.20, p.175-182, **2000**.

PANTALEONE, D., YALPANI, M., SCOLLAR, M. Unusual susceptibility of chitosan to enzymic hydrolysis. **Carbohydrate Research**, v.237, p.325-332, **1992**.

PETER, M. G., FRANCO, T. T. **Tópicos especiais em processos bioquímicos: Biopolymers**. Apostila da aula teórica IQ 824-U. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, **2001**.

PETER, M.G. Chitin and Chitosan from Fungi. In: **Biopolymers**, Vol. 6: Polysaccharides II (A. Steinbüchel, Ed.), Weinheim: Wiley-VCH, **2002a**, p.123-157.

- PETER, M.G. Chitin and Chitosan from Animal Sources. In: **Biopolymers**, Vol. 6: Polysaccharides II (A. Steinbüchel, Ed.), Weinheim: Wiley-VCH, **2002b**, p.481-574.
- REDDY, M. V. B., BELKACEMI, K., CORCUFF, R., CASTAIGNE, F., ARUL, J. Effect of pre-harvest chitosan sprays on post-harvest infection by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.20, p.39-51, **2000**.
- RODRIGUES, N.R. Desenvolvimento analítico e determinação da distribuição de pesos moleculares do galactomanano de sementes de *Dimorphandra mollis* por cromatografia de permeação em gel. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas **1997**. 55 p, **Tese** (Mestrado).
- RZODKIEWICZ, B., KOLODZIEJSKA, I., PAJAK, W. A. Modification of chitosan with chitin deacetylase and chitosanolytic enzymes from *Mucor rouxii*. In: **Chitin Enzimology 2001**, R. A. A. Muzzarelli, ed. Atec, Italy, p.519-526, **2001**.
- SANDFORD, P. A., ANTHONSEN, T., SKJAK-BRAEK, G. **Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications**. London, Elsevier, **1989**, 835 p.
- SANTOS, E. S., GUIRARDELLO, R., FRANCO, T. T. Purification of chitosanase from *Bacillus cereus*. In: **Chitin Enzimology 2001**, R. A. A. Muzzarelli, ed. Atec, Italy, p.519-526, **2001**.

- SASHIWA, H., ZHU, H., YAMANO, N., FUJISHIMA, S., AIBA, S. Production of N-acetyl-D-glucosamine from chitin by enzymatic hydrolysis. In: **Chitin Enzimology 2001**, R. A. A. Muzzarelli, ed. Atec, Italy, p.431-436, **2001**.
- SEDMAN, J. J., GROSSBERG, S. E. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G250. **Analytical Biochemistry**, v.79, p.544-552, **1977**.
- SHIN-YA, Y., LEE, M. Y., HINODE, H., KAJIUCHI T. Effects of N-acetylation degree on N-acetylated chitosan hydrolysis with commercially available and modified pectinases. **Biochemical Engineering Journal**, v.7, p.85-88, **2001**.
- SLUYTERMAN, L.A.Æ. The activation reaction of papain. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.139, p.430-438, **1967**.
- SYNIWIECKI, J., AL-KHATEEB, N. A. A. Q. Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan. **Food chemistry**, v.60, n.4, p.605-610, **1997**.
- TERBOJEVICH, M., COSANI, A., MUZZARELLI, R. A. A. Molecular parameters of chitosans depolymerized with the aid of papain. **Carbohydrate Polymers**, v.29, p.63-68, **1996**.
- TERBOJEVICH, M., COSANI, A. Molecular weight determination of chitin and chitosan. In: **Chitin Handbook**, R. A. A. Muzzarelli and M. G. Peter, eds. European Chitin Society, p.87-101, **1997**.

TSIGOS, I., MARTINOU, A., KAFETZOPOULOS, D., BOURIOTIS, V. Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v.18, n.7, p.305-312, **2000**.

YALPANI, M., PANTALEONE, D. An examination of the unusual susceptibilities of aminoglycans to enzymatic hydrolysis. **Carbohydrate Research**, v.256, p.159-175, **1994**.

ZHANG, H., DU, Y., YU, X., MITSUTOMI, M., AIBA, S. Preparation of chitooligosaccharides from chitosan by a complex enzyme. **Carbohydrate Research**, v.320, p.257-260, **1999**.

ZHANG, H., NEAU, S. H. In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation. **Biomaterials**, v.22, p.1653-1658, **2001**.