

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

Laboratório de Termoquímica de Materiais

TESE DE DOUTORADO

**PREPARAÇÃO, MODIFICAÇÃO QUÍMICA E CALORIMETRIA
DO BIOPOLÍMERO QUITOSANA**

**Aluno: Oyrton Azevedo de Castro Monteiro Junior
Orientador: Prof. Dr. Claudio Airoidi**

Dezembro - 1999



200019607

UNIDADE	IQ	
N.º CHAMADA:	1/UNICAMP	
	M764 p	
V.	EX	
TOMBO BC/	43371	
PROC.	278/2000	
C	<input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00	
DATA	03/04/2001	
N.º CPD		

CM-00153921-1

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

M764p	<p>Monteiro Junior, Oyrton Azevedo de Preparação, modificação química e calorimetria do biopolímero quitosana / Oyrton Azevedo de Castro Monteiro Junior. – Campinas, SP: [s.n], 1999.</p> <p align="center">Orientador: Claudio Airoidi.</p> <p align="center">Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química.</p> <p align="center">1. Quitina. 2. Quitosana. 3. Glutaraldeído. 4. Calorimetria. I. Airoidi, Claudio. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.</p>
-------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

A minha mãe e em especial a meu pai “in memoriam”.

Eu dedico esta tese, fruto de meu trabalho.

Agradecimentos

Ao Prof. Claudio Airoidi, por depositar confiança em meu trabalho, pela excelente orientação profissional e exemplo de como conduzir um grupo de pesquisa.

Ao Instituto de Química da UNICAMP, pelo ótimo centro de ensino e pesquisa em química.

À UNIFOR, por me liberar para realização do Doutorado.

Ao CNPq, pelo fornecimento da bolsa de capacitação.

Ao Hermes pelo companherismo e sincera amizade.

Aos Prof. Cajá, pelas discussões calorimétricas que muito me ajudaram no andamento desse trabalho.

Aos amigos de trabalho Luiza, Liliane, Reinaldo, Eunice, Cícero, Gardênnia, César, Robson, Claudia, Cris, Toshio, Aécio, Almir, Elvio, Akira, Zeca, Emerson, Reni, Antonio, Mauriceia e em especial a Neusa pelas horas de trabalho e de descontração, principalmente no momento do cafezinho.

Aos amigos de outras horas Ednalva, Bosco, Sayure, Paiva, Marlon, Samísia, Marlene, Adriano, Duda, Cristiano e Marcelo pelos debates enriquecedores dentro e fora da química.

Ao pessoal da CPG do IQ da UNICAMP por sempre me atenderem com satisfação.

Aos meus irmãos, Maria Teresa, Erico e Abimho pelo apoio que tenho recebido ao longo da vida.

Ao amigo João Ricardo “in memorian”, que se foi durante este tempo, por boas recordações deixadas para traz.

Ao Tito, Kaya e Tupã, por todo este tempo de convivência (Au Au).

E por fim, é com grande satisfação, que agradeço a todos aqueles que de algum modo colaboraram para realização deste trabalho.

Resumo

Título: Preparação, modificação química e calorimetria do biopolímero quitosana

Aluno: Oyrton Azevedo de Castro Monteiro Junior

Orientador: Prof. Dr. Claudio Airoidi

Palavras chave: quitina, quitosana, glutaraldeído, organossilano, calorimetria.

As quitosanas C e F foram preparadas a partir do biopolímero natural quitina de casca de camarão. O efeito interativo de Cu^{2+} com a quitina, com as quitosanas C e F e com a quitosana comercial A, foi estudado via calorimetria. A quitosana F foi modificada quimicamente com o glutaraldeído e com silanos organofuncionalizados. Foi investigada a capacidade de adsorção de Cu^{2+} e de imobilização de quatro diferentes enzimas pela quitina, quitosana F e quitosanas modificadas.

A energia livre de Gibbs das interações quitina- Cu^{2+} e quitosanas- Cu^{2+} demonstram que os processos são favoráveis à interação polímero- Cu^{2+} . As entalpias dessas interações são exotérmicas, sendo que para as interações quitosanas- Cu^{2+} são bem superiores à interação quitina- Cu^{2+} . A entropia da interação quitina- Cu^{2+} demonstra um aumento na desordem do sistema, o contrário foi observado para as entropias das interações quitosanas- Cu^{2+} .

A concentração do glutaraldeído afeta as propriedades físicas e químicas das quitosanas modificadas com este reagente formador de ligações cruzadas, gerando uma série de produtos QGX (X = 0,0 a 25,0). Estes possuem maior capacidade em adsorver o Cu^{2+} que a quitosana original, entretanto, menor que a QG0,0. Conforme aumenta a concentração de glutaraldeído diminui a capacidade de adsorção de Cu^{2+} .

Os híbridos obtidos com agentes sililantes apresentam-se no estado de hidrogel. Depois de secos mostram ser amorfos e insolúveis em solventes orgânicos, em meios alcalinos e ácidos. Com exceção do SiGQ1 os híbridos apresentam superior capacidade de adsorção de Cu^{2+} em relação à quitosana e esta capacidade aumenta conforme cresce o tamanho da cadeia orgânica do organossilano. Entretanto, um comportamento oposto é observado para a capacidade de imobilizar enzimas, urease, glucose oxidase, catalase e invertase.

Abstract

Title: Preparation, chemical modification and calorimetry of the biopolymer chitosan

Author: Oyrton Azevedo de Castro Monteiro Junior

Supervisor: Prof. Dr. Claudio Airoidi

Keywords: chitin, chitosan, glutaraldehyde, silylating agent, calorimetry.

Chitosans C and F were prepared starting from the natural biopolymer chitin of shrimp shell. The interactive effects of Cu^{2+} with chitin, chitosans C and F and commercial chitosan A were followed via calorimetry. Chitosan F was chemically modified with glutaraldehyde and silylating agents. The capacity of adsorption of Cu^{2+} and the immobilization of four different enzymes for the chitin, chitosan F and modified chitosans were verified.

Gibbs free energy of the chitin- Cu^{2+} and chitosans- Cu^{2+} interactions demonstrates that the processes are favorable. The enthalpies of these interactions are exothermic and the enthalpic values of chitosans- Cu^{2+} interactions are greater than those of chitin- Cu^{2+} interaction. The entropy of the chitin- Cu^{2+} interaction indicates a decrease in the order of the system and the opposite was observed for the chitosans- Cu^{2+} interactions.

The concentration of glutaraldehyde affects the physical and chemical properties of the modified chitosans, originating a series of products QGX (X = 0,0 to 25,0). These chitosans had larger capacity in adsorbing Cu^{2+} than the original chitosan but smaller than that of QG0,0. By increasing of the glutaraldehyde concentration, a decrease of the capacity of adsorption of Cu^{2+} was observed.

The hybrids obtained from chitosan and silylating agents were hidrogels. After drying, a amorphous solid, insoluble in organic solvents and in alkaline and acid solutions, was obtained. With exception of SiGQ1, the other hybrids presented larger capacity of adsorption of Cu^{2+} in relation to the chitosan. This capacity increased as the size of the organic chain of the silylating agents increased. However, an opposite behavior is observed for the capacity of immobilizing enzymes, urease, glucose oxidase, catalase and invertase.

CURRÍCULO RESUMIDO DO AUTOR

1. FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO.

1.1. Graduação:

Química (Bacharelado).

Universidade de Fortaleza, UNIFOR, Ceará, Brasil.

Engenharia de Alimentos.

Universidade Federal do Ceará, UFC, Ceará, Brasil.

Obs: não concluída.

1.2. Pós-graduação:

Especialização em Metodologia do Ensino de Química.

Universidade Estadual do Ceará, UECE, Ceará, Brasil.

Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Universidade Federal da Paraíba, UFPB, Paraíba, Brasil.

2. ARTIGOS COMPLETO PUBLICADOS EM PERIÓDICOS.

Monteiro Junior, O. A. C., AIROLDI, Claudio. Some Studies of Crosslinking Chitosan-glutaraldehyde Interaction in a Homogeneous System. **International Journal of Biological Macromolecules** n.26,p. 229-128, 1999.

Monteiro Junior, O. A. C., AIROLDI, Claudio. Some Thermodynamic Data on Copper-chitin and Copper-chitosan Biopolymer Interactions. **Journal of Colloidal and Interface Sci.**, n. 212, p. 212-219, 1999.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	001
1.1. Quitina e quitosana.....	001
1.1.1. Breve histórico da quitina e quitosana.....	002
1.1.2. Fonte de quitina e quitosana.....	004
1.1.3. Aspectos físico e químicos da quitina e quitosana.....	006
1.1.4. Síntese da quitina e quitosana.....	011
1.1.5. Qualidade da quitina e quitosana.....	013
1.1.6. Grau de desacetilação da quitina e quitosana.....	015
1.1.7. Modificação química e aplicação da quitina e quitosana.....	016
1.2. Agentes sililantes organofuncionalizantes.....	020
1.3. Glutaraldeído.....	022
1.3.1. Mecanismo de reação de glutaraldeído com os grupos NH_2	022
1.3.2. Estrutura formada na interação do glutaraldeído com grupos amina.....	023
1.3.3. Modificação da quitina e quitosana com glutaraldeído.....	024
1.3.4. Afinidade do glutaraldeído com a quitosana e organossilanos.....	026
2. OBJETIVO.....	027
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	028
3.1. Materiais e métodos.....	028
3.1.1. Substâncias e reagentes.....	028
3.1.2. Técnicas instrumentais.....	029

3.2. Síntese das quitosanas.....	030
3.3. Determinação do grau de desacetilação das quitosanas.....	030
3.4. Estudo calorimétrico da interação do íon cobre com os biopolímeros.....	031
3.4.1. O calorímetro.....	031
3.4.2. Princípio básico de calorimetria.....	033
3.4.3. Titulação calorimétrica.....	035
3.4.4. Medidas dos efeitos térmicos.....	036
3.4.5. Isoterma de adsorção.....	037
3.4.6. Tratamento dos dados da isoterma de adsorção da calorimetria.....	038
3.4.7. Tratamento dos dados calorimétricos.....	040
3.4.8. Obtenção dos dados termodinâmicos.....	041
3.5. Preparação da quitosana-glutaraldeído.....	042
3.6. Preparação dos híbridos quitosana-organossilanos.....	043
3.7. Aplicação das quitosanas modificadas.....	043
3.7.1. Capacidade de adsorção do íon Cu^{2+}	043
3.7.2. Capacidade de imobilizar enzimas.....	045
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	045
4.1. Caracterização da quitina e das quitosanas.....	046
4.2. Grau de desacetilação das quitosanas.....	050
4.2.1. Espectroscopia na região do infravermelho.....	050
4.2.2. Análise elementar.....	051
4.2.3. Ressonância magnética nuclear.....	052
4.2.4. Difração de Raios-X.....	055
4.3. Dados calorimétricos.....	057
4.3.1. Adsorção em solução.....	057
4.3.2. Isoterma de adsorção do Cu^{2+} pelos biopolímeros.....	058

4.3.3. Titulação calorimétrica.....	063
4.3.4. Dados termodinâmicos.....	067
4.4. Estudo e caracterização das quitosana-glutaraldeído.....	071
4.4.1. Reação da quitosana com o glutaraldeído.....	071
4.4.2. Espectroscopia vibracional.....	072
4.4.3. Ressonância magnética nuclear de carbono-13.....	077
4.4.4. Análise elementar.....	079
4.4.5. Espectroscopia de Raios-X.....	081
4.4.6. Microscopia eletrônica.....	083
4.5. Caracterização dos híbridos quitosana-organossilano.....	085
4.5.1. Mecanismo de reação.....	085
4.5.2. Espectroscopia na região do infravermelho.....	086
4.5.3. Ressonância magnética nuclear.....	088
4.5.4. Micrografia eletrônica.....	090
4.6. Aplicação das quitosanas modificadas.....	092
4.6.1. Capacidade de adsorção do íon Cu^{2+}	092
4.6.1.1 Capacidade de adsorção de íon Cu^{2+} pelas quitosanas modificadas com glutaraldeído.....	093
4.6.1.2 Capacidade de adsorção de íon Cu^{2+} pelos híbridos.....	096
4.6.2. Imobilização de enzimas.....	097
5. CONCLUSÃO.....	101
6. REFERÊNCIAS.....	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura monoméricas dos biopolímeros: a) celulose, b) quitina e c) quitosana.....	007
Figura 2. Representação do arranjo das cadeias poliméricas das três quitinas conhecidas: a) α , b) β e c) γ	008
Figura 3. Representação da heterogeneidade da cadeia polimérica: quitina (NHCOCH ₃), quitosana (NH ₂) e forma modificada (R).....	009
Figura 4. Fluxograma simplificado da síntese da quitina e quitosana.....	012
Figura 5. Representação geral dos derivados de quitina mais conhecidos....	018
Figura 6. Representação geral dos derivados de quitosana mais conhecidos.....	019
Figura 7. Estrutura dos organossilanos de fórmula geral (CH ₃ O) ₃ Si-R-NH ₂ : a) 3-(trimetoxisilil)propilamina – TMA. b) N-[3-(trimetoxisilil)propil]etilenodiamina – TMD e c) N-[3-(trimetoxisilil)propil]etilenotriamina – TMT.....	021
Figura 8. Estrutura molecular do glutaraldeído.....	022
Figura 9. Diagrama do microcalorímetro isotérmico de condução de calor do tipo LKB-Thermometric 2277 sendo: 1) Cilindro de medida, 2) banho de água termostatzado, 3) recipiente de medida, 4) termopilhas, 5) bloco metálico termostatzado e 6) troca de calor.....	034
Figura 10. Curva da isoterma de adsorção do íon cobre pela quitina N_f versus N_s e sua forma linearizada N_s/N_f versus N_s	039
Figura 11. Curva da titulação calorimétrica da quitina ΣQ_{int} versus X e sua forma linearizada $X/\Sigma Q_{int}$ versus X	041
Figura 12. Isoterma de adsorção de íon Cu ²⁺ em função do tempo da quitosana F.....	044
Figura 13. Espectro da quitina na região do infravermelho.....	047

Figura 14. Espectro na região do infravermelho: a) quitina, b) quitosana C d) quitosana A e d) quitosana F.....	049
Figura 15. Espectro de RMN ¹³ C: a) quitina, b) quitosana, c) quitosana A e e) quitosana F.....	054
Figura 16. Difratoograma de Raios-X: a) quitina, b) quitosana C, c) quitosana F e d) quitosana A.....	056
Figura 17. Isoterma de adsorção do íon cobre pela quitina, apresentado N_f versus N_s e sua forma linearizada N_s/N_f versus N_s	059
Figura 18. Isoterma de adsorção do íon cobre pela quitosana C, apresentado N_f versus N_s e sua forma linearizada N_s/N_f versus N_s	060
Figura 19. Isoterma de adsorção do íon cobre pela quitosana F, apresentado N_f versus N_s e sua forma linearizada N_s/N_f versus N_s	060
Figura 20. Isoterma de adsorção do íon cobre pela quitosana A, apresentado N_f versus N_s e sua forma linearizada N_s/N_f versus N_s	061
Figura 21. Formas linearizadas das curvas das isotermas de adsorção com seus respectivos valores de N^{f} : quitina (■), quitosana C (▲), quitosana F (●) e quitosana A (▼).....	062
Figura 22. Titulação calorimétrica da quitina com o íon cobre: efeito térmico de reação Q_r (●), efeito térmico de diluição Q_d (■) e efeito térmico de interação Q_{int} (▲).....	064
Figura 23. Titulação calorimétrica da quitosana C com o íon cobre: efeito térmico de reação Q_r (●), efeito térmico de diluição Q_d (■) e efeito térmico de interação Q_{int} (▲).....	065
Figura 24. Titulação calorimétrica da quitosana F com o íon cobre: efeito térmico de reação Q_r (●), efeito térmico de diluição Q_d (■) e efeito térmico de interação Q_{int} (▲).....	065
Figura 25. Titulação calorimétrica da quitosana A com o íon cobre: efeito térmico de reação Q_r (●), efeito térmico de diluição Q_d (■) e efeito térmico de interação Q_{int} (▲).....	066

Figura 26. Espectro na região do infravermelho: a) quitosana, b) QG5,0 c) QG15,0 e d) QG25,0.....	072
Figura 27. Espectro na região do infravermelho a) QG15,0, b) QG15,0 na presença de NaBH ₄ e c) QG15,0 na presença de HCl.....	074
Figura 28. Espectro Raman: a) quitosana, b) QG5,0 e c) QG25,0.....	076
Figura 29. Espectro de RMN ¹³ C: quitosana, b) QG0,5, c) QG5,0 e d) QG25,0.....	078
Figura 30. Percentual de nitrogênio (■) e relação carbono/nitrogênio (□) para as quitosanas modificadas com glutaraldeído QGX (X=0,0; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0).....	080
Figura 31. Difratoograma de Raios-X: a) quitosana, b) QG0,5, c) QG5,0 e d) QG25,0.....	082
Figura 32. Micrografia eletrônica: quitosana natural 500x(IA); quitosana natural 100x (IIA); QG0,0 500x (IB); QG0,0 1000x (IIB); QG5,0x (IC); QG5,0 1000x (IIC), QG25,0 500x (IID) e QG25,0 1000x (IID).....	084
Figura 33. Esquema do mecanismo provável de formação dos híbrido: a) processo de ligações cruzadas e b) processo sol-gel.....	085
Figura 34. Espectro na região do infravermelho: a) quitosana F, b) SiGQ1, b) SiGQ2 e d) SiGQ3.....	087
Figura 35. Espectro de RMN ²⁹ Si no estado sólido a) SiGQ1; b) SiGQ2 e c) SiGQ3.....	089
Figura 36. Microscopia eletrônica para: SiGQ1 (A); SiGQ2 (B); SiGQ3 (C) e quitosana (D).....	091
Figura 37. Curva das isotermas de adsorção de íon Cu ²⁺ : quitosana natural (✱); QG0,0 (*); QG0,1 (+); QG1,0 (◆); QG5,0 (▼); QG10,0 (▲); QG20,0 (●); QG25,0 (■).....	094
Figura 38. Curva das isotermas de adsorção de íon Cu ²⁺ : quitosana (■), SiGQ1 (▼), SiGQ2 (●) e SiGQ3 (▲).....	096

Figura 39. Figura 39. Teor de imobilização das enzimas glucose oxidase (Gox), catalase (Cat), invertase (Inv) e urease (Ur) nos polímeros (pol) quitosana (quito) F e seus derivados (QG5,0, SiGQ1, SiGQ2 e SiGQ3).....099

ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1. Composição química (%) experimental e calculado de quitina e quitosana proveniente de lulas.....010
- Tabela 2. Parâmetros propostos para a padronização da quitina e quitosana em algumas áreas de aplicação.....015
- Tabela 3. Percentual de desacetilação (GD) dos biopolímeros, determinados pela espectroscopia na região do infravermelho.....051
- Tabela 4. Percentuais de carbono, hidrogênio, nitrogênio e relação carbono/nitrogênio nos biopolímeros.....052
- Tabela 5. Intensidades relativas dos picos na RMN ¹³C da quitina e das quitosanas associadas aos carbonos da carbonila (C=O) em 173,4 ppm e metila (CH₃) em 22,4 ppm.....055
- Tabela 6. Valores termodinâmicos da interação heterogênea cobre-quitina e cobre-quitosanas A, C e F. Estes valores são comparados com N-carboximetilquitosana (N-carbox) modificada e também alguns complexos de cobre-amônia.....068
- Tabela 7. Percentuais de carbono, hidrogênio e nitrogênio encontrados na quitosana C (X=0,0) e nas QGX (X= 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 25,0)......080

1. INTRODUÇÃO

1.1. Quitina e quitosana

A quitina é um polissacarídeo natural que se destaca do ponto de vista químico, por apresentar um grupo acetoamido, e a sua desacetilação conduz a um novo biopolímero denominado quitosana. Ambos os biopolímeros assemelham-se quimicamente à celulose e possuem características físico-químicas bastante peculiares.¹

Durante os últimos trinta anos, estes biopolímeros vem despertando bastante interesse junto à comunidade científica mundial, devido principalmente ao grande potencial de aplicação apresentado por estes materiais em diversas áreas. Este fato é observado tanto para as formas naturais como para os derivados.² Entretanto, o reconhecimento científico não se deu imediatamente após a descoberta mas só veio depois do conhecimento das propriedades químicas e físicas.

A confirmação da presença de glucosamina na estrutura desses polissacarídeos, que possui como característica básica um grupo amino no carbono 2, os tornaram especiais do ponto de vista químico, físico e biológico.³ Outros fatores também contribuíram para que a quitina e quitosana fossem levadas a terem interesses científico e tecnológico em diversas áreas, donde pode-se destacar por serem: a) muito abundantes na natureza, b) obtidos por síntese natural; c) os principais componentes das cascas de crustáceos, que geralmente são descartados como resíduos do processamento industrial, d) biodegradáveis, e) biocompatíveis com os órgãos, tecidos e células de animais e plantas, f) poucos antigênicos nos tecidos e órgãos de animais, g) não tóxicos em administração oral e implante em animais, h) processados em diversas formas

como flocos, pó fino, grão, membranas, esponjas, algodões, fibras, fios e géis, i) polieletrólitos, e por agirem como quelantes de metais e por fornecerem soluções de viscosidade elevada. Possuem ação biológica em órgãos, tecidos e células dos animais e plantas, como também, nos solos e nas hidrosferas, podem ainda ser química e enzimaticamente modificados.⁴ Estas e muitas outras características dão suporte para que ambos os biopolímeros estejam sendo apontados como materiais, que demonstram grande potencial de uso e aplicações no século XXI.⁵

1.1.1. Breve histórico da quitina e quitosana

A quitina foi isolada pela primeira vez em 1811 por Braconnot, quando trabalhava com fungos. Em seu trabalho conclui que os mesmos continham uma nova substância que, em sua opinião, o novo composto era completamente distinta da encontrada nas madeiras.²

Odier em 1823 isolou uma substância insolúvel contida na armadura/carapaças dos insetos, a qual passou a chamá-la de quitina, que em grego quer dizer túnica, envelope ou cobertura. Falhou em não detectar a presença de nitrogênio na quitina e errou ao afirmar que se tratava da mesma substância anteriormente encontrada nas plantas. Entretanto, foi o primeiro a relatar a semelhança entre as substâncias suportes presentes na armadura dos insetos e nos tecidos dos vegetais. Existem dúvidas se ele tinha conhecimento da substância encontrada por Braconnot nos fungos, pois neste e em trabalhos posteriores, não se refere ao autor. Posteriormente, Odier também observou a presença de quitina na carapaça de caranguejo e sugeriu que ela seria o material básico na formação do exoesqueleto de todos os insetos e possivelmente dos

aracnídeos. Entretanto, só mais tarde, em 1843, Payen detecta a presença de nitrogênio na quitina.³

Os pesquisadores da época Odier e Children relatam que, isolaram a quitina com múltiplos tratamentos com soluções de hidróxido de potássio concentrado. Isto pode ter sido um problema, porque na realidade eles devem ter obtido quitosana ao invés de quitina. No entanto, a quitosana foi descrita pela primeira vez em 1859 por Rouget. Este nome foi proposto em 1894 por Hoppe-Seyler pelo fato de que esta substância possuía quantidade de nitrogênio igual à quitina original.^{3,5}

Devido à grande similaridade entre celulose, quitina e quitosana, uma enorme confusão estabeleceu-se entre elas e manteve-se até o início do século XX, quando as pesquisas demonstraram definitivamente que tratavam-se de substâncias diferentes. A celulose na época, por ser já bastante explorada principalmente nas indústrias de papel e têxtil, passou a ser alvo de grande investimento científico e tecnológico. Por outro lado, a quitina ficou restrita à pesquisa básica com pouco incentivos financeiros.⁵

Apesar da quitina ter sido descoberta há dois séculos, seu estudo e aplicação só veio intensificar-se por volta de 1970, quando começou-se a perceber o grande potencial de aplicação que apresentavam tanto a quitina como a própria quitosana.^{2,6}

A quitosana só foi produzida industrialmente pela primeira vez em 1971 no Japão. Em 1986, este mesmo país já possuía quinze indústrias produzindo quitina e quitosana em escala comercial.⁷ Atualmente estes polissacarídeos vem tomando destaque considerável nas pesquisas e aplicações, sendo até mesmo considerados um dos materiais de maior potencial para o próximo século. Esta afirmação vem sendo tomada com base na grande versatilidade de aplicações encontradas para estes biopolímeros e muitos derivados.⁵ O Japão e os EUA são

os países que vem se destacando como os maiores produtores, consumidores e pesquisadores destes polissacarídeos e derivados,^{5,7-9} Para exemplificar, em 1993 o Japão e EUA publicaram 214 e 84 entre patentes e publicações, respectivamente, de acordo com “Chemical Abstract Citations”, portanto, nesta época, juntos publicaram mais da metade do total no mundo, que foram 501 publicações.⁸ O Brasil aparece em 24ª posição, com 2 publicações e nenhuma patente.

De 1993 para cá, esta situação não tem mudado tanto, o Japão continua à frente das pesquisas vindo em seguida novamente os Estados Unidos. Outros países, passaram a interessar-se mais por esta área, entre eles encontram-se a China, Itália, Brasil e muitos outros, conforme “Institute for Scientific Information Citation Databases”.

Atualmente o Japão elege a quitosana como o material do século XXI, investindo anualmente gigantesca quantidade de recursos financeiros nos desenvolvimentos científico e tecnológico associados a quitina e quitosana.⁵

Acredita-se que no futuro bem próximo muitos materiais atualmente em uso vão perder seu lugar para estes biopolímeros. Isto fica bem claro quando a quitina, quitosana e derivados são testados na substituição de alguns materiais, e é incrível que quase sempre, mostram certas vantagens.

1.1.2. Fontes de quitina e quitosana

Quitina e quitosana são biosintetizados e biodegradados na biosfera terrestre, com estimativa anual de 100 bilhões de toneladas por ano, bem distribuídos na natureza sem haver um excesso de acúmulo.⁴

A quitina é um dos materiais orgânicos mais abundante na natureza, perdendo apenas para a celulose. Por outro lado, a quitosana não é muito encontrada como material natural em si, quando comparada à quitina e à celulose, ocorrendo muito dispersamente em alguns microrganismos.¹ Por isso, devido à baixa ocorrência natural, a quitosana é normalmente obtida por desacetilação da quitina natural. Contudo, a quitosana assim obtida ainda é considerada como um biopolímero natural.⁵

A quitina é largamente distribuída na natureza, sendo o maior componente estrutural do exoesqueleto dos invertebrados marinhos, cuja quantidade relativa varia de 30 a 60% nos crustáceos (cuja quantidade relativa varia de 30 a 60% nos crustáceos) e da cutícula dos insetos, como também é encontrada na parede celular de alguns fungos e leveduras.^{8,10}

A quitina funciona como um componente fibroso na estrutura do exoesqueleto, cutícula e parede celular dos organismos nos quais ocorre. Desta maneira, ela é quase sempre encontrada associada às proteínas, formando oligoproteínas que funcionam como matrizes que interagem com outros constituintes, como os taninos fenólicos na cutícula dos insetos e os minerais no exoesqueleto dos crustáceos.^{8,11}

Embora esteja bastante difundida na natureza, no momento a fonte economicamente mais viável para obtenção da quitina, e conseqüentemente da quitosana, tem sido os refugos industriais do processamento de crustáceos, destacando-se entre eles, já em larga escala, os caranguejos, camarões e lagostas.¹²⁻¹⁴

Nos últimos anos, devido ao aumento acelerado no interesse científico e principalmente industrial em quitina e quitosana, outras fontes destes materiais foram avaliadas como, por exemplo, extração de quitina do fungo utilizado na produção de ácido cítrico.¹⁵ Os investigadores acreditam que no futuro os

microrganismos serão uma das principais fontes de quitina e quitosana.¹⁵⁻¹⁸ Entretanto, estas e outras novas fontes testadas ainda não têm demonstrado viabilidade econômica, devido ao alto custo, além de problemas técnicos e científicos, encarecendo o produto final. Contudo, as fontes naturais no momento são basicamente os resíduos de crustáceos, que ainda mostram suficiência no suprimento da demanda mundial. Entretanto, para evitar problemas futuros, até mesmo de ordem bioecológica, cada vez mais crescem as investigações em busca de novas fontes e tecnologias adequadas para obtenção de quitina e de quitosana.^{16,19}

O Brasil produz grande quantidade de resíduos de crustáceos que são quase completamente desperdiçados.²⁰ Alguns estudos demonstram que existem boa quantidade de quitina no cefalotórax de camarão-rosa (*P. brasiliensis* e *P. paulensis*)^{21,22}, no caranguejo uçá (*Ucides cordatus*) e na lagosta (*Panulirus argus*)²³, sendo encontrado em torno de 14% de quitina em base úmida, demonstrando portanto, a grande potencialidade do Brasil em produzir quitina e quitosana em larga escala. Duas empresas brasileiras: Polimar Industria Comercio Importação e Exportação LTDA, situada em Fortaleza-CE e Kito Química Fina LTDA localizada Palhoça-SC têm se destacado na produção e comercialização destes biopolímeros, ambas também estão vinculadas à pesquisa básica destes materiais.

1.1.3. Aspectos físicos e químicos da quitina e quitosana

A quitina é um biopolímero de cadeia linear formado por unidades de N-acetil-2-amino-2-dioxi-D-glicopirranose, unidades interligadas por ligações glicosídicas (1→4) glucosamina, formando um polissacarídeo cristalino

representado pela fórmula geral $[C_8H_{13}O_5N]_n$. Normalmente é denominado poli $[\beta(1\rightarrow4)$ -N-acetil-D-glucosamina] ou N-acetilglucosamina.³ Sua massa molecular é estimada de 1 a 2×10^6 daltons. 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 no 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 na Figura 1.

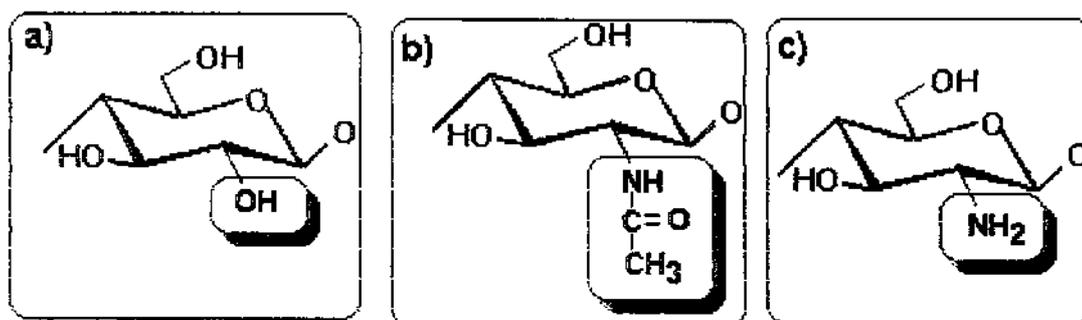


Figura 1. Estrutura monomérica dos biopolímeros: a) celulose, b) quitina e c) quitosana.

A quitina é conhecida em três formas estruturais cristalinas diferentes, α -, β - e γ , mostradas na Figura 2. Destas as α - e β -quitinas, são as mais conhecidas, sendo a α -quitina a mais comum e por isso também é a mais estudada.^{1,24} A estrutura da γ -quitina é muito pouco conhecida devido à rara ocorrência e formação natural.

A quitina é biodegradável, não-tóxica, insolúvel em água e em muitos solventes orgânicos. É despolimerizada na presença de ácidos minerais fortes, sendo parcialmente solúvel em solução de dimetilacetamida com 5% cloreto de lítio (DMAc-LiCl).^{8,19,25}

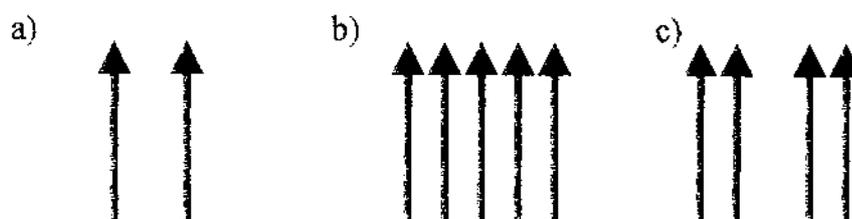


Figura 2. Representação do arranjo das cadeias poliméricas das três quitinas conhecidas: a) α , b) β e c) γ .

A quitosana poli[β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-dioxi-D-glicopirranose] é um biopolímero obtido normalmente pela desacetilação química da quitina, sendo representada pela fórmula geral $[C_6H_{11}O_4N]_n$. É normalmente denominada de poli- β -(1 \rightarrow 4)-D-glucosamina ou N-glucosamina, portanto, assemelha-se quimicamente ao biopolímero original quitina. A quitosana possui no carbono 2 uma amina primária ($-NH_2$),³ como mostra a Figura 1. Esta diferença faz com que a quitosana tenha certas características químicas e físicas diferentes da quitina e da celulose, que na maioria dos casos são consideradas bem mais interessantes como, por exemplo, o fato de ser um polieletrólito, possuir melhor solubilidade, reatividade, etc.⁴

A quitosana é solúvel em muitos ácidos orgânicos diluídos mas é insolúvel em solventes orgânicos e em soluções ácidas cujo pH seja acima de 6,5.^{19,26,27}

O grupo amino presente na quitosana possui um pKa em torno de 6,2 a 7,0, o que a torna um polieletrólito quando dissolvida em meios cujo pH seja mais baixo.²⁸

A quitina e a quitosana são uns dos poucos polieletrólitos catiônicos naturais. Diferente dos outros polissacarídeos naturais, que se apresentam neutros ou negativamente carregados. A quitosana dispõe de grupos amino que reagem com certa facilidade, o que permite a obtenção de muitos compostos derivados.²⁹

A quitina, a quitosana e seus derivados são considerados polímeros heterogêneos, porque possuem na cadeia polimérica tanto monômeros acetilados quanto desacetilados, conforme mostra a Figura 3, isto porque, as formas totalmente acetiladas ou desacetiladas, respectivamente, não ocorrem normalmente na natureza e são de difícil preparação em laboratório.³⁰⁻³³

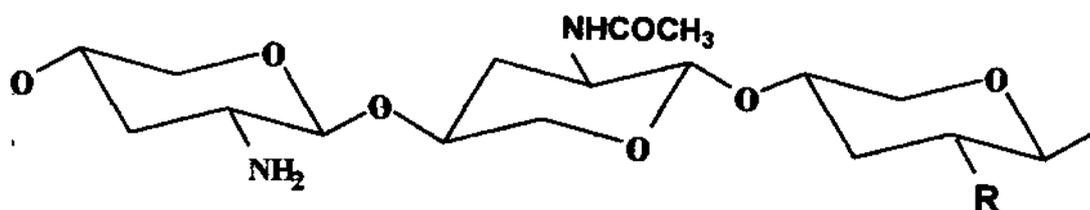


Figura 3. Representação da heterogeneidade da cadeia polimérica dos polímeros: quitina (NHCOCH_3), quitosana (NH_2) e forma modificada (R).

A análise elementar da quitina mostra a presença de moléculas de água incorporadas ao polímero.³⁰⁻³³ Alguns pesquisadores estimam que a quitina é constituída de 82,5% de unidades acetiladas, 12,5% de unidades desacetiladas e 5% de água.³⁴ A Tabela 1 mostra a composição química calculada e experimental de amostras de quitina e quitosana proveniente de lulas.

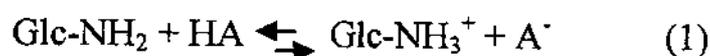
Tabela 1. Composição química (%) experimental e calculado de quitina e quitosana proveniente de lulas.³⁴

Amostra	C	H	N	COCH ₃	N/C	Monômero
N-acetilglucosamina (C ₈ H ₁₃ O ₅ N) _n = I	47,30	6,40	6,90	21,2	0,146	203
N-glucosamina (C ₆ H ₁₁ O ₄ N) _n = II	44,70	6,80	8,70	0,0	0,195	161
82,5% I + 12,5% II + 5% H ₂ O	44,60	6,50	6,80	17,5	0,153	198
Quitina	42,50	6,88	6,50	16,3	0,153	181
77,0% I + 13,7% II + 9,3% H ₂ O	42,66*	6,50*	6,25*			
Quitosana A	43,70	6,80	7,15	12,4	0,164	177
58,5% I + 35,7% II + 5,8% H ₂ O	41,51*	6,54*	7,51*			
Quitosana B	43,30	6,88	7,40	9,1	0,171	170
43,0% I + 50,9% II + 6,1% H ₂ O	42,31*	6,55*	7,87*			
Quitosana C	41,30	7,12	7,25	6,3	0,178	158
29,7% I + 59,7% II + 10,6% H ₂ O	40,45*	5,88*	7,41*			

*Dados experimentais

De um modo prático, a quitina e a quitosana podem ser distintos pelo critério de solubilidade em solução aquosa de ácido diluído. Quando o polímero possui alto teor de grupos N-acetil ($\geq 40\%$) distribuídos na cadeia polimérica, ele é normalmente insolúvel, sendo denominado de quitina. Quando os mesmos grupos são menores que 40%, este polissacarídeo passa a ser solúvel em solução aquosa de ácido diluído, é então denominado de quitosana.⁸

A dissolução da quitosana em solução aquosa de ácido diluído não se deve apenas ao rompimento das ligações intermoleculares envolvendo os grupos N-acetil presentes na quitina, mas também, às propriedades hidrofílicas das unidades de glucosamina (Glc-NH₂), que em pH abaixo de 6 são protonadas levando a um equilíbrio, conforme mostra a Equação 1.³⁵



A solubilidade de quitosana em solução aquosa de ácido diluído está relacionada principalmente com o grau de N-acetilação (GA) ou N-desacetilação (GD) deste biopolímero.

Portanto, a solubilidade da quitosana pode ser associada à vários fatores: quantidade de grupos N-acetil (NCOCH₃) e de grupos amina (NH₂), distribuição destes grupos na extensão da cadeia polimérica, pH e força iônica da solução.²⁸

1.1.4. Síntese de quitina e quitosana

Diversos trabalhos publicados descrevem o processo de obtenção de quitina e quitosana a partir de resíduos de crustáceos. Recentemente, No e

Meyers³⁶ revisaram muito bem diversos métodos de preparação destes biopolímeros. De um modo geral, o processo envolve três etapas básicas: desproteinização, desmineralização e desacetilação. Esta última se limita à obtenção da quitosana, conforme o fluxograma simplificado mostrado na Figura 4.

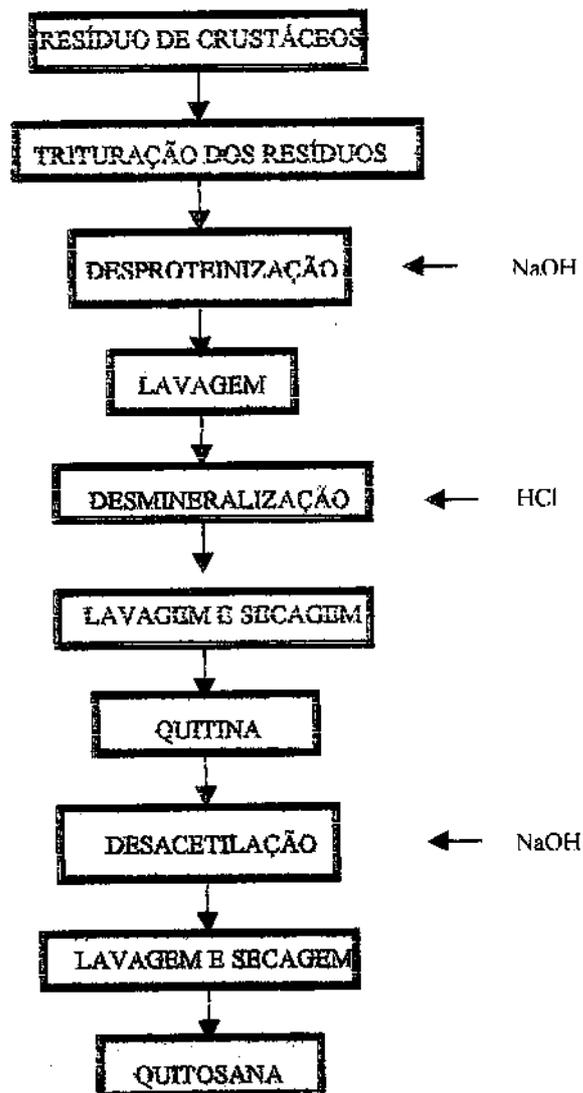


Figura 4. Fluxograma simplificado da síntese de quitina e quitosana

Durante a etapa de desproteíntização, o resíduo é tratado com solução de hidróxido de sódio diluída (1-10%) sob temperatura elevada (65-100 °C).^{23,36} Em alguns casos esta proteína extraída pode ser aproveitada como, por exemplo, em rações para animais.^{13,37}

A etapa de desmineralização tem como objetivo principal dissolver e extrair o carbonato de cálcio e para isso utiliza-se uma solução de ácido clorídrico diluída (<10%) à temperatura ambiente.³⁶

A etapa de desacetilação visa converter a quitina já processada em quitosana, a qual consiste no tratamento da quitina com solução de hidróxido de sódio ou potássio concentrado (40-50%) em temperatura elevada (100 -110%), para remover os grupos acetil presentes na quitina.³⁶

Devido às diferenças físicas e químicas entre as diversas espécies de crustáceos, que dão origem aos resíduos, estas operações são ajustadas conforme a proveniência da matéria-prima pois, tanto as altas concentrações e temperatura das soluções, como também longos períodos de tratamento, podem acarretar danos à quitina e à quitosana.^{7,12,19,38,39}

1.1.5. Qualidade da quitina e quitosana

Comercialmente a quitina e a quitosna são encontradas no mercado mundial sob a forma de flocos, pós, grãos, fibras, placas e filmes.⁷ Entretanto, não existe ainda um padrão internacional dos parâmetros físicos e químicos para estes biopolímeros. Estes parâmetros variam conforme a matéria prima, processamento e área de aplicação. No entanto, a obtenção de quitina e quitosana de boa qualidade depende principalmente das condições da matéria-prima e de um adequado processamento.^{7,12}

As carapaças de crustáceos, que atualmente ainda são as principais fontes de quitina, constituem-se principalmente de proteína, carbonato de cálcio e quitina.^{7,12-14,21-23,36-39} Estes componentes costumam variar de acordo com a espécie do crustáceo e da época do ano de captura, fazendo com que o método de obtenção da quitina e quitosana sofra um certo ajuste a cada tipo de matéria prima.⁴⁰

Além do bom conhecimento das condições do estado inicial da matéria-prima, o correto controle do processamento é também de extrema importância para a obtenção de uma quitina e quitosana de boa qualidade. Por exemplo, sabe-se que as altas concentrações como também as altas temperaturas podem acarretar danos irreparáveis à qualidade destes biopolímeros, como grau de desacetilação, despolimerização, massa molecular, viscosidade, conformação óptica, etc.^{7,10,32,36,38}

As etapas de desmineralização e desacetilação são normalmente consideradas as mais importante na obtenção da quitina e da quitosana, mostradas na Figura 4. A elas devem ser dadas as condições e cuidados adequados para a manutenção da qualidade do produto final.^{12,36} As maiores dificuldades na obtenção de quitina e quitosana de qualidade, encontram-se no encarecimento destes biopolímeros e na dificuldade em produzir estes biopolímeros uniformemente em larga escala de produção.⁸

A quitina e a quitosana podem ser caracterizadas por diversos parâmetros físicos e químicos como: grau de desacetilação, solubilidade, teor de cinzas, pH, viscosidade, turbidez, massa molecular, transição vítrea, etc.³² A importância destes parâmetros varia de acordo com a área de aplicação do biopolímero.⁷ Na Tabela 2 pode ser visto a importância de alguns destes parâmetros associados com sua respectiva área de uso.

Tabela 2. Parâmetros propostos para a padronização de quitina e quitosana em algumas áreas de aplicação.⁷

Parâmetros	Área			
	Médica	Cosmético	Comercial	Industrial
Fonte	X	X	X	X
Aparência (cor)	X	X	X	X
Viscosidade	X	X	X	X
Tamanho das partículas	X	X	X	X
Grau de desacetilação	X	X	X	X
Solubilidade	X	X	X	X
Misturas	X	X	X	X
Cinzas	X	X	X	
Metais pesados	X	X		
Microrganismos	X	X		
Proteínas	X			
Pirrogêneos	X			

1.1.6. Grau de desacetilação da quitina e quitosana

O grau de desacetilação (GD) é considerado normalmente como um dos principais parâmetros na caracterização de quitina e de quitosana. Ele relata de forma direta ou indireta a quantidade de grupos NH_2 na quitosana. Inúmeros métodos já foram propostos na literatura para determinação do GD tais como espectroscopia de infravermelho,⁴¹⁻⁴⁶ de ultravioleta,^{32,46-48} de RMN,⁴⁹⁻⁵¹ análises térmicas⁵² e HPLC^{53,54}. Entretanto, existe uma certa discrepância entre os valores encontrados por estes diferentes métodos,⁴⁷ de forma que, até hoje ainda se aperfeiçoa ou busca-se métodos mais adequados para melhor determinação. Em

grande parte dos trabalhos publicados, o GD é determinado pela técnica de espectroscopia na região do infravermelho,^{16,25,40,55-58} cujos dados são ajustados em equações relacionadas normalmente às bandas associadas aos grupos N-acetil e hidroxila presentes na quitina. Como exemplo, abaixo encontram-se as Equações 2 e 3^{42,45} desenvolvidas por diferentes autores:

$$GD = [1 - (A_{1655} / A_{3450})^{1/1,33}] 100 \quad (2)$$

$$GD = 97,67 - [26,486 (A_{1655} / A_{3450})] \quad (3)$$

Em ambas as equações são utilizados os valores de absorvâncias das bandas em 1655 e 3450 cm^{-1} , que são associadas à carbonila (C=O) dos grupos N-acetil e hidroxila (OH), respectivamente. A primeira banda varia conforme o grau de desacetilação da quitina, diminuindo da quitina para a quitosana e a segunda está presente tanto no espectro da quitina quanto no da quitosana, e portanto, não sofre variação.

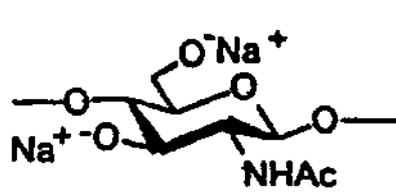
1.1.7. Modificação química e aplicação da quitina e quitosana

Um avanço importante e decisivo na química e tecnologia de quitina e quitosana está também relacionado à modificação química destes polímeros, cujas pesquisas neste sentido vêm intensificando-se rapidamente a cada dia.⁵

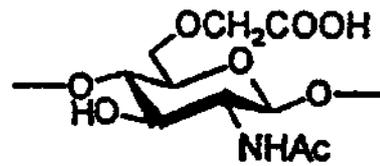
A presença do grupo acetamino na quitina e amino na quitosana as tornam mais interessantes do ponto de vista reativo do que a celulose, que amplia as possibilidades de modificar quimicamente estes biopolímeros.⁸ Na quitina o grupo amino encontra-se acetilado (NCOCH_3), enquanto na quitosana o grupo amino encontra-se livre (NH_2), e esta é a grande vantagem da quitosana com relação aos outros biopolímeros, que a torna um polieletrólito catiônico que forma sais na presença de ácidos, fazendo com que a quitosana seja mais reativa e solúvel.^{8,29,34} Outros caminhos são utilizados para modificar quimicamente a quitina e quitosana como, por exemplo, reações com o grupo hidroxila, caminho este normalmente utilizado para modificar a celulose.⁸ As Figuras 5 e 6 mostram resumidamente algumas rotas mais utilizadas para modificação química de quitina e quitosana, respectivamente.

Por apresentarem biocompatibilidade, biodegradação, não toxidez, biomassa renovável, não poluente e também descoberta de sua grande potencialidade de aplicação em diversas áreas, a quitina e quitosana vêm sendo alvo de grande interesse por parte dos pesquisadores. Entretanto, há pouco tempo atrás, a quitina e seu principal derivado, a quitosana, já foram considerados de pouco valor, até que se descobrissem algumas de suas relevantes propriedades.

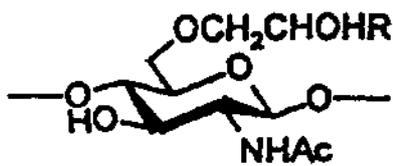
Embora as pesquisas e as aplicações da quitina e da quitosana sejam ainda inferiores às da celulose, estes biopolímeros vêm despertando bastante atenção por parte dos estudiosos, não apenas no campo da química, biologia e bioquímica, onde a princípio se concentravam a maioria dos estudos, mas também em diversas áreas como, por exemplo, farmácia, medicina, agrária, alimento, biotecnologia, etc.^{19,29}



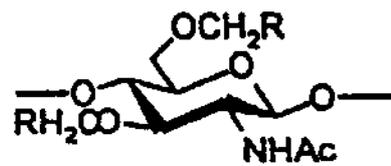
Quitina alcalina



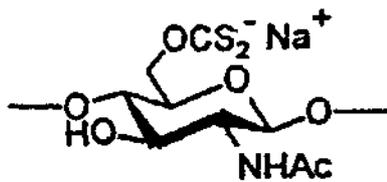
Carboximetilquitina



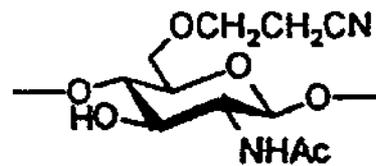
Hidroalquilquitina



Alquilquitina



Xantato de quitina



Cianoetilquitina

Figura 5. Representação geral dos derivados de quitina mais conhecidos

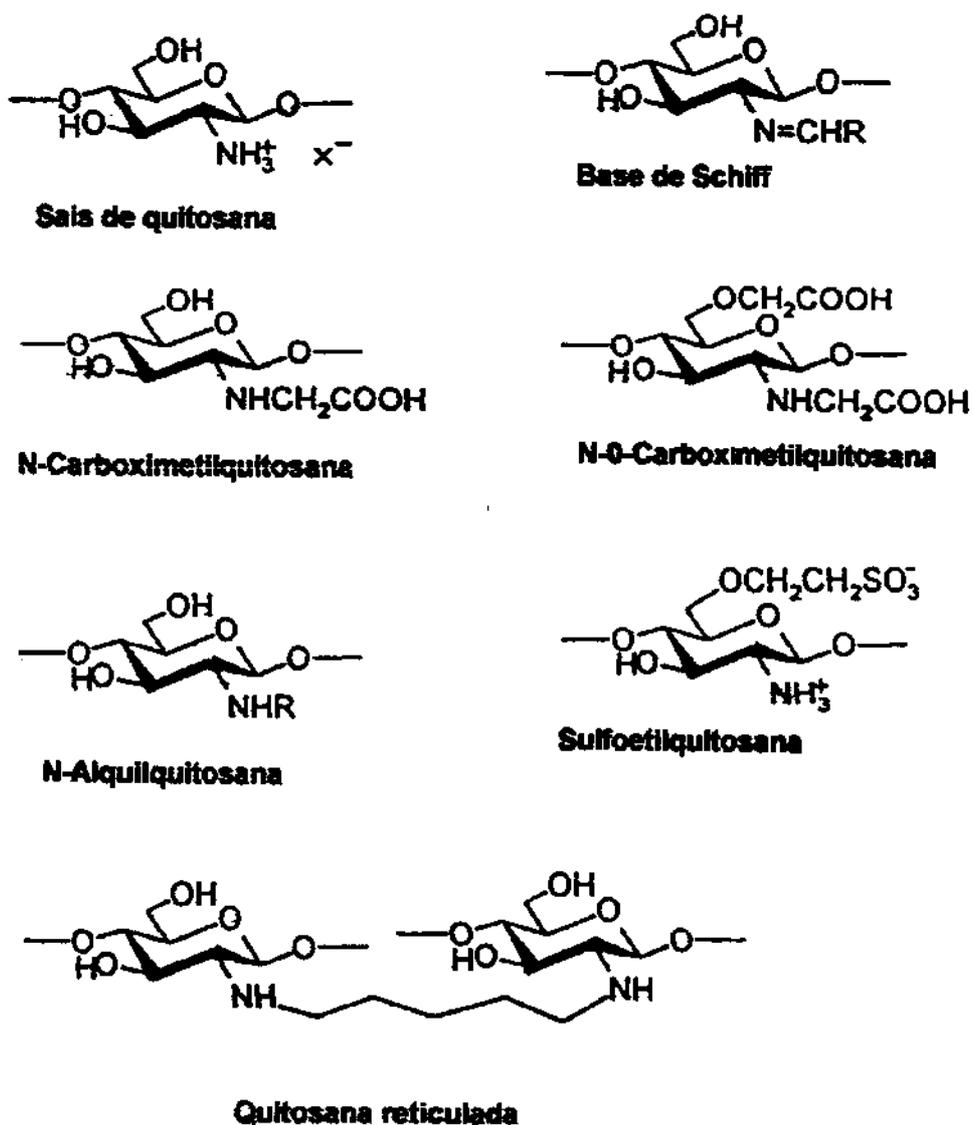


Figura 6. Representação geral dos derivados de quitosana mais conhecidos

Além da pesquisa básica, muito esforço tem sido feito para encontrar novas aplicações para estes biopolímeros e suas formas modificadas, visto que são considerados materiais de grande potencial de aplicação, superando a celulose em muitos aspectos como, por exemplo, ser um amino polissacarídeo.⁵⁹

Os pesquisadores atualmente envolvidos com estas substâncias principalmente os químicos, reconhecem o fato de que a principal direção do estudo e progresso da quitina e quitosana encontra-se na modificação química destes biopolímeros. Isto tem sido normalmente o caminho da solução de alguns problemas mais complexos, ampliando mais ainda o espectro de atuação destes materiais.⁵

1.2. Agentes sililantes organofuncionalizantes

Nas duas últimas décadas o processo sol-gel tem sido visto como uma interessante rota na obtenção de novos materiais híbridos de natureza bastante diversificada.⁶⁰⁻⁶⁴ Estes materiais têm despertado bastante interesse por parte de áreas bastante exigentes: síntese bioorgânica, medicina, biotecnologia e muitas outras relacionadas ao meio tecnológico. Estes compostos oferecem vantagens na elaboração de materiais ópticos, sensores, suportes catalíticos, lamelares e especialmente polímeros. Uma das características bastante interessante destes híbridos é a capacidade de se introduzir, reter e manter atividade de materiais biologicamente sensíveis, especialmente proteínas e células, no interior de sua rígida estrutura físico química. Outra característica bastante interessante é a flexibilidade de formas com que estes materiais híbridos podem ser preparados: monolitos, filmes finos, pó e fibras.

Diversos precursores foram explorados na geração de materiais que envolvem o processo sol-gel,^{60,61} entre muitos deles encontram-se os agentes

sililantes organofuncionalizados de fórmula geral $(\text{CH}_3\text{O})_3\text{Si-R-NH}_2$,^{63,64} como mostra a Figura 7. Caracterizam-se por possuírem dois grupos funcionais reativos: grupo amina ($-\text{NH}_2$) e grupo metoxil ($-\text{OCH}_3$), ambos localizados nas extremidades da cadeia, um oposto ao outro. O grupo metoxil é bastante hidrolizável na presença de água e pode sofrer policondensação pelo processo sol-gel gerando um polímero com estrutura inorgânico $-\text{SiOSi}-$, que forma a espinha dorsal dos polissiloxanos. Estes agentes sililantes são bastante explorados na indústria principalmente em reforço de polímeros,⁶³ como também, na modificação de matrizes orgânicas e inorgânicas,⁶⁵ síntese de novos compostos,^{66,67} etc. Recentemente, a quitosana foi utilizada como um dispersante no processo sol-gel em um novo método de imobilização da enzima α -amilase,⁶⁸ não havendo portanto, interação da quitosana na formação do novo composto.

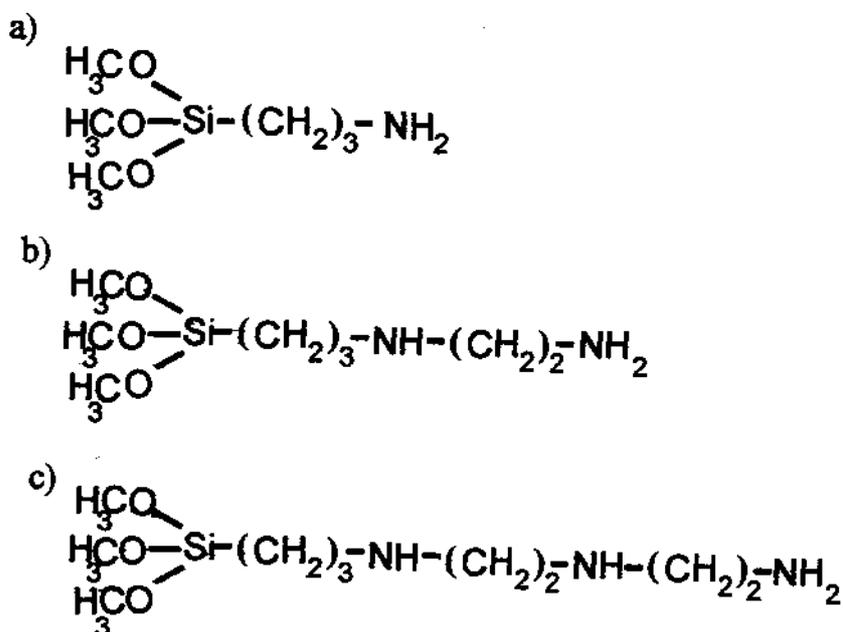


Figura 7. Estrutura dos organossilanos de fórmula geral $(\text{CH}_3\text{O})_3\text{Si-R-NH}_2$:

- a) 3-(trimetoxisilil)propilamina - TMA,
- b) N-[3-(trimetoxisilil)propil]etilenodiamina - TMD e
- c) N-[3-(trimetoxisilil)propil]etilenotriamina - TMT.

1.3. Glutaraldeído

O Glutaraldeído, mostrado na Figura 8, é uma molécula bifuncional que interage muito fortemente com compostos que possuem grupos amino na sua estrutura e com menor intensidade com o grupo tiol. Inicialmente, o glutaraldeído foi muito utilizado como fixador na histoquímica e na microscopia eletrônica. Só depois ele foi utilizado como reagente bifuncional no estudo estrutural de proteínas simples e macromoléculas agregantes.⁶⁹

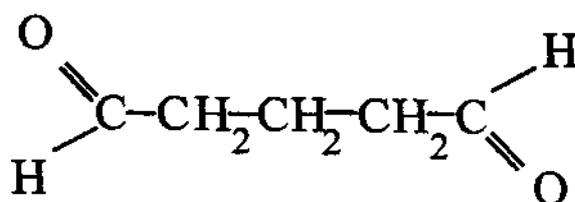


Figura 8. Estrutural molecular do glutaraldeído

1.3.1. Mecanismo de reação do glutaraldeído com grupos NH₂

O glutaraldeído normalmente age como um agente formador de ligações cruzadas (crosslinking). A interação ocorre entre os grupos aldeídos do glutaraldeído e os grupos aminas livres dos compostos.⁶⁹ No entanto, o mecanismo de formação desta interação e as estruturas dos compostos obtidos não estão ainda bem definidos. Normalmente, afirma-se que nesta interação há

formação de uma base de Schiff. Entretanto, tem-se questionado esta afirmativa quando em estudos que envolvem a interação de glutaraldeído comercial (diluído em água) e proteínas. Acredita-se que nesta interação seja muito provável que haja envolvimento de formação de duplas ligações etilênicas conjugadas. Este fato ganha muito apoio pela estabilidade desta interação, irreversível e bastante resistente a variações de pH e temperatura, o que normalmente não é observado para interações que envolvem simplesmente uma base de Schiff.⁷⁰⁻⁷²

1.3.2. Estrutura formada na interação do glutaraldeído com grupos amina

Além do mecanismo de reação, a estrutura formada desta interação também é motivo de grandes questionamentos, geralmente não é estudada nem tão pouco apresentado nos trabalhos publicados, os quais fundamentam-se neste tipo de interação. Nos poucos trabalhos onde os autores arriscam-se em comentar, normalmente, sugerem três estruturas: a) há formação de apenas uma base de Schiff com um dos grupos aldeídicos do glutaraldeído, o outro grupo aldeído permanece livre e é habitualmente utilizado para uma reação subsequente,^{73,74} b) Os dois grupos aldeído de uma única molécula de glutaraldeído reagem com duas aminas formando uma ligação cruzada.⁷⁵ e c) a ligação cruzada (crosslinking) é formada por mais de uma molécula de glutaraldeído.^{76,77}

A interação do glutaraldeído com o grupo amina livre tem sido muito explorada em diversas circunstâncias, destacando-se entre elas a imobilização de enzimas,^{78,79} sendo nesta utilizada uma gama muito grande de diferentes enzimas e suportes, como por exemplo: vidro não poroso-urease,^{80,81} vidro poroso-urease,⁸² -tripsina,⁸³ compósito óxido de celulose titânio-D-glucose oxidase, –

urease, -L-amino oxidase,⁸⁴ composto acetato titânio iso-propóxido-uricase, -invertase,⁸⁵ outras espécies de titânio modificado,⁷² poliuretano-urease,⁸⁶ nylon-invertase,⁸⁷ géis hidrofílico,⁸⁸ gelatina-urease⁸⁹.

1.3.3. Modificação da quitina e quitosana com glutaraldeído

Os estudiosos dos biopolímeros quitina e quitosana como também de seus derivados têm utilizado o glutaraldeído para diversas situações. Comumente, os compostos obtidos da interação destes biopolímeros com o glutaraldeído são testados quanto à capacidade de adsorver cátions metálicos e proteínas. Isto porque os biopolímeros quitina e quitosana em sua forma natural já apresentam boa capacidade em adsorver estas referidas espécies.^{2,19,29,90-95} O mesmo fato é observado para outras diferentes matrizes modificadas com o glutaraldeído.

Recentemente, o interesse em modificar a quitina e quitosana com glutaraldeído aumentou bastante. Os polímeros obtidos são avaliados em diversas aplicações, destacando-se entre elas, a adsorção de uma variabilidade de íons metálicos^{75,96-99} e principalmente enzimas: urease,¹⁰⁰⁻¹⁰³ β -glucosidase, α -amilase, pectinase,¹⁰⁴ fosfalipase,¹⁰⁵ glucoamilase,¹⁰⁶ lactase,¹⁰⁷ α -chymotrypsina, fosfatase⁹³ e glucose isomerase.¹⁰⁸ Apesar de que nestes trabalhos quase sempre obtém-se resultados satisfatórios, normalmente, não discutem o mecanismo de interação dos biopolímeros quitina e quitosana com o glutaraldeído, como também o mecanismo de adsorção de íons metálicos e de enzimas com estes biopolímeros modificados com glutaraldeído. O problema encontra-se na complexidade de eventos que estas interações estão envolvidas. Portanto, são poucos os pesquisadores que se aventuram em estudar e discutir este problema.

Muzzarelli e colaboradores⁹³ não estudando a interação do glutaraldeído com a quitosana propriamente dita, mas investigando a capacidade da quitosana ativada com glutaraldeído em imobilizar certas enzimas, observaram que não se tratava de uma interação tão simples como era suposto por outros pesquisadores. Concluíram que a interação do glutaraldeído com a quitina ou quitosana levava a um alto grau de formação de ligações cruzadas (crosslinking), cuja extensão deveria ser de difícil determinação. Portanto, sugerem que os polímeros resultantes da interação do glutaraldeído com a quitina e quitosana sejam cuidadosamente estudados.

Masri e colaboradores⁹⁶ sugerem que este polímero obtido da interação da quitina com o glutaraldeído tem caráter anfótero, dependendo de certas condições, pode possuir cargas positivas ou negativas. Conclui que este especial comportamento é o principal responsável pelo bom desempenho em adsorver muitos dos cátions metálicos, ânions complexos e íons hidrogênio.

Koyama e Taniguchi⁹⁷ relacionam a capacidade do polímero em adsorver íons metálicos aos grupos aldeídos remanescentes da interação do glutaraldeído com a quitina ou com a quitosana.

Agarwa e Grupta¹⁰⁴ afirmam que a adsorção de enzimas e outros compostos devem-se às condições eletrostáticas e hidrofóbicas do polímero.

Robersts e Taylor,⁷⁶ estudando a formação de gel da interação da quitosana com o glutaraldeído, concluíram que a gelatinização aumenta com o aumento na concentração de quitosana e glutaraldeído, assim como o aumento de temperatura. Entretanto, a gelatinização diminui com o aumento na concentração de ácido acético.

Draget pesquisando a viscosidade de géis obtidos durante a interação covalente do glutaraldeído com quitosanas de diferentes grau de desacetilação, observou surpreendentemente que, conforme aumenta o grau de desacetilação

da quitosana, diminui a viscosidade do gel formado. Sugere então, que as interações hidrofóbicas são envolvidas na estabilização de géis formados por quitosanas que possuem baixo grau de desacetilação.⁷⁷

Como se pode perceber, devido ao pouco tempo de estudo, pouco se conhece a respeito do mecanismo de interação entre os biopolímeros quitina e quitosana com o glutaraldeído, assim como a estrutura formada. Entretanto, sabe-se que uma das principais vantagens mostradas por estes novos polímeros, encontra-se na aumento da hidrofobicidade.^{77,97,104}

Alguns estudos da interação do glutaraldeído com outros materiais relatam algumas propriedades físicas e químicas dos novos materiais como a eficácia na adsorção de íons metálicos,^{96,97} resistência ao esmagamento e solubilidade,⁷⁵ imobilização de enzima e área interna,⁸³ gelatinização e coloração.⁷⁶

1.3.4. Afinidade do glutaraldeído com quitosana e organossilanos

Vimos durante o desenvolver desta introdução que tanto a quitosana com os organossilanos possuem na sua estrutura o grupo amino livre que os tornam bastante reativos na presença do glutaraldeído, formando ligações covalentes bastante estáveis. Aproveitando este fato, neste trabalho realizou-se uma série de modificações químicas da quitosana gerando novos polímeros, os quais foram avaliados quanto a capacidade de adsorver íon cobre e de imobilizar enzimas.

2. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivos principais:

- Preparar duas quitosanas distintas a partir do biopolímero natural quitina.
- Estudar o comportamento calorimétrico da interação do íon cobre com a quitina, com as quitosanas preparadas e com a quitosana comercial.
- Modificar quimicamente a quitosana com o glutaraldeído, e entender melhor o mecanismo de reação e a estrutura formada.
- obter os híbridos quitosana-organossilanos a partir da quitosana e silanos organofuncionalizados interligados pelo glutaraldeído.
- Verificar a capacidade de adsorção do íon cobre e de imobilização de algumas enzimas na quitosana e quitosanas modificadas.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiais e métodos

3.1.1 Substâncias e reagentes

- Quitina de casca de camarão (Fine Chemical Kito, Palhoça-SC-Brasil).
- Quitosana A (Aldrich)
- Glutaraldeído solução em água 50% (Aldrich).
- Ácido acético glacial (Ecibra).
- Ácido clorídrico (Nuclear).
- Boroidreto de sódio (Aldrich).
- EDTA (Nuclear).
- Nitrato de cobre (Vetec).
- 3-(trimetoxisilil)propilamina - TMA (Aldrich).
- N-[3-(trimetoxisilil)propil]etilenodiamina – TMD (Aldrich).
- N-[3-(trimetoxisilil)propil]etilenotriamina - TMT (Aldrich).
- Urease de feijão 1,59 U/mg (Fluka).
- Glucose oxidase de *Aspergillus niger* 23,8 U/mg (Fluka)
- Catalase bovina 47470 U/mg (Fluka)
- Invertase de levedura (*S. cerevisiae*) 104,6 U/mg (Fluka).

3.1.2. Técnicas instrumentais

As análises elementares de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram realizadas em um instrumento da Perkin Elmer modelo PE 2400.

Os difratogramas de raios-X foram obtidos com fonte de Cu-K α em $2\theta = 3-50^\circ$ num difratômetro Shimadzu modelo XD3A.

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos usando pastilha de KBr com 1% de amostra em 20 varreduras com resolução de 4 cm^{-1} em um espectrômetro Bomem modelo MB.

Os espectros de RMN ^{13}C e ^{29}Si foram obtidos em um espectrômetro AC300/p Bruker com ângulo mágico, operando em CP/MAS em 75,47 MHz, pulso de 3 s e tempo de contato de 3 ms para ^{13}C e em 59,63 MHz, pulso de 3 s e tempo de contato de 5 ms para ^{29}Si .

A microscopia eletrônica foi realizada por detecção de elétrons secundários no microscópio Jeol JSTM-300, usando análise EDS.

Os espectros de Raman foram obtidos em pastilhas com um espectrômetro Bomem DA8-FT na região de $0 - 3000\text{ cm}^{-1}$ com 1000 varreduras, 10 cm/s , e resolução 4 cm^{-1} .

Os espectros na região do UV-VISÍVEL, para a determinação de enzima total foram obtidos em um espectrofotômetro Beckman DU 640, com leitura feita em 735 nm.

As medidas calorimétricas foram obtidas em um microcalorímetro de precisão Thermometric 2277 (Thermal Activity Monitor), utilizando a técnica de titulação calorimétrica.

3.2. Síntese das quitosanas

As quitosanas C e F foram sintetizadas pelo processo de desacetilação química alcalina de quitina. Neste processo a quitina foi desacetilada em solução alcalina de NaOH 50% sob temperatura de 110°C durante 1 h. A quitosana foi filtrada e lavada por várias vezes com água bidestilada até pH neutro e por fim foi seca a vácuo à temperatura ambiente.

A quitosana F difere da quitosana C por ter sido obtida através de duas desacetilações seguidas na quitina, enquanto que a quitosana C foi obtida por apenas um processo de desacetilação. A quitina e as quitosanas A, C e F foram trituradas em moinho de facas e passadas em peneira de 80 mesh.

3.3. Determinação do grau de desacetilação das quitosanas

O grau de desacetilação ou então percentual de grupos amino livres NH_2 presentes nas quitosanas foi determinado pelo método de Sabins e Bloch.⁴⁵ O método é fundamentado na relação entre o valor da absorbância em torno da região de 1655 cm^{-1} , que é associada à carbonila presente apenas na unidade básica da quitina e o valor absorbância da banda em torno de 3450 cm^{-1} atribuído ao grupo hidroxila, que está presente tanto na unidade polimérica da quitina,

como da quitosana. O grau de desacetilação das quitosanas foram obtidos aplicando-se a Equação 3.

$$GD=97,67 - [26,486 (A_{1655}/A_{3450})] \quad (3)$$

3.4. Estudo calorimétrico da interação do íon cobre com os biopolímeros

O efeito térmico da interação do íon cobre com os biopolímeros quitina e quitosanas A, C e F foi estudado no microcalorímetro de precisão, aplicando a técnica de titulação calorimétrica, onde uma suspensão aquosa do polímero é titulada com um solução aquosa do íon Cu^{+2} . Esta mesma titulação foi acompanhada também fora do calorímetro pela técnica de isoterma de adsorção em batelada. Com os dados obtidos em ambas as titulações, foram determinados os valores termodinâmicos $\Delta_{\text{int}}H^{\circ}$, $\Delta_{\text{int}}G^{\circ}$ e $\Delta_{\text{int}}S^{\circ}$ para a interação do íon cobre com os biopolímeros. Este mesmo procedimento tem sido aplicado em outros tipos de sistema heterogêneo,¹⁰⁹⁻¹¹⁹ cuja metodologia será descrita com mais detalhes a seguir.

3.4.1. O calorímetro

Os calorímetros são instrumentos termodinâmicos desenvolvidos para detectar o efeito térmico, endotérmico ou exotérmico, de um conhecido processo. O efeito térmico é detectado como potência elétrica que a partir desta, pode-se determinar alguns valores energéticos envolvidos na reação.¹²⁰ O uso de

calorímetros é fundamentado no fato que todo processo físico, químico ou biológico dá origem a um efeito térmico.¹²¹ Apesar de ser um instrumento termodinâmico este também tem sido explorado como ferramenta analítica.^{120,122} Desde a primeira descrição de um calorímetro ocorrido há mais de 200 anos, vários tipos de calorímetros foram desenvolvidos, com diferentes princípios de medida, formato e procedimento experimental.¹²³ Do ponto de vista do princípio de medida do efeito térmico, é muito comum dividir os calorímetros em três grupos: calorímetros adiabáticos, calorímetros de condução de calor e calorímetros de compensação de potência.^{120,123} Em um calorímetro adiabático ideal não deve haver troca de potência térmica entre o vaso reator do calorímetro e o ambiente. No calorímetro de condução de calor, a potência térmica liberada ou absorvida ao sistema, é permitida escoar entre o vaso reator e o ambiente. Normalmente, a potência térmica deslocada entre o vaso reator e o ambiente (pia escoadora de calor) é detectado por um sensor composto de termopilhas posicionado entre eles. No calorímetro de compensação de potência, a potência térmica de um processo exotérmico é balanceada por uma potência de resfriamento.¹²⁰

Muitos calorímetros bastante sensíveis e outros utilizados para acompanhar o efeito térmico de pequenos sistemas são frequentemente chamados de microcalorímetros.¹²³ No entanto, esta terminologia ainda é bastante discutida.^{120,122,123} Um microcalorímetro moderno possui uma sensibilidade variando de 10 a 100 μW , com capacidade do vaso reator variando 1,0 a 25,0 cm^3 .^{121,123} Estes microcalorímetros são frequentemente utilizados em experimentos calorimétricos que envolvem interações de ligantes e processos de interações em solução, processos de dissolução e de mistura, processos de vaporização e sublimação, processos de cura e degradação e experimentos que envolvem materiais vivos.^{120,122}

3.4.2. Princípio básico de calorimetria

O princípio básico termodinâmico que fundamenta estes estudos calorimétricos encontra-se na magnitude de efeito térmico liberado ou absorvido em um sistema, evento químico ou físico, que é proporcional à quantidade de matéria envolvida.¹²³ Então, quando a potência térmica (P) de uma dada interação é medida sob pressão constante, o efeito térmico de interação (Q) pode ser determinado,^{120,123} conforme a equação abaixo:

$$P = d(\Delta Q)/dt \quad (4)$$

Se o sistema é bem conhecido portanto, conhece-se a quantidade dos componentes envolvidos no processo químico, em número de moles (N) envolvidos, a entalpia de interação (ΔH^0) pode então ser calculada pela Equação 5. Subsequentemente, pode-se estimar outros valores termodinâmicos: energia livre de Gibbs (ΔG^0) e entropia (ΔS^0),¹⁰⁹ conforme Equações 6 e 7.

$$\Delta H^0 = Q/N \quad (5)$$

$$\Delta G^0 = -RT \ln K \quad (6)$$

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (7)$$

Os microcalorímetros de condução de calor são montados com diversas partes mecânica e elétrica de tecnologias diferentes, algumas destas podem ser visualizadas na Figura 9.

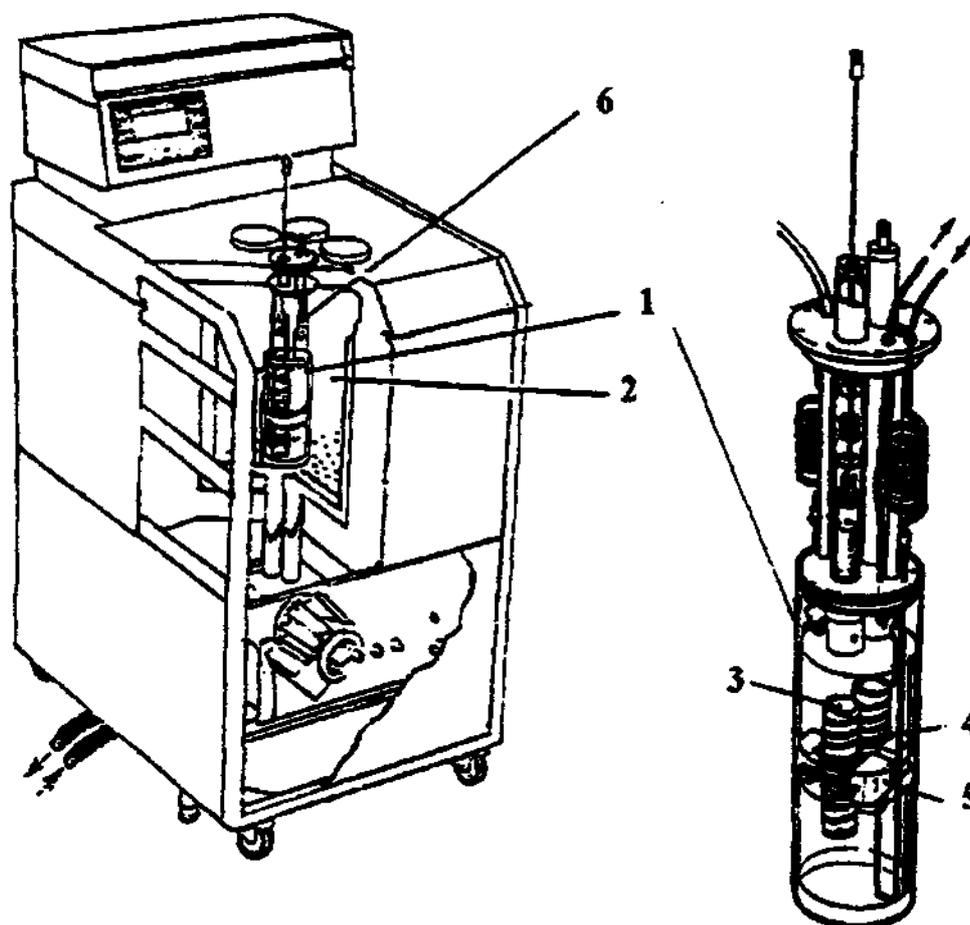


Figura 9. Diagrama do microcalorímetro isotérmico de condução de calor do tipo LKB-Thermometric 2277 sendo: 1) cilindro de medida, 2) banho de água termostaticado, 3) recipiente de medida, 4) termopilhas. 5) bloco metálico termostaticado e 6) trocador de calor.

Entre elas encontram-se as termopilhas, que são componentes microeletrônicos compostos de semi-condutores que destacam-se por serem as responsáveis pelo aumento de sensibilidade dos calorímetros mais modernos, permitindo por este detectar pequenos eventos térmicos.

Frequentemente, as termopilhas, também são conhecidas como placas termopares ou placas de efeito Peltier, que funcionam como sensor da potência térmica escoada entre o vaso reator do microcalorímetro e a pia de escoamento de calor, que normalmente, é um bloco metálico termostatizado, como mostrado na Figura 9.

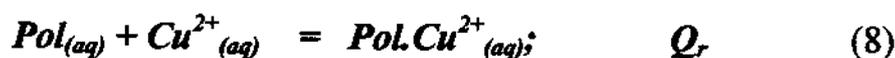
3.4.3. Titulação calorimétrica

Estudos microcalorimétricos que investigam interações de macro-sistemas são em muitos casos realizados pela técnica de titulação calorimétrica. Esta técnica consta em acompanhar ponto a ponto o efeito térmico total da interação. É conduzida por injeções sucessivas da solução titulante ao sistema contido no vaso calorimétrico. Este procedimento é levado até o término da reação ou qualquer outro ponto desejado. É bom salientar que, a solução titulante antes de entrar em contato com o titulado é previamente termostatizada à mesma temperatura. O efeito térmico total de interação é então determinado pelo somatório dos efeitos térmicos obtidos durante a titulação calorimétrica¹²³

3.4.4. Medidas dos efeitos térmicos

Os efeitos térmicos foram obtidos por titulação calorimétrica, realizada com incrementos sucessivos de 10 μL da solução titulante, 0,10 mol dm^{-3} de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ à suspensão aquosa de 50,0 mg do biopolímero em 19,0 cm^3 de água bidestilada, acondicionado em um vaso calorimétrico de vidro com capacidade máxima de 20,0 cm^3 , mantido sob agitação mecânica de 90 rpm, com agitador tipo turbina e termostaticado a $298,15 \pm 0,02$ K.

O efeito térmico obtido da interação do íon cobre com os biopolímeros (Pol), foi determinado em um ciclo de experimentos calorimétricos, com no mínimo três repetições para cada experimento, conforme mostram as equações abaixo:



O efeito térmico de reação Q_r , de hidratação Q_h e de diluição Q_d de cada experimento foi registrado ponto a ponto para cada incremento da titulação calorimétrica. Com isso, o efeito térmico de interação do íon cobre com os biopolímeros Q_{int} em cada ponto da titulação calorimétrica foi obtido aplicando a Equação (11).

$$Q_{int} = Q_r - Q_h - Q_d \quad (11)$$

Pelo fato de o efeito térmico de hidratação ter sido nulo, $Q_h = 0$, em todos os polímeros, a Equação 11 ficou reduzida à Equação 12:

$$Q_{int} = Q_r - Q_d \quad (12)$$

3.4.5. Isoterma de adsorção

Fora do calorímetro a quantidade de íon cobre adsorvido para cada ponto da titulação calorimétrica foi determinado utilizando o método de isoterma em batelada. Neste processo, 50,0 mg do polímero foram suspensos em 19,0 cm³ de água bidestilada em um frasco de polietileno. A este sistema foi adicionado um volume idêntico da solução titulante de nitrato de cobre, utilizado na titulação calorimétrica, correspondente a cada ponto deste experimento calorimétrico. O sistema foi mantido em um banho termostaticado a 298 ± 1 K por 2 h. Após este intervalo de tempo, uma amostra do sobrenadante foi titulada com solução de EDTA $1,0 \times 10^{-2}$ mol dm⁻³. O número de moles fixos ou adsorvidos (N_f) de íon cobre foi calculado aplicando a Equação 13.

$$N_f = (N_i - N_s)/m \quad (13)$$

onde N_i é o número de moles inicial de íon cobre na solução titulante, N_s o número de moles final de íon cobre em equilíbrio no sobrenadante e m a massa do polímero.

As condições experimentais destas isotermas foram as mais próximas possíveis das condições da titulação calorimétrica, pois variações muito grande podem afetar o comportamento de adsorção do íon cobre pelos biopolímeros.

3.4.6. Tratamento dos dados da isoterma de adsorção da calorimetria

Nos sistemas em estudos nos quais a adsorção em solução ocorre na interface sólido-solução seguem o modelo de Langmuir que considera a superfície composta de sítios de adsorção na qual a espécie adsorvida interage somente com um sítio, formando uma monocamada sobre a superfície. Os dados da isoterma foram assim ajustados ao modelo de Langmuir, aplicando-se a Equação 14, com o objetivo de obter a fração molar do íon cobre em equilíbrio no sobrenadante (X), em cada ponto da titulação calorimétrica.

$$N_s/N_f = N_s/N^s + 1/b \quad (14)$$

Na Equação 14 N_s é o número de moles final de íon cobre no sobrenadante em cada ponto da titulação, N_f o número de moles fixo de íon cobre por grama do polímero em cada ponto da titulação, ambos obtidos na isoterma de adsorção, Equação 13, N^s é a quantidade de íon cobre necessário para formação da monocamada e b é uma constante relacionada com a intensidade de adsorção, obtidos pela linearização da curva da isoterma de adsorção. Como exemplo é mostrada na Figuras 10 a curva da isoterma de adsorção, N_f versus N_s da quitina.

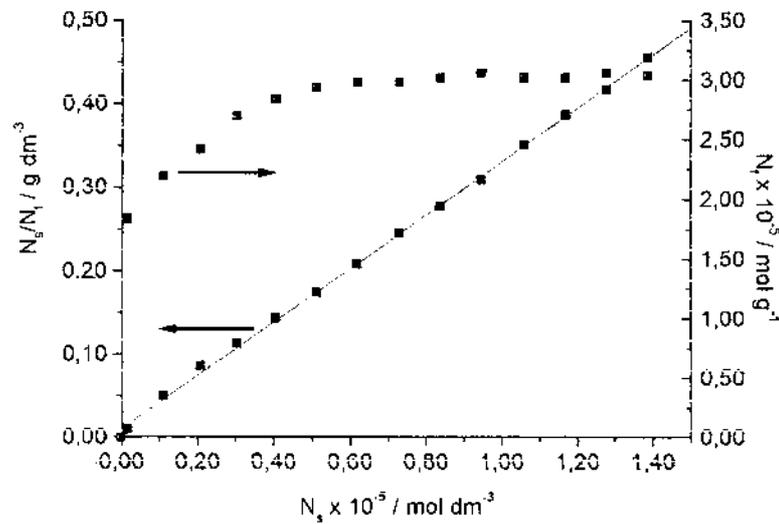


Figura 10. Curva da isoterma de adsorção do íon cobre pela quitina, N_f versus N_s , e sua forma linearizada, N_s/N_f versus N_s .

O coeficiente angular obtido $\alpha = I/N^0$, e o coeficiente linear $\beta = I/b$ obtido da curva linearizada, N_s/N_f versus N_s , foi aplicado ao modelo de Langmuir Equação 15, que é um rearranjo da Equação 14. A partir da qual foi determinado o número de moles do íon cobre em equilíbrio no sobrenadante, para cada ponto da titulação, N_{sob} .

$$\alpha N_{sob}^2 + (m - N_i \alpha + \beta V) N_{sob} - \beta V N_i \quad (15)$$

onde α é o coeficiente angular (g mol^{-1}), β o coeficiente linear (g dm^{-3}), V o volume total adicionado em cada ponto da titulação (dm^3), N_i o número de moles adicionados em cada ponto da titulação (mol) e m a massa do polímero (g).

A fração molar de íon cobre em equilíbrio no sobrenadante para cada ponto da titulação calorimétrica (X) foi então determinado pela Equação 16.

$$X = N_{sob} / (N_{sob} + N_{\acute{a}gua}) \quad (16)$$

3.4.7. Tratamento dos dados calorimétricos

O valor de X e os dados obtidos da titulação calorimétrica foram ajustado ao modelo de Langmuir, conforme Equação 17.

$$X/Q_{int} = X/Q_{mono} + 1/Q_{mono} (K-1) \quad (17)$$

onde Q_{int} é o efeito térmico de interação do íon cobre-polímero em cada ponto da titulação calorimétrica, Q_{mono} é o efeito térmico de formação da monocamada de íon cobre no polímero e K a constante de proporcionalidade, na qual está incluída a constante de equilíbrio de cada ponto da reação.

Um tratamento similar foi realizado para os dados da titulação calorimétrica. Da curva linearizada, X/Q_{int} versus X , obteve-se o coeficiente angular $\alpha = 1/Q_{int}$ e o coeficiente linear $\beta = 1/Q_{mono} (K-1)$. Como exemplo, tem-se os dados da quitina mostrados na Figura 11, que foram ajustados ao modelo de Langmuir modificado, pela aplicação da Equação 17, obtendo-se o efeito térmico de formação da monocamada Q_{mono} , como também a constante de proporcionalidade K .

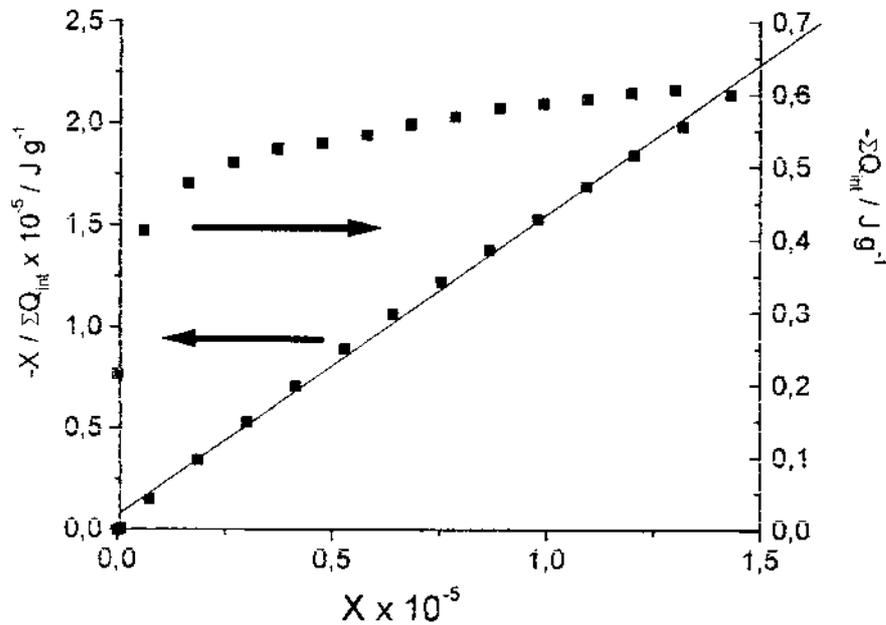


Figura. 11 Curva da titulação calorimétrica da quitina ΣQ_{int} versus X e sua forma linearizada $X/\Sigma Q_{int}$ versus X .

3.4.8. Obtenção dos dados termodinâmicos

Com a entalpia de formação da monocamada Q_{mono} e a quantidade de íon cobre adsorvido para formação da monocamada N^s , determinou-se a entalpia de interação $\Delta_{int}H^0$ pela Equação (18).

$$\Delta_{int}H^0 = Q_{mono}/N^s \quad (18)$$

A partir de $\Delta_{int}H^0$ e K pode-se determinar outros dados termodinâmicos $\Delta_{int}G^0$ e $\Delta_{int}S^0$ aplicando as Equações (6) e (7).

$$\Delta_{int}G^0 = -RT \ln K \quad (6)$$

$$\Delta_{int}G^0 = \Delta H^0 - T \Delta S^0 \quad (7)$$

onde R é a constante dos gases, T temperatura em kelvin e K é a constante de proporcionalidade calculada, em que está incluída a constante de equilíbrio.

3.5. Preparação da quitosana-glutaraldeído

Nesta preparação foram dissolvidos 0,40g da quitosana F ($2,48 \times 10^{-3}$ mol) em 60 cm^3 de solução de ácido acético glacial ($5,0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) à temperatura ambiente. Após 1 h sob agitação, a fração insolúvel foi separada por centrifugação, eliminando-se assim as impurezas. À quitosana F dissolvida em ácido acético foram adicionados $80,0 \text{ cm}^3$ de glutaraldeído em várias concentrações, variando de 0,0 à $25,0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$. Desta forma, obtiveram-se nove diferentes quitosanas modificadas com glutaraldeído, que foram denominadas por QGX, onde X= (0,0; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 e 25,0) que representa a concentração de glutaraldeído utilizado na preparação de cada composto. Após a adição do glutaraldeído a mistura foi imediatamente agitada mecanicamente por 30 s e depois foi mantida em repouso por 1 h. O gel formado foi neutralizado lentamente com solução de hidróxido de sódio $0,20 \text{ mol dm}^{-3}$ até pH em torno de 6 a 7. O gel foi então lavado extensivamente com água bidestilada e finalmente seco a vácuo. É bom salientar que a QG0,0 foi preparada

sem adição do glutaraldeído, isto é, a quitosana foi apenas dissolvida em solução de ácido acético e precipitada em solução de hidróxido de sódio.

3.6. Preparação dos híbridos quitosana-organossilanos

A preparação dos híbridos constituiu na dissolução de 1,0g de quitosana F ($6,2 \times 10^{-3}$ mol) em 40 cm^3 de solução de ácido acético glacial ($0,10 \text{ mol dm}^{-3}$). As impurezas insolúveis desta solução foram eliminadas por centrifugação. À quitosana dissolvida foi adicionado o equivalente molar de organossilano ($6,2 \times 10^{-3}$ mol). Para assegurar uma boa homogeneização, a mistura foi agitada mecanicamente por 1 h. Só então, foi adicionado á esta mistura $6,2 \times 10^{-3}$ mol de glutaraldeído para cada mol de nitrogênio presente nos organossilanos. Um gel foi formado imediatamente, o qual foi mantido em repouso por 24 h com o objetivo de favorecer a ocorrência do processo sol-gel. Após este tempo, o gel foi lavado extensivamente com água bidestilada e finalmente seco a vácuo. Toda a preparação foi realizada à temperatura ambiente. Para obtenção dos híbridos SiGQ1, SiGQ2 e SiGQ3 utilizaram-se três organossilanos diferentes TMA, TMD e TMT.

3.7. Aplicação das quitosanas modificadas

3.7.1. Capacidade de adsorção do íon Cu^{2+}

A capacidade das quitosanas modificadas adsorver o íon cobre foi determinada pelo método de batelada. Uma série de amostras do polímero (em

torno de 50 mg) foi suspensa em 20,0 cm³ de de solução de nitrato de cobre 1,0 x 10⁻³ mol dm⁻³, em um frasco de polietileno. Todos os frascos foram mantidos em um banho termostaticado à 298 ± 1 K, sob agitação mecânica por vários intervalos de tempo, variando de 10 a 180 min. Após o tempo de contato definido, o sólido foi separado por filtração e a quantidade de cobre remanescente na solução foi determinada por titulação com solução de EDTA 1,0 x 10⁻² mol dm⁻³. A quantidade de cobre adsorvido pelo polímero foi determinada utilizando a Equação 13. Os resultados são mostrados nos gráficos de N_t versus tempo de contato. Um exemplo, relativos aos resultados da quitosana F, são mostrados na Figura 12.

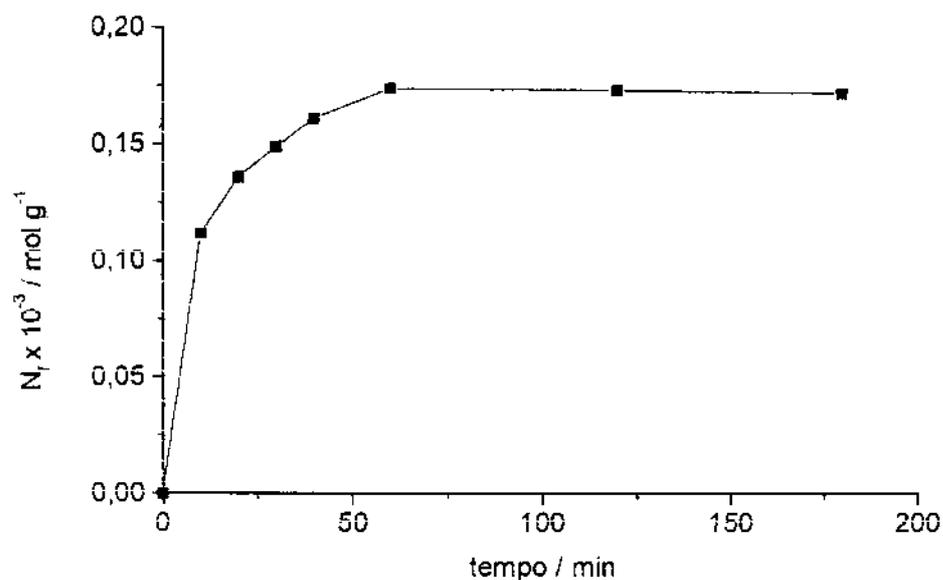


Figura 12. Isoterma de adsorção de íon Cu⁺² da quitosana F.

3.7.2. Capacidade de imobilizar enzimas

Uma amostra do polímero, em torno de 50 mg, foi suspensa em 10,0 cm³ de uma solução contendo 2,5 mg cm⁻³ de enzima com tampão fosfato de pH 6,86 em um frasco de vidro vedado. Este sistema foi mantido em um banho termostático a 298 ± 1 K sob agitação mecânica durante 2 h. A quantidade de enzima imobilizada pelo polímero (E_{im}) foi calculada subtraindo a quantidade de enzima determinada no sobrenadante após o processo de imobilização (E_{fi}) da quantidade de enzima determinada na solução antes do processo de imobilização (E_{in}), conforme a Equação 19. A quantidade de enzima foi determinada pelo método de Lowry.¹²⁴ O método mede o teor de proteína total em solução por espectrofotometria com leitura em 735 nm, utilizando o reagente Folin fenol depois de um prévio tratamento com cobre alcalino.

$$E_{im} = E_{in} - E_{fi} \quad (19)$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização da quitina e das quitosanas

A espectroscopia na região do infravermelho é uma das técnicas muito utilizadas para a caracterização destes biopolímeros, de forma que, um estudo detalhado destes polímeros naturais e modificados é de fundamental importância para este trabalho.

O espectro da quitina é mostrado na Figura 13. A banda na região de 3400 cm^{-1} , intensa e larga, é devido às vibrações de estiramento do grupo OH presente na quitina e na água que acompanha o polímero. Esta banda permanece presente em todos os espectros dos biopolímeros e das quitosanas modificadas. As bandas entre 3200 a 3100 cm^{-1} , estão associadas à presença do grupo amida, pois, como veremos a seguir, as mesmas não devem ser notadas no espectro da quitosana. As bandas na região de 2900 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento C-H. As quatro bandas consideravelmente fortes, observadas entre 1700 e 1300 cm^{-1} , são bem características no espectro destes biopolímeros. A banda em 1654 cm^{-1} é atribuída à deformação axial de C=O da carbonila presente na quitina, denominada amida I. A banda em 1558 cm^{-1} corresponde à mistura de dois modos vibracionais, N-H no plano e o estiramento C-H, que é chamada de amida II. A banda em 1378 cm^{-1} é atribuída à deformação angular simétrica do grupo CH_3 . A banda em 1313 cm^{-1} é menos intensa que as outras três e é atribuída às ligações C-N e CH_2 .¹²⁵⁻¹²⁸ As bandas entre 1200 e 1100 cm^{-1} , que também são encontradas no espectro da quitosana e celulose, ainda não se sabe muito bem a respeito das suas origens.^{125,126}

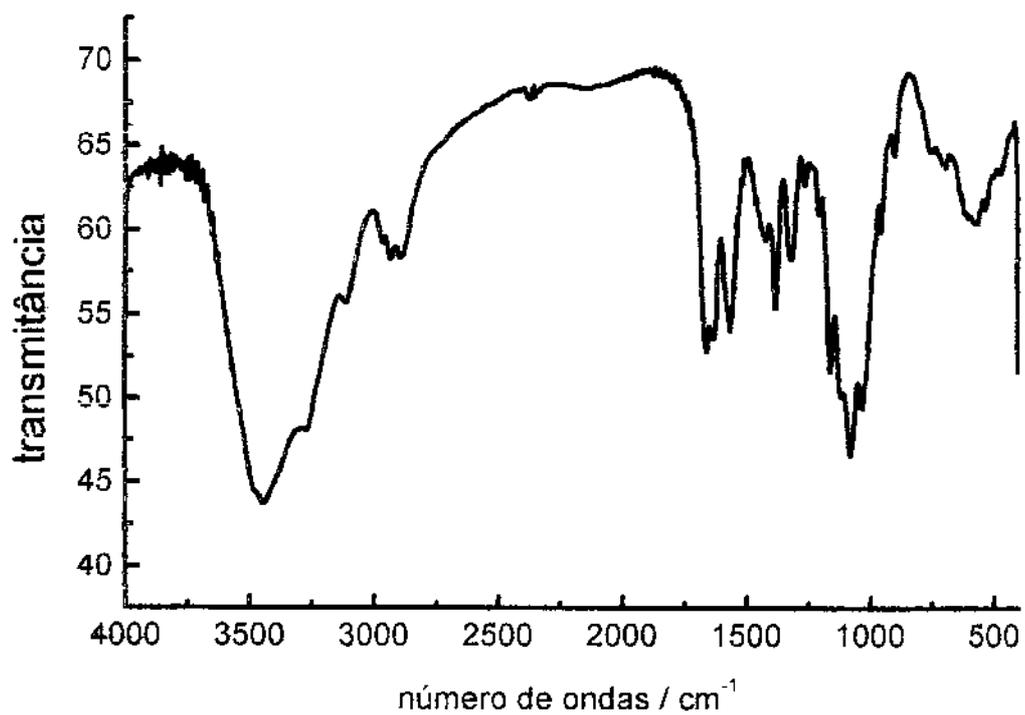


Figura 13. Espectro da quitina na região do infravermelho.

Para efeito comparativo, a Figura 14 mostra o conjunto de espectros da quitina e das quitosanas A, C e F. Comparando os espectros das quitosanas com o espectro da quitina verifica-se que, com exceção do espectro da quitosana C, notam-se significativas modificações na região entre 1700 a 1300 cm^{-1} . O desaparecimento da banda em 1558 cm^{-1} e o surgimento de uma nova banda em 1598 cm^{-1} , devido à deformação NH_2 , predomina sobre a banda em 1654 cm^{-1} . Esta última banda está associada à carbonila $\text{C}=\text{O}$, que tende a diminuir, conforme vai aumentando o grau de desacetilação da quitosana.

O desaparecimento das duas bandas entre as regiões 3200 e 3100 cm^{-1} , como já mencionado, está relacionado à desacetilação do grupamento NHCOCH_3 , transformando a amida em amina primária. Entretanto, nota-se a permanência das bandas nas regiões em torno de 3400 cm^{-1} , esta associada à hidroxila. A banda em 2900 cm^{-1} está relacionada à ligação CH e as bandas entre 1200 a 1100 cm^{-1} são características destes biopolímeros. De um modo geral, pode-se notar que o espectro da quitosana C possui uma semelhança muito grande com o espectro da quitina e ambas diferem dos espectros das quitosanas A e F. Isto demonstra que a quitosana C assemelha-se mais com o biopolímero quitina do que com o biopolímero quitosana. Este fato será melhor comentado a seguir, quando for discutido o grau de desacetilação de cada quitosana.

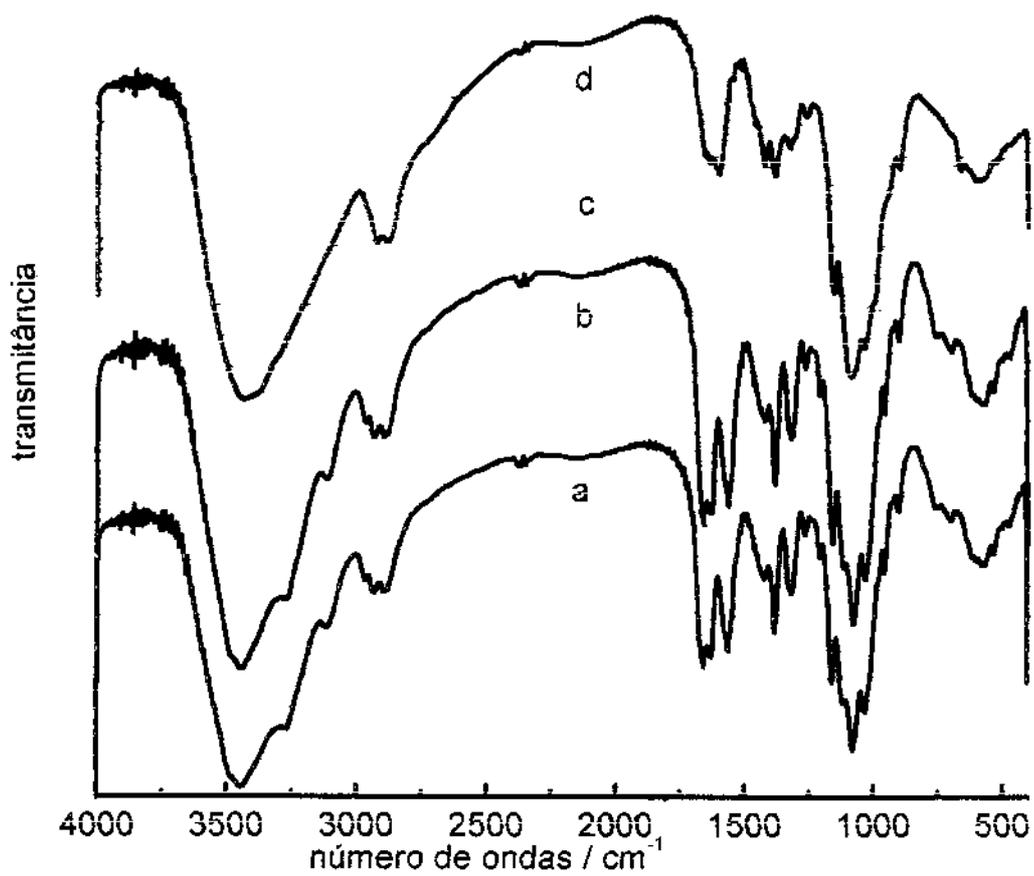


Figura 14. Espectro na região do infravermelho: a) quitina, b) quitosana C, c) quitosana A e d) quitosana F.

4.2. Grau de desacetilação das quitosanas

A melhor forma para se determinar o grau de desacetilação da quitosana (GD) ainda tem sido motivo de muitas investigações. Este parâmetro está associado diretamente à quantidade de grupos amina livres $-NH_2$ e de grupos N-acetil $-NHCOCH_3$ distribuídos na superfície da quitosana. Algumas técnicas instrumentais propostas para sua determinação, serão apresentadas a seguir.

4.2.1. Espectroscopia na região do infravermelho

Várias técnicas são empregadas para determinar o grau de desacetilação, entretanto, dentre elas a mais utilizada tem sido a espectroscopia na região do infravermelho.⁴¹⁻⁴⁶

A Tabela 3 mostra o grau de desacetilação dos biopolímeros, obtidos pela técnica de espectroscopia na região do infravermelho.⁴³ Nesta tabela, foi incluído também o grau de desacetilação da quitina, pelo fato de que o produto natural também possui unidades desacetiladas. Sabe-se que a quitina e a quitosana naturais são considerados biopolímeros heterogêneos, isto é, na cadeia polimérica de ambos são encontrados tanto monômeros de quitina, quanto de quitosana, porém, o que as diferem é o percentual destas unidades na cadeia polimérica.³⁰⁻³³

Colocando as quitosanas em ordem crescente de grau de desacetilação obtidos por esta técnica, observa-se a seqüência: C < A < F. Este resultado confirma o baixo grau de desacetilação da quitosana C. Este comportamento já era esperado, pois o espectro da quitosana C apresentou-se muito semelhante ao da quitina, com GD = 77,48 e 73,26%, respectivamente.

Tabela 3. Percentual de desacetilação (GD) dos biopolímeros, determinados pela espectroscopia na região do infravermelho.

Quitina	Quitosana A	Quitosana C	Quitosana F
73,26	81,01	77,48	86,12

Os dados demonstram também que as quitosanas A e F possuem grau de desacetilação bastante elevado. Entretanto, a quitosana A possui grau de desacetilação inferior ao da quitosana F, como se observa pelos valores de GD = 81,01 e 86,12%, respectivamente. Esta diferença só foi possível ser observada através da aplicação desta técnica, pois como visto nos espectros mostrados na Figura 14, são bastante semelhantes, o que indica um grau de desacetilação bastante próximos.

4.2.2. Análise elementar

A análise elementar pode ser uma outra ferramenta empregada para se avaliar a eficiência do processo de desacetilação da quitina, pois espera-se que, quanto mais eficiente for a desacetilação da quitina, maior será o percentual de nitrogênio encontrado na quitosana, e conseqüentemente maior o grau de desacetilação.

A Tabela 4 mostra os percentuais de carbono, hidrogênio, nitrogênio e a relação carbono/nitrogênio encontrados nos biopolímeros. Colocando-os em ordem crescente de percentual de nitrogênio temos outra vez a seqüência $C < A < F$. Novamente o comportamento da quitosana C aproxima-se mais da quitina, com

percentuais de nitrogênio de 5,06 e 6,78 %, respectivamente, portando, mais uma vez a quitosana C é apontada como a que possui menor grau de desacetilação. Os valores do percentual de nitrogênio obtidos para as quitosanas A e F são próximos entre si, ou seja, 7,68 e 7,86 %, respectivamente, e bem superiores à quitosana C com 6,78 %. Este comportamento também foi observado com os valores do grau de desacetilação obtidos na espectroscopia na região do infravermelho. Desta forma, com os resultados até aqui apresentados, com relação ao grau de desacetilação das quitosanas, verifica-se que, ambas as técnicas, espectroscopia na região do infravermelho e análise elementar, são bastante coerentes entre si.

Tabela 4. Percentuais de carbono, hidrogênio, nitrogênio e relação carbono/nitrogênio nos biopolímeros

	Quitina	Quitosana A	Quitosana C	Quitosana F
C	36,04	39,16	43,64	40,76
H	5,47	7,62	6,40	7,33
N	5,06	7,68	6,78	7,86
C/N	7,12	5,10	6,44	5,19

4.2.3. Ressonância magnética nuclear

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{13}C no estado sólido é normalmente pouco utilizada para estimar o grau de desacetilação destes polímeros. Entretanto, recentemente, alguns estudos foram realizados na tentativa de ajustar esta técnica para este fim, com resultados bastante animadores.^{47,129,130}

Por esta técnica é fundamental a observação do comportamento de dois picos, um em torno de 173 ppm relacionado ao carbono da carbonila C=O e outro em torno de 22 ppm, este relacionado ao carbono da metila CH₃, que corresponde à parte acetilada do biopolímero. Conforme a eficiência do processo de desacetilação sobre a quitina, a intensidade destes picos tende a diminuir, verificando-se portanto, que as intensidades estão claramente associadas ao grau de desacetilação da quitosana.

Na Figura 15 podem ser vistos os espectros de RMN ¹³C dos biopolímeros quitina e quitosanas C, A e F. Observa-se no espectro da quitina, Figura 15a, a presença dos dois picos característicos deste biopolímero relacionados ao carbono da carbonila e ao carbono da metila, dando os valores em 173,4 e 22,4 ppm, respectivamente.

Como pode ser visto também, ambos os picos apresentam intensidade bem elevada. Os valores relativos das intensidades destes picos para cada biopolímero pode ser melhor acompanhado na Tabela 5.

Como esperado, a quitina é o biopolímero que apresenta picos com maiores intensidades. Em seguida vem a quitosana C com valores bem aproximados aos da quitina, demonstrando que esta quitosana possui baixo grau de desacetilação. As quitosanas A e F apresentam espectros bem semelhantes ao espectro esperado para uma quitosana 100% desacetilada, demonstrando que ambas as quitosanas A e F possuem ótimo grau de desacetilação. Entretanto, observando os dados da Tabela 5, verifica-se que a quitosana F é a que apresenta menor valor de intensidade para o pico relacionado ao carbono da metila e ausência do pico que corresponde ao carbono da carbonila. Esta técnica mais uma vez confirma a maior desacetilação da quitosana F e leva novamente à seqüência C < A < F, para o grau de desacetilação das quitosanas.

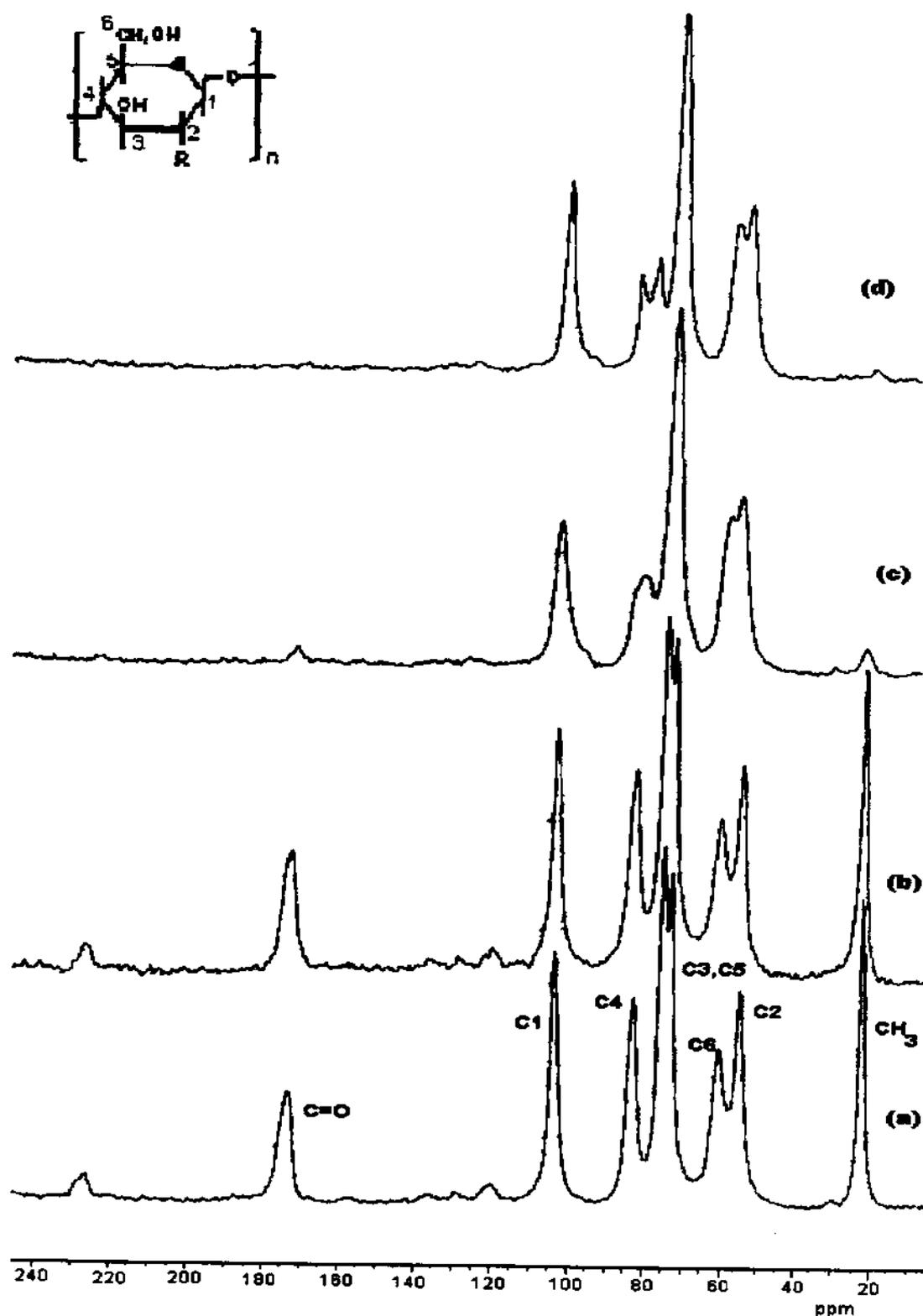


Fig. 15 Espectro de RMN ^{13}C : a) quitina, b) quitosana C, c) quitosana A e d) quitosana F

Tabela 5. Intensidades relativas dos picos na RMN ^{13}C da quitina e das quitosanas associadas aos carbonos da carbonila (C=O) em 173,4 ppm e metila (CH_3) em 22,4 ppm.

Carbono	Quitina	Quitosana A	Quitosan C	Quitosana F
C=O	6,37	0,73	4,64	0,00
CH_3	14,73	1,22	13,38	0,58

4.2.4. Difração de Raios-X

Das técnicas utilizadas neste trabalho, a difratometria de Raios-X é a menos apropriada para a determinação do grau de desacetilação. No entanto, tem-se observado uma certa correlação entre elas.¹³⁰

A Figura 16 mostra os difratogramas de Raios-X dos biopolímeros. A quitina é a que apresenta maior grau de cristalinidade, com nove picos bem definidos, cujos valores em 2θ são: 8,94; 18,92; 20,47; 26,09; 35,09; 39,75; 42,12; 45,22; e 49,58°.

De um modo geral, verifica-se que as quitosanas possuem menor grau de cristalinidade do que a quitina, e conforme aumenta o grau de desacetilação diminui o grau de cristalinidade, levando a quitosana A a apresentar apenas dois picos no seu difratograma em 2θ igual a 10,06 e 19,62°. A diminuição do grau de cristalinidade durante a desacetilação da quitina não está associada apenas à remoção dos grupos acetil na quitosana, mas também, às drásticas condições de processamento da quitina e da quitosana.^{7,12,19,38,39}

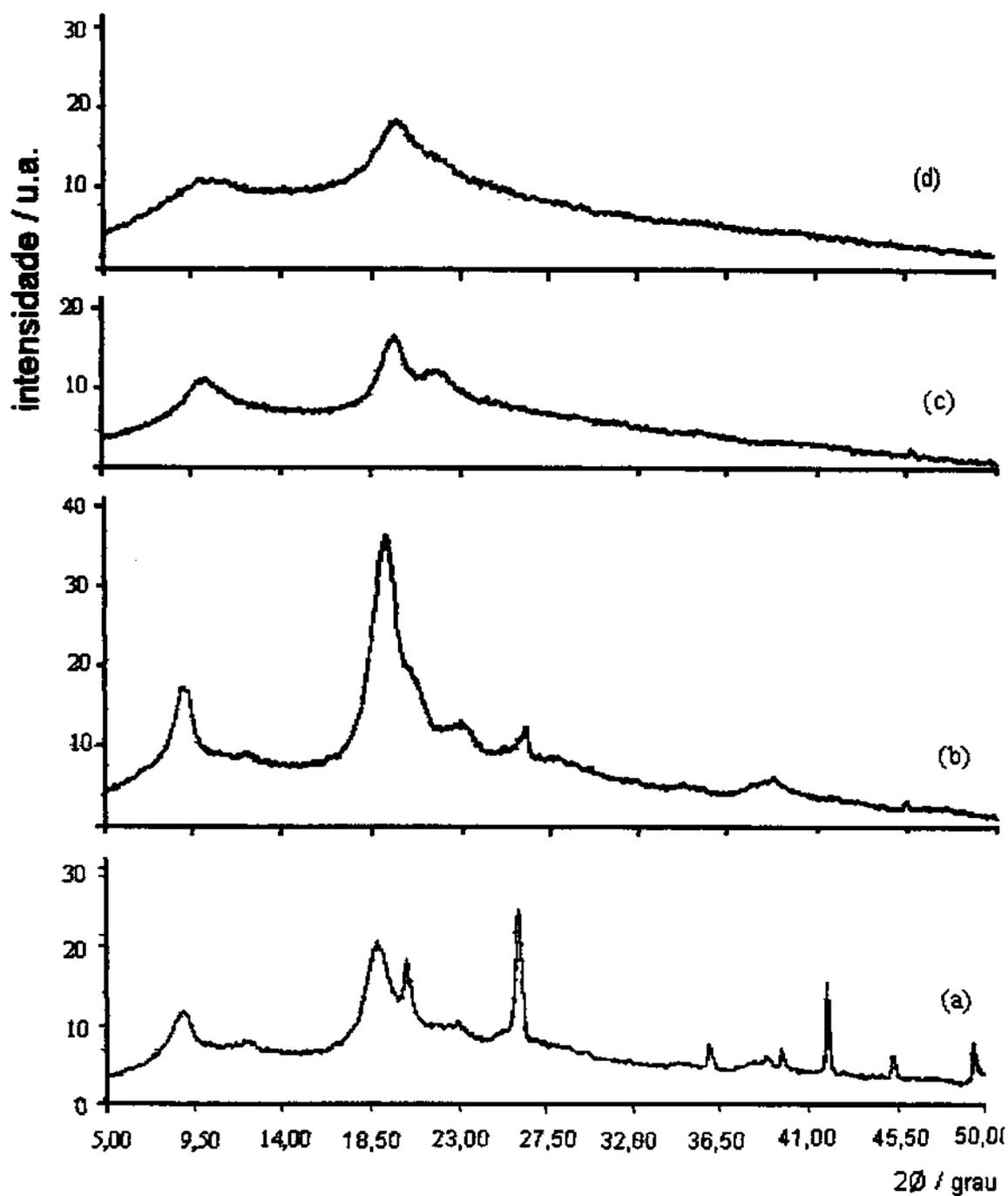


Figura 16. Difratoograma de Raios-X: a) quitina, b) quitosana C, c) quitosana F e d) quitosana A

Portanto, as quitosanas F e A foram obtidas a partir de diferentes quitinas e processamento, sendo natural que ambas possuam características físico-químicas bastante distintas. Este fato já foi comentado na parte introdutória deste trabalho, quando discutiu-se sobre a qualidade deste biopolímeros, vide item 1.1.5. Quando colocamos as quitosanas em ordem decrescente quanto ao grau de cristalinidade obtém-se $C > F > A$. Verifica-se que esta é diferente da seqüência encontrada na espectroscopia na região do infravermelho, análise elementar e RMN de ^{13}C , observando uma inversão entre as posições das quitosanas A e F. De fato, o grau de cristalinidade não dá uma relação direta com a presença ou ausência do grupo amina na cadeia polimérica do biopolímero. Entretanto, este estudo físico-químico pode ser um importante caminho para o esclarecimento de alguns comportamentos adversos destes biopolímeros, que serão vistos e discutidos posteriormente.

4.3. Dados calorimétricos

4.3.1. Adsorção em solução

Nos processos de adsorção em estudo a adsorção ocorre na interface solução/sólido. É um processo mais complexo do que aquele que ocorre na interface gás/sólido. Isto porque, no processo de adsorção que ocorre na interface solução/sólido há a participação de um terceiro componente, que é o solvente, no caso a água, cujas moléculas provocam interações adicionais entre os componentes do sistema, gerando competitividade entre o soluto/superfície, solvente/superfície e entre soluto/solvente.¹³¹

Para os dados experimentais de isoterma de adsorção em solução o modelo de monocamada é melhor desenvolvido e mais aplicável, no qual toma-

se como base os modelos usados para adsorção de gases, introduzindo-se parâmetros específicos do sistema em solução, aproximando-o de um sistema ideal.¹³²

Um modelo aplicável a este sistema de adsorção é o modelo de Langmuir, que considera a superfície composta de sítios de adsorção, na qual toda espécie adsorvida interage somente com um sítio, formando uma monocamada sobre a superfície.

Desde o começo das investigações destes biopolímeros, observou-se que tanto a quitina como a quitosana e alguns de seus derivados possuem muita habilidade em adsorver íons metálicos em soluções aquosas,¹³²⁻¹⁴⁵ possuindo em particular, grande afinidade pelo íon cobre.^{8,73,146-150} Estes processos de adsorção foram perfeitamente ajustados ao modelo de Langmuir, cujo resultados serão mostrados a seguir.

4.3.2. Isoterma de adsorção do Cu^{2+} pelos biopolímeros

O principal objetivo das isotermas é estimar os valores da fração molar (X) do íon cobre em equilíbrio no sobrenadante, em cada ponto da titulação calorimétrica. Este procedimento foi necessário pelo fato de não se possível determinar este parâmetro durante os experimentos calorimétricos, de maneira simultânea.

O comportamento das curvas de adsorção deste íon pelos biopolímeros quitina e quitosanas C, F e A, obtidos pelo método de isoterma em bateladas, pode ser observado nas Figuras 17, 18, 19 e 20, respectivamente.

De um modo geral, as curvas das isotermas demonstram que a superfície da quitina e de todas as quitosanas ficam saturadas pelo íon cobre, atingindo

patamares de saturação bem definidos. Entretanto, estas isotermas mostram níveis de patamares diferentes. Comparando os níveis dos patamares das isotermas, fica bem claro que, todas as quitosanas possuem maior capacidade em adsorver o íon cobre do que a quitina. Este fato já é bem conhecido e é atribuído ao diferente grau de população dos grupos amino acetilado e ou desacetilado, localizado no carbono 2 da unidade monomérica dos biopolímeros. Na quitina o grupo amino está acetilado, enquanto que na quitosana este encontra-se livre,^{4,28} conforme mostra a Figura 1. Este mesmo fato é também associado às diferentes capacidades de adsorção de íons metálicos apresentadas por quitosanas possuidoras de grau de desacetilação distintos. A quitosana que apresenta maior grau de desacetilação, isto é, possui maior quantidade de grupos amino livres na superfície, mostra melhor capacidade de adsorção do que a quitosana, que possui grau de desacetilação menor. Entretanto, neste trabalho algumas divergências foram observadas nos resultados obtidos pelas isotermas de adsorção.

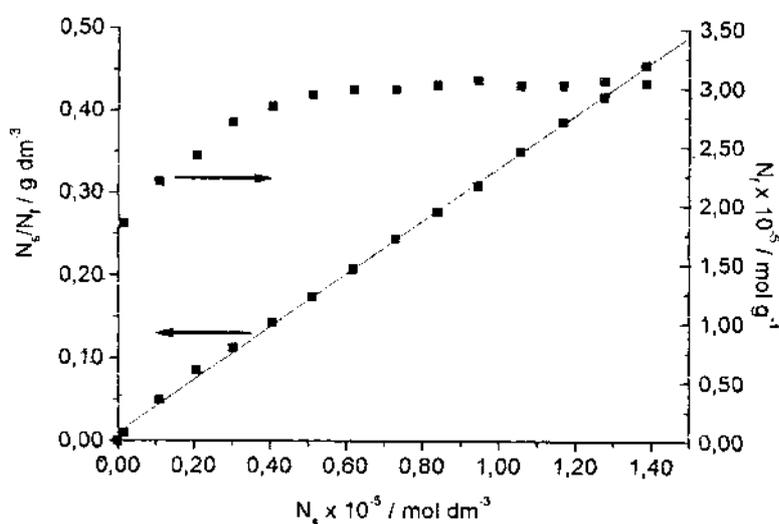


Figura 17. Isoterma de adsorção do íon cobre pela quitina, apresentado N_f versus N_s e sua forma linearizada N_s/N_f versus N_s .

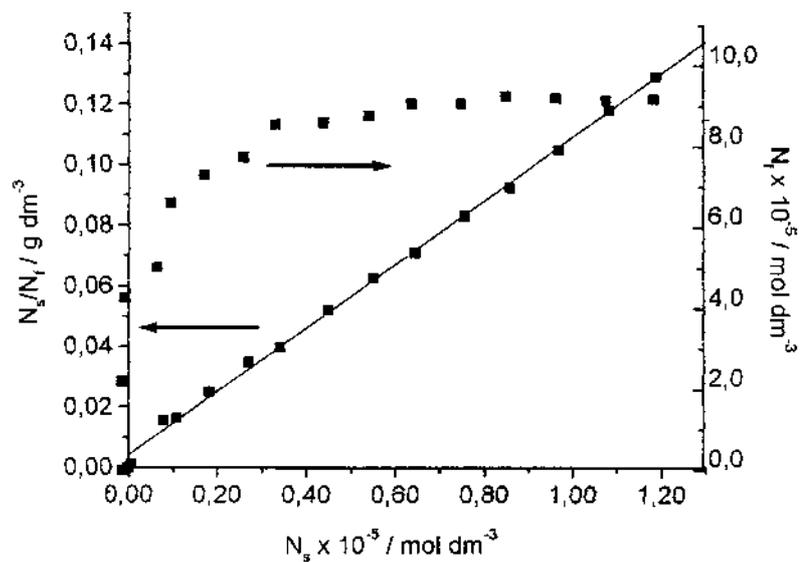


Figura 18. Isotherma de adsorção do íon cobre pela quitosana C, apresentado N_f versus N_s e sua forma linearizada N_s / N_f versus N_s .

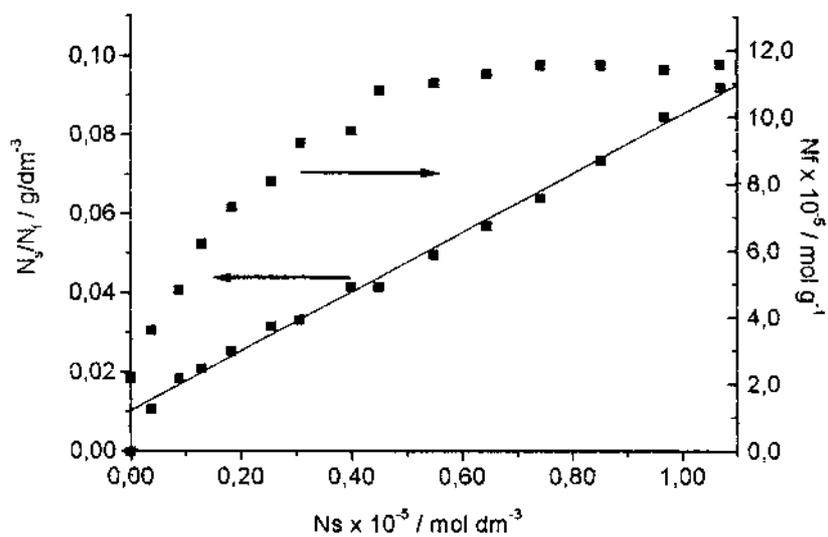


Figura 19. Isotherma de adsorção do íon cobre pela quitosana F, apresentado N_f versus N_s e sua forma linearizada N_s / N_f versus N_s .

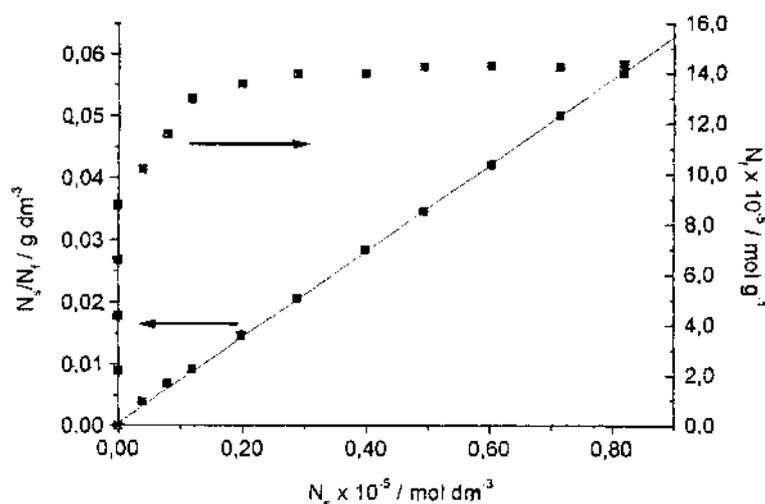


Figura 20. Isotherma de adsorção do íon cobre pela quitosana A, apresentado N_f versus N_s , e sua forma linearizada N_s/N_f versus N_s .

A Figura 21 mostra a forma linearizada das isotermas de adsorção do íon cobre pelos biopolímeros em um só gráfico, N_s/N_f versus N_f , das quais obteve-se a quantidade do cátion necessário para formação da monocamada de cada biopolímero, onde $N^S = 1/\text{coeficiente angular da reta}$, tendo $3,1 \times 10^{-5}$, $9,5 \times 10^{-5}$, $1,3 \times 10^{-4}$ e $1,4 \times 10^{-4} \text{ mol g}^{-1}$ para a quitina, quitosana C, F e A, respectivamente. Esperava-se que a capacidade de adsorção do íon cobre pelas quitosanas fosse a mesma seqüência observada para o grau de desacetilação das quitosanas. Entretanto, como verifica-se, o valor de N^S para a quitosana A é superior ao da quitosana F, fazendo com que a seqüência da capacidade de adsorção de íon cobre pelas quitosanas, $C < F < A$, torne-se diferente da seqüência obtida para o grau de desacetilação das mesmas que foi, $C < A < F$, contrariando o que se esperava. Este fato será melhor discutido em detalhes junto aos resultados da titulação calorimétrica, devido ambas os experimentos estarem

fundamentados sob o mesmo fenômeno, que envolve os centros ácido e básicos do sistema.

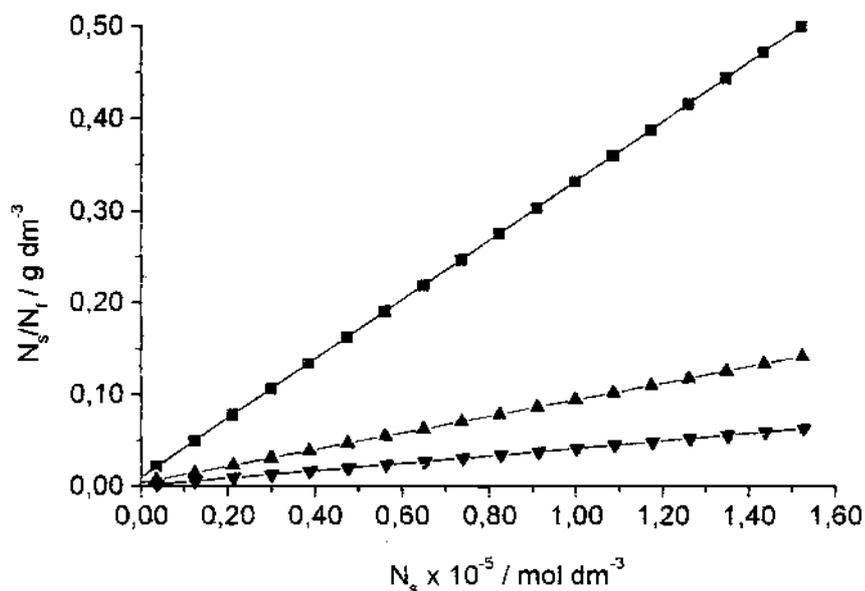


Figura 21. Formas linearizadas das curvas das isotermas de adsorção com seus respectivos valores de N^s : quitina (\blacksquare), quitosana C (\blacktriangle), quitosana F (\circ) e quitosana A (\blacktriangledown).

Outro fato interessante é que, a quantidade de íons cobre necessária para formação da monocamada N^s em todos os biopolímeros é muito inferior à capacidade teoricamente esperada, se levado em consideração que 1 mol do polímero seria capaz de adsorver pelo menos 1 mol do íon cobre. Isto porque, cada monômero do polímero possui 1 átomo de nitrogênio, que como tudo indica, é o maior responsável pela interação do íon metálico com a quitina e quitosana. Entretanto, uma total saturação destes centros só seria possível se os mesmos estivessem totalmente livres e disponíveis, o que normalmente não é verificado neste tipo de material. Apesar disso, estes biopolímeros são

considerados bons adsorventes de metais, principalmente quando comparados com materiais semelhantes.

A não total disponibilidade dos centros quelantes presentes na quitina e quitosana, pode estar associado a vários fatores como, por exemplo, o grau de desacetilação e cristalinidade, ambos já discutido neste trabalho. Entretanto, um fato que vem chamando muita atenção recentemente é a observação de fortes interligações entre as longas cadeias poliméricas e rigidez das mesmas, que chegam a formar grandes quantidade de agregados em solução, estando fortemente associados à heterogeneidade físico-química característica destes biopolímeros, principalmente com relação ao grau de desacetilação.^{152,153} Estes fatos podem ser um caminho para explicar a baixa disponibilidade dos centros adsorventes de metais.

4.3.3. Titulação calorimétrica

O efeito térmico de interação (Q_{int}) do íon cobre com os biopolímeros foram obtidos subtraindo o efeito térmico de diluição (Q_d) do efeito térmico de reação (Q_r), ambos obtidos experimentalmente, conforme Equação 12.

As curvas das titulações calorimétricas obtidas para a quitina e quitosanas C, A e F são mostradas nas Figuras 22 a 25, respectivamente. A grande afinidade do grupo amina livre presente na quitosana pelo íon cobre é claramente demonstrado pelas curvas de titulações calorimétricas.

Embora a quitosana A possua grau de desacetilação superior à quitosana F, tanto os resultados das isotermas de adsorção como os resultados da titulação calorimétrica comprovam que a quitosana A tem maior afinidade pelo íon cobre. Isto pode ser perfeitamente entendido pelo fato de que ambas as quitosanas A e F possuam grau de desacetilação muito próximos, ou seja, 81,01 e 86,12 %, respectivamente.

respectivamente. Isto faz com que outras diferenças físico-químicas, que normalmente são despercebidas, quando se trata apenas da diferença do grau de desacetilação entre as quitosanas, passam a se manifestar, influenciando na capacidade de adsorção do biopolímero. Este fato é confirmado quando comparamos estes resultados com o grau de cristalinidade das quitosanas, como já discutido no item 4.2.4.

Os resultados obtidos através da isoterma de adsorção e da titulação calorimétrica divergem em parte dos resultados obtidos para o grau de desacetilação das quitosanas. Porém, estes resultados são totalmente coerentes com aqueles obtidos na análise de Raios X, quando observou-se o grau de cristalinidade para cada quitosana. Assim, a seqüência obtida com ambas as técnicas mostraram resultados semelhantes, conforme a seqüência C, F e A, onde o grau de cristalinidade da quitosana A é menor que o da quitosana F.

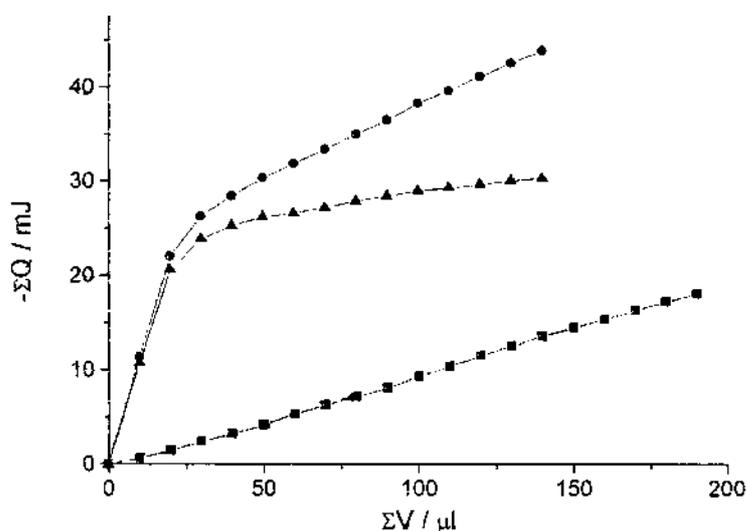


Figura 22. Titulação calorimétrica da quitina com o íon cobre: efeito térmico de reação Q_r (●), efeito térmico de diluição Q_d (■) e efeito térmico de interação Q_{int} (▲).

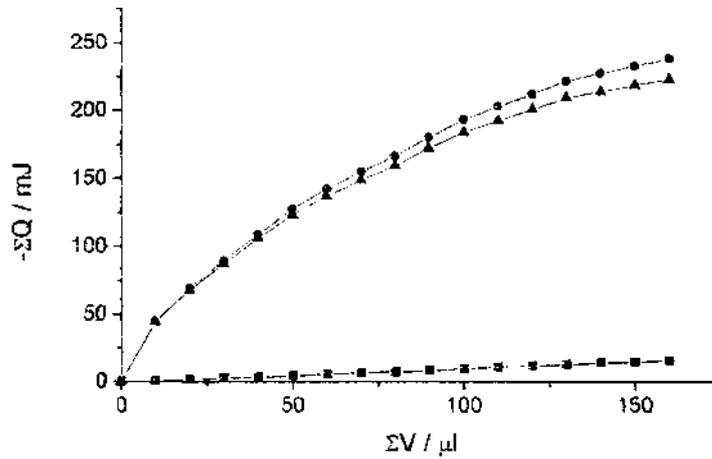


Figura 23. Titulação calorimétrica da quitosana C com o íon cobre: efeito térmico de reação Q_r (●), efeito térmico de diluição Q_d (■) e efeito térmico de interação Q_{int} (▲).

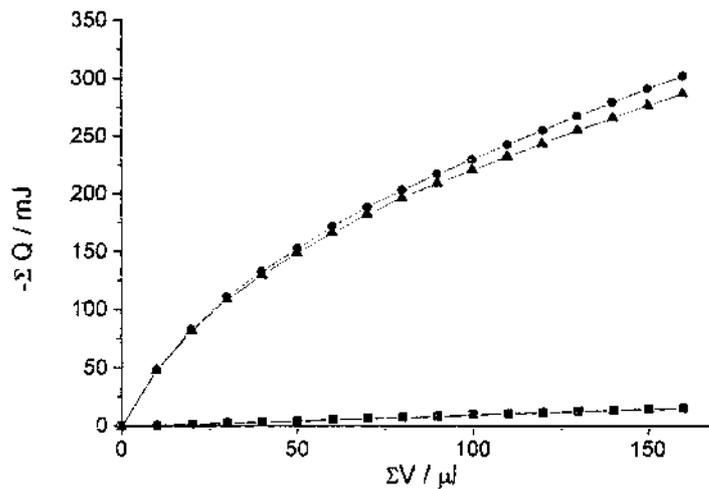


Figura 24. Titulação calorimétrica da quitosana F com o íon cobre: efeito térmico de reação Q_r (●), efeito térmico de diluição Q_d (■) e efeito térmico de interação Q_{int} (▲).

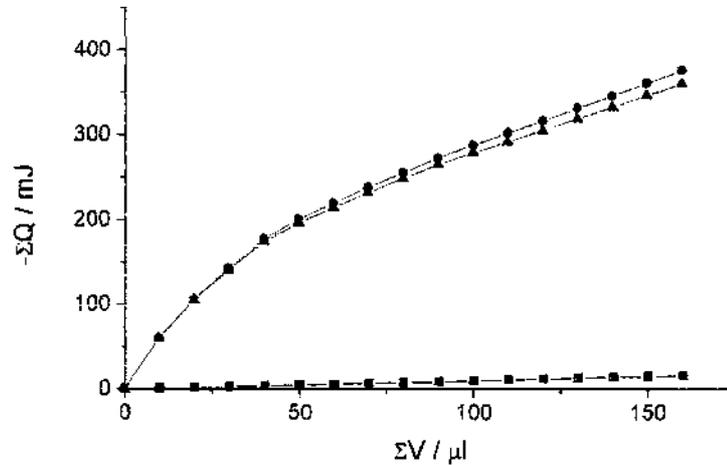


Figura 25. Titulação calorimétrica da quitosana A com o íon cobre: efeito térmico de reação Q_r (\bullet), efeito térmico de diluição Q_d (\blacksquare) e efeito térmico de interação Q_{int} (\blacktriangle).

Observa-se que os efeitos térmicos de interação do íon cobre com todas as quitosanas são bem superiores ao da quitina. Verifica-se também que os efeitos térmicos da quitosana A são superiores ao da quitosana F, que por sua vez são superiores aos da quitosana C. Estes resultados são coerentes com aqueles obtidos na isoterma de adsorção, sendo observado, como é de se esperar, a mesma seqüência $C < A < F$.

Considerando os resultados obtidos, tudo leva a crer que o grau superior de cristalinidade da quitosana F pode dificultar a acessibilidade do íon metálico aos sítios ativos do biopolímero, fazendo com que diminua a capacidade em adsorver íons cobre. O contrário ocorre para a quitosana A, cujo baixo grau de cristalinidade aumenta a capacidade em adsorver os mesmos íons. Estes resultados inferem que, além do grau de desacetilação, outros fatores físico-

químicos devem ser levados em considerações na comparação de quitosanas, que apresentam graus de desacetilação semelhantes.

Outro fato importante a ser observado, é que existe uma diferença quanto ao comportamento entre as titulações calorimétricas e as isotermas de adsorção. Nessas verifica-se a formação de um patamar bem definido, o que não é observado nas titulação calorimétricas. Isto sugere que mesmo após a formação de uma aparente saturação ou formação de uma monocamada, demonstrado pelas isotermas de adsorção, de alguma forma, ainda há uma pequena e lenta adsorção de íons cobre pela superfície dos biopolímeros. Estes dados levam-se a acreditar na possibilidade de que o biopolímero continua adsorvendo íon cobre muito lentamente, devido ao equilíbrio dinâmico que ocorre na interface líquido/sólido. Este fato somente pode ser observado com técnicas que apresentam alta sensibilidade em detectar o fenômeno, como é o caso da técnica calorimétrica e em especial com de calorímetro utilizado neste trabalho, o que satisfaz estas condições de trabalho.

4.3.4. Dados termodinâmicos

Com os dados obtidos através da isoterma de adsorção e titulação calorimétrica, foi possível determinar alguns valores termodinâmicas para a interação do íon cobre com os biopolímeros. Os principais valores termodinâmicos obtidos nesta investigação estão mostrados na Tabela 6, juntamente com outros valores encontrados na literatura, com o intuito de estabelecer comparações.

Tabela 6. Valores termodinâmicos da interação heterogênea cobre-quitina e cobre-quitosanas A, C e F. Estes valores são comparados com N-carboximetilquitosana (N-carbox) modificada¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ e também alguns complexos de cobre-amônia.¹⁵⁷

Polímero	$-\Delta_{mon}H^0$ $J g^{-1}$	$\ln K$	$-\Delta_{int}G^0$ $kJ mol^{-1}$	$-\Delta_{int}H^0$ $kJ mol^{-1}$	$\Delta_{int}S^0$ $J mol^{-1} K^{-1}$
Quitina	0,62±0,01	14,5	35,9±0,1	19,85±0,34	54±1
Quitosana C	4,20±0,08	14,5	36,1±0,3	44,18±1,97	-27±2
Quitosana F	5,49±0,08	14,8	36,8±0,1	41,27±1,57	-15±1
Quitosana A	6,81±0,11	15,3	37,9±0,6	47,16±0,82	-31±2
N-carbox ^a			33,89	39,33	-4,4
Cu(NH ₃) ²⁺				23,40	
Cu(NH ₃) ₂ ²⁺				46,20	
Cu(NH ₃) ₃ ²⁺				69,90	
Cu(NH ₃) ₄ ²⁺				81,10	

O valor das entalpias de formação da monocamada, $-\Delta_{mon}H^0$, obtidos a partir dos tratamentos dos dados experimentais foram todos negativos, $-0,62 \pm 0,01$, $-4,20 \pm 0,08$, $-5,49 \pm 0,08$ e $-6,81 \pm 0,11 J g^{-1}$ para a quitina e quitosanas C, F e A, respectivamente. A partir destes dados pode-se calcular a entalpia de interação do íon cobre com o polímero, $-\Delta_{int}H^0$, conforme a Equação 18, obtendo-se os valores $-19,85 \pm 0,34$, $-44,18 \pm 1,97$, $-41,27 \pm 1,57$ e $-47,16 \pm 0,82 kJ mol^{-1}$, também todos negativos. O valor negativo destas entalpias concorda com reações exotérmicas observadas entre Cu^{2+} e grupos amino presentes em outras espécies de polímeros em solução aquosa.¹⁵⁸ Isto confirma a forte influência dos grupos amino presentes na quitina e na quitosana na interação com o íon cobre.

Em ambos os dados entálpicos $\Delta_{mon}H^0$ e $\Delta_{ini}H^0$ verifica-se uma diferença significativa entre os valores da quitina e das quitosanas. Estes resultados confirmam mais uma vez a alta afinidade do biopolímero quitosana em adsorver íon cobre. Outro fato importante a ser observado é que ambos os valores entálpicos mostram uma seqüência semelhante à observada na isoterma de adsorção e titulação calorimétrica, ou seja, $C > F > A$. Esta seqüência é um pouco diferente da encontrada para o grau de desacetilação das quitosanas. Isto já foi bem comentado quando discutiu-se os dados da isoterma de adsorção e da titulação calorimétrica.

Os dados existentes na literatura a respeito do estudo termodinâmico da interação Cu^{2+} com um derivado da quitosana, N-carboximetil quitosana encontra-se também na Tabela 6.¹⁵⁰ O referido estudo difere do apresentado, por ter sido conduzido em sistema homogêneo, isto é, foram utilizadas soluções aquosas do polímero, enquanto no presente trabalho utilizou-se o polímero em sua forma natural, ou seja, suspenso em água. Entretanto, a entalpia encontrada no sistema homogêneo, que foi de $-39,33 \text{ kJ mol}^{-1}$,¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ é intermediária às observadas neste trabalho, concordando também com uma forte participação dos grupos amino na interação destes polímeros com o íon cobre.

Para acompanhar a interação do átomo centro básico nitrogênio com o centro ácido de cobre, alguns dados com a amônia,¹⁵⁷ disponíveis na literatura são também mostrados na mesma Tabela 6. As entalpias de formação do complexo são $-23,4$; $-46,2$, $-69,9$ e $-81,10 \text{ kJ mol}^{-1}$, do primeiro ao quarto ligantes, respectivamente. Observa-se que os valores entálpicos $\Delta_{ini}H^0$ determinados para a quitina e quitosanas estão situados entre os valores de coordenação mais baixos na formação do complexo cobre-amônia, ficando intermediário entre o primeiro e segundo ligantes. Por outro lado, do ponto de vista de coordenação, para o modelo em estudo, o cobre pode teoricamente

coordenar-se com até quatro átomo de nitrogênio presentes nos biopolímeros. Entretanto, considerando que a natureza interativa seja a mesma, ou seja, cobre-nitrogênio, as características destes centros são distintos, pois, espera-se que no polímero a interação seja mais restrita, do que em solução aquosa, devido a vários fatores físico-químicos. Com estes resultados leva-se a acreditar em que apenas um centro ativo é envolvido na interação do íon cobre com o nitrogênio do biopolímero.

Com os valores de $\Delta_{int}H^0$ e K calcularam-se os valores da energia livre de Gibbs, $\Delta_{int}G^0$. O valor de $\Delta_{int}G^0$ para todas as interações foram negativos, demonstrando que todos os processos em estudo são favoráveis à formação do complexo íon cobre-polímero: $-35,9 \pm 0,1$, $-36,1 \pm 0,3$, $-36,8 \pm 0,1$ e $-37,9 \pm 0,6 \text{ kJ mol}^{-1}$ para a quitina e quitosanas C, F e A, respectivamente, tendo a mesma seqüência dos valores entálpicos. Estes valores estão próximos ao encontrado para a quitosana modificada com o grupo N-carboximetil, que é $-33,89 \text{ kJ mol}^{-1}$ ¹⁵⁴⁻¹⁵⁶.

Os valores entrópicos encontrados nesta investigação parecem ser bastante interessantes. Na interação quitina-cobre obteve-se a entropia positiva de $54 \pm 1 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, indicando um aumento na desordem do sistema. Por outro, lado na interação cobre-quitosanas C, F e A são negativas, obtendo-se entropias de -27 ± 2 , -15 ± 1 , $-31 \pm 2 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, sugerindo um decréscimo na desordem do sistema, portanto, o oposto do observado para a interação quitina-cobre. Os valores entrópicos encontrados para a interação cobre-quitina e cobre-quitosanas, demonstram claramente que provavelmente ambos os processos de interação em estudo ocorrem com comportamentos bem distintos. Como se deve esperar, a entropia está relacionada às moléculas de água que estão associadas tanto ao polímero como ao cátion. No processo interativo as moléculas de solvatação são

removidas para o meio da reação. Os resultados com as quitosanas indicam que as moléculas de água removidas devem ajustar-se tanto ao polímero como ao complexo formado, de maneira a ordenarem o sistema, com conseqüente diminuição na entropia do sistema. Por outro lado, os resultados da interação cobre-quitina demonstram um certo desajuste no sistema, que pode ser associada provavelmente a participação também do grupo acetil na formação do complexo. A participação do grupo acetil na formação do complexo cobre-quitina, pode fazer com que um número maior de moléculas de água de solvatação do íon cobre sejam liberadas ao meio, com conseqüente aumento na entropia do sistema. Estes resultados poderão ser um suporte muito importante no desvendamento da estrutura formada durante a interação do íon cobre com estes biopolímeros em meio aquoso, as quais ainda não são bem conhecidas.

4.4. Estudo e caracterização das quitosana-glutaraldeído

4.4.1. Reação da quitosana com o glutaraldeído

A reação da quitosana com o glutaraldeído foi realizada em meio ácido com pH em torno de 3 e 4 por um tempo de 1 h. Aparentemente, estas condições foram suficientes para que houvesse uma completa reação. Isto é importante ser mencionado, pois alguns pesquisadores relatam que a interação do glutaraldeído com amina livre sofre interferência de reação, quando realizada em meio de pH baixo e afirmam que as melhores condições encontradas para esta interação foi em meios que possuem pH que variam de neutro a básico.^{70,71,83,104} Entretanto, no presente caso, o pH e tempo de reação estabelecidas foram suficientes para obtenção das quitosanas modificadas com glutaraldeído (QGx). Durante esta reação há formação de um gel de maneira rápida, que a partir da QG5,0 torna-se

mais firme e consistente, isto é, o gel não escorre quando o vaso reator é inclinado.

Outro fato a ser mencionado é que se observa uma variação na cor dos compostos obtidos. Esta coloração está diretamente associada às diferentes concentrações de glutaraldeído utilizadas para cada QGX, variando desde amarelo bem claro à vermelho tijolo bem intenso. Estes materiais depois de secos mostram ser facilmente triturados quando comparados à quitosana original, como também bastante resistente à variação de pH.

4.4.2. Espectroscopia vibracional

Os espectros na região do infravermelho da quitosana e das amostras QGX ($X = 0,5, 5,0$ and $25,0$) são vistos na Figura 26.

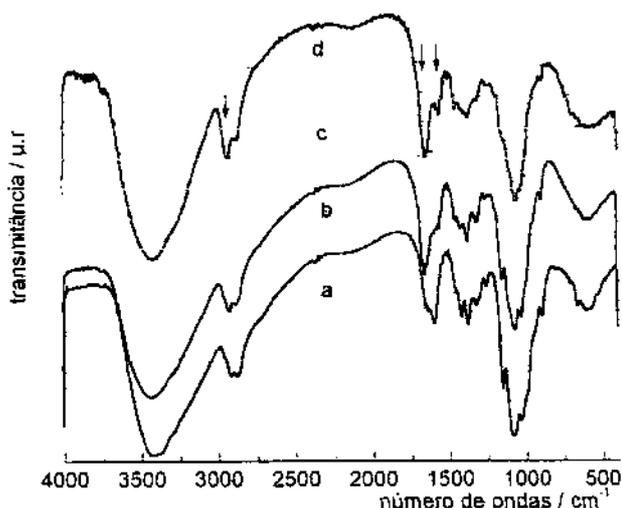


Figura 26. Espectro na região do infravermelho: a) quitosana, b) QG5,0, c) QG15,0 e d) QG25,0.

Comparando os espectros observa-se o surgimento de duas novas bandas em QGX. A primeira em torno de 1655 cm^{-1} pode ser atribuída à ligação imina $\text{N}=\text{C}$ e uma segunda em torno de 1562 cm^{-1} que é associada à ligação etilênica $\text{C}=\text{C}$.^{64,127,128,159} Entretanto, não foi detectada a banda característica do grupo aldeído livre em torno de 1720 cm^{-1} nos espectros das QGX, como mostram as Figuras 26 b, c e d, demonstrando que não há grupos aldeídicos livres remanescentes, em proporções consideráveis, para serem detectados por esta técnica.

Os dados obtidos levam a acreditar na possibilidade de que no polímero há presença de ligação imina conjugada com ligação dupla etilênica no material.¹⁵⁹ Com objetivo de comprovar esta hipótese alguns testes foram realizados.

Um dos teste consiste em reduzir a ligação imina, com boroidreto de sódio e em presença do ácido clorídrico. Esse procedimento é aplicado em muitos compostos que contém base de Schiff.^{64,71,73} Os espectros da quitosana modificada com glutaraldeído e tratada com boroidreto de sódio e com ácido clorídrico são mostrados na Figura 27. Nota-se que em nenhum dos casos a redução foi bem sucedida. Este fato corrobora com a hipótese levantada anteriormente, pois, trata-se de uma ligação imina bastante estável, fato este normalmente não observado para uma típica imina da base de Schiff.

Os resultados deste teste é mais um suporte na possibilidade de que há formação de ligação imina conjugada com a dupla ligação etilênica, durante a interação da quitosana com o glutaraldeído.

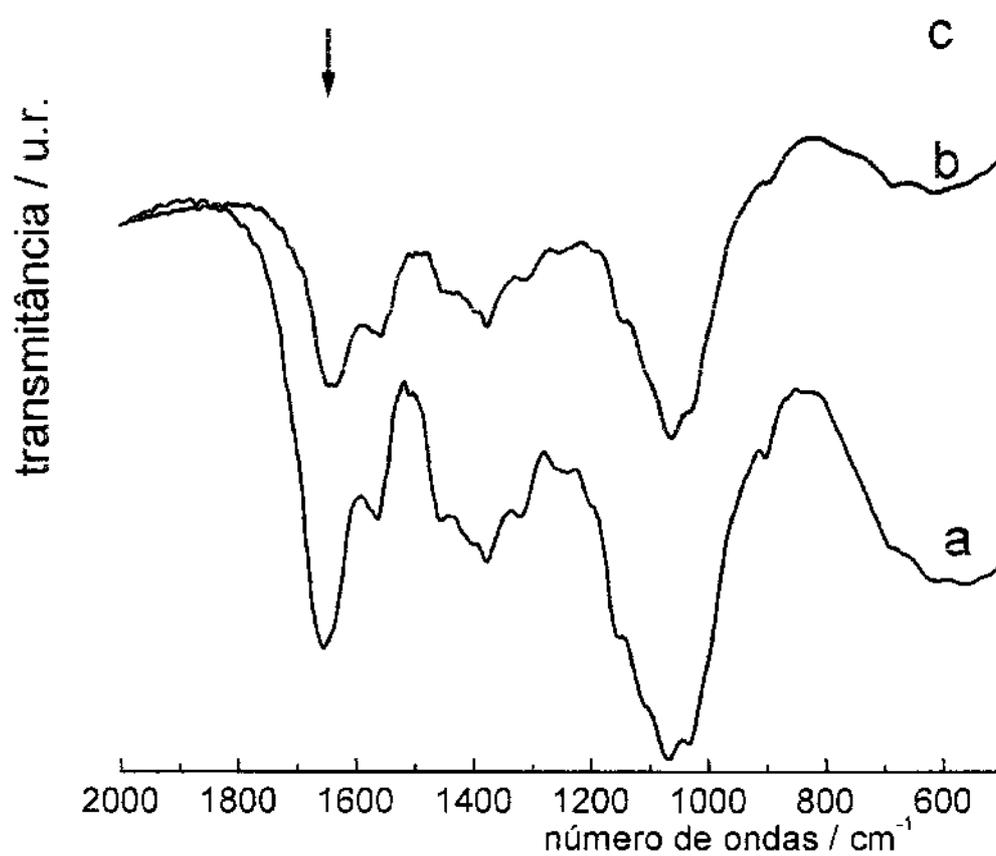


Figura 27. Espectro na região do infravermelho a) QG15,0, b) QG15,0 na presença de NaBH₄ e c) QG15,0 na presença de HCl.

Outro fato observado é que o sucessivo aumento do percentual de glutaraldeído na obtenção das amostras QGX, acarreta também um sucessivo aumento na intensidade da banda associada à ligação etilênica C=C em 1562 cm^{-1} , como mostra a Figura 26.

O mesmo comportamento é observado com a banda em 2936 cm^{-1} , que é associada ao estiramento da ligação C-H. O aumento na intensidade destas bandas podem ser atribuído ao aumento da contribuição de moléculas de glutaraldeído durante a interação da quitosana com o mesmo. Este fato leva a acreditar na possibilidade de que, conforme aumenta a concentração de glutaraldeído nesta interação, há também um aumento no número e tamanho das ligações cruzadas, formadas pelas moléculas de glutaraldeído, entre as cadeias poliméricas da quitosana. Porém, o que se sabe, é que o glutaraldeído em condições favoráveis é muito sensível à polimerização.⁷⁰ Entretanto, o aumento na intensidade destas bandas é notado apenas até o espectro da QG5,0. Dessa em diante, até a QG25,0, os espectros mostram-se bastante semelhantes. Este fato leva a acreditar que haja uma provável parada no crescimento das ligações cruzadas com esta concentração de glutaraldeído, entre as cadeias poliméricas da quitosana.

A técnica de espectroscopia vibracional Raman tem sido um método muito utilizado para obter informações sobre a estrutura molecular e a estrutura eletrônica dos polímeros, que contém ligações duplas etilênicas.¹⁶⁰ Portanto, trata-se de uma ferramenta poderosa para o entendimento da estrutura da quitosana modificada com o reagente glutaraldeído. Os espectros Raman da quitosana F, QG5,0 e QG25,0 são mostrados na Figura 28. Como observado nos espectros na região do infravermelho, o sucessivo aumento da proporção de glutaraldeído na formação das QGX, também causa um aumento na intensidade das bandas até o espectro da QG5,0, fato que é também observado com os espectros Raman.

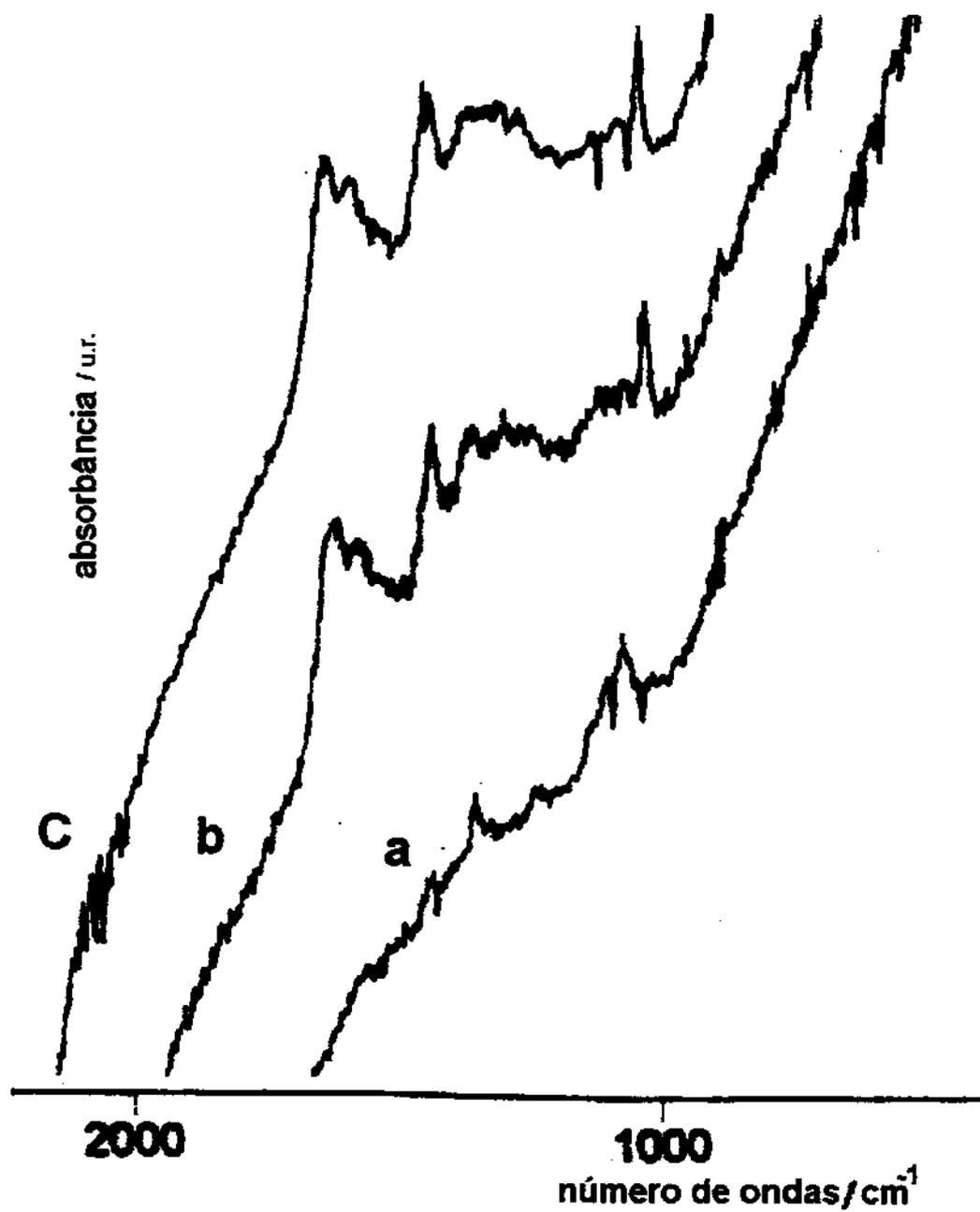


Fig. 28 Espectro Raman: a) quitosana, b) QG5,0 e c) QG25,0.

Da mesma forma confirma-se uma provável parada no crescimento no tamanho das ligações cruzadas, como já mencionado acima. No entanto, o fato mais importante nos resultados obtidos na espectroscopia Raman é a presença das bandas em 1629 e 1579 cm^{-1} que estão associadas à ligação imina C=N e etilênica C=C, respectivamente.^{161,162} Desta forma confirma-se a real possibilidade da existência de ligação imina conjugada com ligação dupla etilênica, na estrutura das quitosanas modificadas com glutaraldeído.

4.4.3. Resonância magnética nuclear de carbono-13

A Figura 29 mostra os espectros de RMN de ^{13}C no estado sólido da quitosana C, QG0,5, QG5,0 e QG25,0. Observa-se no espectro da quitosana C, Figura 29a, a presença dos picos em 173,4 e 23,2 ppm, associados aos carbonos da carbonila e metila, respectivamente, os quais são característicos da molécula da quitina. Como já foi discutido durante a caracterização da quitina e quitosana, a intensidade destes picos variam de acordo com o grau de desacetilação da quitosana. Portanto, eles são também vistos nos espectros da quitosana C e das QGX, devido a não total desacetilação da quitina original.

Os espectros das QGX mostraram um alargamento dos picos C1, C3-C5 e C6, sobrepondo aos picos C4 e C2. Estes carbonos podem ser visualizados na estrutura da quitosana mostrada na parte superior esquerda da mesma Figura 29 dos espectros. Conforme aumenta a contribuição de glutaraldeído na elaboração das QGX, verifica-se o surgimento gradativo de sete novos picos, estes sofrem aumento de intensidade até o espectro da QG5,0. Deste em diante nota-se semelhanças entre os espectros.

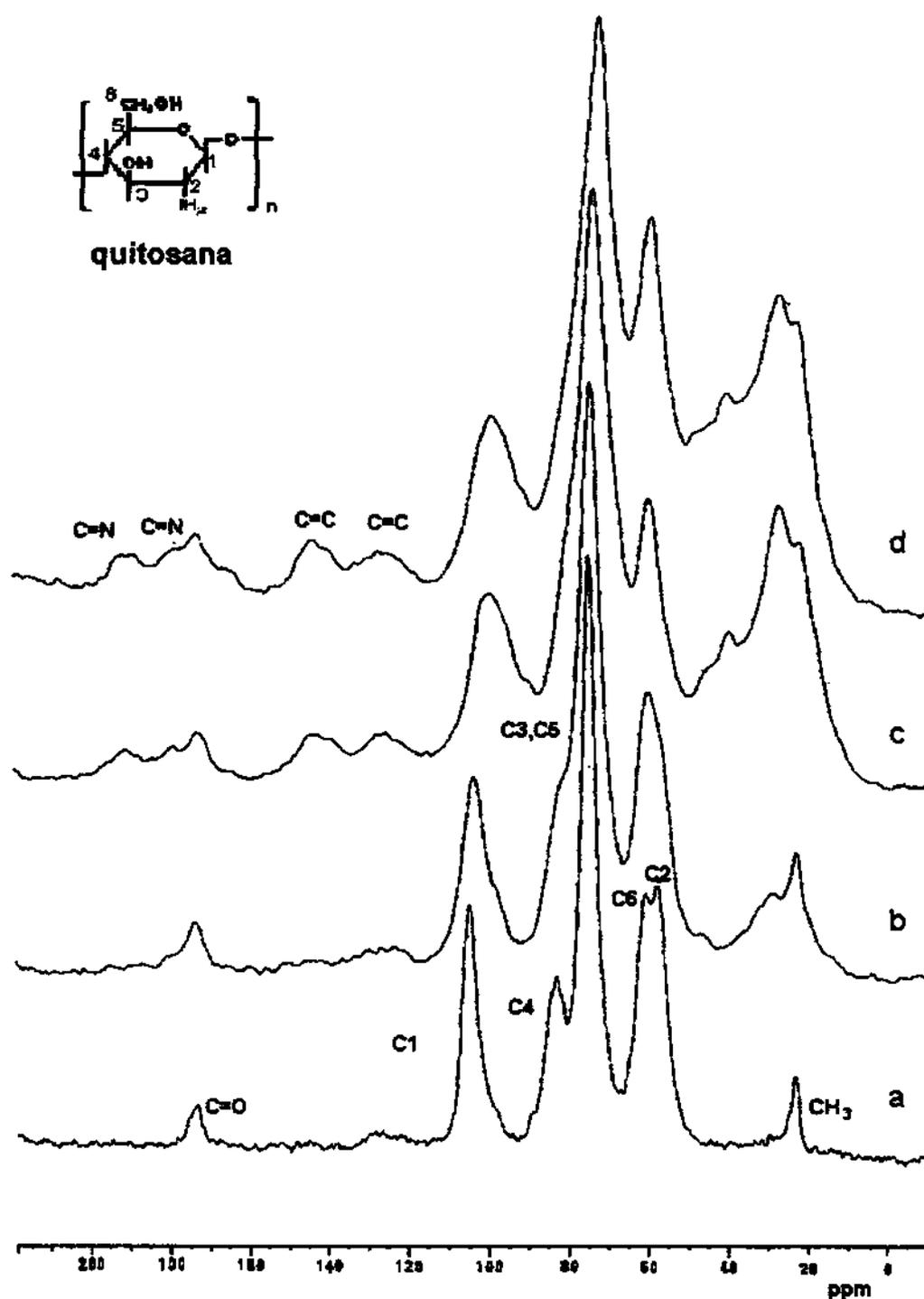


Figura 29. Espectro de RMN ^{13}C : quitosana, b) QG0,5, c) QG5,0 e d) QG25,0.

Os picos em 23,8, 28,3 e 41,4 ppm são atribuídos à três diferentes ambientes químicos do carbono do grupo CH_2 . Estes três diferentes carbonos são provenientes da molécula de glutaraldeído, portanto, fazem parte da estrutura das ligações cruzadas. Os dois picos em 127,8 e 144,5 ppm estão associados aos carbonos da ligação dupla etilênica $\text{C}=\text{C}$. Já os dois picos em 174,1 e 189,6 ppm são atribuídos ao carbono da imina $\text{C}=\text{N}$.^{73,163,164} Portanto, obtém-se na RMN de ^{13}C novamente os indícios da presença não apenas da ligação imina, que é característica da base de Schiff, mas também a presença de ligação dupla etilênica conjugada nestes compostos.

4.4.4. Análise elementar

Os percentuais de carbono, hidrogênio e nitrogênio obtidos na análise elementar das quitosanas modificadas com glutaraldeído estão mostrados na Tabela 7. Os percentuais de carbono e hidrogênio crescem conforme aumenta a quantidade de glutaraldeído na preparação das QGX. Por outro lado, fato oposto ocorre com o percentual de nitrogênio. Ambos os comportamentos são observados até em torno da QG5,0 e QG10,0. A partir deste valor observa-se uma leve inversão nos percentuais. Este fato pode ser melhor acompanhado nos diagramas de barra mostrados na Figura 30.

Os resultados da análise elementar como também os observados na espectroscopia na região do infravermelho, Raman e RMN de ^{13}C , mostraram que as condições estequiométricas em torno da QG5,0 parece ser o ponto de parada da reação, provavelmente acarretado pela não mais presença de grupos amina livres na superfície da quitosana.

Tabela 7. Percentuais de carbono, hidrogênio e nitrogênio encontrados na quitosana C (X=0,0) e nas QGX (X= 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 25,0)

%	X=0	X=0,1	X=0,5	X=1,0	X=5,0	X=10,0	X=15,0	X=20,0	X=25,0
C	42,13	43,39	44,59	44,77	50,75	52,11	52,25	53,29	53,28
H	7,63	7,22	7,36	7,46	7,45	7,67	7,67	7,72	7,83
N	7,30	6,37	6,15	6,20	4,71	4,63	4,48	4,7	5,18
$\frac{C}{N}$	5,77	6,81	7,25	7,23	10,79	11,26	11,66	11,34	10,30

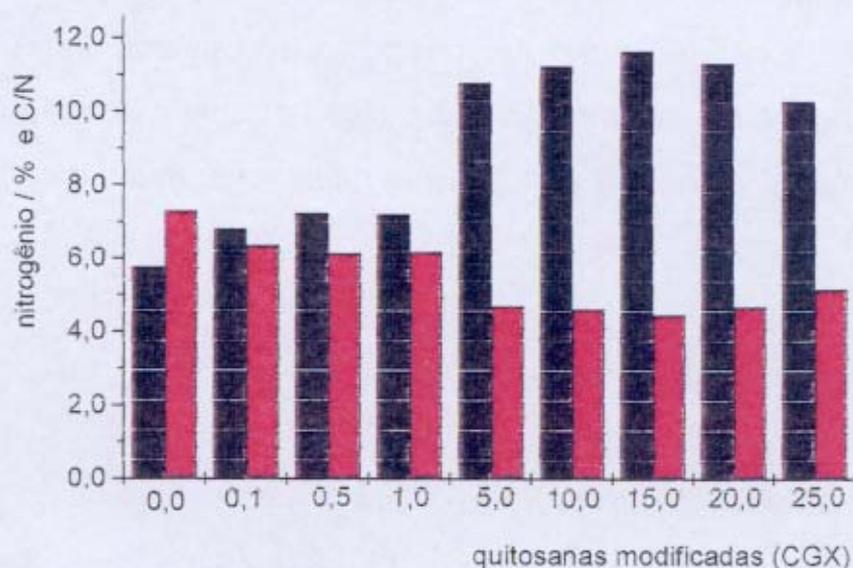


Figura 30. Percentuais de nitrogênio (■) e relação carbono/nitrogênio (■) para as quitosanas modificadas com glutaraldeído QGX (X = 0,0; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 e 25,0).

Levando em consideração a possível parada de reação em torno das condições da QG5,0 e utilizando a massa molecular da quitosana 186,9, calculada a partir do percentual 7,3% do nitrogênio encontrado nesta quitosana, pode-se chegar à relação de 1:20 para a relação quitosana:glutaraldeído. Este valor é alto quando comparado aos valores encontrados nos estudos da interação do glutaraldeído com proteínas, que mostra estar entre 4 e 8 moles de glutaraldeído para um mol de proteína.⁷⁰ No presente estudo, o alto número de moles de glutaraldeído envolvido na interação com a quitosana pode estar associado com a prévia dissolução da quitosana em ácido acético, durante a modificação da quitosana, aumentando a dispersão e maleabilidade das cadeias poliméricas.

Conclui-se com estes resultados que, as ligações cruzadas podem ser formadas com mais de uma unidade monomérica, pertencente ou não à mesma cadeia polimérica. Portanto, estes compostos apresentam uma estrutura bastante complexa, como um aglomerado de ligações cruzadas não uniformes, que contém ligações iminas conjugadas com ligações duplas etilênicas.

4.4.5. Espectroscopia de Raios-X

Os difratogramas de Raios-X da quitosana natural, QG0,5, QG5,0 e QG25,0 são mostrados na Figura 31. O difratograma da quitosana mostra uma pobre cristalinidade, concordando com o difratograma característico do biopolímero quitosana original. Isto é indicado pela presença de dois picos largos em 2θ : 10,54 e 19,98 graus. Nos difratogramas das QGX, observa-se que o grau de cristalinidade diminui conforme aumenta a concentração de glutaraldeído.

Desta forma, a partir da QG5,0 não se verifica mais a presença de picos nos difratogramas das QGX. Portanto, o contínuo aumento na concentração de glutaraldeído tende a transformar a quitosana modificada com glutaraldeído em um polímero que tem mais características amorfas.

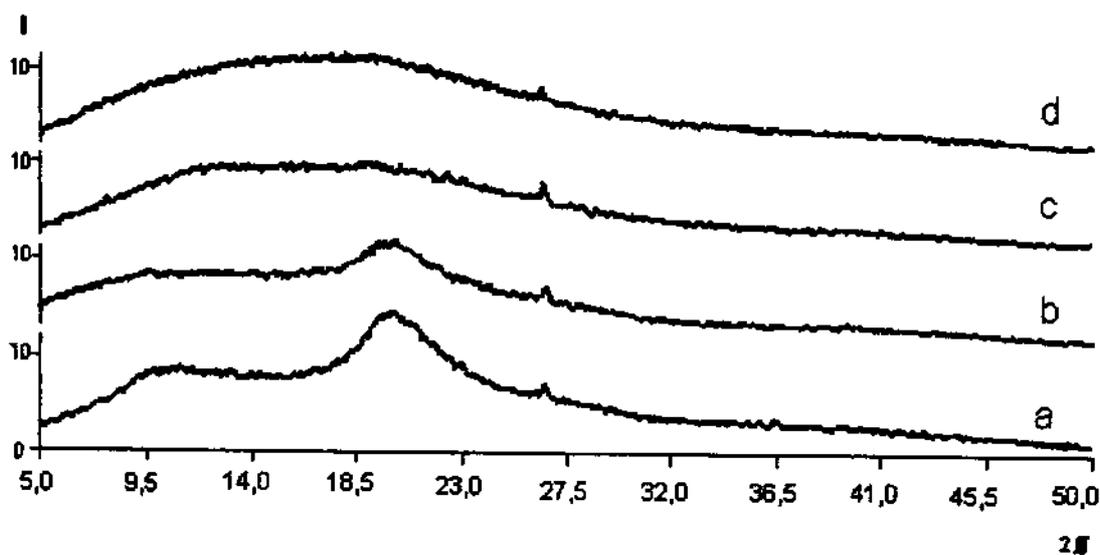


Figura 31. Difratogramas de Raios-X : a) quitosana, b) QG0,5, c) QG5,0 e d) QG25,0.

4.4.6. Microscopia eletrônica

A morfologia, distribuição e tamanho das partículas dos polímeros foram estudados através de fotos obtidas em um microscópio eletrônico, como mostra a Figura 32. A quitosana mostra ter uma superfície mais regular, como também apresenta partículas maiores do que todas as quitosanas modificadas com glutaraldeído.

As fotografias mostram que em todas as QGX são formadas partículas de tamanho e superfície irregulares. Da quitosana natural para a QG0,0 foi observado uma modificação significativa tanto na morfologia quanto no tamanho das partículas, como ilustra a Figura 32 IA, IIA, IB e IIB. A quitosana natural apresenta um aspecto fibroso de maior superfície e tamanho do que as partículas da QG0,0, que mostram partículas irregulares com buracos na superfície. Esta diferença na morfologia das quitosanas pode ser um caminho para elucidar certas distinções observadas entre a quitosana natural e a QG0,0, com relação à capacidade em adsorver íons cobre, que será discutido sobre a aplicação dos materiais. Este fato também pode ser um caminho para explicar as diferenças físico-químicas entre os materiais obtidos por processos homogêneo e heterogêneo.^{75,97} A Figura 32 IC, IIC, ID e IID, mostram as microfotografias das QG5,0 e QG25,0. Em geral, a morfologia de todas as QGX são similares à QG0,0. Entretanto, observa-se que, o sucessivo aumento na concentração do glutaraldeído, acarreta uma diminuição gradativa no tamanho das partículas das QGX até a QG10,0. Da QG10,0 até a QG25,0 as microfotografias demonstram que há uma diminuição dos buracos na superfície, apresentando partículas mais compactas do que as demais QGX. Os resultados obtidos na microscopia eletrônica dão uma indicação a respeito dos resultados da capacidade de adsorver íons de cobre, os quais serão discutidos mais adiante.

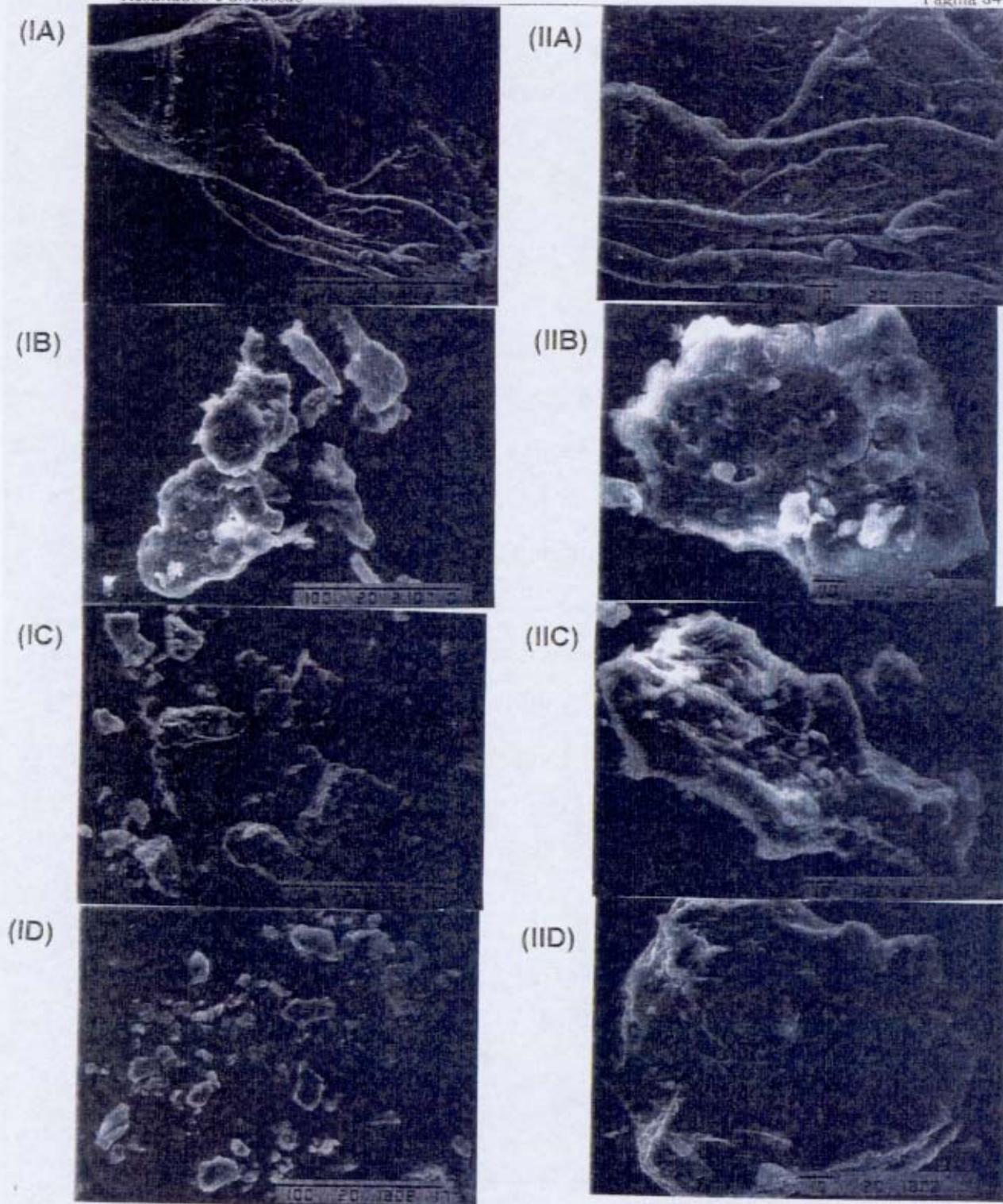


Figura 32. Micrografia eletrônica: quitosana natural 500x (IA); quitosana natural 1000x (IIA); QG0,0 500x (IB); QG0,0 1000x (IIB); QG5,0 500x (IC); QG5,0 1000x (IIC); QG25,0 500x (ID) e QG25,0 1000x (IID).

4.5. Caracterização dos híbridos quitosana-organossilano

4.5.1. Mecanismo de reação

De uma maneira geral, o mecanismo proposto para a formação destes híbridos pode ser dividido em duas etapas, as quais ocorrem com velocidades diferentes, como mostra a Figura 33. Na primeira etapa, ocorre o processo de ligações cruzadas (crosslinking), formada pela interação covalente do grupo aldeídico $-COH$ presente no glutaraldeído com o grupo amina $-NH_2$ da quitosana e do organossilanos, como mostra a Figura 33a.

A reação do glutaraldeído com a amina primária foi anteriormente bastante discutida no estudo da quitosana modificada com glutaraldeído. Observou-se que nesta interação há formação de ligação imina estabilizada com duplas ligações adjacentes e que as ligações cruzadas não são uniformes.

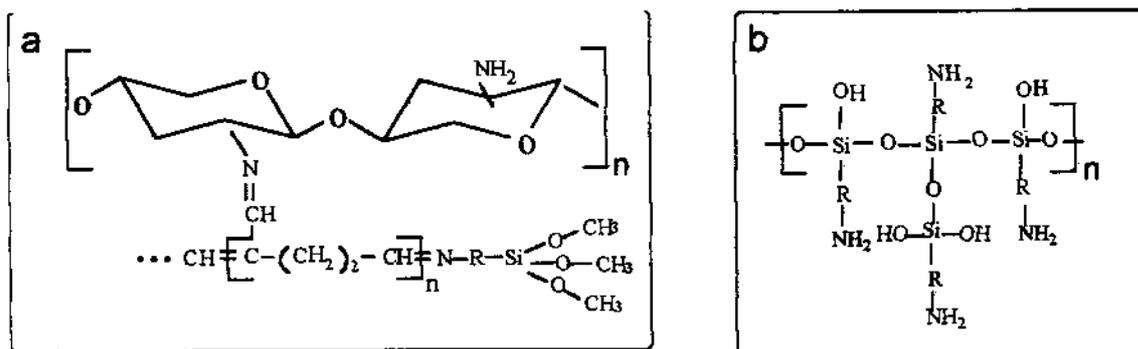


Figura 33. Esquema do mecanismo provável de formação dos híbridos:

a) processo de ligações cruzadas e b) processo sol-gel.

Na segunda etapa ocorre o processo sol-gel, a qual é bem mais lenta que a primeira. Durante este estágio há formação de um polímero inorgânico pela condensação hidrolítica dos grupos metoxílicos $-\text{Si}(\text{OCH}_3)_2$ para dar formação do polímero de polissiloxano $-\text{SiOSi}-$, conforme mostra Figura 33b.

4.5.2. Espectroscopia na região do infravermelho

A Figura 34 apresenta os espectros da quitosana F e dos híbridos SiGQX (X=1, 2 e 3). Os espectros destes híbridos são bastante similares entre si, com relação ao comprimento de onda e intensidade das bandas. Entretanto, quando comparados com o espectro da quitosana F, também mostrado na mesma Figura 34, fica evidente o surgimento de uma nova banda em torno de 1636 cm^{-1} , que é atribuída à ligação imina $\text{C}=\text{N}$. O aparecimento desta banda confirma a interação do glutaraldeído com a quitosana e o organossilano. Observou-se também um aumento na intensidade da banda em torno de 1560 cm^{-1} , atribuída ao surgimento de ligações duplas etilênicas $\text{C}=\text{C}$ durante a formação das ligações cruzadas. Porém, este fenômeno já foi bem relatado e discutido anteriormente no item 4.4. Verificou-se também um aumento na intensidade da banda em torno de 2932 cm^{-1} , associada à ligação $\text{C}-\text{H}$, atribuído à contribuição das moléculas de glutaraldeído e do organossilano que interagiram no composto final.^{127,128} Portanto, os dados obtidos pela técnica de infravermelho confirmam a formação do processo de ligações cruzadas (crosslinking), referente à primeira etapa do mecanismo de formação destes híbridos.

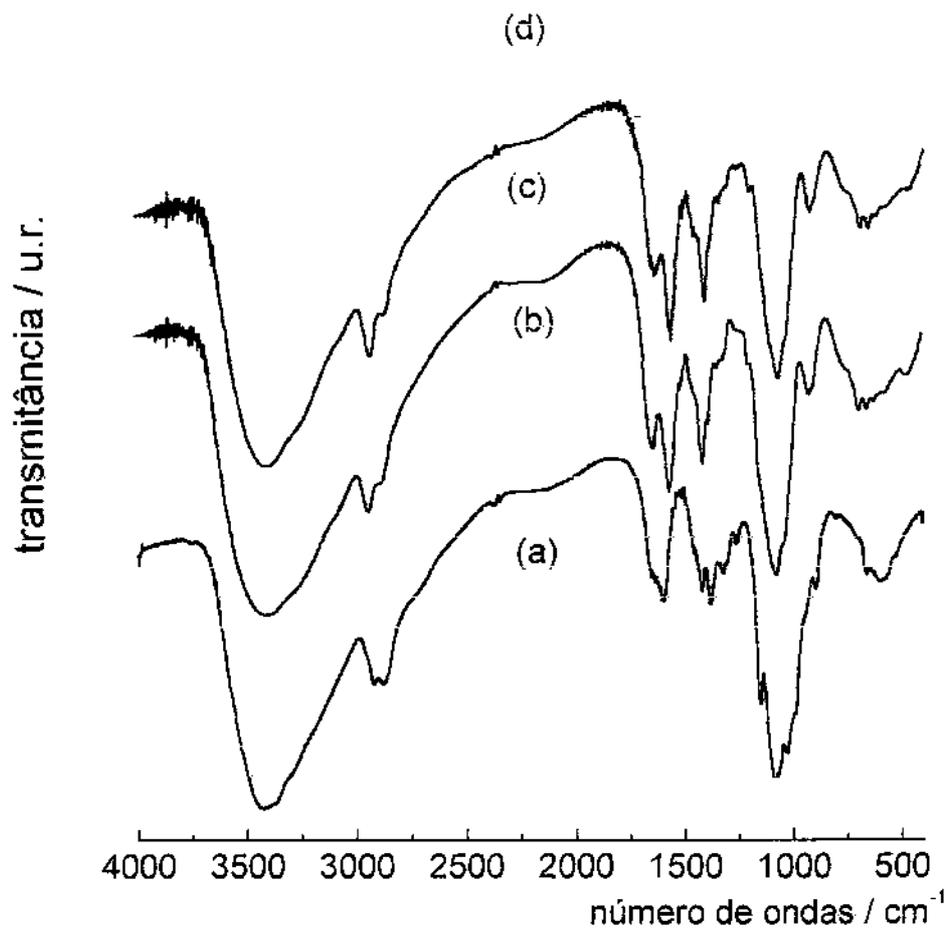


Figura 34. Espectro na região do infravermelho: a) quitosana F, b) SiGQ1 c) SiGQ2 e d) SiGQ3.

4.5.3. Ressonância magnética nuclear

A espectroscopia de RMN de ^{29}Si no estado sólido é um método bastante utilizado na caracterização da estrutura de híbridos de silicatos, onde se observa em princípio, quatro sinais distintos em torno de - 66, - 58, - 50 e - 40 ppm associados à ocorrência ou não dos grupos siloxanos $-\text{SiOSi}-$ e silanol $-\text{SiOH}$ no híbrido.¹⁶⁵⁻¹⁶⁹ O sinal em torno de - 66 ppm é atribuído à presença de três grupos siloxanos no polímero inorgânico, como representado por $-\text{RSi}(\text{OSi})_3$. O sinal em torno de - 58 ppm está associado à presença de dois grupos siloxanos e um grupo silano, com a seguinte representação $-\text{RSi}(-\text{OSi})_2\text{OH}$. A presença de apenas um grupo siloxano e dois grupos silanóis, $-\text{RSi}(-\text{OSi})(\text{OH})_2$ mostram um pico em torno de - 50 ppm. Finalmente, a ausência do grupo siloxano e presença de três grupos silanóis, $-\text{RSi}(\text{OH})_3$ apresentam um pico em torno de - 40 ppm.

A presença e intensidade destes quatros sinais no espectro dos híbridos foram relacionadas ao grau de polimerização, o qual reflete também a intensidade de formação de grupos polissiloxano $-\text{OSiO}-$, que ocorrem no processo sol-gel.

Os espectros de RMN de ^{29}Si no estado sólido dos híbridos são mostrados na Figura 35. Os três primeiros sinais mencionados estão presentes nos espectros de todos os híbridos vindo a corroborar com a esperada ocorrência do processo sol-gel na reação, referente à segunda etapa do mecanismo de formação destes híbridos. Entretanto, mostram que há entre os híbridos diferenças quanto ao grau de formação do polissiloxano.

O espectro do SiGQ1, mostrado na Figura 35a, apresenta alta intensidade para os sinais em - 66,0 e - 58,7 ppm, baixa intensidade para o sinal em - 49,5 ppm e ausência do sinal em torno - 40 ppm, portanto, indicando alta população dos grupos siloxanos neste híbrido.

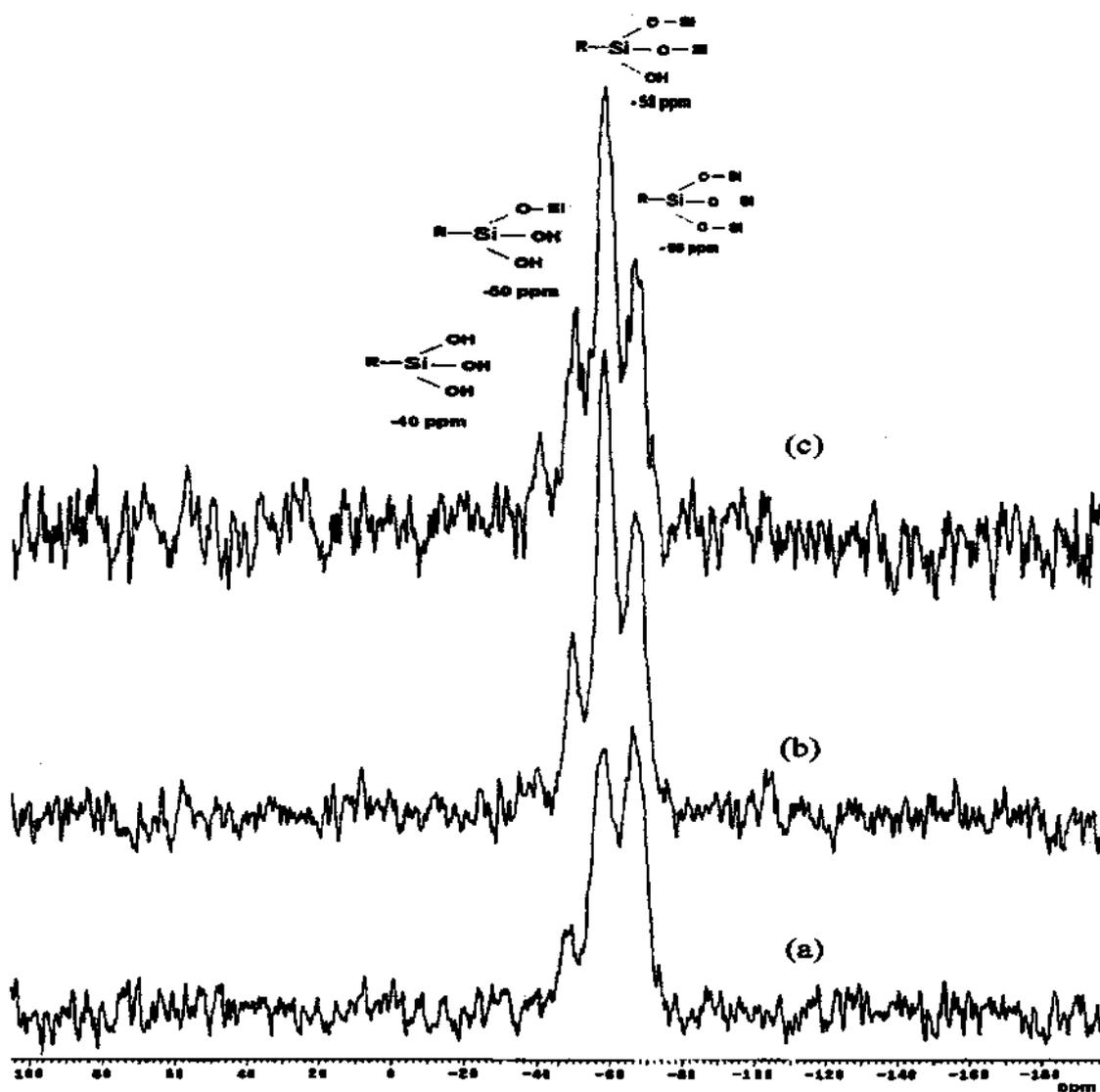


Figura 35. Espectro de RMN ^{29}Si no estado sólido: a) SiGQ1; b) SiGQ2 e c) SiGQ3.

O espectro do SiGQ2, mostrado na Figura 35b, apresenta intensidade média para o sinal em - 66,7 ppm, alta intensidade para o sinal em - 58,7 ppm, baixa intensidade para o sinal em - 49,7 ppm e ausência do sinal em torno - 40 ppm, indicando também alta população de grupo siloxano neste híbrido, entretanto, menos do que o encontrado em SiGQ1.

O espectro do SiGQ3, mostrado na Figura 35c, apresenta, intensidade média para os sinais em - 66,6 e - 50,3 ppm, alta intensidade para o sinal em - 58,5 ppm e baixa intensidade para o sinal em - 49,7 ppm. A presença deste último sinal indica a ocorrência neste híbrido de átomos de silício totalmente hidrolizados, dando -RSi(OH)_3 , proveniente do organossilano TMT. O espectro do SiGQ3 mostra que este possui menos população de grupos siloxanos do que os SiGQ1 e SGQ2, portanto, dentre estes híbridos é o que apresenta menor grau de formação do polímero inorgânico.

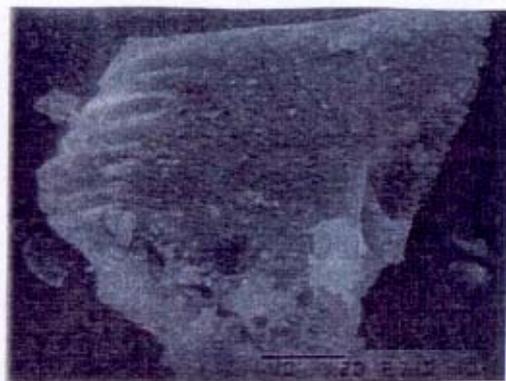
De um modo geral a RMN de ^{29}Si no estado sólido mostra que todos os híbridos apresentam alta formação de polissiloxano, que sofre redução conforme aumenta o tamanho da cadeia orgânica do organossilano. Portanto, estes dados sugerem que o aumento da cadeia orgânica dos organossilanos provavelmente, acarreta um certo distúrbio no decorrer da segunda etapa de formação do híbrido, dificultando o andamento do processo sol-gel.

4.5.4. Micrografia eletrônica

As microfotografias da superfície dos híbridos SiGQ1, SiGQ2 e SiGQ3 mostradas na Figura 36 A, B e C, respectivamente, demonstram que estes possuem uma morfologia homogênea, com características do tipo lamelar.



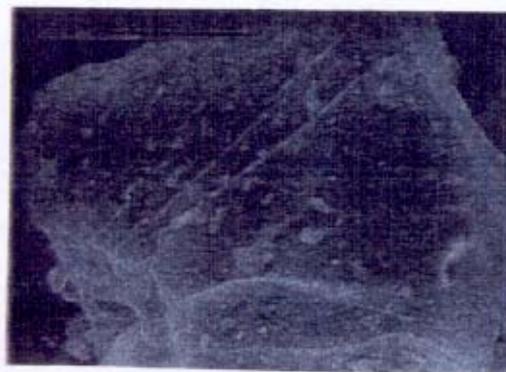
A



B



C



D

Figura 36. Microscopia eletrônica para: SiGQ1 (A); SiGQ2 (B); SiGQ3 (C) e quitosana (D)

Esta homogeneidade está relacionada provavelmente, à boa miscibilidade entre a quitosana dissolvida em ácido acético e os organossilanos, durante a síntese dos híbridos. A morfologia do tipo lamelar destes híbridos é extremamente diferente da morfologia apresentada pela quitosana natural, que é do tipo fibrosa, mostrada na Figura 36 D.

4.6. Aplicação das quitosanas modificadas

A quitina, a quitosana e seus derivados têm sido bastante exploradas em diversas áreas. Entretanto, a adsorção de metais pesados^{75,95-99} e imobilização de enzimas¹⁰⁰⁻¹⁰⁸ vem destacando-se entre as demais. Na tentativa de se explorar estes materiais obtidos, os mesmos foram testados quanto à capacidade de adsorver íons Cu^{2+} e de imobilizar algumas enzimas.

4.6.1. Capacidade de adsorção do íon Cu^{2+}

Devido ao fato de que Cu^{2+} ser o íon que apresenta maior afinidade em interagir com a quitina e a quitosana,^{8,76,147-151} conforme já são descritos em várias oportunidades, logo este foi escolhido como cátion modelo para testar a capacidade de adsorção de íons metálicos pelas quitosanas modificadas.

4.6.1.1 Capacidade de adsorção de íon Cu^{2+} pelas quitosanas modificadas com glutaraldeído

A Figura 37 mostra as isotermas de adsorção de íon cobre pela quitosana natural e pelas quitosanas modificadas com glutaraldeído (QGX), obtidas através do método de batelada.

Todos os polímeros mostram uma cinética de adsorção bastante semelhante, com um patamar já definido em torno de 1 h. Observa-se que todas as QGX possuem capacidade de adsorver íons cobre superior à quitosana natural. Entretanto, observa-se que todas as QGX, as quais na sua síntese incluem-se glutaraldeído, mostraram menor capacidade de adsorção que a QG0,0, na qual não é incluído glutaraldeído.

O aumento significativo na capacidade de adsorção da QG0,0, com relação a quitosana natural, provavelmente seja proveniente de modificações físico-químicas ocorridas no polímero, durante a dissolução em ácido acético e reprecipitação em meio alcalino. Uma destas modificações físico-químicas foi perfeitamente detectada e mostrada durante a discussão da microscopia eletrônica, onde verificou-se que a morfologia da quitosana natural é muito diferente da QG0,0. Esta e outras diferenças físico-químicas, causado pela dissolução e reprecipitação da quitosana, faz com que um maior número de grupos amina livres da quitosana fiquem acessíveis à interação do íon cobre, justificando, portanto, o aumento significativo da capacidade de adsorção da QG0,0 com relação à quitosana natural.

Esta discussão também pode ser um caminho muito importante para esclarecer as diferenças observadas por alguns estudiosos que utilizaram os processos homogêneo e heterogêneo.^{75,77}

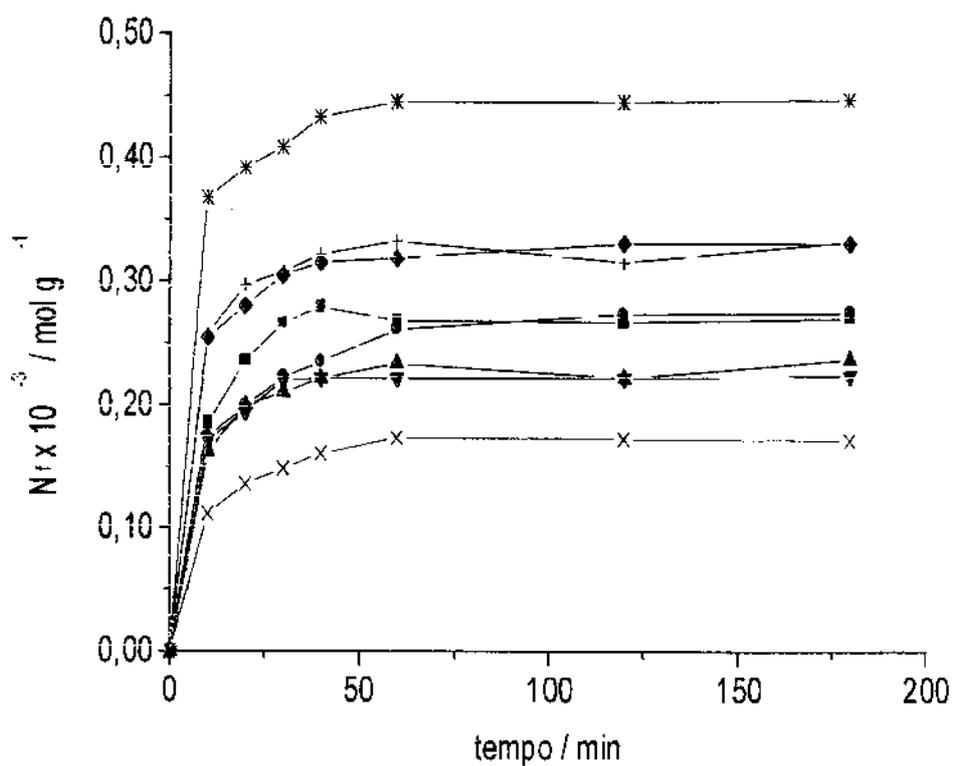


Figura 37. Curvas das isotermas de adsorção de íons Cu^{2+} : quitosana natural (x); QG0,0 (*); QG0,1 (+); QG1,0 (◆); QG5,0 (▼); QG10,0 (▲); QG20,0 (●); QG25,0 (■)

Observou-se também que a capacidade de adsorção diminui quando se utiliza o glutaraldeído em processo heterogêneo, o contrário é observado em processo homogêneo, onde aumenta a capacidade de adsorção de íons metálicos.⁷⁷

Com exceção da QG20,0 e QG25,0 a capacidade de adsorver o íon cobre diminui conforme aumenta a quantidade de glutaraldeído na elaboração desses compostos, mostrando desta forma uma certa proporcionalidade. O aumento da contribuição de glutaraldeído na síntese das QGX, como é de se esperar, afeta a estrutura física e química deste polímero. Este fato foi comprovado durante as discussões de caracterização destes polímeros.

Durante o estudo da reação do glutaraldeído com a quitosana verificou-se a formação de ligação imina $N=C$, proveniente da interação do grupo aldeídico do glutaraldeído e do grupo amina livre presente na quitosana. Portanto, os aspectos químicos de modificação da quitosana com glutaraldeído, tornam coerente com a diminuição da capacidade de adsorção, conforme aumenta-se a contribuição do glutaraldeído na síntese do polímero. Isto ocorre devido à diminuição de grupos amina livres, os quais são os maiores responsáveis pelos efeitos interativos da quitosana com o cátion. Outro fato que pode influenciar o decréscimo na capacidade de adsorção é a diminuição de buracos na superfície das QGX, conforme aumenta a contribuição de glutaraldeído, fato este observado durante o estudo da morfologia desses polímeros.

Outra observação importante é que o aumento na capacidade de adsorção das QGX com relação à quitosana natural, não se deve à contribuição do glutaraldeído na síntese deste polímero, mas, devido à certas modificações físico-químicas ocorridas na quitosana durante a dissolução. Isto já foi bem discutido acima durante a comparação entre a capacidade de adsorção da quitosana natural e QG0,0.

4.6.1.2 Capacidade de adsorção de íon Cu^{2+} pelos híbridos

As isotermas de adsorção do íon cobre pela quitosana e por todos os híbridos são mostradas na Figura 38. Observa-se que todos os polímeros mostram uma cinética de adsorção bastante semelhante entre si, com um patamar também já definido em torno de 1 h.

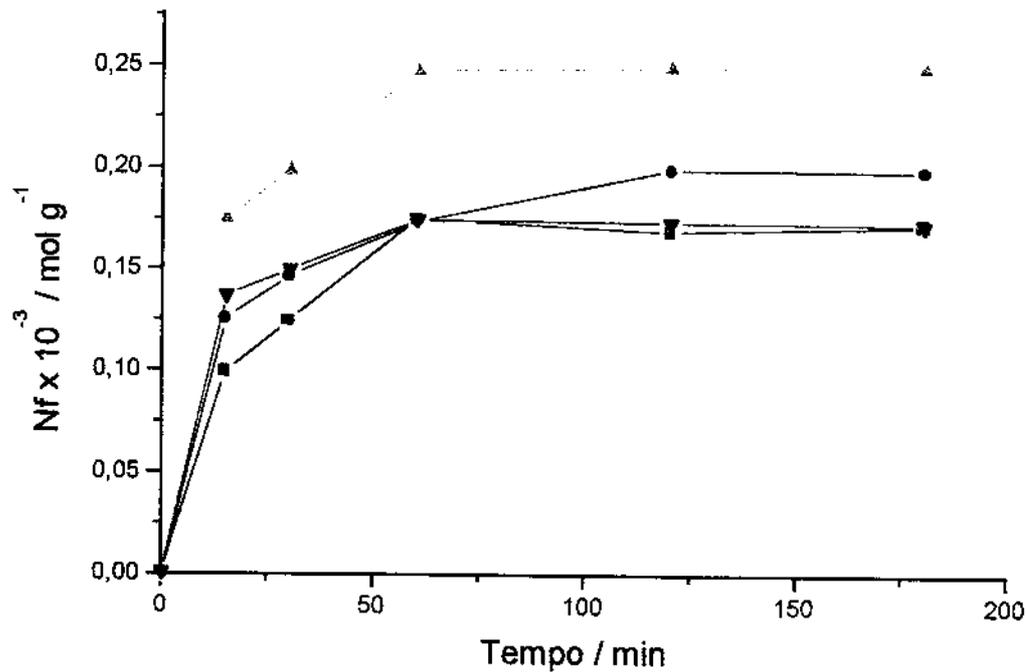


Figura 38. Curvas das isotermas de adsorção de íon Cu^{+2} : quitosana (■), SiGQ1 (▼), SiGQ2 (●) e SiGQ3 (▲).

O híbrido SiGQ1 apresenta uma capacidade de adsorção semelhante à quitosana. Entretanto, os outros dois híbridos SiGQ2 e SiGQ3 apresentam uma capacidade de adsorção maior que a quitosana. Comparando os híbridos, observa-se que a capacidade de adsorção aumenta conforme cresce o tamanho da cadeia orgânica do organossilano. Isto é justificado pela presença de átomos de nitrogênio na cadeia orgânica destes organossilanos, cujo número aumenta conforme aumenta o tamanho da cadeia.

4.6.2. Imobilização de enzimas

A quitina e a quitosana possuem certas características notáveis, principalmente pela presença de grupos amino presentes em ambos os biopolímeros, que as qualificam como bons suportes para imobilização de enzimas, principalmente quando comparados à outros polímeros naturais semelhantes como celulose, agarose, amido e dextrana.^{170,171}

A imobilização de enzimas por estes biopolímeros normalmente é realizado por dois caminhos: a) formação de ligação covalente entre a enzima e o biopolímero e b) por adsorção simplesmente, envolvendo ligações fracas, entre a macromolécula e a cadeia polimérica dos biopolímeros. No primeiro a ligação da enzima com os biopolímeros é realizado utilizando um reagente formador de ligações cruzadas, normalmente utiliza-se um dialdeído, o qual reage com os grupos amino presentes, tanto na enzima como nos biopolímeros, dando a formação de ligação covalente. Entretanto, apesar de apresentar boa eficiência, a ligação covalente formada entre os grupos aldeído e os grupos amino da enzima conduz à uma queda significativa na atividade da enzima, resultado de uma provável desnaturação da própria enzima.¹⁷⁰

exemplo, não necessitar de reagentes adicionais e geralmente não acarreta quaisquer danos à enzima imobilizada. A interação das enzimas com estes biopolímeros é normalmente atribuída ao efeito atrativo que ocorre entre os grupos amino presente na quitina ou quitosana e os grupos carboxílicos das enzimas, tendo a participação de ligações de hidrogênio, forças de van der Waals e interação hidrofóbica.¹⁷⁰ Entretanto, estudos precedentes afirmam que a interação de enzimas com a quitina, quitosana e alguns de seus derivados ocorre tanto via eletrostática como hidrofóbica.¹⁰⁴

Quatro diferentes enzimas foram utilizadas para testar a capacidade de imobilização da quitosana F e seus derivados QG5,0 e SiGQX. A Figura 39 mostra os resultados da imobilização das enzimas pela quitosana F e seus derivados. Neste caso o teor de imobilização comparativo entre as enzimas é expresso pela quantidade de enzima que permanece ligada ao suporte (mg), por um grama do polímero.

Observa-se que a quantidade de glucose oxidase e catalase imobilizadas na quitosana modificada com glutaraldeído QG5,0 é bem superior à quantidade imobilizada na própria quitosana. Entretanto, observa-se que a quantidade de invertase e urease imobilizadas na QG5,0 é menor do que a quantidade imobilizada na quitosana.

Com relação aos híbridos, verifica-se que à exceção do SiGQ1, a quitosana apresentou-se em igualdade ou até mais eficiente do que a os demais híbridos.

Verifica-se ainda com relação à catalase, que a mesma mostra uma gradativa diminuição na capacidade de imobilização, que decresce do híbrido SiGQ1 para o SiGQ3.

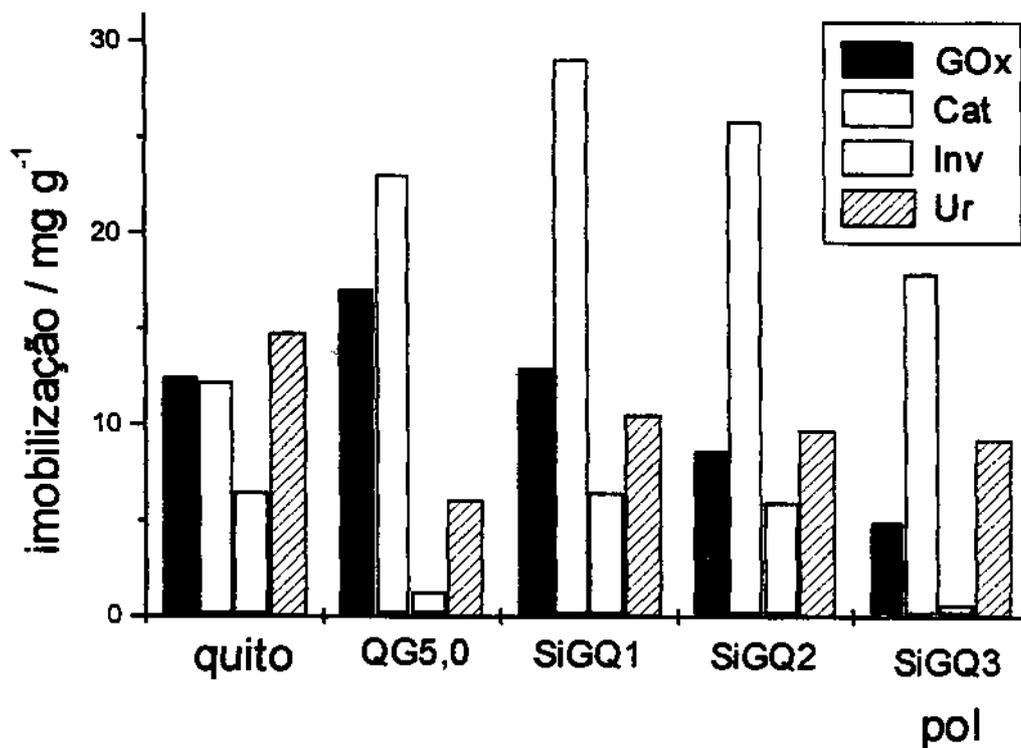


Figura 39. Teor de imobilização das enzimas glucose oxidase (Gox), catalase (Cat), invertase (Inv) e urease (Ur) nos polímeros (pol) quitosana (quito) F e seus derivados (QG5,0, SiGQ1, SiGQ2 e SiGQ3).

A quantidade de glucose oxidase imobilizada no SiGQ1 é semelhante à quitosana. Observa-se como na catalase, uma gradativa diminuição na quantidade desta enzima imobilizada, que também decresce do híbrido SiGQ1 para o SiGQ3.

O teor de invertase imobilizado na quitosana, SiGQ1 e SiGQ2 é similar, mas, verifica-se uma drástica queda na quantidade para o SiGQ3. Quanto à urease, o teor imobilizado diminui da quitosana para os híbridos, os quais possuem capacidade de imobilizar esta enzima semelhantes entre si.

Esperava-se que com a introdução de mais átomos de nitrogênio na estrutura do polímero aumentasse também a capacidade de imobilizar enzima, como observado na capacidade de adsorver íons cobre. Entretanto, verificou-se o contrário, conforme aumenta o tamanho da cadeia orgânica do organossilano diminui a capacidade de imobilizar enzimas do polímero. Isto pode estar associado ao fato de que as enzimas são macromoléculas de dimensões muito superiores ao íon cobre, sendo impedidas estericamente em penetrar e atingir os sítios ativos localizados no interior das partículas destes polímeros, onde estão presentes os centros reativos. Com estes resultados observou-se uma certa seletividade destes polímeros na adsorção destas enzimas. Isto leva-se a acreditar que estes materiais em forma de gel ou pó provavelmente devem mostrar boa resposta em estudos cromatográficos na separação ou purificação de materiais protéicos.

5. CONCLUSÃO

A sequência quanto ao grau de desacetilação das quitosanas, determinadas através da técnica de infravermelho corresponde a $C < A < F$, com 77,48; 81,01 e 86,12 %, respectivamente.

A concentração do glutaraldeído afeta as propriedades físicas e químicas das quitosanas modificadas com glutaraldeído QGX.

As técnicas de infravermelho, Raman e análise elementar sugerem que a reação quitosana-glutaraldeído se estabiliza em torno das condições da QG5,0, envolvendo uma grande quantidade moléculas de glutaraldeído, dando a proporção de 1:20 entre quitosana:glutaraldeído.

As quitosanas modificadas QGX apresentam estruturas bastante complexas. A formação das ligações cruzadas com glutaraldeído podem envolver duas ou mais unidades básicas de quitosana no final da reação. As ligações cruzadas podem ou não pertencer à mesma cadeia polimérica.

As técnicas de RMN de ^{13}C , infravermelho e Raman mostram evidências da formação de ligação imina, a qual é estabilizada por ressonância, com duplas ligações etilênicas adjacentes.

As quitosanas modificadas QGX possuem maior capacidade em adsorver o íon cobre que a quitosana original, entretanto, menor que a QG0,0. Com exceção das QG20,0 e QG25,0, conforme aumenta a concentração de glutaraldeído na composição das mesmas, diminui a capacidade de adsorção de íons cobre.

O aumento na capacidade de adsorção das QGX com relação à quitosana natural, parece não ser devido à contribuição do glutaraldeído na síntese deste polímero, mas, devido à dissolução e reprecipitação da própria quitosana natural.

O mecanismo de formação dos híbridos pode ser dividido em dois estágios, consistindo nos processos de ligações cruzadas e sol-gel. Estas etapas foram muito bem caracterizadas por espectroscopia na região do infravermelho e RMN de ^{29}Si .

Os híbridos obtidos com organossilanos apresentaram-se no estado de hidrogel. Depois de secos mostraram ser amorfos e insolúveis em solventes orgânicos e em meios alcalinos e ácidos.

As superfícies dos híbridos têm morfologia do tipo lamelar, que são completamente diferente da morfologia da quitosana original.

Com exceção do SiGQ1 os outros dois híbridos apresentam superior capacidade de adsorção de íon cobre em relação à quitosana e esta capacidade aumenta conforme cresce o tamanho da cadeia orgânica do organossilano.

Os híbridos com organossilanos apresentam boa capacidade em imobilizar enzimas, mas, com exceção da catalase, o teor imobilizado dos híbridos foram menores do que o da quitosana. Em geral este teor diminui conforme aumenta o tamanho da cadeia orgânica do organossilano, que é o oposto do observado na adsorção dos íons cobre.

A energia livre de Gibbs das interações cobre-quitina e cobre-quitosanas, demonstram que os processos são favoráveis à interação do cobre-polímero. As entalpias dessas interações são exotérmicas, sendo que as entalpias de interação cobre-quitosanas são bem superiores à interação cobre-quitina. A entropia da interação do cobre-quitina demonstra um aumento na desordem do sistema, o contrário foi observado para as entropias das interações cobre-quitosanas.

6. REFERÊNCIAS

1. Muzzarelli, R. A. A.; *Natural Chelating Polymers: Alginic Acid, Chitin and Chitosan*, Pergamon, New York 1973.
2. Knorr, D.; *Food Technol.* **1991**, january, 114 - 120.
3. Roberts, G. A. F.; *Chitin Chemistry*, Macmillan, London 1992.
4. Hirano, S.; *Biotech. Ann. Res.* **1996**, 2, 237- 258.
5. Nifant'ev, N. E. ; Chernetskii, V. N. *Mendeleev Chem. J.* **1998**, 41, 96 - 100.
6. Hong, Xiao-Yin; *J.M.S.-Pure Appl. Chem.* **1996**, 10, 1459-1477.
7. Hirano, S. *Chitin and Chitosan*, Elsevier, New York 1989, 37-43.
8. Peter, M. G.; *J.M.S.-Pure Appl. Chem.* **1995**, 4, 629 - 640.
9. Kobelke, D. N. *Food Australia* **1990**, 42, 18-19.
10. Austin, P. R.; Brine, C. J.; Castle, J. E.; Zikakis, J. P. *Science* **1981**, 212, 749-753.
11. Chen, J.; Wang, M.; Ho, C. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 3207-3209.
12. Jonson, E. L.; Peniston, Q. P. *Chem. Biochem. Marine Food*, AVI Publishing Co., Westport, 1982.
13. Shahidi, F.; Synowiecki, J. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, 39, 1527-1532.
14. Abazinge, M. D. A.; Fontenot, J. P.; Allen, V. G.; Flick, G. J. *J. Agric. Food Chem* **1993**, 41, 657-661.
15. Muzzarelli, R. A. A.; Ilari, P.; Tarsi, R.; Dubini, B.; Xia, W. *Carbohydr. Polym.* **1994**, 25, 45-50.
16. Arcidiacono, S.; Kaplan, D. L. *Biotechnol. Bioeng.* **1992**, 39, 281-286.
17. Kim, S. Y.; Shon, D. H.; Lee, K. H. *J. Microb. Biotechnol.* **1998**, 8, 568-574.
18. Abdel-Aziz, S. M. *J. Basic Microb.* **1999**, 39, 79-87.

- 19.Ornum, J. V. *Infofish Int.* **1992**, 6, 48-52.
- 20.IBAMA *Lagosta, Caranguejo-uçá e Camarão do Nordeste*, GPE-IBAMA, 1994.
- 21.Tenuta Filho, A.; Zucas, S. M. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **1985**, 5, 78-85.
- 22.Tenuta Filho, A.; Zucas, S. M. *B. SBTA* **1987**, 21, 163-169.
- 23.Ogawa, M; Alves, T. T.; Braz Filho, R.; Rodrigues, A. S.; Maia, E. L. *Arq. Ciên. Mar* **1973**, 13, 83-89.
- 24.Takai, M.; Shimizu, Y.; Hayashi, J. *Chitin and Chitosan*, Elsevier, New York 1989, 431-436.
- 25.Terbojevich, M.; Carraro, C.; Cosani, A. *Carbohydr. Res.* **1988**, 188, 73-86.
- 26.Yazdani-Pedram, M.; Lagos, A. *J.M.S.-Pure Appl. Chem.* **1995**, A32, 1037-1047.
- 27.Knorr, D. *J. Food Science* **1983**, 48, 36-38.
- 28.Anthonsen, M. W.; Vårum, K. M.; Smidsrod, O. *Carbohydr. Polym.* **1993**, 22, 193-201.
- 29.Ogawa, M.; Magalhães-Neto, E. O. *VI Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca*, 1989, 91-105.
- 30.Muzzarelli, R. A. A.; Belmonte, M. M.; Muzzarelli, B.; Simonelli, L. *Polimeri in Medicina*, XX Convegno-Scuola, Associazione Italiana di Scienza e Tecnologia delle Macromolecole, Villa Fetrinelli, 1997, 307-336.
- 31.Belamie, E.; Domard, A.; Chanzy, H.; Giraud-Guille, M. M. *Langmuir* **1999**, 12, 1549-1555.
- 32.Knaul, J. Z.; Kasaai, M. R.; Tam Bui, V.; Creber, K. A. M. *Can. J. Chem.* **1998**, 76, 1699-1706.

33. Kim, C. Y.; Choi, Hyung-min; Cho, H. T. *J. Appl. Polym. Sci.* **1997**, *63*, 725-736.
34. Muzzarelli, R. A. A. *Chitin*, Pergamon, Oxford 1973.
35. Rinaudo, M.; Domard, A. *Chitin and Chitosan*, Elsevier, New York 1989, 71-86.
36. No, H. K.; Meyers, S. P. *J. Aquatic Food Prod. Technol.* **1995**, *4*, 27-52.
37. Tenuta Filho, A.; Zucas, S. M. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **1985**, *5*, 86-93.
38. Mandravan, P.; Nair, R. *Fishery Technol.* **1974**, *11*, 50-53.
39. No, H. K.; Meyers, S. P.; Lee, K. S. *J. Agric. Food Chem.* **1989** *37*(3), 575-579.
40. Cho, I. Y.; No, H. K.; Meyers, S. P. *J. Agric. Chem.* **1998**, *46*, 3839-3843.
41. Sannan, T.; Kurita, K.; Ogura, K. Iwakura, Y. *Polymer* **1978**, *19*, 458-459.
42. Moore, G. K.; Roberts, A. F. *Int. J. Macromol.* **1980**, *2*, 115-116.
43. Miya, M.; Iwamoto, R.; Yoshikawa, S.; Mima, S. *Int. J. Macromol.* **1980**, *2*, 323-324.
44. Domszy, J. G.; Roberts, G. A. F. *Makromol. Chem.* **1985**, *186*, 1671-1677.
45. Sabnis, S.; Block, L. H. *Polym. Bull.* **1997**, 67-71.
46. Muzzarelli, R. A. A.; Rocchetti, R.; Stanic, V.; Weckx, M. *Chitin Handbook*, European Chitin Society, 1997, 109-119.
47. Aiba, Sei-ichi *Int. Biol. Macromol.* **1986**, *8*, 173-176.
48. Domard, A. *Int. Biol. Macromol.* **1987**, *9*, 333-336.
49. Vårum, K. M.; Anthonsen, M. W.; Grasddalen, H.; Smidsrod, O. *Carbohydr. Res.* **1991**, *211*, 17-23.
50. Yu, G. E.; Morin, F. G.; Nobes, G. A. R., Marchessault, R. H. *Macromolecules* **1999**, *32*, 518-520.
51. Signini, R.; Campana Filho, S. P. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* **1998**, Out/Dez, 63-68.

52. Alonso, I. G.; Peniche-covas, C.; Nieto, J. M. *J. Thermal Anal.* **1983**, *28*, 189-193.
53. Niola, F.; Basora, N.; Chornet, E.; Vidal, P. F. *Carbohydr. Res.* **1993**, *238*, 1-9.
54. Sato, S.; Mizutani, S.; Tsuge, S.; Ohtani, H.; Aoi, K.; Takasu, A.; Okada, M.; Kobayashi, S.; Kiyosada, T.; Shoda S. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 7-12.
55. Hirano, S.; Ohe, Y.; Ono, H. *Carbohydr. Res.* **1976**, *47*, 315-320.
56. Blair, S. H.; Guthrie, J.; Law, Tak-Kau; Turkington, P. *J. Appl. Polym. Sci.* **1987**, *33*, 641-656.
57. Monteiro, O. A. C.; Airoidi, C. *J. Colloid Interface Sci.* **1999**, *212*, 212-219.
58. Monteiro, O. A. C.; Airoidi, C. *Int. J. Biol. Macromol.* **1999**, *26*, 119-128.
59. Kurita, K. *Chitin in Nature and Technology*, Plenum, New York 1986, 287-293.
60. Brinker, C. J.; Scherer, G. W. *Sol-Gel Science – The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, Academic, New York 1990.
61. Curriu, J. P. R.; Leclercq, D. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1421-1436.
62. Mark, J. E. *Heterog. Chem. Res.* **1996**, *3*, 307-326.
63. Deschler, U.; Kleinschmit, P.; Panster, P. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 136-252.
64. Gill, L.; Ballesteros, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8587-85698.
65. Silva, C. R.; Jardim, I. C. S. F.; Airoidi, C. *HRC – J. High Resol. Chromatogr.* **1999**, *22*, 103-108.
66. da Fonseca; M. G.; Silva, C. R.; Airoidi, C. *Langmuir* **1999**, *15*, 5048-5055.
67. Silva, C. R.; Airoidi, C. *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *195*, 381-387.

68. Cho, G.; Moon I.; Lee, J. *Chem. Lett.* **1997**, 577-578.
69. Hajdu, J. Friedrich, P. *Anal. Biochem.* **1975**, 65, 273-280.
70. Monsan, P.; Puzo, G.; Mazarguil, H. *Biochimie* **1975**, 57, 1281-1292.
71. Navarro, J. M.; Mansan, P. *Ann. Microbiol.* **1976**, 127 B, 295-307.
72. Kennedy, J. F. *Transition Met. Chem.* **1987**, 12, 481-493.
73. Cestari A. R.; Airoidi, C. *Langmuir* **1997**, 13, 2681-2686.
74. Ishii, H.; Minegishi, M.; Lavitpichayawong, B.; Mitani, T. *Int. J. Biol. Macromol.* **1995**, 17, 21-23.
75. Hsien Tzu-Yang; Rorrer, G. L. *Sep. Sci. Technol.* **1995**, 30, 2455-2475.
76. Roberts G. A. F.; Taylor, K. E. *Makromol. Chem.* **1989**, 190, 951-960.
77. Draget, K. I. *Polym. Gels Networks* **1996**, 4, 143-151.
78. Weetall, H. H. *Cereal Food World* **1976**, 21, 581-587
79. Grose, A. F.; Blakebrough, N.; Fiechter, A. *Advance in Biochemical Engineering*, vol. 10, Springer-Verlag, Berlin 1978, 89-126.
80. Ramachandran, K. B.; Perlmutter, D. D. *Biotechnol. Bioeng.* **1976**, 18, 685-699.
81. Vasudevan, P. T.; Ruggiano, L.; Weiland, H. *Biotechnol. Bioeng.* **1990**, 35, 1145-1149.
82. Schifreen, R. S.; Hanna, D. A.; Bowers, L. D.; Carr, P. W. *Anal. Chem.* **1977**, 49, 1929-1939.
83. Monsan, P. *J. Mol. Cat.* **1977/78**, 3, 371-384.
84. Kurokawa, Y.; Sano, T.; Ohta, H.; Nakagawa, Y. *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, 42, 394-397.
85. Ohmori, Y.; Kurokawa, Y. *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, 33, 205-209.
86. Huang, Ting-Chia; Chen, Dog-Hwang *Biotechnol. Bioeng.* **1992**, 40, 1203-1209.
87. Onyezili, F. N. *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, 29, 399-402.

88. Makino, K.; Naruo, Shi-Ichi; Morita, Y.; Takeuchi, T. *Biotechnol. Bioeng.* **1988**, 31, 617-619.
89. Bollmeier, J. P.; Middleman, S. *Biotechnol. Bioeng.* **1979**, 21, 2303-2321.
90. Finley, J. W.; Stanley, W. L.; Watters, G. G. *Biotechnol. Bioeng.* **1977**, 28, 1895-1897.
91. Muzzarelli, R. A. A.; Barontini, G.; Rocchetti, R. *Biotechnol. Bioeng.* **1978**, 20, 87-94.
92. Hirano, S.; Miura, O. *Biotechnol. Bioeng.* **1979**, 21, 715-719.
93. Muzzarelli, R. A. A. *Biotechnol. Bioeng.* **1976**, 18, 1445-1454.
94. Muzzarelli, R. A. A. *Biotechnol. Bioeng.* **1980**, 2, 177-184.
95. Krajewska, B. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **1991**, 52, 157-162.
96. Masri, M. S.; Randall, V. G.; Pittman, A. G. *ACS Polym. Prep.* **1978**, 19, 483-488.
97. Koyama, Y.; Taniguchi, A. *J. Appl. Polym. Sci.* **1986**, 31, 1951-1954.
98. Muzzarelli, R. A. A.; Weckx, M.; Filippini, O. *Carbohydr. Polym.* **1989**, 11, 293-306.
99. Guibal, E.; Milot, C.; Roussy, J. *Chitin Handbook*, Atec Edizioni, San martino-Italy, 1997, 423-429.
100. Iyengar, L.; Prabhakara Rao, A. V S. *Biotechnol. Bioeng.* **1979**, 21, 1333-1343.
101. Krajewaka, B.; Leszko, M.; Zaborska, W. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **1990**, 48, 337-350.
102. Krajewska, B.; Zaborska, W.; Leszko, M. *J. Mol. Catal.* **1997**, 3B, 231-238.
103. Leszko, M.; Zaborska, W. *Chem. Tech. Biotechnol.* **1993**, 57, 113-120.
104. Agarwal, R.; Gupta, M. N. *Anal. Chim. Acta* **1995**, 253-257.
105. Chen Jyh-Ping; Chen, Jong-Yeh *J. Mol. Cat.* **1998**, 5B, 483-490.

106. Stanley, W. L.; Watters, G. G.; Kelly, S. H.; Olson, A. C. *Biotechnol. Bioeng.* **1978**, 20, 135-140.
107. Stanley, W. L.; Watters, G. G.; Chan, B.; Mercer, J. M. *Biotechnol. Bioeng.* **1975**, 17, 315-326.
108. Stanley, W. L.; Watters, G. G.; Kelly, S. H.; Chan, B. G.; Garibaldi, J. A.; Shade, J. A. *Biotechnol. Bioeng.* **1976**, 18, 139-143.
109. Wadsö, I. *Chem. Sci. Rev.* **1997**, 26, 79-86.
110. Wadsö, I. *Thermochim. Acta* **1993**, 219, 1-15.
111. Stödeman, M.; Wadsö, I. *Pure Appl. Chem.* **1995**, 67, 1059-1068.
112. Wadsö, I. *Indian J. Technol.* **1992**, 30, 537-544.
113. Vieira, E. F. S.; Simoni, J. A.; Airoidi, C. *J. Mater. Chem.* **1997**, 7, 2249-2252.
114. Roca, S.; Airoidi, C. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1997**, 2517-2523.
115. Airoidi, C.; Santos, M. R. M. C. *J. Mat. Chem.* **1994**, 4, 1479-1485.
116. Nunes, L. M.; Airoidi, C.; Farias, R. F. *J. Solid State Chem.* **145**, 649-654.
117. Nunes, L. M.; Airoidi, C. *Thermochim. Acta* **1999**, 297-
118. Airoidi, C.; Alcântara, E. F. C. *J. Chem. Thermodynamics* **1995**, 27, 623-632.
119. Roca, S.; Airoidi, C. *Thermochim. Acta* **1996**, 284, 289-297.
120. Cesàro, A.; Delben, F.; Paoletti, S. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I* **1988**, 84, 2573-2584.
121. Airoidi, C.; Alcântara, E. F. C. *J. Chem. Thermodynamics* **1995**, 27, 623-632.
122. Airoidi, C.; Alcântara, E. F. C. *J. Chem. Thermodynamics* **1995**, 259, 95-102.
123. Cestari, A. R.; Airoidi, C. *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, 195, 338-342.

124. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. F.; Randall, R. J. *J. Biol. Chem.* **1951**, 193, 265
125. Domszy, J. G.; Roberts, A. F. *Makromol. Chem.* **1985**, 186, 1671-1677.
126. Lepri, L.; Desideri, G. P.; Tanturli, G. J. *Chromatogr.* **1978**, 147, 375-381.
127. Colthup, N. B.; Daly, I. H.; Wiberley, S. E. *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*, Academic, New York, 1964.
128. Lin-Vien, D.; Colthup, N. B.; Fateley, W. G.; Grasselli, J. G. *The handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*, Academic, London, 1991.
129. Pelletier A.; Lemire, I.; Sygusch, J.; Chomet, E.; Overend, R. P. *Biotechnol. Bioeng.* **1990**, 36, 310-315.
130. Li, J.; Revol, J. F.; Marchessault, R. H. *J. Appl. Polym.* **1997**, 65, 373-380.
131. Admson, A. W. *Physical Chemistry of Surfaces*, John Wiley & Sons, New York 1990.
132. Everett, D. H.; Podoll, R. T. *J. Colloid Interface Sci.* **1981**, 82, 14.
133. Piron, E.; Accominotti, M.; Domard, A. *Langmuir*, **1997**, 13, 1653-1658.
134. Baba, Y.; Hirakawa, H.; Yoshizuka, K.; Inoue, K.; Kawano, Y. *Anal. Sci.* **1994**, 10, 601-605.
135. Baba, Y.; Masaaki, K.; Kawano, Y. *Chem. Lett.* **1994**, 2389-2392.
136. Baba, Y.; Adachi, Y.; Kawazu, K. *Chem. Lett.* **1991**, 1529-1532.
137. Nieto, J. M.; Peniche-Covas, C.; Bosque, J. D. *Carbohydr. Polym.* **1992**, 18, 221-224.
138. Ohga, K.; Kurauchi, Y.; Yanase, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, 60, 444-446.

139. Minamisawa, H.; Arai, N.; Okutani, T. *Anal. Sci.* **1995**, 11, 961-965.
140. Kondo, K.; Sumi, H.; Matsumoto, M. *Sep. Sci. Technol.* **1996**, 31, 1771-1775.
141. Guibal, E.; Jansson-Charrier, M.; Saucedo, I.; Cloirec, P. L. *Langmuir* **1995**, 11, 591-598.
142. Nair, K. G. R.; Madhavan, P. *Fishery Technol.* **1984**, 21, 109-112.
143. Muzzarelli, R. A. A.; Tanfani, F.; Emanuelli, M.; Mariotti, S. *Carbohydr. Res.* **1982**, 107, 199-214.
144. Muzzarelli, R. A. A. *Anal. Chim. Acta.* **1971**, 54, 133-142.
145. Shimizu, Y.; Kono, K.; Kim, I. S.; Takagishi, T. *J. Appl. Polym. Sci.* **1995**, 55, 255-261.
146. Tikhonov, V. E.; Radigina, L. A.; Yamskov, Y. A. *Carbohydr. Res.* **1996**, 290, 33-41.
147. Tsezos, M. *Biotechnol. Bioeng.* **1983**, 25, 2025-2040.
148. Kawamura, Y.; Mitsuhashi, M.; Tanibe, H. *Ind. Eng. Chem. Res.* **1993**, 32, 386-391.
149. Inoue, K.; Yoshizuka, K.; Baba, Y. *New Developments in Ion Exchange*, Elsevier, Tokyo, 1991.
150. Inoue, K.; Baba, Y.; Yoshizuka, K.; Noguchi, H.; Yoshizaki, K. *Chem. Lett.* **1988**, 1281-1284.
151. Inoue, K.; Ohto, K.; Yoshizuka, K.; Yamaguchi, T.; Tanaka, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1997**, 70, 2443-2447.
152. Berth, G.; Dautzenberg, H.; Peter, M. G. *Carbohydr. Polym.* **1998**, 36, 205-216.
153. Anthonsen, M. W.; Vårum, K. M.; Hermansson, A. M.; Smidsrød; Brant, D. A. *Carbohydr. Polym.* **1994**, 25, 13-23.
154. Delben, F.; Muzzarelli, R. A. A. *Carbohydr. Polym.* **1989**, 11, 221-232.

155. Delben, F.; Muzzarelli, R. A. A.; Terbojevich, M. *Carbohydr. Polym.* **1989**, 11, 205-219.
156. Dobbetti, L.; Delben, F. *Carbohydr. Polym.* **1992**, 18, 273-282.
157. Ashcroft, S. F., Mortimer, C. T. *Thermochemistry of Transition Metal Complexes*, Academic, London, 1970.
158. Barbucci, R.; Casolaro, M.; Barone, V.; Ferruti, P.; Tramontini, M. *Macromolecules* **1983**, 16, 1159-1164.
159. Blout, E. R.; Fields, M.; Karplus, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, 70, 194-198.
160. Kuzmany, H.; Kastner, J. *Macromolecules* **1992**, 333-346.
161. Dollish, F. R.; Fateley, W. G.; Bentley, F. F. *Characteristic Raman Frequencies of Organic Compounds*, Wiley-Interscience, New York 1974.
162. Tobin, M. C. *Chemical Analysis-Laser Raman Spectroscopy*, Wiley-Interscience, Vol. 35, New York, 1971.
163. Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S. *Introduction to Spectroscopy*, Saunders College Publishing, New York 1996.
164. Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, New York, 1991.
165. Fyfe, C. A.; Zhang, Y.; Aroca, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 3252-3255.
166. Sherriff, B. L.; Grundy, H. D.; Hartman, J. S. *Eur. J. Mineral.* **1991**, 3, 751-768.
167. Sanz, J.; Serratosa, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 106, 4790-4793.
168. Piron, E.; Accominotti, M.; Domard, A. *Langmuir* **1997**, 13, 1653-1658.

169. Sindorf, D. W.; Marciel, G. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 3767-3769.
170. Synowiecki, J.; Sikorska-Siondalska, A.; El-Bedawey, A. E. F. *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, 29, 352-354.
171. Muzzarelli, R. A. A. *Enzyme Microb. Technol.* **1980**, 2, 177-184.