

**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS**  
**CURSO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS**

FERNANDA DE MAGALHÃES OLIVEIRA

**DETERMINAÇÃO DO GRAU DE DESACETILAÇÃO DA QUITOSANA POR MEIO  
DAS TÉCNICAS DE TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA E  
ESPECTROFOTOMETRIA DE ULTRAVIOLETA VISÍVEL**

BELO HORIZONTE

2012

FERNANDA DE MAGALHÃES OLIVEIRA

DETERMINAÇÃO DO GRAU DE DESACETILAÇÃO DA QUITOSANA POR MEIO  
DAS TÉCNICAS DE TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA E ESPECTROFOTOMETRIA  
DE ULTRAVIOLETA VISÍVEL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
no Curso de Graduação em Engenharia de  
Materiais do Centro Federal de Educação  
Tecnológica de Minas Gerais como requisito  
parcial para obtenção do título de Bacharel em  
Engenharia de Materiais.

Orientador: Ezequiel de Souza Costa Júnior

BELO HORIZONTE

2012

FERNANDA DE MAGALHÃES OLIVEIRA

**DETERMINAÇÃO DO GRAU DE DESACETILAÇÃO DA QUITOSANA POR MEIO  
DAS TÉCNICAS DE TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA E  
ESPECTROFOTOMETRIA DE ULTRAVIOLETA VISÍVEL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no Curso de Graduação em Engenharia de Materiais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Materiais.

Aprovado em 12/11/2012

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Ezequiel de Souza Costa Júnior – Orientador

---

Prof. M. Sc. Wanderlei Ferreira de Freitas

---

Prof. Dra. Patrícia Santiago de Oliveira Patricio

*Aos meus pais, pelo incentivo e carinho.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que estiveram envolvidos de alguma maneira para a realização deste trabalho.

Em especial ao Professor Dr. Ezequiel de Souza Costa Júnior, pela compreensão, orientação e incentivo neste estudo.

À colega de graduação em Engenharia de Materiais Nayara Gontijo Fernandes e à aluna de mestrado em Engenharia de Materiais Talita Martins, pelo companheirismo, disponibilidade e colaboração na execução dos ensaios de titulação e UV-VIS.

Ao Professor Mestre Joel Romano Brandão, pela estimada ajuda nos assuntos relacionados ao Laboratório de Biomateriais do Departamento de Engenharia de Materiais do CEFET-MG.

À professora Sonja Bárbara Barczewski do Departamento de Química Tecnológica do CEFET-MG e ao professor Ricardo José Alves do Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da UFMG, pelo material e suporte fornecidos.

Ao amigo Luis Fellipe Nunes Barcelos Dias, pela compreensão e valiosa ajuda na execução e desenvolvimento das atividades deste trabalho.

Às colegas de graduação em Engenharia de Materiais Aline Silva Magalhães e Suzanny Cristina Soares Martins e ao colega do Curso Técnico de Mecânica Roberto Wagner de Oliveira Elias, pela amizade e incentivo para realização deste trabalho.

Ao técnico Alisson Luiz Diniz Silva do Departamento de Química Tecnológica do CEFET-MG, pelo auxílio nos ensaios de *FTIR*, *TGA* e UV-VIS para caracterização da quitosana.

Ao técnico Bruno Cordeiro de Souza do Laboratório de Caracterização e Microscopia do Departamento de Engenharia de Materiais do CEFET-MG, pelo auxílio no ensaio de DRX para caracterização da quitosana.

Aos meus amados pais, Jorge Luiz de Oliveira e Eunice Argemiro de Magalhães Oliveira, e querido irmão, Ricardo de Magalhães Oliveira, pela constante presença, paciência e dedicação durante todos esses anos.

Por fim, é com muita alegria e felicidade que agradeço especialmente a Deus, que colocou no meu caminho todos os que contribuíram para mais essa vitória!

*“Comece fazendo o que é necessário,  
Depois o que é possível,  
E, de repente, você estará fazendo o impossível.”*

*São Francisco de Assis.*

## RESUMO

A quitosana é um biopolímero obtido por meio de desacetilação parcial da quitina. O grau de desacetilação (GD) envolvido nessa conversão é um parâmetro importante, pois determina as propriedades físicas, químicas e biológicas da quitosana. Neste trabalho, busca-se determinar o GD da quitosana por meio das técnicas de titulação potenciométrica e de espectrofotometria de ultravioleta visível. As propriedades físico-químicas da quitosana foram caracterizadas por espectroscopia de absorção na região do infravermelho, difração de raios-X, termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial. O espectro de infravermelho da quitosana confirmou as principais bandas de absorção associadas aos grupos químicos presentes na sua estrutura, além de atribuir um GD de 69,7%. O difratograma apontou 24,6% de cristalinidade, a análise térmica confirmou a perda de massa em dois estágios característicos de desidratação e decomposição do polímero, além de evidenciar os picos de temperatura envolvidos nesses eventos. Na titulação, evidenciaram-se os dois pontos de inflexão típicos da curva, além de um GD de 74,9% segundo metodologia de Tan *et al.* (1998), e de 60,7% segundo Torres *et al.* (2005). Foi encontrado um máximo de absorção em ultravioleta visível para a quitosana em 203,9nm, bem como uma faixa de relação linear da concentração do polímero pela absorbância entre 0,05 e 0,50mg/mL, além de absortividade molar de  $3,467\text{mg}^{-1}.\text{mL}.\text{cm}^{-1}$  e GD de 81,2%. Portanto, percebeu-se que o GD da quitosana é influenciado pelo método empregado, o que explica as grandes variações observadas, e por isso o método utilizado na sua determinação deve ser também relatado junto ao valor encontrado para a amostra.

Palavras-chave: Quitosana. Grau de desacetilação. Titulação. Espectrofotometria.

## ABSTRACT

Chitosan is a biopolymer obtained by partial deacetylation of chitin. The degree of deacetylation (DD) involved in this conversion is an important parameter because it determines the physical, chemical and biological properties of chitosan. In this work, the DD of chitosan is determined by potentiometric titration and ultraviolet visible spectrophotometry. Chitosan physico-chemical properties were characterized by infrared spectroscopy, X-ray diffraction, differential scanning calorimetry and thermogravimetry. Chitosan infrared spectrum revealed major absorption bands associated with its chemical groups and assigned a DD of 69.7%. The diffractogram showed 24.6% of crystallinity, the thermal analysis confirmed a characteristic two-stage mass loss due to polymer dehydration and decomposition, and pointed out the temperature peaks involved in these events. The titration revealed two typical inflection points, DD of 74.9% according to Tan et al. (1998) method, and 60.7% according to Torres *et al.* (2005). An ultraviolet visible maximum absorption in 203.9nm was found to chitosan, and a linear range of polymer concentration versus absorbance between 0.05 and 0.50 mg/mL, molar absorptivity of  $3.467\text{mg}^{-1}\cdot\text{mL}\cdot\text{cm}^{-1}$  and DD of 81.2%. Therefore, the DD of chitosan is influenced by the method used, which explains the large variations observed, so the technique used for its determination should also be reported with the value found for the sample.

Keywords: Chitosan. Degree of deacetylation. Titration. Spectrophotometry.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura molecular da celulose.....	20
Figura 2 – Estrutura molecular da quitina.....	21
Figura 3 – Estrutura molecular da quitosana.....	21
Figura 4 – Fluxograma das etapas do trabalho.....	41
Figura 5 – Representação da linha de base utilizada para análise qualitativa do espectro da quitosana.....	45
Figura 6 – Espectro de <i>FTIR</i> da quitosana e a representação de sua estrutura.....	46
Figura 7 – Espectro da quitosana para cálculo do GD.....	48
Figura 8 – Difratoograma da amostra de quitosana pura.....	49
Figura 9 – Estrutura química de um segmento da quitosana com destaque para a numeração da posição dos átomos de carbono, oxigênio e nitrogênio.....	50
Figura 10 – Difratoograma da quitosana com destaque para a área total da curva.....	52
Figura 11 – Difratoograma da amostra de quitosana pura com destaque para área cristalina do pico de $2\theta=20,16^\circ$ .....	52
Figura 12 – Difratoograma da amostra de quitosana pura com destaque para área cristalina do pico de $2\theta=9,8^\circ$ .....	53
Figura 13 – Difratoograma da quitosana com destaque para as áreas cristalinas em $2\theta=20, 16^\circ$ e $9,8^\circ$ .....	54
Figura 14 – Curva de <i>TGA</i> da quitosana.....	55
Figura 15 – Curva de <i>DSC</i> da quitosana.....	56
Figura 16 – Curva de titulação potenciométrica da quitosana.....	57
Figura 17: Derivada primeira da curva de titulação potenciométrica da quitosana.....	58
Figura 18 – Derivada segunda da curva de titulação potenciométrica da quitosana.....	58
Figura 19 – Espectros de ordem zero das soluções de ácido acético: a) 0,01M; b) 0,02M; c) 0,03M.....	60
Figura 20 – Espectros de derivada primeira das soluções de ácido acético: a) 0,01M; b) 0,02M; c) 0,03M.....	61
Figura 21 – Curva de calibração de soluções padrão de quitosana de 0,05mg/mL a 1,00mg/mL.....	61
Figura 22 – Curva de calibração de soluções padrão de quitosana de 0,05mg/mL a 0,50mg/mL.....	62

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 – Relação entre bandas e grupos funcionais da quitosana.....</b>	<b>47</b>
<b>Tabela 2 – Perda de massa da quitosana em função dos estágios térmicos. ....</b>	<b>55</b>
<b>Tabela 3 – Temperaturas e respectivos eventos térmicos característicos da quitosana. .</b>	<b>56</b>
<b>Tabela 4 – Volumes necessários para neutralizar o excesso de ácido da solução e a quitosana na titulação. ....</b>	<b>57</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- $\Delta E/\Delta V$  – Variação do potencial por unidade de titulante;
- $\Delta pH/\Delta V$  – Variação de pH por unidade de titulante;
- $2\theta$  – Ângulo de espalhamento;
- A – Absorbância;
- a – Parâmetro de rede da célula ortorrômbica;
- $A_A$  – Área da fração amorfa;
- $A_C$  – Área da fração cristalina;
- ATR* – *Attenuated Total Reflectance* – Reflexão Total Atenuada;
- b – Parâmetro de rede da célula ortorrômbica;
- C – Concentração do analito;
- c – Parâmetro de rede da célula ortorrômbica;
- $cm^{-1}$  – Número de onda;
- dA – Variação da absorbância;
- $dA/d\lambda$  – Variação da absorbância por comprimento de onda;
- DRX – Difração de Raios-X;
- DSC* – *Differential Scanning Calorimetry* – Calorimetria exploratória diferencial;
- $d\lambda$  – Variação do comprimento de onda;
- FTIR* – *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* – Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho;
- GC – Grau de Cristalinidade;
- GD – Grau de Desacetilação;
- GliN – Monômero glicosamina;
- GliNAc – Monômero acetilglicosamina;
- $K\alpha$  – Transição eletrônica entre as camadas L e K.
- l – Comprimento do caminho óptico;
- M – Massa da amostra;
- MM – Massa molar;
- n – Ordem da curva diferencial;
- PI – Ponto de Inflexão da curva de titulação;
- pKa – Logaritmo negativo da constante de acidez;
- TGA* – *Thermogravimetric Analysis* – Análise Termogravimétrica;
- u.a. – Unidades arbitrárias;

UV – Ultravioleta;

VIS – Visível;

$V_m$  – Volume médio do titulante;

x – Unidade monomérica de glicosamina;

y – Unidade monomérica de acetilglicosamina;

ZCP – *Zero Crossing Point* – Ponto zero da curva;

$\beta$  – Ângulo da célula unitária monoclinica;

$\delta$  – Vibrações de deformação.

$\varepsilon$  – Absortividade molar;

$\theta$  – Ângulo de difração;

$\lambda$  – Comprimento de onda;

$\lambda_{\max}$  – Comprimento de onda máximo;

$\nu$  – Vibrações de estiramento.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
3.1.	<b>Objetivo Principal</b> .....	<b>18</b>
3.2.	<b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>18</b>
<b>4</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>19</b>
4.1	<b>Biomateriais</b> .....	<b>19</b>
4.2	<b>Quitosana</b> .....	<b>20</b>
4.2.1	<i>Aspectos Gerais</i> .....	<b>20</b>
4.2.2	<i>Histórico</i> .....	<b>23</b>
4.2.3	<i>Obtenção</i> .....	<b>23</b>
4.2.4	<i>Características</i> .....	<b>26</b>
4.2.5	<i>Propriedades</i> .....	<b>27</b>
4.2.6	<i>Aplicações</i> .....	<b>30</b>
4.2.7	<i>Aplicações em Biomateriais</i> .....	<b>30</b>
4.2.8	<i>Grau de Desacetilação</i> .....	<b>31</b>
4.3	<b>Titulação Potenciométrica</b> .....	<b>32</b>
4.3.1	<i>Titulação Potenciométrica de Quitosana</i> .....	<b>34</b>
4.4	<b>Espectrofotometria de UV-VIS</b> .....	<b>35</b>
4.4.1	<i>Espectrofotometria de UV-VIS derivada</i> .....	<b>37</b>
4.4.2	<i>Espectrofotometria de UV-VIS de Quitosana</i> .....	<b>39</b>
<b>5</b>	<b>PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>41</b>
5.1	<b>Etapas de desenvolvimento do trabalho</b> .....	<b>41</b>
5.2	<b>Materiais</b> .....	<b>41</b>
5.3	<b>Métodos</b> .....	<b>41</b>
5.3.1	<i>Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)</i> .....	<b>41</b>
5.3.2	<i>Difração de Raios-X (DRX)</i> .....	<b>42</b>
5.3.3	<i>Análise Térmica</i> .....	<b>42</b>
5.3.4	<i>Titulação Potenciométrica</i> .....	<b>43</b>
5.3.5	<i>Espectrofotometria de UV-VIS</i> .....	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>45</b>
6.1	<b>Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)</b> .....	<b>45</b>

<b>6.2</b>	<b>Difração de Raios-X (DRX)</b> .....	<b>48</b>
<b>6.3</b>	<b>Análise Térmica</b> .....	<b>54</b>
<b>6.4</b>	<b>Titulação Potenciométrica</b> .....	<b>56</b>
<b>6.5</b>	<b>Espectrofotometria de UV-VIS</b> .....	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>64</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>65</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Tecidos do corpo humano que sofrem algum tipo de lesão podem ser reparados por meio da utilização de biomateriais: materiais utilizados em dispositivos que têm como objetivo promover a reparação estrutural, estética e/ou funcional de um órgão ou tecido biológico ou, ainda, que entram em contato com fluidos corporais. Esses materiais não só permitem melhores e mais adequadas condições de manipulação de suas estruturas e propriedades, como também proporcionam mais garantia e confiabilidade na reconstituição do local danificado (ORÉFICE *et al.*, 2006).

A quitosana tem sido muito estudada para aplicação como biomaterial em diversas áreas, com destaque para engenharia, biotecnologia e medicina (ASSIS; SILVA, 2003). Seu grande potencial decorre da abundância na natureza da matéria-prima da qual é derivada, a quitina, que é um constituinte das conchas de crustáceos (WANG *et al.*, 2004). Além disso, suas vantagens de utilização como biomaterial decorrem de importantes características, tais como: biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade e hidrofiliabilidade (TORRES *et al.*, 2005).

A quitosana e a quitina são aminopolissacarídeos (ASSIS; SILVA, 2003) de estrutura semelhante à da celulose. Como diferença a quitina apresenta em sua estrutura um grupo acetamido (DALLAN, 2005), a partir do qual, por meio da desacetilação parcial, se obtém a quitosana (DON *et al.*, 2006). Nessa conversão, estão presentes vários grupos amino livres na estrutura, o que confere à quitosana expressiva característica catiônica (WANG *et al.*, 2004).

O grau de desacetilação (GD) da quitosana é um parâmetro fundamental para esse polímero, pois surge da sua obtenção a partir da quitina (SILVA; MANO; REIS, 2008). O GD relaciona a quantidade de grupos amino que estão livres na cadeia polimérica (SANTOS, 2004), por isso exerce influência nas suas propriedades físicas, químicas e biológicas (TAN *et al.*, 1998), já que interfere em aspectos como solubilidade (WU; ZIVANOVIC, 2008); viscosidade (ZHANG *et al.*, 2011); comportamento mecânico (CHATELET; DAMOUR; DOMARD, 2001), eletrostático (WU; ZIVANOVIC, 2008), imunológico (TAN *et al.*, 1998); biodegradação (KASAAI, 2009); cicatrização de feridas, (CHATELET; DAMOUR; DOMARD, 2001) dentre outros.

A dificuldade de se determinar o GD da quitosana se deve ao desafio dos métodos analíticos, e por isso, um grande número de técnicas diferentes tem sido publicadas nas últimas décadas (BEIL *et al.*, 2012). Métodos para esse fim se referem a: espectroscopia de absorção na região do infravermelho, espectrofotometria de ultravioleta, titulação coloidal,

titulação potenciométrica, determinação enzimática, ressonância nuclear magnética, dentre outros (KHAN, PEH, CH'NG, 2002; TAN *et al.*, 1998; WU, ZIVANOVIC, 2008; HEUX *et al.*, 2000).

Para se escolher uma metodologia, devem ser consideradas as limitações inerentes a mesma, além de fatores como simplicidade e rapidez de execução, relação custo-benefício, confiabilidade, tolerância a contaminações e presença de impurezas (TAN *et al.*, 1998). Com destaque, a titulação potenciométrica e a espectrofotometria de ultravioleta surgem como boas alternativas para a determinação do GD, em função de apresentarem, respectivamente, baixo custo e boa reprodutibilidade (ZHANG *et al.*, 2011; BEIL *et al.*, 2012).

A determinação do GD faz parte das análises de rotina realizadas para o controle de qualidade de amostras de quitina e quitosana. Ajustes no processamento desses polímeros baseados no GD são geralmente necessários para facilitar uma preparação mais rápida e viável das amostras (ZHANG *et al.*, 2005). Além disso, é essencial obter um método padrão para se determinar o GD da quitosana, que satisfaça aos fabricantes e aos usuários finais, a fim de promover um maior aproveitamento desse material (TAN *et al.*, 1998).

Assim, o estudo e o aprimoramento da quitosana, bem como da determinação do seu grau de desacetilação, constituem itens de relevante contribuição para o desenvolvimento desse material na promoção da saúde e do bem estar das pessoas.

## 2 JUSTIFICATIVA

O grau de desacetilação (GD) é uma propriedade de extrema importância, já que, em primeiro lugar, define se o polímero é quitina ou quitosana. Por outro lado, o GD é um dos parâmetros mais relevantes também em termos de caracterização da quitosana, pois influencia suas propriedades físicas, químicas e biológicas, além de determinar, conseqüentemente, a sua utilização e aplicações. Desse modo, é essencial se determinar o GD da quitosana, o que pode ser alcançado por meio de várias técnicas e métodos de análise química. A busca por um método de determinação do GD que se torne uma metodologia padronizada e confiável considera processos simples, rápidos e de baixo custo, e isso é associado por muitos autores à titulação potenciométrica e à espectrofotometria de ultravioleta visível.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Principal**

Determinar o grau de desacetilação (GD) da quitosana por meio das técnicas de titulação potenciométrica e de espectrofotometria de ultravioleta visível.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

Caracterizar as propriedades físico-químicas do polímero quitosana por meio das técnicas de espectroscopia de absorção na região do infravermelho (*FTIR*), difração de raios-X (DRX), termogravimetria (*TGA*) e calorimetria exploratória diferencial (*DSC*).

## 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 Biomateriais

A palavra biomaterial pode ser definida como o material que é utilizado para fabricar dispositivos que substituem uma parte ou uma função do corpo humano ou que entram em contato com tecidos vivos, ambos de maneira segura, econômica e fisiologicamente aceitável. O objetivo da utilização desses biomateriais é melhorar a saúde humana por meio da restauração da função natural de um tecido ou órgão do corpo, por isso, muitos desses dispositivos tratam de doenças e lesões (PARK; LAKES, 2007).

De acordo com a Conferência de Consenso da Sociedade Europeia de Biomateriais, realizada em Chester, Inglaterra, em março de 1986, os biomateriais são materiais destinados a interagir com sistemas biológicos de modo biocompatível, isto é, capaz de desempenhar seu papel com uma resposta adequada do hospedeiro em determinada aplicação (RATNER *et al.*, 2004).

Em outra definição, os biomateriais se referem aos materiais que constituem partes de implantes médicos, dispositivos extracorpóreos e descartáveis, de origem sintética ou natural, que podem ser utilizados por qualquer período de tempo, como o todo ou como uma parte de um sistema que trata, aumenta ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do corpo (DEE; PULEO; BIZIOS, 2002).

Os biomateriais correspondem a tipos de materiais que se diferenciam de outros materiais por conter uma combinação de propriedades mecânicas, químicas, físicas e biológicas que os tornam viáveis a sua utilização em contato com o corpo humano. Cada relação de propriedade do material é específica para cada tecido ou para cada função que se deseja restaurar e recompor no organismo (ORÉFICE *et al.*, 2006).

A ciência responsável pelo estudo e fabricação de materiais tem a necessidade de buscar e desenvolver materiais que possam estar em contato direto com o corpo humano e com tecidos vivos em geral sem causar nenhum tipo de dano, problema ou rejeição por parte do organismo (MÁRQUEZ, 2005).

Os biomateriais apresentam inúmeras vantagens de utilização, pois permitem melhores e mais adequadas condições de manipulação de suas estruturas, propriedades e interações com o organismo receptor; promovem grandes oportunidades de realizar, com mais garantia e confiabilidade, a reconstrução de tecidos ou órgãos afetados por patologias ou falhas (ORÉFICE *et al.*, 2006).

O conceito de biocompatibilidade do biomaterial implica, obviamente, em sua compatibilidade com o organismo, mas isso se refere a capacidade do material de não provocar danos ao corpo humano, em termos de reações tóxicas, carcinogênicas, antigênicas, mutagênicas e trombogênicas (BLACK; HASTINGS, 1998).

O sucesso de um biomaterial é altamente dependente de três fatores principais: propriedades e biocompatibilidade do dispositivo, estado de saúde do paciente receptor do dispositivo e as condições de implantação no organismo (PARK; LAKES, 2007). Esses fatores podem ser exemplificados pelo grau da resposta inflamatória do organismo, pelo tempo de recuperação pós-operatório, pela interferência na qualidade de vida do paciente e, ainda, pelo tempo de vida útil do implante (ORÉFICE *et al.*, 2006).

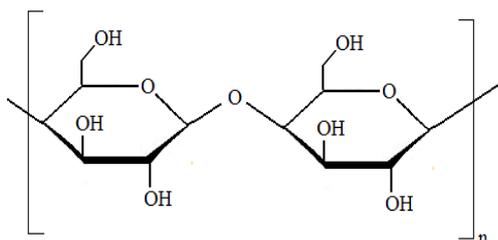
Os campos de aplicação dos biomateriais abrangem medicina, cirurgia, odontologia e medicina veterinária, bem como todos os aspectos relacionados ao cuidado da saúde do paciente (DEE; PULEO; BIZIOS, 2002).

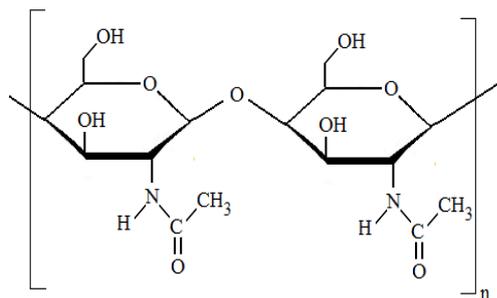
## 4.2 Quitosana

### 4.2.1 Aspectos Gerais

A quitosana e a quitina representam uma família de biopolímeros (FREIER *et al.*, 2005) formados por unidades monoméricas de composição aminopolissacarídica (ASSIS; SILVA, 2003) em sequência linear semelhante à da celulose. A diferença estrutural entre a celulose, cuja estrutura é apresentada na Figura 1, e a quitina, apresentada na Figura 2, é a ligação de um grupo hidroxila na celulose e um grupo acetamido na quitina, ambos na posição do carbono 2 de cada unidade glicosídica. Assim, a quitina é um polímero  $\beta$ -(1-4)-2-acetamido-2-deoxi-D-glicose reconhecido por suas unidades monoméricas acetilglicosamina (GliNAc) (DALLAN, 2005).

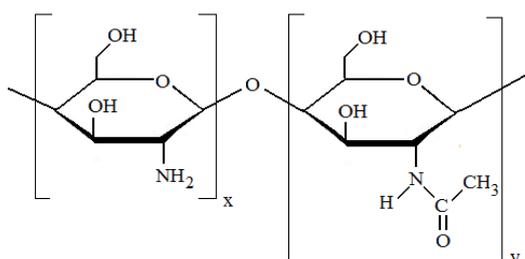
**Figura 1 – Estrutura molecular da celulose.**



**Figura 2 – Estrutura molecular da quitina.**

A quitina é o segundo composto orgânico mais abundante da natureza depois da celulose (ASSIS; SILVA, 2003). A quitina apresenta o mesmo papel estrutural que a celulose cumpre nas plantas e que o colágeno realiza nos animais superiores (PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009). A quitina está presente nas carapaças de crustáceos, como no camarão, no caranguejo, na lagosta, no siri e em krills (NGAH; KAMARI; KOAY, 2004), além de compor o exoesqueleto de artrópodes, em insetos como formigas e besouros (BRITO *et al.*, 2009), também na parede celular de fungos, leveduras (WAN *et al.*, 2003) e nematódeos. Alguns tipos de fungos contêm quitosana naturalmente em suas paredes celulares (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006), a exemplo de algumas espécies de cogumelos (VINSOVA; VAVRIKOVA, 2008).

A quitosana é obtida por desacetilação parcial da quitina em solução alcalina em diferentes extensões de reação (DON *et al.*, 2006), isto é, por N-desacetilação, a partir da qual se obtém um copolímero de 2-amino-2-desoxi-D-glicose e 2-acetamido-2-desoxi-D-glicose. Assim, a quitosana é um copolímero formado por unidades monoméricas de glicosamina (GliN) e acetilglicosamina (GliNAc), como representado, na Figura 3, pelas unidades x e y respectivamente (SILVA *et al.*, 2004).

**Figura 3 – Estrutura molecular da quitosana.**

A proporção dos grupos GliN na estrutura da quitosana é conhecido como grau de desacetilação (GD) e corresponde aos grupos amino que estão livres no polímero (SANTOS,

2004). Esse parâmetro serve como critério para definição da espécie corresponder a quitina ou quitosana (SILVA; MANO; REIS, 2008). Dessa forma, considera-se como o copolímero quitosana, de acordo com a Figura 3 anterior, quando o GD é maior do que 50%, isto é,  $x > 50\%$ , e ao contrário, considera-se quitina quando  $y > 50\%$ . Preparos de quitosana disponíveis comercialmente possuem GD variando de 50 a 90% (SUH; MATTHEW, 2000).

O GD é um parâmetro que possui importante influência nas propriedades físicas, químicas e biológicas da quitosana (TAN *et al.*, 1998), pois representa a quantidade de grupos  $\text{NH}_2$  que podem ser protonados em meio ácido e, desse modo, está relacionado a sua propriedade de solubilidade (SILVA *et al.*, 2004). Além do critério de nomenclatura utilizado para a identificação das espécies de quitina e quitosana, pode-se distingui-las baseando-se exatamente nas suas propriedades de solubilidade em referência ao ácido acético 0,1M, e assim, considera-se quitina como a forma insolúvel e quitosana como a solúvel (KUMIRSKA *et al.*, 2010).

A quitina é um polímero de coloração branca, duro e inelástico (KUMAR, 2000), inerte e insolúvel em água, em solventes orgânicos (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009), em ácidos diluídos e em soluções alcalinas. É solúvel em ácidos minerais concentrados, porém sofre simultaneamente degradação de sua cadeia polimérica (SANTOS, 2004). A sua solubilidade é considerada em casos dos ácidos hexafluoroisopropanol hexafluoroacetona, cloroalcoois em conjugação com soluções aquosas de ácidos minerais mineirais (KUMAR, 2000). A sua dificuldade de solubilização se deve a alta extensão de ligações de hidrogênio em uma estrutura semicristalina (PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009).

A quitosana é insolúvel em água, ácidos concentrados, bases, alcoóis e acetona (DALLAN, 2005) e em soluções com pH maior que 7, devido às fortes ligações intra e intermoleculares de hidrogênio (MA *et al.*, 2009). Porém, é reativa e solúvel em determinadas condições (ASSIS; SILVA, 2003), como em ácidos fracos e diluídos com pH menor que 5, pois nesses casos os grupos amino são protonados e as moléculas de quitosana se tornam completamente solúveis (TUZLAKOGLU *et al.*, 2004). Exemplos desses ácidos que solubilizam a quitosana são tanto os de caráter inorgânico, como os ácidos nítrico, perclórico, fosfórico (DALLAN, 2005) e clorídrico (SILVA *et al.*, 2004), quanto os de caráter orgânico, como o ácido acético, o qual é o solvente mais utilizado (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009), ácidos fórmico, láctico e cítrico (SILVA *et al.*, 2004).

Quitina e quitosana são exemplos de polissacarídeos altamente básicos. A solubilidade da quitosana se deve a seu comportamento de base forte, pois possui grupos amino primários com pKa de 6,3. Assim, para soluções com pH abaixo de 6, a quitosana é solúvel, mas se

torna insolúvel em pH acima de 6. Essa faixa de transição solúvel-insolúvel ocorre entre pH 6 a 6,5 (PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009).

#### **4.2.2 Histórico**

A quitina foi descoberta em 1811 por Henri Braconnot quando foi isolada pela primeira vez de espécies de fungos, sendo por isso inicialmente denominada “Fungina”. Em 1823, Antoine Odier isolou um resíduo insolúvel proveniente de carapaças de insetos, o qual foi designado por quitina (SCHWENDICKE, 2009).

O termo quitina vem da palavra grega *khitón*, que significa carapaça ou caixa de revestimento, uma vez que sua função é revestir e proteger os invertebrados nos quais é encontrada. Por muitos anos houve controvérsia com relação à quitina em função da dúvida de se tratar ou não de um novo material, devido às suas grandes semelhanças estruturais com a celulose. Esse impasse foi resolvido em 1843 por Payen, por causa do registro da presença de nitrogênio na estrutura da quitina (SANTOS, 2004).

A quitosana foi descoberta em 1859 por C. Rouget, durante o tratamento da quitina com uma solução de hidróxido de sódio, e conseqüente obtenção de uma “quitina modificada”. Em 1894 F. Hoppe-Seyler submeteu a quitina a um novo tratamento alcalino com hidróxido de potássio a 180°C e obteve um produto muito solúvel em ácido acético (RANGEL-MENDEZ; ESCOBAR-BARRIOS; DAVILA-RODRIGUEZ, 2010). F. Hoppe-Seyler propôs o nome quitosana ao produto, o qual continha o mesmo conteúdo de nitrogênio que a quitina original (ALMEIDA, 2009).

Porém, as primeiras pesquisas envolvendo a quitosana se iniciaram somente no século XX (SANTOS, 2004). A quitosana foi produzida comercialmente pela primeira vez em 1971 no Japão, e em 1986 a mesma já possuía quinze indústrias produzindo comercialmente tanto quitina quanto quitosana (ALMEIDA, 2009).

#### **4.2.3 Obtenção**

A produção de quitina e quitosana ocorrem frequentemente a partir dos rejeitos da indústria de alimentos enlatados baseados em crustáceos, como caranguejo e camarão. Dessa forma corresponde a um processo realizado com um custo relativamente baixo (KUMAR, 2000). As carapaças de crustáceos são resíduos abundantes e rejeitados pela indústria pesqueira, pois em muitos casos são consideradas poluentes. A utilização desse resíduo reduz

o impacto ambiental causado pelo seu acúmulo nos locais onde é gerado ou estocado (AZEVEDO *et al.*, 2007). Assim, o processo de produção da quitosana é economicamente viável e ecologicamente interessante, devido a utilização de subprodutos da indústria de pesca (CAMPOS *et al.*, 2005).

Nesse processo a quitina é extraída por tratamentos ácidos para dissolver o carbonato de cálcio do crustáceo (KUMAR *et al.*, 2004), ao se utilizar ácidos como clorídrico e nítrico (GOY; BRITO; ASSIS, 2009), seguido de uma extração alcalina para solubilizar proteínas (RINAUDO, 2006), lipídios e pigmentos (KUMAR *et al.*, 2004). Além disso, há uma etapa de descoloração frequentemente adicionada, que pode ser realizada, por exemplo, com  $\text{KMnO}_4$  e ácido oxálico (AZEVEDO *et al.*, 2007), para remover resíduos de pigmentos e obter um produto incolor (RINAUDO, 2006).

O processo de desacetilação da quitina para obtenção da quitosana deve ser realizado de forma adequada para garantir alto grau de pureza e ausência de contaminantes, como proteínas, endotoxinas e metais tóxicos (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006). A certificação do produto obtido em termos de pureza e coloração depende de resíduos dessas proteínas e pigmentos, os quais podem causar problemas no seu uso subsequente, caso seja para uma aplicação, por exemplo, em um biomaterial (RINAUDO, 2006).

Uma das preocupações relacionadas às carapaças de crustáceos utilizadas na obtenção de quitina e quitosana está no fato de a qualidade dessa fonte de material ser baixa devido a uma contaminação da água das regiões nas quais esses animais foram recolhidos, e que podem ser passíveis, por exemplo, de contaminação com metais pesados. A possibilidade de existência desses resíduos deve ser averiguada, pois pode comprometer a utilização desses animais para fabricação de quitina e quitosana (KHOR, 2005).

Um exemplo do processo de produção da quitosana envolve as seguintes etapas como descrito a seguir: 1) obtenção das cascas e/ou esqueletos de animais marinhos, que correspondem às fontes de quitina; 2) desmineralização das cascas e/ou esqueletos obtidos, por meio de secagem, moagem e tratamento do pó com solução de HCl 0,5 mol/L; 3) desproteínação, por meio de uma solução diluída de NaOH 1% sob agitação por 24h a 65°C; 4) obtenção da quitina, que corresponde ao resíduo da etapa anterior; 5) N-desacetilação da quitina, por meio do tratamento com uma solução de NaOH 50% a 100°C de 2 a 5 horas sob atmosfera de nitrogênio; 6) Lavagem do resíduo obtido na etapa anterior para eliminação do excesso alcalino, seguida de secagem a 110°C por 24 h; 7) obtenção da quitosana (SANTOS, 2004).

A obtenção de quitosana com elevado GD é geralmente difícil, pois à medida que o GD aumenta (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006), isto é, com o prolongamento da reação e geração de produtos mais completamente desacetilados, cresce a possibilidade de severa degradação das cadeias do polímero (AZEVEDO *et al.*, 2007). Em termos práticos, o GD máximo que pode ser alcançado em um único tratamento alcalino está em torno de 75 a 85% (ARANAZ *et al.*, 2009).

Foram desenvolvidos dois métodos para a conversão alcalina da quitina em quitosana: homogêneo e heterogêneo (DING *et al.*, 2003). O primeiro ocorre em meio aquoso com quitina previamente intumescida sob baixa pressão, já o segundo, com quitina em estado sólido (ARANAZ *et al.*, 2009).

O método de processamento utilizado na preparação da quitosana, seja em condições heterogêneas, seja em homogêneas, determina como as unidades GliN e GliNAc são distribuídas no copolímero: de forma aleatória ou em bloco (KHOR; LIM, 2003). Nos casos de síntese da quitosana por desacetilação da quitina em condições heterogêneas, formam-se cadeias polimerizadas em bloco, e em condições homogêneas, há polimerização aleatória dos monômeros (PRASHANTH; THARANATHAN, 2007).

A reação de desacetilação da quitina envolve a utilização de uma substância alcalina em temperatura elevada por longo tempo de exposição para produzir a quitosana (VELDE; KIEKENS, 2004), pois esse composto alcalino remove proteínas simultaneamente ao processo de desacetilação (KUMAR, 2000). Utilizam-se geralmente soluções extremamente concentradas de 40 a 50% de hidróxido de sódio (CANELLA; GARCIA, 2001). No caso de desacetilação em meio homogêneo, uma quitina com GD menor que 40% já é suficiente para resultar em quitosana. No caso de condições heterogêneas, o GD necessário é menor (VELDE; KIEKENS, 2004).

A excessiva quantidade utilizada de hidróxido de sódio no processo de desacetilação corresponde a uma preocupação tanto econômica, quanto ecológica, por isso estratégias alternativas têm sido buscadas para manter uma quantidade mínima desse hidróxido. Exemplo disso é a reação em estado sólido que utiliza a metade da quantidade de NaOH que um sistema aquoso utilizaria, a partir da mistura da quitina com NaOH em pó em proporção em massa de 1:5, seguida de extrusão a 180°C, e conseqüente produção de quitosana com alto GD (KUMAR *et al.*, 2004).

As reações em meio heterogêneo ocorrem preferencialmente nas regiões amorfas do polímero, e por isso os produtos da reação podem apresentar heterogeneidade ao longo da cadeia (GARCIA *et al.*, 2008). Além disso, por causa da morfologia semicristalina da quitina,

a quitosana obtida por esse mecanismo de reação de desacetilação em estado sólido possui estrutura irregular com uma distribuição heterogênea de grupos acetilados ao longo das cadeias (RINAUDO, 2006).

A distribuição dos grupos acetilados pela estrutura polimérica, aleatória ou em bloco, influencia a solubilidade da quitosana e a formação das interações entre as cadeias, devido às ligações de hidrogênio e às ligações hidrófobas do grupo acetilado (RINAUDO, 2006).

A reação de desacetilação parcial da quitina pode ocorrer em várias extensões e produzir quitosana com diferentes GD e massa molar (MM) (ZHANG; NEAU, 2001). Variações de GD e MM provocam alterações nas propriedades físico-químicas e biológicas da quitosana (ZHANG; NEAU, 2002). As propriedades da solução de quitosana dependem não só do GD e da MM, como também da distribuição dos grupos acetilados ao longo da cadeia principal (RINAUDO, 2006).

Outra opção para a desacetilação alcalina da quitina é a versão enzimática (GUPTA; JABRAIL, 2006), como ocorre naturalmente a desacetilação enzimática em espécies de bactérias e fungos (ARANAZ *et al.*, 2009). Esse processo é alcançado em condições mais brandas, quando comparadas às condições severas do método convencional, além de ser realizada com menor degradação do polímero e com baixa poluição, porém a um custo mais elevado (WANG; TURHAN; GUNASEKARAN, 2004).

#### **4.2.4 Características**

A quitosana apresenta elevada MM com variação de 10 a 1000kDa (PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009), isto é, de  $10^4$  a  $10^6$ g/mol (CANELLA; GARCIA, 2001). As composições de elevada MM possuem boa capacidade filmogênica como resultado das ligações de hidrogênio intra e intermoleculares (BALAU *et al.*, 2004). Em função da elevada MM, sua viscosidade é também alta, alcançando valores até 2000mPa.s (ILLUM, 1998). A quitosana possui uma massa de 161g por unidade de monômero glicosamina e uma concentração de grupos amino ( $-NH_2$ ) de 6,21mmol/g quando na forma completamente desacetilada (WU; TSENG; JUANG, 2009).

A quitosana é um polímero semicristalino (RINAUDO, 2006), cuja cristalinidade é função do GD, e alcança máximos para a quitina (GD = 0%) e quitosana completamente desacetilada (GD = 100%). Já os mínimos de cristalinidade são alcançados por GD intermediários (SUH; MATTHEW, 2000).

No estado sólido, cristalitos relativamente rígidos se formam devido ao arranjo regular dos grupos hidroxila e amino nas posições equatoriais ao redor da ligação glicosídica de repetição das unidades. Já em solução, as ligações de hidrogênio conduzem a formação de microfibrilas, as quais dependem da concentração da quitosana (GHOLIPOUR; BAHRAMI; NOURI, 2009).

A configuração promovida pela ligação glicosídica resulta em uma estrutura rígida e sem ramificações. Além disso, a abundância de grupos hidroxila e amino com tendência a formar ligações de hidrogênio intra e intermolecular resultam em formações lineares com alta cristalinidade (PRASHANTH; THARANATHAN, 2007). Por essa estrutura rígida, a quitosana apresenta elevado módulo de elasticidade, baixa tensão de ruptura e elevada temperatura de transição vítrea (KOLHE; KANNAN, 2003). Já as ligações de hidrogênio intramoleculares conferem alta resistência ao calor (KIM *et al.*, 2004).

#### **4.2.5 Propriedades**

A quitosana é um polímero policatiônico, pois em meio ácido se comporta como um polieletrólito, isto é, apresenta uma alta densidade de carga positiva por unidade de glicosamina, devido à protonação dos grupos amino (DALLAN, 2005). Assim, na presença de soluções aquosas diluídas de ácidos, surgem interações eletrostáticas repulsivas entre os grupos amino ionizados ao longo da cadeia polimérica (CANELLA; GARCIA, 2001).

Devido a sua natureza catiônica, a quitosana é versátil e moldável em diversas formas e sua fácil capacidade de formação de géis e filmes, destacam a formação de estruturas tais como géis, membranas, além de esferas, microesferas (TORRES *et al.*, 2005), pós, flocos, nanopartículas, esponjas, colmeias, fibras e fibras ocas (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009).

Por apresentar essa característica catiônica, a quitosana é capaz de interagir e se aderir a biomoléculas como proteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos e ácidos graxos, dentre outras, pois essas podem apresentar cargas negativas em suas superfícies. Outra propriedade decorrente do caráter catiônico é o comportamento flocculante que ocorre na interação com coloides carregados negativamente (DALLAN, 2005).

A quitosana apresenta capacidade de se complexar com diversos íons metálicos em processos de quelação e remoção de íons, tais como ferro, cobre, magnésio, prata, cádmio, mercúrio, chumbo, níquel e cromo (DALLAN, 2005), pois a presença de grupos amino e hidroxila servem como sítios quelantes para adsorção desses íons metálicos e também de substâncias como corantes e proteínas (NGAH; KAMARI; KOAY, 2004). A adsorção de íons

de metais de transição na quitosana ocorre via coordenação com os grupos amino não protonados, como a coordenação de metais pesados divalentes, a exemplo do  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  e  $\text{Pb}^{2+}$  (WU; TSENG; JUANG, 2009).

A quitosana é um polímero hidrofílico, devido a presença de grande número de hidroxilas e aminas na sua estrutura (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009). A predominância desses grupos hidroxila, amino e acetamido nas suas cadeias poliméricas fornecem sítios de alta polaridade que são favoráveis ao contato com moléculas de água e caracterizam, assim, um material com alto grau de afinidade e retenção de água, isto é, comportamento de hidrogel (ASSIS; SILVA, 2003).

A presença de uma alta porcentagem de grupos amino reativos na estrutura polimérica permite que inúmeras modificações químicas sejam realizadas levando a formação de diversos outros compostos derivados, por processos como carboxilação, acilação, sulfonação, amidação dentre outros (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009).

Entre as principais propriedades da quitosana estão: biocompatibilidade, biodegradabilidade, capacidade de interagir com células, acelerar a cicatrização de feridas, propriedades hemostáticas, antibactericidas, antifúngicas (LEE *et al.*, 2009), mucoadesão, ação cicatrizante, agente hipocolesterolêmico, hipouricêmico (GARCIA *et al.*, 2008), atividade antitumoral, imunoadjuvante (CAMPOS *et al.*, 2005).

A quitosana é biocompatível, isto é, um material que não produz reações adversas no organismo receptor e tem a habilidade de desencadear uma resposta apropriada para uma determinada aplicação. A biocompatibilidade depende de diversos fatores, tanto os inerentes ao organismo receptor, como sua espécie, sua herança genética e o local de implantação ou aplicação; quanto as relativas ao material, como sua composição, sua forma, seu tamanho, sua rugosidade, química de superfície e degradação (BRITO *et al.*, 2009).

A propriedade de biodegradação resulta na liberação de aminoaçúcares que podem ser excretados ou incorporados ao caminho metabólico de glicosaminoglicanos e glicoproteínas (BALAU *et al.*, 2004). As enzimas hidrolíticas envolvidas no processo de biodegradação de quitina e quitosana são: lisozima, quitinase, quitina deacetilase e quitosanase. Estas estão largamente distribuídas nos tecidos e fluidos corpóreos dos animais, das plantas, além de microrganismos do solo (DALLAN, 2005).

A quitosana apresenta capacidade de inibir o crescimento de uma variedade de fungos, leveduras e bactérias. A sua atividade antimicrobiana é elevada contra muitos microorganismos patógenos, incluindo bactérias gram-positivas e gram-negativas (TRIPATHI; MEHROTRA; DUTTA, 2009).

Esse comportamento se deve a sua natureza catiônica e habilidade de interagir agressivamente com a superfície da membrana celular desses microorganismos ou com componentes aniônicos de suas paredes, como lipopolissacarídeos e proteínas. O resultado da morte celular pode ocorrer por diversos processos, tais como modificação da permeabilidade da membrana e vazamento de conteúdo intracelular, ou impedimento de entrada de nutrientes nas células, ou por ligação com o DNA e inibição do RNA e da síntese proteica (PRASHANTH; THARANATHAN, 2007).

As propriedades hemostáticas da quitosana envolvem a aglutinação de células vermelhas do sangue, devido a sua propriedade policatiônica e a sua interação inespecífica com membranas celulares (RAO; SHARMA, 1997). A quitosana possui efeito coagulante ao participar muito eficazmente do processo de coagulação sanguínea, pois apresenta capacidade de agregar plaquetas e especialmente eritrócitos, devido a interação das cargas positivas dos grupos amino livres da quitosana com os receptores aniônicos dos eritrócitos (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

A quitosana apresenta propriedades antioxidantes, de proteção contra radicais livres causadores de diversas doenças crônicas. Sua contribuição se destaca por ser um derivado natural de ação potente que pode substituir antioxidantes sintéticos (PRASHANTH; THARANATHAN, 2007).

A quitosana apresenta potente ação analgésica tópica, que é decorrente da captura de íons  $H^+$  liberados no local da inflamação no processo de ionização do grupo amino (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

A quitosana apresenta capacidade de acelerar o processo de cicatrização de feridas, pois ativa macrófagos que, por sua vez, ativam fibroblastos para a produção de fibras colágenas, e promove, também, a migração de neutrófilos para o local da lesão, facilitando a resolução da resposta inflamatória. Outras propriedades da quitosana envolvidas no caso de feridas que colaboram para a cicatrização correspondem aos efeitos bactericidas e bacteriostáticos, prevenindo infecções, além da ação analgésica, capacidade umectante e aderente ao local da lesão (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

A quitosana possui efeito hipocolesterolêmico e hipolipidêmico, os quais se referem a capacidade de promover, respectivamente, a redução dos níveis de colesterol e triglicerídeos plasmáticos, devido à sua capacidade de se ligar aos lipídeos e diminuir a sua absorção intestinal (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006), além de interferir na emulsificação realizada pela bile (PRASHANTH; THARANATHAN, 2007).

#### **4.2.6 Aplicações**

A quitosana possui grande variedade de aplicações em diversas áreas industriais, tais como alimentos, nutrição, agricultura, veterinária e proteção ambiental. O mercado mundial desse material está relacionado aos segmentos de tratamento de água, cosméticos, alimentos, saúde, agroquímicos, biotecnologia, papel, têxtil, fotografia dentre outros (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009).

As aplicações mais comuns da quitosana abrangem os seguintes casos: meio complexante de íons metálicos, embalagens com ação antifúngica e bactericida, membranas filtrantes para sistemas de purificação de água ou separação de resíduos, sistemas de permeação de gases (ASSIS; SILVA, 2003), sistemas de controle de troca iônica, estabilizante de gorduras e aromas adicionados a alimentos, aditivos de cosméticos como xampus, absorvente de remoção de íons metálicos pesados, estabilizante de frutas e verduras perecíveis (DALLAN, 2005), filmes com ação antimicrobiana para a conservação de carnes, frutas e cereais (BRITO *et al.*, 2009), filmes e embalagens para alimentos com barreira de gases e aromas (TRIPATHI, MEHROTRA; DUTTA, 2009), adubos e defensivos agrícolas, conservante para molhos, cosméticos como esfoliantes para a pele, tratamento de acne, hidratante capilar, creme dental (AZEVEDO *et al.*, 2007).

Atualmente, as maiores aplicações da quitosana seguem a tendência atual das aplicações industriais de produtos de alto valor agregado, a exemplo de cosméticos, aditivos alimentares e outros produtos farmacêuticos (DALLAN, 2005).

#### **4.2.7 Aplicações em Biomateriais**

A quitosana é um biomaterial de potencial aplicação principalmente nas áreas médica e farmacêutica (TORRES *et al.*, 2005), biomédica e biotecnológica (ASSIS; SILVA, 2003). Sua capacidade de permitir a obtenção de formas variáveis, como comprimidos, micro e nanopartículas, microesferas, granulados, lipossomas, géis e hidrogéis, permite que seus produtos sejam aplicados pelas vias: parenteral, transdérmica, oral, vaginal, nasal, ocular e por terapia gênica (GARCIA *et al.*, 2008).

As aplicações mais comuns da quitosana como biomaterial abrangem os seguintes casos: membranas para hemodiálise, desenvolvimento de pele artificial para o tratamento de queimaduras, curativos com capacidade de contenção de hemorragias (BRITO *et al.*, 2009), aplicações tópicas para regeneração e cicatrização de feridas, matrizes para liberação

controlada de drogas, material para reestruturação de cartilagens, agente ativo no emagrecimento humano (ASSIS; SILVA, 2003), na absorção de gorduras, agente redutor de colesterol, auxiliar no controle de pressão arterial, agente redutor do nível de ácido úrico (DALLAN, 2005), regeneração de nervos de compósitos de quitosana, auxílio em processos de recuperação e/ou de purificação de proteínas (TORRES *et al.*, 2005), sistemas de imobilização de células em gel, *scaffolds* em engenharia de tecidos, biossensores para diagnósticos clínicos, géis injetáveis, membranas periodontais, como analgésico, agente no combate à artrite (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009), suturas, membranas de barreira e contenção de crescimento de tecido conjuntivo indesejado (SILVA *et al.*, 2004), hidrogéis (BERGER *et al.*, 2004) e lentes de contato (CARREIRA *et al.*, 2010).

#### **4.2.8 Grau de Desacetilação**

Uma das mais importantes propriedades da quitosana é o seu grau de desacetilação (GD), o qual permite diferenciar a quitosana da quitina, o polímero do qual é derivada. O GD possui uma importante relação tanto com as aplicações da quitosana, quanto com as suas propriedades químicas, físicas (TAN *et al.*, 1998), biológicas e mecânicas (KASAAI, 2009).

A variação do GD provoca modificações na quitosana em termos da sua viscosidade, da capacidade de realizar troca iônica, da habilidade de floculação, da reação com grupos amino (ZHANG *et al.*, 2011), da resistência mecânica de filmes, da habilidade de funcionar como quelante de íons metálicos, da atividade imunoadjuvante (TAN *et al.*, 1998), da solubilidade, da conformação da cadeia polimérica, das suas propriedades eletrostáticas (WU; ZIVANOVIC, 2008), das propriedades de biodegradação, valores de pKa, da expansão e rigidez das cadeias poliméricas, da tendência das cadeias de se agregarem (KASAAI, 2009), do alongamento na ruptura, resistência à tração, cicatrização de feridas e melhora da osteogênese (CHATELET; DAMOUR; DOMARD, 2001), do grau de cristalinidade e hidrofobicidade da sua estrutura (GUPTA; JABRAIL, 2006).

Muitos métodos têm sido utilizados para determinar o GD da quitosana, tais como espectroscopia de infravermelho (KHAN; PEH; CH'NG, 2002), espectrofotometria de ultravioleta, espectrofotometria de ultravioleta por derivada (TAN *et al.*, 1998; WU, ZIVANOVIC, 2008), titulação coloidal, titulação potenciométrica, determinação enzimática, ressonância nuclear magnética (HEUX *et al.*, 2000) dentre outros. Em todos os casos, as limitações inerentes a cada método devem ser consideradas, como por exemplo, o uso de instrumentos caros para a realização da espectroscopia de infravermelho e da ressonância

nuclear magnética e a insuficiente precisão para procedimentos de titulação e espectroscopia de infravermelho (WU; ZIVANOVIC, 2008).

A escolha do método geralmente depende da sua simplicidade de execução, rapidez, relação custo-benefício, confiabilidade, tolerância a contaminações e presença de impurezas (TAN *et al.*, 1998). Comparado a outros métodos, a titulação potenciométrica é uma das técnicas mais convenientes e de baixo custo (ZHANG *et al.*, 2011). Por outro lado, o método de espectrofotometria de UV-VIS necessita de pequena quantidade de amostra, proporciona resultados com desvio padrão muito pequeno e apresenta boa reprodutibilidade. Apesar de a análise ser executada em solução, a massa seca exata da amostra deve ser conhecida (BEIL *et al.*, 2012).

A determinação do GD faz parte das análises de rotina realizadas para o controle de qualidade de amostras de quitina e quitosana. Ajustes no processamento desses polímeros baseados no GD são geralmente necessários para facilitar uma preparação mais rápida e viável das amostras (ZHANG *et al.*, 2005). Além disso, é essencial um método padrão para se determinar o GD da quitosana, que satisfaça aos fabricantes e aos usuários finais, a fim de promover um maior aproveitamento desse material (TAN *et al.*, 1998).

Métodos que utilizam medições em solução possuem a limitação devido à solubilidade das amostras, e podem ser aplicados, por definição, na análise e determinação de GD da quitosana de acordo com a faixa de GD > 50% (BEIL *et al.*, 2012), para alguns autores, e dentro da faixa de GD > 40% para outros (SILVA; MANO; REIS, 2008), incluindo nesse último caso algumas variações de composição do que se considera quitina.

### **4.3 Titulação Potenciométrica**

Em uma titulação, pequenos volumes da solução de reagente – o titulante – são adicionados ao analito – o titulado – até que a reação termine. A partir da quantidade que foi usada de titulante pode-se calcular a quantidade de analito que está presente. As titulações mais comuns são baseadas em reações ácido-base. Os principais requisitos para uma reação de titulação estão relacionados à sua constante de equilíbrio, que deve ser elevada, e ao tempo necessário de reação, que deve ser pequeno. Isso significa que cada adição de titulante deve ser consumida rápida e completamente pelo analito até que este acabe (HARRIS, 2008).

O ponto de equivalência em uma titulação ocorre quando a quantidade de titulante adicionado é exatamente aquela suficiente para a reação estequiométrica com o analito. Esse é o ponto ideal que se busca em uma titulação, porém o que é realmente medido é o ponto final.

Este é marcado por uma variação física brusca tal como a variação da cor do indicador, ou do potencial ou valor de pH de um eletrodo (HARRIS, 2008).

A titulação potenciométrica é uma técnica que envolve medidas de potencial de um eletrodo indicador adequado em função do volume do titulante utilizado, de modo que é registrado o potencial da célula, em unidades de milivolts ou pH, conforme mais apropriado, após cada adição do reagente. Inicialmente, o titulante é adicionado em incrementos grandes, que são reduzidos à medida que se aproxima do ponto final, o qual é indicado por grandes variações na resposta do eletrodo por unidade de volume (SKOOG *et al.*, 2006).

Uma titulação potenciométrica é essencialmente uma titulação em que o ponto final se determina a partir dos valores de potencial ou pH da solução para os vários volumes de reagente adicionados. Para isso, durante o ensaio a solução deve ser bem agitada para que fique homogênea. Como a localização do ponto final não envolve os erros pessoais que entram na mudança de cor de um indicador, as titulações potenciométricas constituem um dos métodos analíticos mais exatos (GONÇALVES, 2001).

No início de uma titulação potenciométrica, a variação de potencial ou de pH pela adição de titulante é pequena, mas torna-se mais acentuada à medida que a reação se aproxima do ponto estequiométrico, modificando-se muito pouco a partir da adição de excesso do titulante. Para uma melhor avaliação dos dados, recomenda-se a adição de volumes pequenos e iguais de titulante nas proximidades do ponto estequiométrico. No caso de soluções desconhecidas, é aconselhável realizar uma titulação prévia que, na realidade, consiste em uma estimativa preliminar dos volumes a serem adicionados na titulação definitiva (CIENFUEGOS; VAITSMAN, 2000).

As vantagens relacionadas a essa técnica abrangem: o fornecimento de dados mais confiáveis do que os gerados por titulações que empregam indicadores químicos; a utilidade em especial em casos de soluções coloridas ou turvas; a detecção da presença de espécies insuspeitas (SKOOG *et al.*, 2006); a determinação de espécies químicas em uma mistura em uma única titulação sem a separação preliminar; a possibilidade de se realizar titulações em meio não aquoso (CIENFUEGOS; VAITSMAN, 2000); a titulação de soluções muito diluídas e a possibilidade de se analisar certas reações para as quais a técnica convencional é impraticável em virtude da falta de indicadores apropriados (OSAWA; GONÇALVES; RAGAZZI, 2006).

Diversos métodos podem ser utilizados para se detectar o ponto final de uma titulação potenciométrica. O mais simples envolve um gráfico direto dos valores de potencial ou pH em função do volume de reagente, em que o ponto de inflexão na porção mais vertical da curva

corresponde ao ponto final. Uma segunda abordagem para a detecção do ponto final consiste no cálculo da variação do potencial ou pH por unidade de titulante, isto é,  $\Delta E/\Delta V$  ou  $\Delta pH/\Delta V$ , respectivamente, o que corresponde à derivada primeira da curva de titulação. Assim, um gráfico dos dados da primeira derivada em função do volume médio,  $V_m$ , produz uma curva com um máximo que corresponde ao ponto de inflexão (SKOOG *et al.*, 2006).

De acordo com a primeira abordagem citada, pode-se traçar gráficos de valores de potencial ou de pH na ordenada em função do volume de titulante na abscissa para se encontrar o ponto de inflexão (PI) da curva de titulação e, conseqüentemente, se determinar o ponto final da titulação (CIENFUEGOS; VAITSMAN, 2000).

De acordo com a segunda abordagem citada, a curva de derivada primeira é obtida lançando-se na ordenada a razão entre os valores sucessivos das diferenças de potencial ( $\Delta E/\Delta V$ ) ou pH ( $\Delta pH/\Delta V$ ) e os volumes de titulante, e na abscissa, a média aritmética dos mesmos volumes, representada como volume médio do titulante ( $V_m$ ). O ponto de inflexão da curva obtida corresponde ao ponto de equivalência da titulação. Assim, para elaborar gráficos diferenciais, é necessário, além do volume adicionado de titulante e do potencial ou pH medido, calcular as diferenças entre os volumes sucessivos de titulante, as médias aritméticas dos volumes adicionados e as diferenças entre os valores de potencial ou pH (CIENFUEGOS; VAITSMAN, 2000).

Considera-se que a curva de titulação é simétrica nas proximidades do ponto de equivalência e que a inflexão da curva corresponde a esse ponto, devido à premissa de proporção de reação de 1:1 entre o analito e o titulante. Assim, se a curva de titulação é simétrica, o ponto de máxima inclinação coincide com o ponto de equivalência (SKOOG *et al.*, 2006).

#### **4.3.1 Titulação Potenciométrica de Quitosana**

A titulação potenciométrica é uma técnica simples e de baixo custo que pode ser aplicada na determinação do grau de desacetilação (GD) da quitosana (SWEIDAN *et al.*, 2011). Nesse método, a quitosana é dissolvida em uma solução conhecida de ácido clorídrico que é titulada com hidróxido de sódio (JIANG *et al.*, 2003).

A curva de titulação potenciométrica encontrada possui dois pontos de inflexão, ou dois pontos de equivalência, de modo que o primeiro corresponde à titulação do excesso de HCl, e o segundo, à titulação da quitosana protonada (JIANG *et al.*, 2003). Isso significa que a quantidade utilizada da base foi consumida para neutralizar tanto os íons  $H^+$  referentes ao

ácido clorídrico da solução, quanto os grupos  $\text{NH}_3^+$  da quitosana (KASAAI, 2009). De outra maneira, a diferença de volume entre esses dois pontos corresponde à quantidade de ácido necessária para protonar os grupos amino da quitosana (JIANG *et al.*, 2003).

Assim, o grau de desacetilação se baseia na quantidade de mols de NaOH que conseguem neutralizar a mesma quantidade em mols de íons  $\text{NH}_3^+$  presentes na quitosana, os quais correspondem ao número de mols de grupos amino livres na estrutura. Esses grupos estão associados às unidades de glicosamina presentes na amostra de quitosana, e que determinam o seu GD (SWEIDAN *et al.*, 2011).

#### 4.4 Espectrofotometria de UV-VIS

A espectrofotometria é uma técnica que utiliza luz para medir concentrações de espécies químicas (HARRIS, 2008). A espectrofotometria de absorção de ultravioleta (UV) visível (VIS) é amplamente empregada na identificação de espécies orgânicas, inorgânicas e biológicas, principalmente em análises quantitativas (SKOOG *et al.*, 2006). Essas espécies podem absorver UV-VIS diretamente ou podem ser convertidas por reação química em derivados absorventes (SKOOG *et al.*, 2000).

A espectrofotometria de absorção UV-VIS é uma das técnicas mais úteis disponíveis para uma análise quantitativa, em função de sua ampla aplicabilidade a espécies de diferentes tipos, alta sensibilidade em baixos limites de detecção na faixa de  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  mol/L, alta seletividade de comprimento de onda no qual somente o analito absorve, boa exatidão com erros relativos na faixa de 1 a 5%, facilidade de medição, rapidez e conveniência (SKOOG *et al.*, 2006).

A absorção da radiação UV-VIS por moléculas é baseada nas transições realizadas por elétrons entre um estado fundamental e outro excitado quando interagem com fótons de determinada energia. No caso das moléculas orgânicas, essa absorção de UV-VIS é resultante das interações de fótons com os elétrons envolvidos diretamente na formação de ligações químicas e, dessa forma, os elétrons estão associados a mais de um átomo. Outra forma de ocorrência de absorção é relativa aos elétrons não-ligantes localizados sobre átomos como oxigênio, enxofre, nitrogênio e halogênios (SKOOG *et al.*, 2006). Com a espectroscopia de UV-VIS pode-se analisar a transferência de elétrons em orbitais ou bandas de átomos, íons e moléculas que compõem fases sólidas, líquidas e gasosas (KUMIRSKA *et al.*, 2010).

Os grupos funcionais orgânicos insaturados, isto é, os que contêm ligações duplas e triplas que absorvem nas regiões do UV-VIS são denominados cromóforos (SKOOG *et al.*,

2006). Na tradução do grego, cromóforo é o grupo funcional da molécula que dá origem e é responsável por sua cor, porém na utilização comum, cromóforo corresponde ao grupo funcional que absorve UV-VIS (SKOOG *et al.*, 2000).

Os espectros UV para análises qualitativas são medidos empregando-se soluções diluídas do analito e em solventes transparentes na região do espectro na qual o soluto absorve. Além disso, o solvente deve ser capaz de dissolver uma quantidade suficiente do soluto para originar espectros bem definidos do analito (SKOOG *et al.*, 2006).

Muitos analitos não-absorventes podem ser determinados por espectrofotometria de UV-VIS ao submetê-los a uma reação com reagentes cromóforos para gerar produtos que absorvem fortemente nessa região. Isso requer que a reação entre o analito e o reagente cromóforo seja completa (SKOOG *et al.*, 2006). Essa reação deve ser quantitativa, mesmo em baixas concentrações do analito, e a estabilidade do produto formado deve ser suficiente para permitir as medições necessárias (HARGIS, 1988).

Os procedimentos devem especificar as condições apropriadas de reação entre o reagente cromóforo e o analito, tais como pH, solvente, ordem de adição do reagente e temperatura, pois esses fatores influenciam na extensão e na taxa de reação entre as duas espécies em questão e também na estabilidade do produto absorvente (HARGIS, 1988).

A primeira etapa para a análise espectrofotométrica é o desenvolvimento de condições que produzam uma relação preferencialmente linear e reprodutível entre a absorbância e a concentração do analito. Assim deve-se selecionar o comprimento de onda para a análise em questão (SKOOG *et al.*, 2006). Normalmente a absorbância é medida em um comprimento de onda no qual as outras substâncias presentes na solução da amostra não absorvem (HARGIS, 1988).

Para alcançar uma sensibilidade máxima, as medidas de absorbância são realizadas em comprimentos de onda que correspondem ao pico máximo de absorbância (SKOOG *et al.*, 2006), pois a absorbância é, nesse ponto, mais sensível a mudanças na concentração e menos sensível a alterações no comprimento de onda (HARGIS, 1988). Assim, no ponto de absorção máxima obtém-se um máximo de resposta para uma dada concentração do analito. Além disso, a curva de absorção na região correspondente ao máximo tem sua forma relativamente mais achatada, o que causa uma variação pequena na absorbância (HARRIS, 2008), o que leva a menor incerteza (SKOOG *et al.*, 2006).

Na maioria das análises espectrofotométricas é importante preparar um reagente em branco que contem todos os reagentes que estão presentes durante as análises, exceto o analito a ser determinado, o qual é substituído por água destilada. Um branco alternativo para outros

casos contém o analito, mas sem a presença do reagente que produz a espécie colorida. Em ambos os casos, a escolha do branco depende de quais as espécies químicas que interferem na região do comprimento de onda em que é realizada a análise do analito (HARRIS, 2008).

Na maioria dos procedimentos de espectrofotometria de UV-VIS utiliza-se uma curva de calibração por meio do método de padrões externos, que são preparados a partir de uma série de soluções padrão conhecidas do analito. As absorvâncias desses padrões são medidas em função de suas respectivas concentrações a fim de se produzir uma curva com relação linear entre essas variáveis e que possa ser descrita pela Lei de Beer-Lambert, apresentada na Equação 1, a qual relaciona a absorvância ( $A$ ) com a concentração do analito ( $C$ ) em um determinado comprimento de onda ( $\lambda$ ), com a sua absorvidade molar ( $\epsilon$ ) e o comprimento do caminho óptico utilizado no ensaio ( $l$ ) (SKOOG *et al.*, 2000).

$$A(\lambda) = \epsilon(\lambda)lC \quad (1)$$

O coeficiente angular da reta obtida na curva de calibração corresponde ao produto da absorvidade pelo comprimento do caminho óptico. Assim, por esse método de soluções padrão externas é possível determinar a relação e a proporcionalidade existente entre a absorvância e a concentração da amostra sobre as mesmas condições e com os mesmos instrumentos utilizados para as amostras desconhecidas (SKOOG *et al.*, 2000).

Nas análises quantitativas, quando a adequação a Lei de Beer-Lambert é verificada, os padrões utilizados devem ser considerados para o cálculo da absorvidade molar, a partir dos dados experimentais. Com a utilização de um branco para a análise, a equação resultante é uma reta cujo coeficiente linear representa a absorvância do branco. Se um branco adequado for tiver sido utilizado, seu valor fica próximo de zero (SKOOG *et al.*, 2000).

#### **4.4.1 Espectrofotometria de UV-VIS derivada**

A utilização da espectrofotometria de UV-VIS convencional como ferramenta em análises químicas tem sido reduzida em função do problema de sobreposição de bandas de transição eletrônica nos espectros de amostras com misturas de componentes (PASCHOAL *et al.*, 2003). Com desenvolvimento de equipamentos analíticos com capacidade de realizar a derivação dos dados da espectrofotometria foi possível contornar esse aspecto negativo da sobreposição. Nesse sentido, a espectrofotometria derivada consegue aumentar a área de

abrangência das bandas de transição e permitir a análise de substâncias ativas em misturas de multicomponentes com sobreposição de bandas (DONATO *et al.*, 2010).

A espectrofotometria de UV-VIS derivada é uma técnica simples e muito conveniente de ser escolhida para utilização dentre os métodos disponíveis, pois necessita de apenas pequenas quantidades da amostra, além de reagentes e instrumentação simples (TAN *et al.*, 1998). Além disso, não necessita de separação prévia dos componentes, possui baixo custo, é de fácil execução, apresenta maior seletividade que a espectrofotometria convencional, em função da separação das bandas espectrais sobrepostas, consegue detectar melhor pequenos traços espectrais, transforma bandas largas em mais finas para individualizar melhor os constituintes da mistura e consegue eliminar a interferência de produtos indesejáveis, como excipientes e produtos de degradação (DONATO *et al.*, 2010). Dessa forma, a espectroscopia derivada corresponde a uma técnica precisa, sensível, seletiva, reprodutível e de baixo custo (PASCHOAL *et al.*, 2003).

A espectrofotometria derivada consiste na transformação por meio de derivação dos dados contidas no espectro convencional, classificado como de ordem zero. Nesse processo não há aumento do conteúdo de informações e sim o aumento do número de bandas de absorção, responsáveis pela melhor individualização dos constituintes, melhora de detecção de pequenas características espectrais, como os “ombros” (DONATO *et al.*, 2010), supressão de bandas largas e realce de bandas estreitas (PASCHOAL *et al.*, 2003).

A maior seletividade da espectrofotometria derivada quando comparada à espectrofotometria convencional se deve a separação das bandas sobrepostas. Já a maior sensibilidade é consequência da amplificação do sinal da derivada e da diminuição do ruído, já que o sinal obtido para uma determinada faixa de concentração é proporcional à concentração da substância (DONATO *et al.*, 2010).

Os espectros derivados podem ser obtidos por métodos ópticos, eletrônicos ou matemáticos. O método matemático, atualmente, é o mais utilizado pela sua versatilidade, pois permite que os espectros sejam facilmente calculados utilizando diferentes parâmetros, além de usar técnicas de suavização para melhorar a relação sinal/ruído. O aumento da ordem da derivada leva a uma maior resolução espectral, entretanto diminui a sensibilidade e pode aumentar o nível de ruído (DONATO *et al.*, 2010).

A escolha da ordem de derivada depende das características do espectro de ordem zero dos constituintes da mistura e dos interferentes. A primeira derivada é a razão entre a variação da absorbância ( $dA$ ) versus variação do comprimento de onda ( $d\lambda$ ). Assim, plotando-se  $dA/d\lambda$  versus  $\lambda$ , obtém-se o espectro de absorção de primeira derivada, no qual a anulação ocorre no

ponto referente ao comprimento de onda máximo ( $\lambda_{\max}$ ) do espectro de absorção de ordem zero, a curva é positiva quando a absorção aumenta e negativa quando diminui (DONATO *et al.*, 2010).

A partir desse procedimento, constrói-se uma curva diferencial de ordem  $n$ , relacionada a ordem da derivada efetuada, que se anula  $n$  vezes e apresenta  $n + 1$  bandas. A sobreposição de várias derivadas de concentrações crescentes de cada componente de uma mistura, para os quais se obtém os valores das amplitudes nos pontos de anulação ou zero da curva (*ZCP – Zero Crossing Point*), permite construir curvas de calibração, além de eliminar erros sistemáticos provenientes de interferências (*overlapping*) (PASCHOAL *et al.*, 2003).

#### 4.4.2 Espectrofotometria de UV-VIS de Quitosana

Os espectros de quitosana são geralmente realizados em soluções aquosas ácidas, como nos casos dos ácidos acético, fosfórico, perclórico e clorídrico (KUMIRSKA *et al.*, 2010). Dentro de limites razoáveis, a concentração de ácido acético como solvente não interfere na espectrofotometria da quitosana (SILVA; MANO; REIS, 2008). No comprimento de onda máximo ( $\lambda_{\max}$ ), a absorção dos grupos cromóforos da quitosana é máxima e a contribuição do ácido acético é a menor possível (PEDRONI; GSCHAIDER, SCHULZ, 2003).

A quitosana é composta por dois grupos cromóforos no UV, N-acetilglicosamina (GliNAc) e a glicosamina (GliN) (KUMIRSKA *et al.*, 2010). Esses grupos contribuem de maneira aditiva à absorbância total do material em um determinado comprimento de onda, já que não interagem dentro do polímero de uma forma que pudesse afetar a absorção de radiação UV (SILVA; MANO; REIS, 2008).

O grupo amida das unidades GliNAc apresenta um sinal relativamente forte com um máximo próximo de 200nm, o qual é a base da maioria dos métodos de determinação do GD da quitosana. As unidades GliN, apesar de possuírem sinal relativamente fraco, também absorvem a radiação UV-VIS nessa região, o que pode interferir na medição de altos valores de GD (SILVA; MANO; REIS, 2008).

A absorção de misturas de N-acetil-cloridrato de glucosamina e glucosamina possuem o mesmo  $\lambda_{\max}$  em 201nm que a quitosana para uma solução 0,1M de ácido clorídrico, e dessa forma, essas misturas de monômeros fornecem espectros de UV-VIS bastante similares ao espectro da quitosana pura. Nessa metodologia, o GD foi determinado por meio de uma equação que relaciona diretamente a absorbância da amostra com sua massa e com o volume

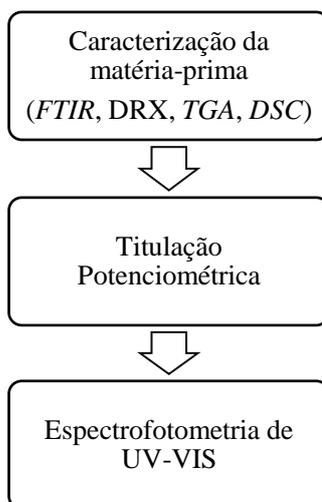
de solução utilizado no ensaio, e esse valor correspondeu ao obtido por análise elementar, o que confirma ser um método simples, conveniente e de boa precisão para a determinação do GD da quitosana (LIU *et al.*, 2006).

## 5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 5.1 Etapas de desenvolvimento do trabalho

A Figura 4 apresenta o fluxograma de descrição das etapas envolvidas no desenvolvimento do trabalho.

Figura 4 – Fluxograma das etapas do trabalho.



### 5.2 Materiais

Foi utilizada água deionizada no preparo das soluções. Todos os seguintes reagentes foram utilizados em grau analítico:

- Ácido Acético, CH<sub>3</sub>COOH, Cinética;
- Ácido Clorídrico, HCl, Cinética;
- Hidróxido de Sódio, NaOH, Cinética;
- Quitosana, Sigma-Aldrich, Cat.#419419.

### 5.3 Métodos

#### 5.3.1 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho pela transformada de Fourier (FTIR – *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) foi realizada pelo modo de reflexão total

atenuada (*ATR – Attenuated Total Reflectance*). Os espectros foram obtidos entre  $4000\text{cm}^{-1}$  e  $650\text{cm}^{-1}$  com 40 varreduras e  $4\text{cm}^{-1}$  de resolução utilizando um Espectrofotômetro IR Prestige-21, Shimadzu. Os dados dos espectros foram normalizados a fim de fornecerem os principais modos de vibração dos grupos funcionais existentes nas amostras.

### 5.3.2 Difração de Raios-X (DRX)

O padrão de Difração de Raios-X (DRX) foi obtido das matérias-primas usando a radiação  $K\alpha$  do cobre com  $\lambda = 1,54056\text{Å}$ . A análise de DRX foi conduzida com  $2\theta$  variando de  $3,01^\circ$  a  $90,00^\circ$  com passo de  $0,06^\circ$ , operando com tensão de 30mV e corrente de 30mA. A quitosana foi avaliada segundo a estrutura ortorrômbica ( $a=8,9\text{Å}$ ,  $b=10,25\text{Å}$  e  $c=17,0\text{Å}$ ) e monoclínica com  $\beta = 88^\circ$ .

A partir dos difratogramas obtidos, a avaliação quantitativa da cristalinidade foi realizada dividindo-se o difratograma em três regiões cristalina, amorfa e background. As áreas correspondentes às frações cristalina ( $A_C$ ) e amorfa ( $A_A$ ) foram estimadas por meio do programa OriginPro® 8.0 para o cálculo do Grau de Cristalinidade (GC) da amostra como descrito na Equação 2 (COSTA JR., 2008).

$$GC = \frac{A_C}{A_C + A_A} \times 100 \quad (2)$$

### 5.3.3 Análise Térmica

A análise termogravimétrica (*TGA – Thermogravimetric Analysis*) foi realizada a fim de se observar o comportamento e a estabilidade térmica das amostras. O aquecimento foi realizado em uma razão de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  em faixa de temperatura de 20 a  $900^\circ\text{C}$  e sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de  $50\text{mL}/\text{min}$ . As medidas termogravimétricas foram efetuadas utilizando-se suporte de amostra de alumina em um analisador termogravimétrico DTG-60H da marca Shimadzu.

A análise de calorimetria exploratória diferencial (*DSC – Differential Scanning Calorimetry*) foi realizada a fim de se verificar os eventos térmicos envolvidos e característicos da amostra. O aquecimento foi efetuado em uma razão de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  em faixa de temperatura de 30 até  $500^\circ\text{C}$  em atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de

90mL/min. As medições foram efetuadas utilizando-se suporte de amostra de alumínio em analisador térmico DSC7020 da marca Seiko SII.

### 5.3.4 Titulação Potenciométrica

O Grau de Desacetilação (GD) da quitosana foi determinado por meio de titulação potenciométrica segundo Tan *et al.* (1998). Amostras em triplicatas de 0,6g de quitosana foi dissolvida em 60mL de solução padronizada de HCl 0,10mol/L e diluída com 30mL de água destilada. Em seguida, sob agitação constante titulou-se a solução de quitosana com solução padronizada de NaOH 0,01mol/L, obtendo-se a curva típica de titulação potenciométrica. Os valores encontrados em cada titulação foram levados na Equação 3 (TAN *et al.*, 1998) e na Equação 4 (TORRES *et al.*, 2005), a fim de se comparar o GD encontrado nas duas metodologias com o fornecido pelo fabricante.

$$GD\% = \frac{\varphi}{\frac{M-161\varphi}{204} + \varphi} \times 100 \quad (3)$$

Em que:

$$\varphi = \frac{N_A V_A - N_B V_B}{1000};$$

$N_A$  e  $N_B$  = [HCl] e [NaOH] em mol/L, respectivamente;

$V_A$  e  $V_B$  = Volume de HCl e NaOH no ponto final em mL, respectivamente;

M = Massa da amostra em gramas;

161 = MM do monômero 2-amino-2-desoxi-D-glicose em g/mol;

204 = MM do monômero 2-acetamido-2-desoxi-D-glicose em g/mol.

$$GD\% = \frac{N_{NaOH} \times (V_2 - V_1) \times 161}{M} \times 100 \quad (4)$$

Em que:

$N_{NaOH}$  = [NaOH] em mol/L;

$V_1$  = Volume do NaOH para neutralizar o excesso de HCl;

$V_2$  = Volume de NaOH usado para neutralizar a amostra de quitosana protonada;

M = Massa da amostra em gramas.

### 5.3.5 Espectrofotometria de UV-VIS

A técnica de espectrofotometria de UV-VIS foi realizada conforme os trabalhos de Tan *et al.* (1998), e Silva, Mano e Reis (2008). Foi utilizado Espectrofotômetro de Ultravioleta Visível Cary 50 Versão 3. As leituras dos valores de absorbância das amostras ocorreram em triplicatas, com média velocidade de varredura, em cubeta de quartzo de 1cm e à temperatura ambiente.

Foram preparadas soluções de ácido acético 0,01M, 0,02M e 0,03M a fim de se encontrar o comprimento de onda máximo ( $\lambda_{\max}$ ) no qual se realiza a leitura das amostras de quitina e quitosana. Utilizou-se amostra de água como branco dessas leituras. Os espectros de ordem zero para as soluções de ácido acético foram obtidos na faixa de 190 a 250nm e, em seguida, foram realizados seus respectivos espectros de derivada de primeira ordem. A partir destes por meio de superposição encontrou-se o ponto em comum às curvas, denominado *ZCP* (*zero crossing point*) ou ponto zero da curva, que corresponde ao ponto cujo comprimento de onda se relaciona ao  $\lambda_{\max}$ .

A partir do  $\lambda_{\max}$  encontrado, foram realizadas as leituras das amostras de quitina e quitosana para construção da curva de calibração. Foram preparadas soluções padrão de quitina e quitosana com as seguintes concentrações de 0,05mg/mL, 0,10mg/mL, 0,25mg/mL, 0,50mg/mL, 1,00mg/mL em ácido acético 0,01M para leitura das respectivas absorbâncias no  $\lambda_{\max}$  encontrado. A partir desses valores, construí-se a curva de calibração entre a absorbância e a concentração do analito para observação da relação existente entre essas variáveis.

O Grau de Desacetilação (GD) da quitosana foi determinado por meio da Equação 5 adaptada de Liu *et al.* (2006). O valor encontrado no ensaio foi comparado com o GD fornecido pelo fabricante.

$$GD\% = 100 - \left( \frac{161,1 \times A \times V - 0,0218 \times M}{3,3615 \times M - 42,1 \times A \times V} \times 100 \right) \quad (5)$$

Em que:

A = Absorbância;

V = Volume da solução em litros;

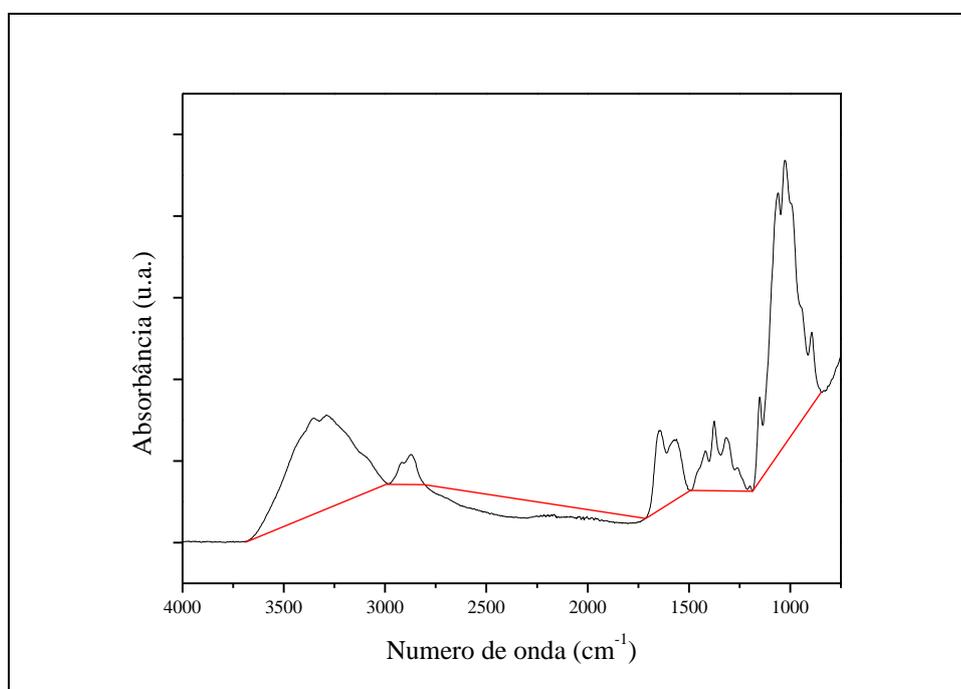
M = Massa da amostra em miligramas.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 6.1 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

Para a análise qualitativa do espectro de *FTIR* das bandas da quitosana foi traçada uma linha de base para o alinhamento das bandas conforme apresentado na Figura 5. Essa abordagem foi utilizada apenas para a identificação das bandas e de seus grupos funcionais. Posteriormente foram utilizadas novas linhas de base para a análise quantitativa e obtenção do GD da quitosana.

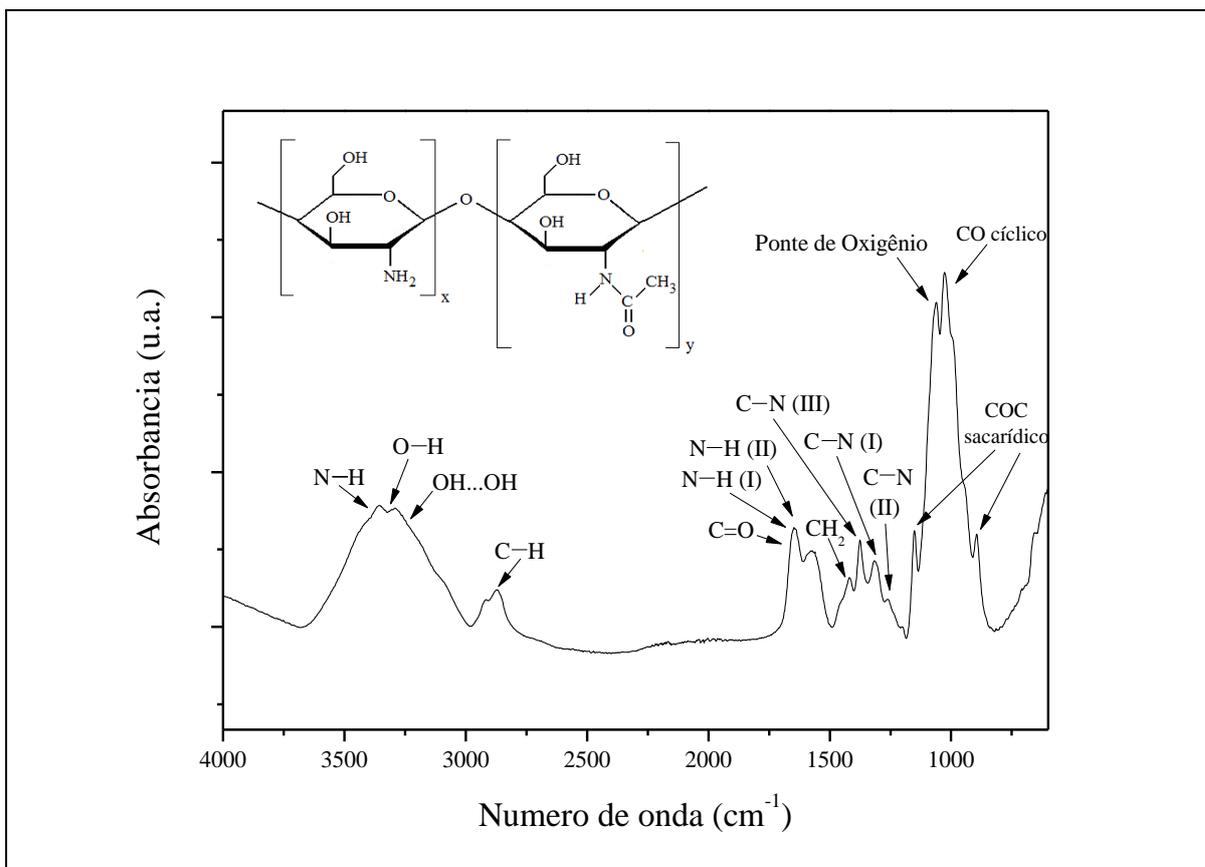
Figura 5 – Representação da linha de base utilizada para análise qualitativa do espectro da quitosana.



A Figura 6 apresenta o espectro de infravermelho obtido da quitosana com suas bandas de absorção correlacionadas aos seus respectivos grupos funcionais característicos. A faixa de número de onda entre  $3570\text{cm}^{-1}$  e  $3200\text{cm}^{-1}$  corresponde à região de absorção das ligações O–H livres e das intermoleculares OH...OH (COSTA JR., 2008).

No grupo da amina primária, as vibrações de estiramento da ligação N–H correspondem à faixa de  $3400\text{cm}^{-1}$  a  $3380\text{cm}^{-1}$ , já as deformações entre  $1650\text{cm}^{-1}$  e  $1550\text{cm}^{-1}$ , com destaque em  $1556\text{cm}^{-1}$  (COATES, 2000). A vibração de estiramento em C–N (I) está entre  $1350\text{cm}^{-1}$  a  $1000\text{cm}^{-1}$  (PAVIA *et al.*, 2010), com destaque em  $1315\text{cm}^{-1}$ , já a deformação da ligação C–N (III) está na faixa  $1340\text{cm}^{-1}$  a  $1250\text{cm}^{-1}$  (COSTA JR., 2008).

Figura 6 – Espectro de FTIR da quitosana e a representação de sua estrutura.



No grupo da amida secundária, a vibração de estiramento da carbonila (C=O) ou Amida I está entre 1680cm<sup>-1</sup> e 1630cm<sup>-1</sup> com destaque em 1645cm<sup>-1</sup> (COATES, 2000), já a deformação da ligação N-H ou Amida II está na faixa 1570cm<sup>-1</sup> a 1515cm<sup>-1</sup>. A deformação das ligações N-H estão entre 1650cm<sup>-1</sup> e 1550cm<sup>-1</sup> (WANG *et al.*, 2004), enquanto o estiramento C-N (II) está na faixa de 1305cm<sup>-1</sup> a 1200cm<sup>-1</sup> (BARBOSA, 2007), com destaque em 1259cm<sup>-1</sup> (COSTA JR., 2008).

As bandas próximas a 2800cm<sup>-1</sup> e 2900cm<sup>-1</sup> abrangem os estiramentos assimétricos e simétricos da ligação C-H na estrutura do CH<sub>2</sub>, com picos em 2916cm<sup>-1</sup> e 2870cm<sup>-1</sup> respectivamente (WANG *et al.*, 2004). Além disso, evidencia-se a banda característica da deformação angular ou tesoura do grupo CH<sub>2</sub> próximo a 1404cm<sup>-1</sup> (COSTA JR., 2008). A estrutura COC sacarídica está presente próximo das bandas de absorção em 1152cm<sup>-1</sup> e 896cm<sup>-1</sup>, enquanto as ligações C-O cíclicas estão próximas a 1022cm<sup>-1</sup> (WANG *et al.*, 2004).

A Tabela 1 relaciona os grupos químicos da estrutura da quitosana com suas bandas e picos característicos, conforme a legenda para “v” representando as vibrações de estiramento, e “δ” as doformações.

Tabela 1 – Relação entre bandas e grupos funcionais da quitosana.

Banda (cm <sup>-1</sup> )	Grupo
3570 – 3200	v O–H v OH...OH
3400 – 3380	v N–H
1650 – 1550	δ N–H
1350 – 1000	v C–N (I)
1340 – 1250	δ C–N (III)
1680 – 1630	v C=O (Amida I)
1570 – 1515	δ N–H (Amida II)
1259	v C–N (II)
2800 – 2900	v C–H
1404	δ CH <sub>2</sub>
1152	v COC
896	
1022	v C–O

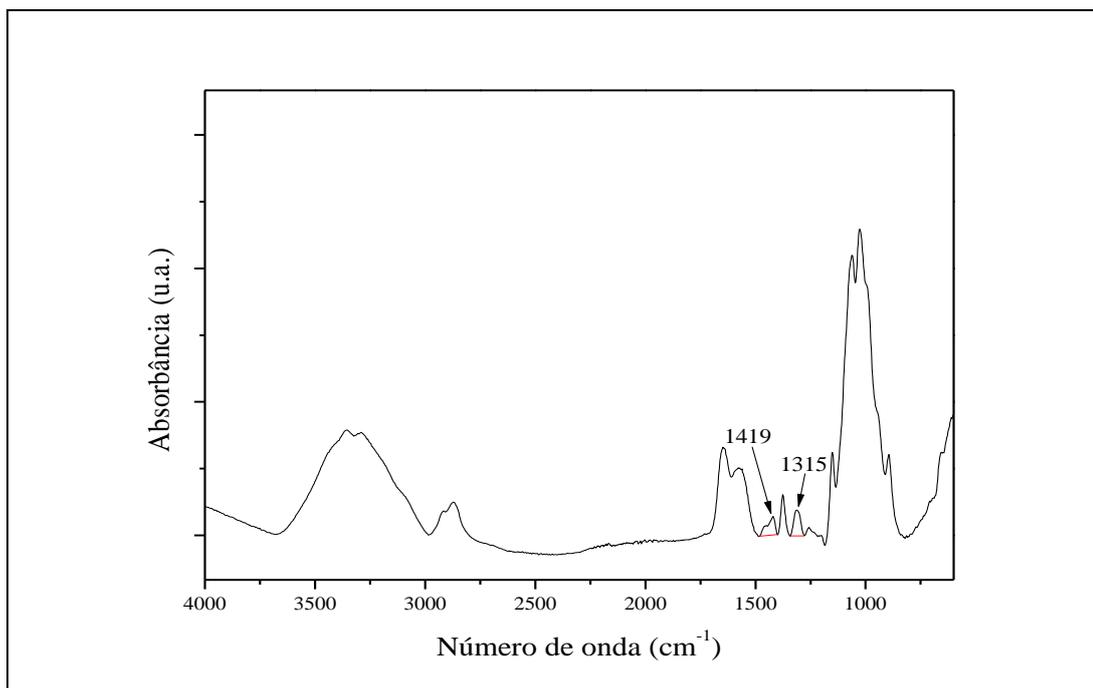
A Figura 7 apresenta o espectro de quitosana com a representação das linhas de base utilizadas para a abordagem quantitativa e obtenção do seu GD, conforme realizado por Brugnerotto *et al.* (2001). As linhas de base utilizadas, em destaque em vermelho, se referem ao pico característico de 1315cm<sup>-1</sup> e ao pico de referência em 1419cm<sup>-1</sup>, relacionados, respectivamente, às bandas de absorção em 1320cm<sup>-1</sup> e 1420cm<sup>-1</sup> e utilizados para o cálculo o GD.

É possível avaliar o GD da amostra de quitosana considerando-se as bandas de absorção em 1420cm<sup>-1</sup> e 1320cm<sup>-1</sup>, independentemente do tipo de técnica utilizada, do estado da amostra ou da sua estrutura secundária. Assim, uma relação linear obtida entre essas duas bandas pode ser utilizada para calcular o GD da quitosana conforme apresentado na Equação 5 (BRUGNEROTTO *et al.*, 2001):

$$\frac{A_{1320}}{A_{1420}} = 0,3822 + 0,03133 \times (100 - \text{GD}) \quad (6)$$

Utilizando-se a Equação 6 e os valores de absorbância das bandas de referência 1420cm<sup>-1</sup> e característica 1320cm<sup>-1</sup> do espectro da quitosana, obtém-se o GD de 69,7% com desvio padrão de 0,2%.

**Figura 7 – Espectro da quitosana para cálculo do GD.**



A espectroscopia de absorção na região do infravermelho é um método via estado sólido que utiliza uma linha de base para o cálculo do GD. A utilização de diferentes linhas de base pode inevitavelmente promover alterações nos resultados finais (KHAN; PEH; CH'NG, 2002). Além disso, deve-se considerar que as linhas de base se adequam aos diferentes intervalos de variação de GD da quitosana (TAN *et al.*, 1998).

Assim, a escolha da linha de base é um ponto importante, principalmente quando as amostras possuem GD em uma faixa desconhecida. Por isso, muitos autores não consideram o *FTIR* como um método padrão para se determinar o GD de quitosana (TAN *et al.*, 1998), e em geral, essa técnica é utilizada para se estimar o GD da amostra (KHAN; PEH; CH'NG, 2002). Dessa maneira, o valor através dos espectros de infravermelho, mesmo sendo abaixo do indicado pelo fabricante, cujo  $GD \geq 75\%$ , já pode ser considerado para uma aproximação da faixa na qual está inserido.

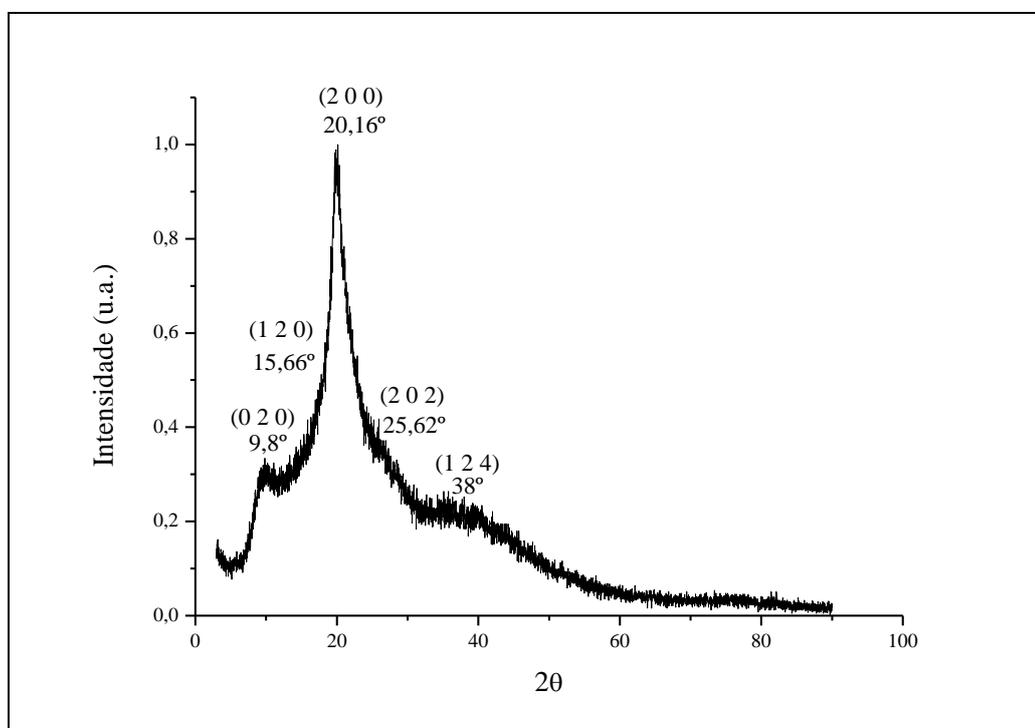
## 6.2 Difração de Raios-X (DRX)

A Figura 8 apresenta o difratograma obtido a partir do pó de quitosana pura. Pode ser observado um pico de grande intensidade característico da presença da fase cristalina da quitosana em  $2\theta = 20,16^\circ$  ( $d = 0,440\text{nm}$ ) associado ao plano cristalográfico (2 0 0) (OGAWA; YUI; OKUYAMA; 2004). Os picos em  $2\theta = 9,8^\circ$  ( $d = 0,901\text{nm}$ ), referente ao plano (0 2 0), e

em  $2\theta = 15,66^\circ$  ( $d = 0,565\text{nm}$ ), ao plano (1 2 0), estão associados a cristais hidratados, devido à característica hidrofílica da quitosana (OGAWA, 1991).

Os picos em  $2\theta = 20,16^\circ$  e em  $2\theta = 9,8^\circ$  sugerem a formação de ligações de hidrogênio inter e intramoleculares na presença dos grupos amino livres da quitosana (JIAO *et al.*, 2011). Os halos em torno de  $2\theta = 25,62^\circ$  e  $2\theta = 38^\circ$  podem ser associados, respectivamente, às reflexões dos planos (2 0 2) e (1 2 4). Já a parte amorfa da amostra de quitosana está compreendida na ampla faixa abaixo desses picos de referência cristalina, no halo entre  $2\theta = 5^\circ$  e  $2\theta = 80^\circ$  (COSTA JR., 2008).

**Figura 8 – Difratoograma da amostra de quitosana pura.**



Os picos evidenciados no difratograma apresentado para a quitosana pura são endossados pela literatura dos seguintes autores: Ogawa, Yui e Okuyama (2004); Tripathi, Mehrotra e Dutta (2009); Kumirska *et al.* (2010); Jiao *et al.* (2011); Cervera *et al.* (2004); Wu *et al.* (2007); Ren *et al.* (2005); Dambies *et al.* (2001); Kolhe, Kannan (2003); Monteiro Jr., Airoidi (1999); Wan *et al.* (2003); Jia *et al.* (2007); Zhang *et al.* (2007); Trung *et al.* (2006).

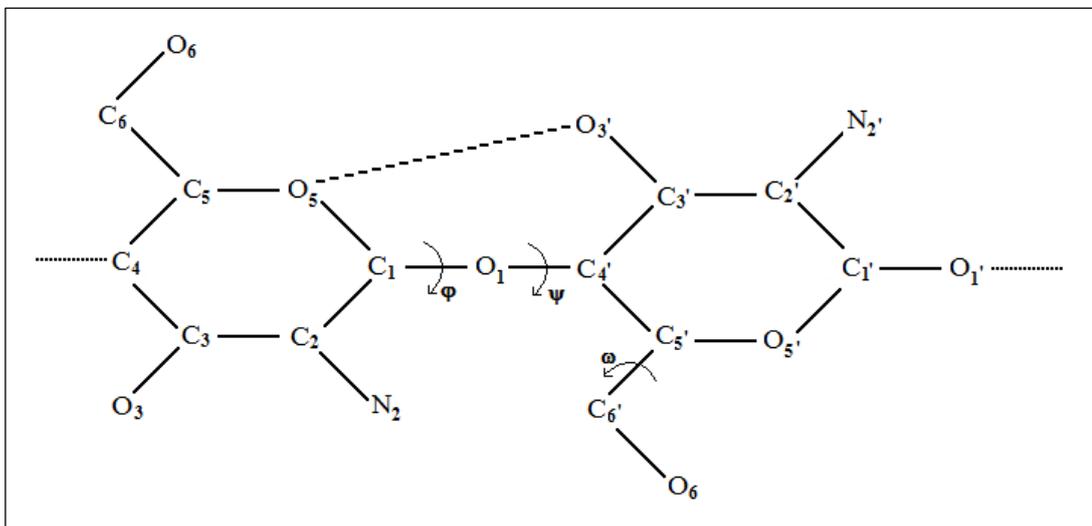
A quitosana pode apresentar pelo menos duas diferentes conformações espaciais em ambientes cristalinos, tais como, com duas ou oito hélices. Além desse aspecto, a quitosana pode adotar várias morfologias cristalinas, que diferem entre si essencialmente pelo empacotamento lateral das cadeias. Isso se refere à condição de organização de apenas

cadeias de quitosana ou à condição em que quitosana interage com pequenas moléculas de água, ácidos e até mesmo com partículas de sais (MAZEAU; WINTER; CHANZY, 1994).

A quitosana apresenta basicamente dois padrões polimórficos: hidratado e anidro. A sua forma mais comum corresponde à hidratada (VINSOVA; VAVRIKOVA, 2008), que é composta por quatro unidades monoméricas e oito moléculas de água organizadas em célula unitária ortorrômbica (KUMAR *et al.*, 2004), com parâmetros de redes de  $a = 0,895\text{nm}$ ,  $b = 1,697\text{nm}$  e  $c = 1,034\text{nm}$  (OGAWA; YUI; OKUYAMA; 2004).

Na condição hidratada, cada cadeia de quitosana se apresenta em dupla hélice estendida com estrutura em zigue-zague (VINSOVA; VAVRIKOVA, 2008), conforme apresentada na Figura 9. Essa estrutura é estabilizada por ligações de hidrogênio intra e intermoleculares (OGAWA; YUI; OKUYAMA; 2004), tais como, respectivamente, a ligação entre  $O_3$ - $O_5$  com orientação gauche-trans do  $O_6$  na mesma cadeia polimérica e a ligação de  $N_2$ - $O_6$  entre cadeias adjacentes (VINSOVA; VAVRIKOVA, 2008; KUMIRSKA *et al.*, 2010). Os ângulos  $\varphi$  e  $\psi$  definem a conformação da cadeia e o ângulo  $\omega$  determina a orientação do  $O_6$ . A linha tracejada representa a ligação de hidrogênio  $O_3$ - $O_5$  (KUMAR *et al.*, 2004). Cada célula unitária contém duas cadeias poliméricas com empacotamento antiparalelo. Já que moléculas de água estão presentes entre as cadeias poliméricas dentro da célula unitária, elas conferem estabilidade à estrutura cristalina, além de proporcionarem hidratação aos cristais de quitosana. Essa morfologia hidratada é a mais frequente, inclusive para as formas comerciais (OGAWA; YUI; OKUYAMA; 2004).

**Figura 9 – Estrutura química de um segmento da quitosana com destaque para a numeração da posição dos átomos de carbono, oxigênio e nitrogênio.**



A estabilidade proporcionada pela presença de moléculas de água se deve à grande quantidade de ligações de hidrogênio que essas moléculas realizam e por isso funcionam como intermediários de ligação das cadeias de quitosana no empacotamento de diversos planos de redes poliméricas. A periodicidade e distâncias das ligações de hidrogênio formam uma estrutura tridimensional típica de polissacarídeos que possuem ligação glicosídica, como a celulose (OKUYAMA *et al.*, 1997).

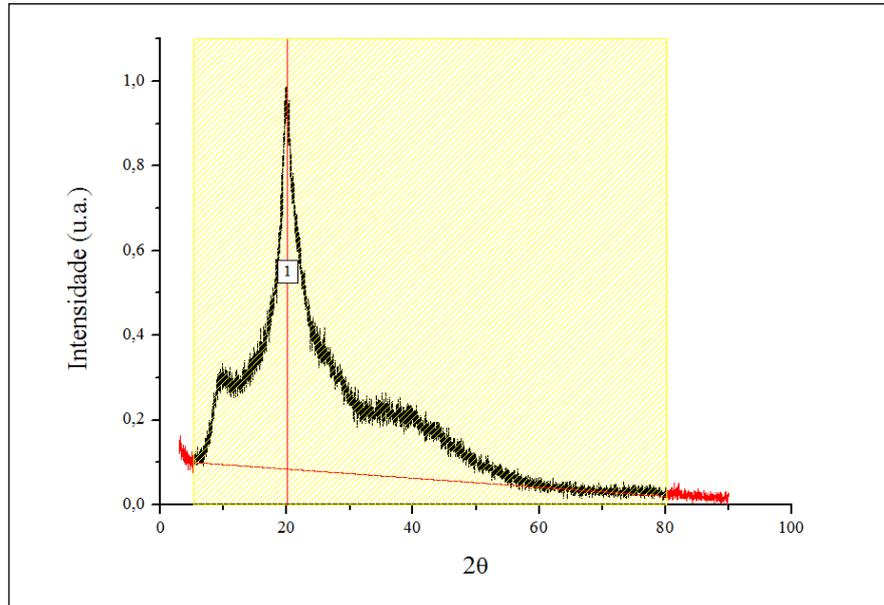
Já no caso da quitosana na forma anidro, não há moléculas de água dentro da célula unitária, e a conformação segue o mesmo padrão de dupla hélice estendida. A diferença da forma hidratada para a anidro está nas dimensões da célula unitária, que se reduzem em função da ausência de água, e passam a ser  $a = 0,807\text{nm}$ ,  $b = 0,844\text{nm}$  e  $c = 1,034\text{nm}$  (MAZEAU; WINTER; CHANZY, 1994).

A possibilidade de uma estrutura monoclinica com  $\beta = 88^\circ$  para o padrão de dupla hélice estendida com empacotamento antiparalelo é considerada para o padrão cristalográfico da quitosana e também não é descartada (MAZEAU; WINTER; CHANZY, 1994).

O Grau de Cristalinidade (GC) da quitosana foi calculado conforme a proporção entre a área cristalina e a total (cristalina + amorfa) apresentada na Equação 2. O valor do GC foi obtido por meio do cálculo de integral da área compreendida entre a curva do difratograma e a linha de base proposta para a mesma, de acordo com ferramentas disponíveis de integração de áreas sobre picos do programa OriginPro® 8.0.

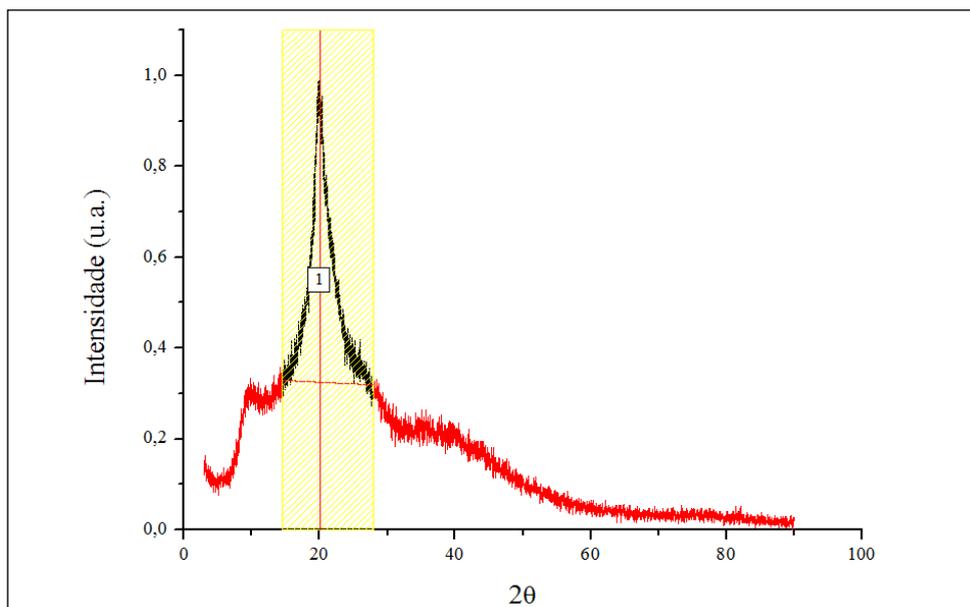
A Figura 10 apresenta em destaque a seção da curva do difratograma cuja área foi utilizada no cálculo da área total do gráfico, correspondente à soma das porções cristalina e amorfa. Dessa forma, foi integrada a área para a curva destacada em preto dentro do retângulo hachurado em amarelo, correspondente a faixa de  $2\theta = 5,3^\circ$  a  $2\theta = 80,16^\circ$ , acima da linha de base proposta em vermelho. A parte da curva destacada em vermelho foi desconsiderada para esse cálculo.

**Figura 10 – Difratoograma da quitosana com destaque para a área total da curva.**



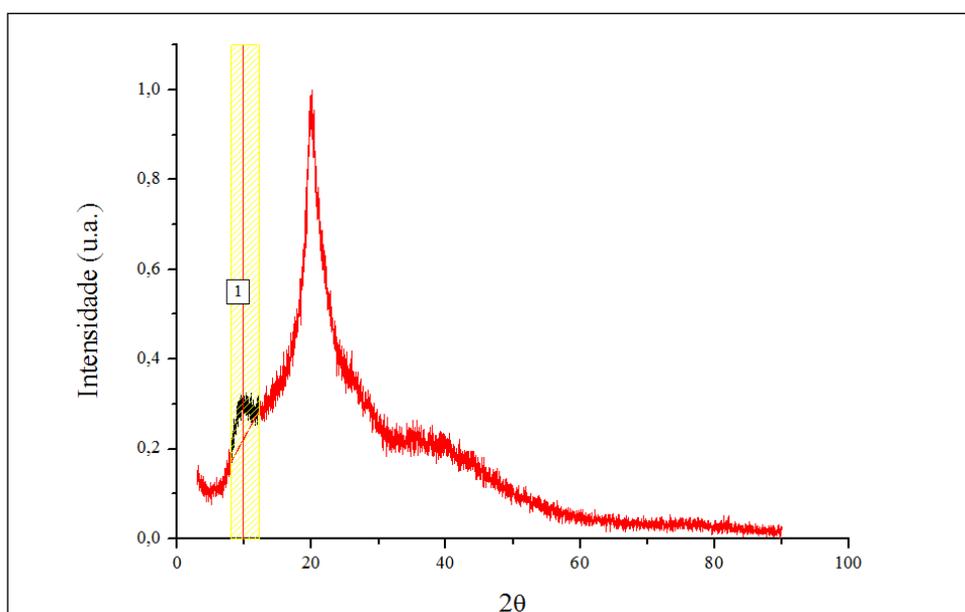
A Figura 11 apresenta em destaque a seção da curva do difratograma cuja área foi utilizada no cálculo da área cristalina correspondente ao pico destacado em  $2\theta = 20,16^\circ$ . Dessa forma, foi integrada a área para a curva destacada em preto dentro do retângulo hachurado em amarelo, correspondente a faixa de  $2\theta = 14,54^\circ$  a  $2\theta = 27,94^\circ$ , acima da linha de base proposta em vermelho. A parte da curva destacada em vermelho foi desconsiderada para esse cálculo.

**Figura 11 – Difratoograma da amostra de quitosana pura com destaque para área cristalina do pico de  $2\theta=20,16^\circ$ .**



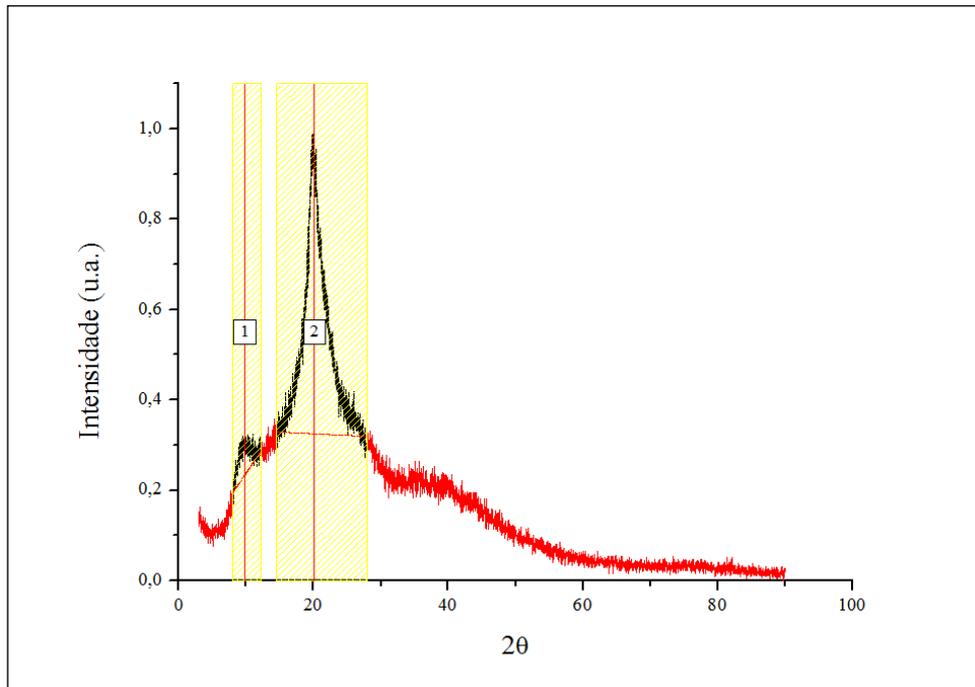
A Figura 12 apresenta em destaque a seção da curva do difratograma cuja área foi utilizada no cálculo da área cristalina correspondente ao pico destacado em  $2\theta = 9,8^\circ$ . Dessa forma, foi integrada a área para a curva destacada em preto dentro do retângulo hachurado em amarelo, correspondente a faixa de  $2\theta = 7,98^\circ$  a  $2\theta = 12,22^\circ$ , acima da linha de base proposta em vermelho. A parte da curva destacada em vermelho foi desconsiderada para esse cálculo.

**Figura 12 – Difratograma da amostra de quitosana pura com destaque para área cristalina do pico de  $2\theta=9,8^\circ$ .**



A partir dos difratogramas apresentados anteriormente, calculou-se o GC do pó de quitosana pura ao se considerar a diferença da área total da curva, apresentada na Figura 10, com as áreas dos picos em  $2\theta = 20,16^\circ$  e em  $2\theta = 9,8^\circ$ , conforme a Figura 13. A partir dos dados encontrados foi possível estimar o GC em 24,6% com desvio padrão de 1,2%.

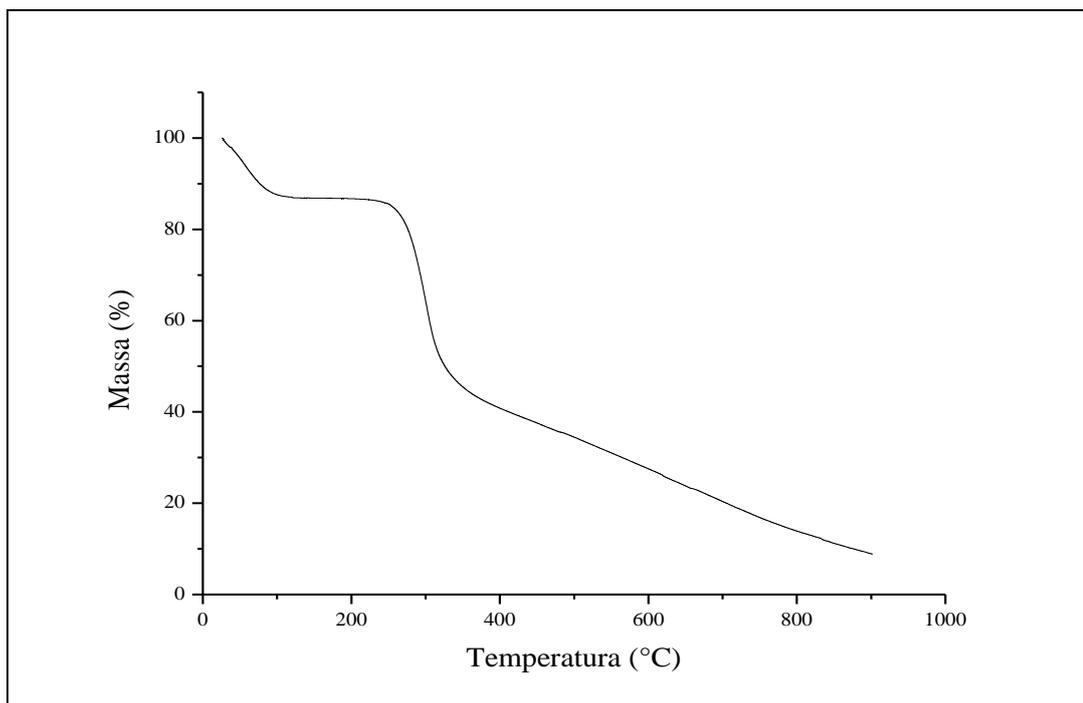
Figura 13 – Difratograma da quitosana com destaque para as áreas cristalinas em  $2\theta=20, 16^\circ$  e  $9,8^\circ$ .



### 6.3 Análise Térmica

A Figura 14 apresenta a curva da análise termogravimétrica (*TGA*) da amostra de quitosana. Podem ser observados três estágios de perda de massa, que podem ser relacionados a degradação térmica da quitosana, tanto no que se referente à desidratação, quanto à decomposição da amostra em fragmentos que contenham os grupos amino e acetilado (KASAAI, 2009).

**Figura 14 – Curva de TGA da quitosana.**



No primeiro estágio, há perda de massa de 13,48% no intervalo de temperatura do início do ensaio até 220°C. Essa perda de massa inicial se refere à perda de água residual. Polímeros hidrofílicos e higroscópicos como a quitosana podem conter água adsorvida e estrutural, por isso o primeiro estágio de perda de massa se refere à evaporação de água (BRANT, 2008; KASAAI, 2009).

Os outros estágios de perda de massa ocorrem entre 220 e 340°C e entre 340 e 900°C. Ambos se devem à degradação térmica e decomposição da quitosana em fragmentos menores. Polissacarídeos sofrem pirólise por meio da quebra aleatória da ligação glicosídica, seguida por uma decomposição adicional em um grupo de ácidos graxos de cadeia curta de até seis carbonos (NETO, 2008). Na segunda etapa, a perda total de massa da amostra alcança 46,88% do valor inicial, e na terceira, alcança 91,11% do inicial, restando no cadinho 8,84% a 900°C.

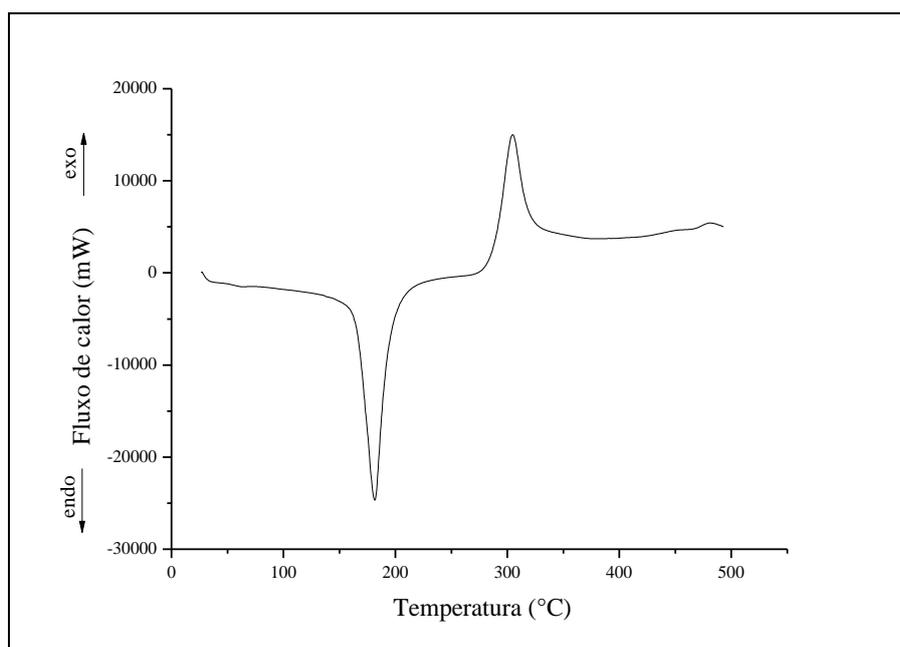
Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Tripathi *et al.* (2009); Tonhi e Plepis (2002); Balazs e Sipos (2007); Torres *et al.* (2005); Laus *et al.* (2006). A Tabela 2 apresenta resumidamente os valores de perda de massa encontrados no ensaio.

**Tabela 2 – Perda de massa da quitosana em função dos estágios térmicos.**

Estágios	Estágio 1 25 ~220°C	Estágio 2 220 ~340°C	Estágio 3 340~900°C	Resíduo a 900°C
<b>Perda de Massa (%)</b>	13,48	46,88	91,11	8,84

A Figura 15 apresenta a curva de calorimetria exploratória diferencial (*DSC*) da amostra de quitosana. Podem ser observados dois picos expressivos relacionados a transições de primeira ordem decorrentes da análise de *TGA* anterior. Observa-se um pico endotérmico em 181,1°C referente à perda de água da amostra. Já o pico exotérmico em 304,5°C se refere à decomposição da quitosana.

**Figura 15 – Curva de *DSC* da quitosana.**



Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Tripathi *et al.* (2009), Ding *et al.* (2003); Torres *et al.* (2005). A Tabela 3 apresenta resumidamente as temperaturas e seus respectivos eventos térmicos encontrados no ensaio.

**Tabela 3 – Temperaturas e respectivos eventos térmicos característicos da quitosana.**

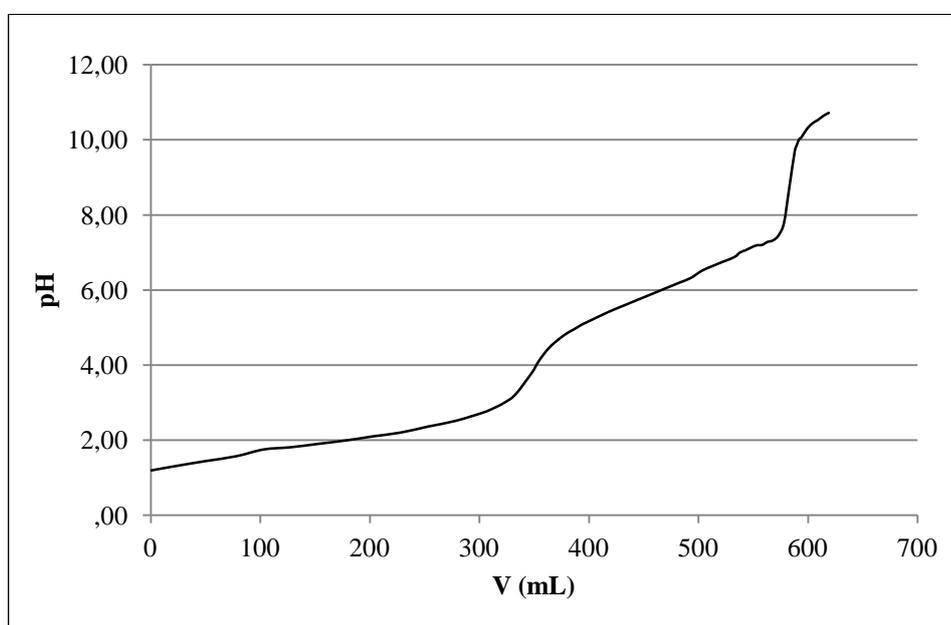
Tipo de Transição	Temperatura (°C)	Evento
Endotérmico	181,1	Desidratação
Exotérmico	304,5	Decomposição

#### 6.4 Titulação Potenciométrica

A Figura 16 apresenta a curva típica de titulação potenciométrica da quitosana. Observa-se como esperado a presença de dois pontos de inflexão, que correspondem às diferentes etapas de neutralização do titulado. O primeiro ponto de inflexão corresponde ao

ponto em que o excesso de HCl é titulado pelo NaOH. Já o segundo ponto corresponde à neutralização dos grupos amina protonados ( $\text{NH}_4^+$ ) e sua consequente transformação em sais amônio. Em média foram necessários 344,5mL de NaOH para a neutralização do excesso de ácido, com desvio padrão de 10,2mL, e mais 235,9mL para a neutralização da quitosana protonada, com desvio padrão de 7,4mL. A Tabela 4 apresenta resumidamente os volumes de base utilizados para neutralizar tanto o excesso de ácido na solução, quanto a quitosana protonada, além de apresentar esses valores em percentual do total de NaOH utilizado em cada etapa.

**Figura 16 – Curva de titulação potenciométrica da quitosana.**

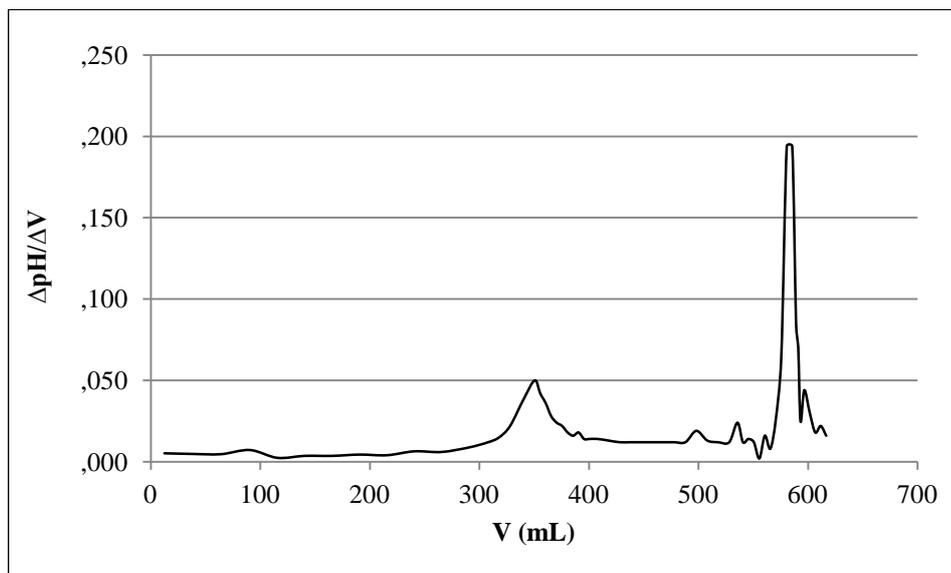


**Tabela 4 – Volumes necessários para neutralizar o excesso de ácido da solução e a quitosana na titulação.**

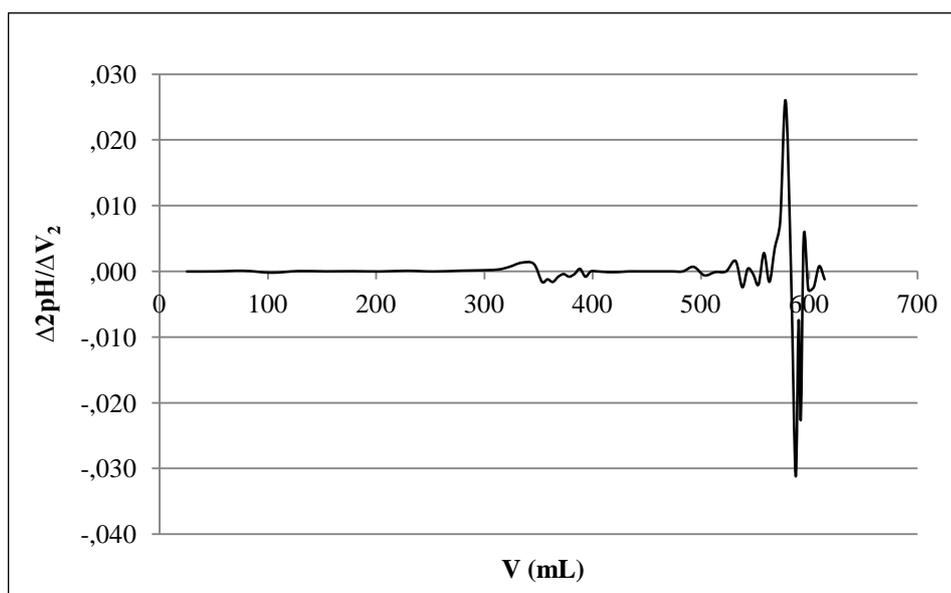
Neutralização	Volume (mL)	Desvio (mL)	Desvio (%)
$\text{H}^+$	344,5	10,2	2,9
$\text{NH}_4^+$	235,9	7,4	3,1

O resultado da titulação e os pontos exatos de neutralização do ácido em excesso e da quitosana podem ser confirmados no gráfico de derivação da curva apresentada na Figura 16. A derivada primeira indica por meio de seus pontos de máximo, correspondentes ao ponto de inflexão, o ponto de virada na curva, já a derivada segunda evidencia esse ponto quando a curva cruza o eixo das abscissas. A Figura 17 apresenta a curva da derivada primeira e a Figura 18, a derivada segunda da curva típica de titulação da amostra de quitosana.

**Figura 17: Derivada primeira da curva de titulação potenciométrica da quitosana.**



**Figura 18 – Derivada segunda da curva de titulação potenciométrica da quitosana.**



A partir da Equação 3 proposta por Tan *et al.* (1998) e utilizando os valores e dados envolvidos na titulação, pode-se encontrar o grau de desacetilação médio de 74,9% com desvio padrão de 2,3%. Em comparação com o valor informado pelo fabricante da quitosana, cujo  $GD \geq 75\%$ , percebe-se que há uma boa aproximação do GD médio encontrado na titulação por essa metodologia.

No caso da Equação 4 proposta por Torres *et al.* (2005), o GD médio encontrado foi de 60,7% com desvio padrão de 1,9%. Em comparação com o valor informado pelo fabricante

da quitosana, cujo  $GD \geq 75\%$ , percebe-se que há um distanciamento maior do valor do GD médio encontrado na titulação por essa metodologia.

Foi encontrado GD médio de 67,8% com desvio padrão de 7,8% quando se considera os resultados das duas metodologias de Tan *et al.* (1998) e Torres *et al.* (2005) em conjunto. Em comparação com o valor informado pelo fabricante da quitosana, cujo  $GD \geq 75\%$ , percebe-se que há um distanciamento do valor do GD médio encontrado na titulação por essas duas metodologias.

Os erros mais comumente encontrados em métodos de titulação potenciométrica de ácido-base para a quitosana podem decorrer de muitos aspectos, tais como da medição errônea da massa da amostra de quitosana ou do volume de titulante; da forte característica higroscópica desse polímero; da precipitação de quitosana durante a titulação para condições de pH acima de 6; da redução da concentração desse polímero na solução, devido à precipitação do mesmo; da sua precipitação sobre a superfície de leitura do eletrodo de pH, o qual perde sua precisão; de erros indeterminados em função da própria medição do pH da solução (JIANG; CHEN; ZHONG, 2003).

Todos esses fatores podem ser considerados para explicar a subestimação do valor do GD da quitosana encontrado por titulação potenciométrica. O fator principal é a inevitável precipitação da quitosana em pH acima de 6, já que a titulação ocorreu até pH próximo de 10. Apesar disso, a titulação executada pode ter contornado parte desse problema, em função de ter sido realizada sob vigorosa agitação e sem interrupções, com amostras armazenadas em dessecador previamente à etapa de pesagem, a qual foi realizada em balança com precisão de décimos de miligramas.

Esses pontos de minimização dos erros são reforçados pelo pequeno desvio padrão encontrado para ambas as metodologias utilizadas para o cálculos do GD, tanto segundo Tan *et al.* (1998), quanto Torres *et al.* (2005), considerando que o processo foi realizado em triplicatas. Em termos percentuais, os volumes dos desvios padrão gastos na neutralização da quitosana protonada representam apenas 3% do volume utilizado nessa etapa. Esses fatores contribuem para validar a titulação potenciométrica, que é um método simples e prático para se determinar o GD da quitosana.

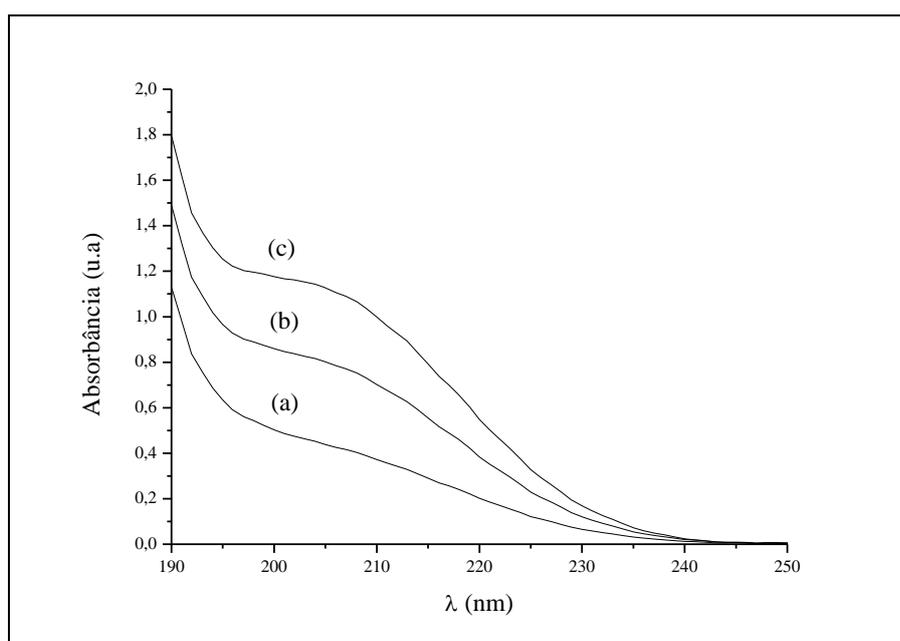
A dificuldade da titulação potenciométrica pode estar, enfim, associada à metodologia a ser escolhida para o cálculo do GD, em qual equação que melhor se adéqua ao processo, isto é, entre Tan *et al.* (1998) e Torres *et al.* (2005). Isso pode ser notado pelo distanciamento dos valores encontrados quando considerados para a média em conjunto, o que elevou consideravelmente o desvio padrão. Esse ponto é crucial para se determinar o GD da

quitosana, já que o cálculo final pode diminuir em grande escala o real valor da amostra. Quando comparado ao valor fornecido pelo fabricante, a divergência pode ser significativa e definitiva para a caracterização do material.

## 6.5 Espectrofotometria de UV-VIS

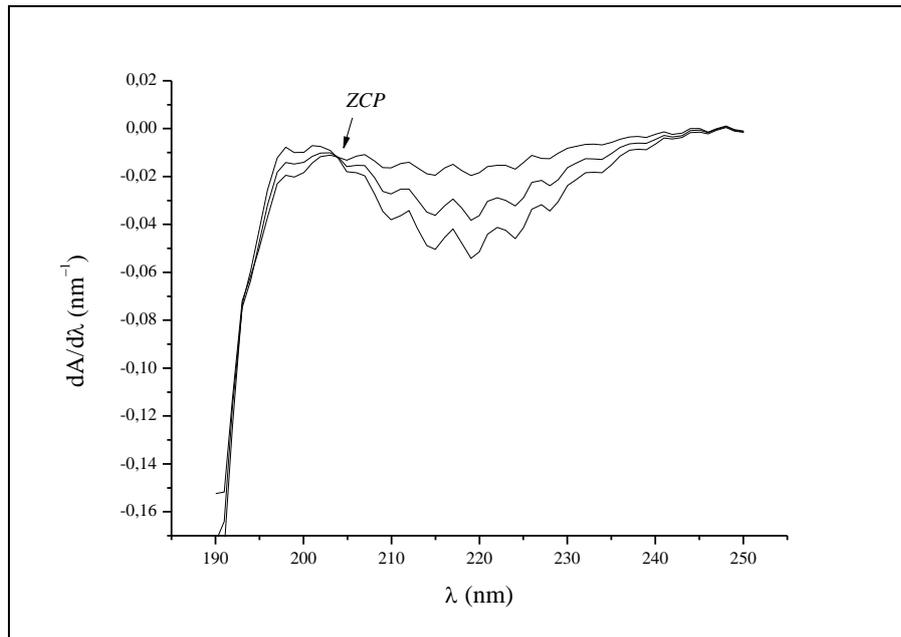
A Figura 19 apresenta os espectros de ordem zero das soluções de ácido acético 0,01M, 0,02M e 0,03M obtidos na faixa de 190 a 250nm. Percebe-se que a alta absorbância do ácido acético na concentração utilizada na solução pode interferir na leitura da absorbância da quitosana, por isso, utilizaram-se os espectros de primeira derivada para a análise subsequente.

**Figura 19 – Espectros de ordem zero das soluções de ácido acético: a) 0,01M; b) 0,02M; c) 0,03M.**



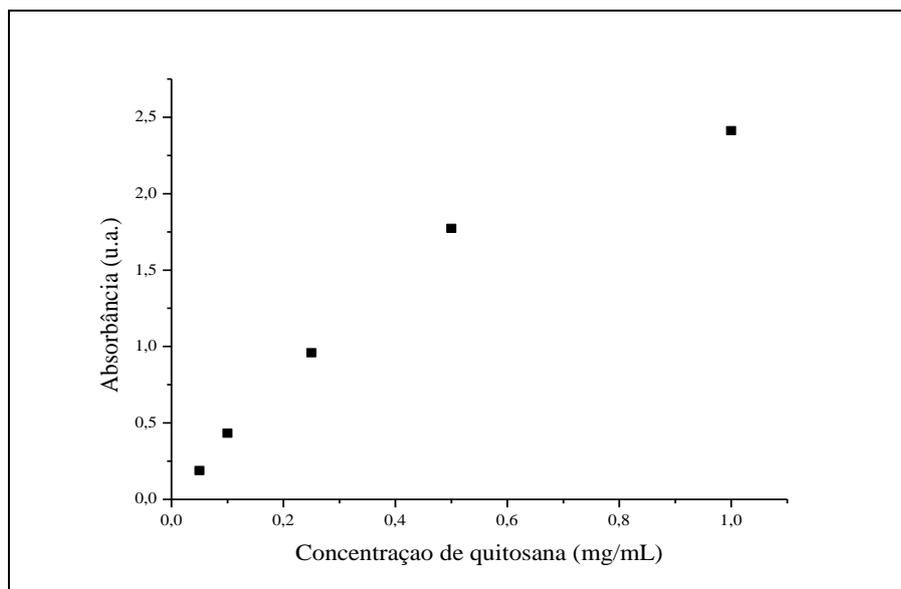
A Figura 20 apresenta os espectros de derivada primeira das soluções de ácido acético 0,01M, 0,02M e 0,03M obtidos na faixa de 190 a 250nm. Pode-se observar o ponto comum entre as curvas, designado como ponto zero da curva (*ZCP*), próximo a 203,9nm, o qual corresponde ao ponto de comprimento de onda máximo para a leitura das soluções de quitosana. No *ZCP* a contribuição da absorbância do ácido acético é baixa e sua concentração não interfere na leitura dos grupos cromóforos da quitosana, permitindo uma melhor aproximação e determinação do seu GD.

**Figura 20 – Espectros de derivada primeira das soluções de ácido acético: a) 0,01M; b) 0,02M; c) 0,03M.**



A Figura 21 apresenta a curva de calibração desenvolvida por regressão linear para as soluções padrão de quitosana em concentrações de 0,05mg/mL, 0,10mg/mL, 0,25mg/mL, 0,50mg/mL, 1,00mg/mL em ácido acético 0,01M.

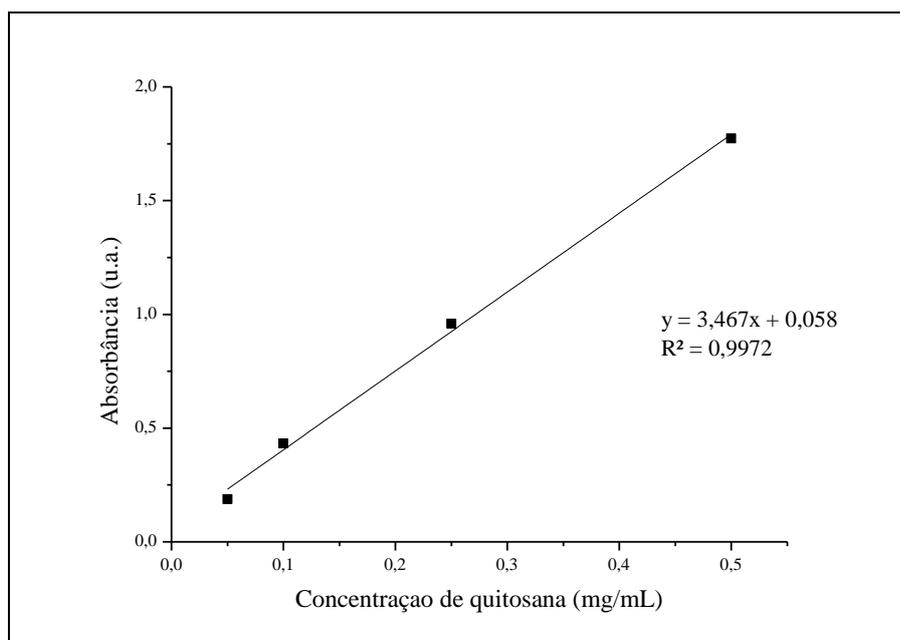
**Figura 21 – Curva de calibração de soluções padrão de quitosana de 0,05mg/mL a 1,00mg/mL.**



Percebe-se que a faixa descrita por essas concentrações não possui uma relação completamente linear em toda sua extensão, como descrito pela Lei de Beer. A região entre as concentrações de 0,50mg/mL e 1,00mg/mL não possui proporcionalidade entre a absorbância

e a concentração do analito, e deve portanto ser desconsiderada para a realização da análise a que se pretende. Assim, uma nova curva de calibração foi elaborada, considerando as concentrações de 0,05mg/mL, 0,10mg/mL, 0,25mg/mL, 0,50mg/mL, como apresentado na Figura 22 a seguir.

**Figura 22 – Curva de calibração de soluções padrão de quitosana de 0,05mg/mL a 0,50mg/mL.**



Percebe-se que a nova curva de calibração obteve uma regressão linear adequada e excelente coeficiente de determinação ( $R^2$ ). A partir da Lei de Beer-Lambert, apresentada na Equação 1, adequou-se a equação da reta encontrada na curva de calibração (7).

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda)lC \quad (1)$$

$$y = 3,467x + 0,058 \quad (7)$$

Considerando que a variável independente  $x$  na Equação 7 corresponde à concentração do analito na Equação 1, assim como a variável dependente  $y$  corresponde à absorbância, então o coeficiente angular da Equação 7 se relaciona ao produto da absorvidade molar pelo comprimento do caminho óptico, e o coeficiente linear da Equação 7 corresponde à absorbância do branco utilizado na análise, ou seja, ao ácido acético.

Portanto, resolvendo essas igualdades, encontra-se que: a absorbância do ácido acético em 203,9nm ( $A = 0,058$ ) foi bem baixa e próxima de zero, o que significa que o branco

utilizado estava adequado à análise; a absorvividade molar da quitosana é  $3,467\text{mg}^{-1}.\text{mL}.\text{cm}^{-1}$ , já que a cubeta de quartzo apresenta 1,0cm.

Os valores encontrados na curva de calibração de absorvância para cada concentração de quitosana foram levados na Equação 5 adaptada de Liu *et al.* (2006) para o cálculo do GD. Foi encontrado um GD médio de 81,2% com desvio padrão de 1,7%. Em comparação com o valor informado pelo fabricante da quitosana, cujo  $\text{GD} \geq 75\%$ , percebe-se que esse valor atende a faixa especificada. Isso pode ter ocorrido em função das vantagens desse método de apuração do GD, tais como de alta sensibilidade, facilidade de ser executado, mínima interferência de contaminantes nos resultados, entre outros (TAN *et al.*, 1998). Além disso, verifica-se que o valor do GD calculado pela espectrofotometria de UV-VIS foi o mais alto quando comparado aos obtidos por outras técnicas, como também observado por Khan, Peh, Ch'ng (2002).

Conforme observado por Tan *et al.* (1998) e Khan; Peh; Ch'ng (2002), o GD da quitosana é altamente dependente do tipo de método analítico empregado. Assim, com base nos resultados obtidos neste estudo, o GD da quitosana variou de acordo com os métodos utilizados para sua medição. Como cada metodologia tem suas vantagens e desvantagens, é difícil apurar, baseado também somente nesses resultados e ensaios, qual o método mais preciso e adequado para determinar o GD da quitosana. Portanto, conforme observado por Khan; Peh; Ch'ng (2002), o método utilizado na determinação do GD da quitosana deve ser também relatado junto ao valor encontrado para a amostra em análise.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, buscou-se determinar o GD da quitosana por meio das técnicas de titulação potenciométrica e de espectrofotometria de UV-VIS. As propriedades físico-químicas da quitosana foram caracterizadas por *FTIR*, *DRX*, *TGA* e *DSC*.

O espectro de *FTIR* da quitosana evidenciou as principais bandas de absorção associadas aos grupos químicos presentes na sua estrutura, além de atribuir um GD de 69,7%. O *DRX* da quitosana apontou 24,6% de cristalinidade, a *TGA* confirmou a perda de massa em dois estágios característicos de desidratação e decomposição do polímero, já o *DSC* apontou os picos de temperatura envolvidos nesses eventos.

Na titulação potenciométrica, evidenciaram-se os dois pontos de inflexão típicos da curva, além de um GD de 74,9% segundo metodologia de Tan *et al.* (1998), e de 60,7% segundo Torres *et al.* (2005). Em conjunto, as duas metodologias citadas atribuem GD médio de 67,8%. Foi encontrado um máximo de absorção em UV-VIS para a quitosana em 203,9nm, bem como uma faixa de relação linear da concentração pela absorbância entre 0,05 e 0,50mg/mL, além de absorvidade molar de  $3,467\text{mg}^{-1}\cdot\text{mL}\cdot\text{cm}^{-1}$  e GD de 81,2%.

O GD da quitosana é influenciado pelo método empregado para sua determinação, por isso foram observadas grandes variações nesses valores, desde os obtidos por *FTIR*, passando pela titulação, até o UV-VIS.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, T. L. de. **Desenvolvimento de membrana composta de PVAI e quitosana compatível com o sistema dermo-epidérmico**. 2009. 105p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ARANAZ, I.; MENGÍBAR, M.; HARRIS, R.; PAÑOS, I.; MIRALLES, B.; ACOSTA, G. G.; HERAS, A. Functional characterization of chitin and chitosan. **Current Chemical Biology**, v.3, p.203-230, 2009.

ASSIS, O. B. G.; SILVA, V. L. Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p.223-228, 2003.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.2, n.3, p.27-34, 2007.

BALAU, L.; LISA, G.; POPA, M. I.; TURA, V.; MELNIG, V. Physico-chemical properties of chitosan films. **Central European Journal of Chemistry**, v.2, n.4, p.638-647. 2004.

BALAZS, N.; SIPOS, P. Limitations of pH-potenciometric titration for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. **Carbohydrate Research**, v. 342, p. 124-130, 2007.

BARBOSA, L. C. de A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa: Ed. UFV, 2007. 189p.

BEIL, S.; SCHAMBERGER, A., NAUMANN, W., MACHILL, S., VAN PÉE, K.H. Determination of the degree of N-acetylation (DA) of chitin and chitosan in the presence of water by first derivative ATR FTIR spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v.87, p.117-122, 2012.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O.; GURNY, R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.57, p.35-52, 2004.

BLACK, J.; HASTINGS, G. **Handbook of biomaterials properties**. London: Chapman & Hall, 1998. 629p.

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

BRITO, M. K. M. de; SCHELLINI, S. A.; PADOVANI, C. R.; PELLIZZON, A. H.; NETO, C. G. da T. Inclusões de quitosana no subcutâneo de rato: avaliação clínica, histológica e morfométrica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.84, n.1, p.35-40, 2009.

BRUGNEROTTO, J.; LIZARDI, J.; GOYCOOLEA, F. M.; ARGÜELLES-MONAL, W.; DESBRIÈRES, J.; RINAUDO, M. An Infrared Investigation in Relation with Chitin and Chitosan Characterization. **Polymer**, v.42, p.3569-3580, 2001.

CAMPOS, M. G. N.; GROSSO, C. R. F.; CÁRDENAS, G.; MEI, L. H. I. Effects of neutralization process on preparation and characterization of chitosan membranes for wound dressing. **Macromolecular Symposia**, v.229, p.253-257, 2005.

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

CARREIRA, A. S.; GONÇALVES, F. A. M. M.; MENDONÇA, P. V.; GIL, M. H.; COELHO, J. F. J. Temperature and pH responsive polymers based on chitosan: applications and new graft copolymerization strategies based on living radical polymerization. **Carbohydrate Polymers**, v.80, p.618-630, 2010.

CERVERA, M. F.; HEINÄMÄKI, J.; KROGARS, K.; JÖRGENSEN, A. C.; KARJALAINEN, M.; COLARTE, A. I.; YLIRUUSI, J. Solid-state mechanical properties of aqueous chitosan-amylose starch films plasticized with polyols. **AAPS PharmSciTech**, v.5, n.1, p.1-6, 2004.

CHATELET, C.; DAMOUR, O.; DOMARD, A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. **Biomaterials**, v.22, p.261-268, 2001.

CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. **Análise instrumental**. Rio de Janeiro: Interciência, 2000. 606p.

COATES, J. **Interpretation of Infrared Spectra**. In: Encyclopedia of Analytical Chemistry. Chichester, 2000, p. 10815-10837.

COSTA JR., E. S. **Desenvolvimento de matriz de Quitosana/PVA quimicamente reticulada para aplicação potencial em engenharia de tecido epitelial**. 2008. 133p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

DALLAN, P. R. M. **Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele**. 2005. 194p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

DAMBIES, L.; VINCENT, T.; DOMARD, A.; GUIBAL, E. Preparation of chitosan gel beads by ionotropic molybdate gelation. **Biomacromolecules**, n. 2, p.1198-1205, 2001.

DEE, K. C.; PULEO, D. A.; BIZIOS, R. **An introduction to tissue-biomaterial interactions**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2002. 228p.

DING, W.; LIAN, Q.; SAMUELS, R. J.; POLK, M. B. Synthesis and characterization of a novel derivative of chitosan. **Polymer**, v.44, p.547-556, 2003.

DON, T.-M.; KING, C.-F.; CHIU, W.-Y.; PENG, C.-A. Preparation and characterization of chitosan-g-poly(vinyl alcohol)/poly(vinyl alcohol) blends used for the evaluation of blood-contacting compatibility. **Carbohydrate Polymers**, v.63, p.331-339, 2006.

DONATO, E. M.; CANEDO, N. A. P.; ADAMS, A. I. H.; FRÖEHLICH, P. E.; BERGOLD, A. M. Espectrofotometria derivada: uma contribuição prática para o desenvolvimento de métodos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.31, n.2, p.125-130, 2010.

FREIER, T.; KOH, H. S.; KAZAZIAN, K.; SHOICHET, M. S. Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by N-acetylation. **Biomaterials**, v.26, p.5872-5878, 2005.

GARCIA, R. B.; SILVA, D. L. P. da; COSTA, M.; RAFFIN, F. N.; RUIZ, N. M. da S. Avaliação de géis obtidos a partir da acetilação da quitosana em meio heterogêneo. **Química Nova**, v.31, n. 3, p.486-492, 2008.

GHOLIPOUR, A. K.; BAHRAMI, S. H.; NOURI, M. Chitosan-poly(vinyl alcohol) blend nanofibres; morphology, biological and antimicrobial properties. **e-Polymers**, v.133, p.1-12, 2009.

GONÇALVES, M. de L. S. S. **Métodos instrumentais para análise de soluções**. Lisboa: Fundação Calouste Gulberkian, 2001. 1050p.

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

GUPTA, K. C.; JABRAIL, F. H. Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. **Carbohydrate Polymers**, v.66, p.43-54, 2006.

HARGIS, L. G. **Analytical chemistry: principles and techniques**. New Jersey: Prentice-Hall, 1988. 672p.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008. 868p.

HEUX, L.; BRUGNEROTTO, J.; DESBRIÈRES, M.-F.; RINAUDO, M. Solid state NMR for determination degree of acetylation of chitin and chitosan. **Biomacromolecules**, v.1, p.746-751, 2000.

ILLUM, L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. **Pharmaceutical Research**, v.15, n.9, 1998.

JIA, Y.-T.; GONG, J.; GU, X.-H.; KIM, H.-Y.; DONG, J.; SHEN, X.-Y. Fabrication and characterization of poly(vinyl alcohol)/chitosan blend nanofibers produced by electrospinning method. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, p.403-409, 2007.

JIANG, X.; CHEN, L.; ZHONG, W. A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v.54, p.457-463, 2003.

JIAO, T. F.; ZHOU, J.; ZHOU, J.X.; GAO, L.H.; XING, Y.Y.; LI, X.H. Synthesis and characterization of chitosan-based Schiff base compounds with aromatic substituent groups. **Iranian Polymer Journal**, n. 20, v. 2, p.123-136, 2011.

KASAAI, M. R. Various methods for determination of the degree of n-acetylations of chitin and chitosan: a review. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v.57, p.1667-1676, 2009.

KHAN, T. A.; PEH, K. K.; CH'NG, H. S. reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. **Journal of Pharmaceutical Science**, v.5, n.3, p.205-212, 2002.

KHOR, E. Chitin and chitosan as biomaterials: going forward based on lessons learnt. **Journal of Metals, Materials and Minerals**, v.25, n.1, p.69-72, 2005.

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

KIM, S. B.; KIM, Y. J.; YOON, T. L.; PARK, S. A.; CHO, I. H.; KIM, E. J.; KIM, I. A.; SHIN, J.-W. The characteristics of a hydroxyapatite-chitosan-PMMA bone cement. **Biomaterials**, v.25, p.5715-5723, 2004.

KOLHE, P.; KANNAN, R. M. Improvement in ductility of chitosan through blending and copolymerizations with PEG: FTIR investigation of molecular interactions. **Biomacromolecules**, v.4, p.172-180, 2003.

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

KUMAR, M. N. V. R.; MUZZARELLI, R. A. A.; MUZZARELLI, C.; SASHIWA, H. DOMB, A. J. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. **Chemical Reviews**, v.104, p.6017-6080, 2004.

KUMIRSKA, J.; CZERWICKA, M.; KACZYNSKI, Z.; BYCHOWSKA, A.; BRZOZOWSKI, K.; THÖMING, J.; STEPNOWSKI, P. Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. **Marine Drugs**, v.8, p.1567-1636, 2010.

LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**, v.32, n.3, p.672-678, 2009.

LAUS, R.; LARANJEIRA, M. C. M.; MARTINS, A. O.; FÁVERE, V. T. Microesferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato utilizadas para remoção da acidez, ferro (III) e manganês (II) de águas contaminadas pela mineração de carvão. **Química Nova**, v. 29, n.1, p.34-39, 2006.

LEE, K. Y.; JEONG, L.; KANG, Y. O.; LEE, S. J.; PARK, W. H. Electrospinning of polysaccharides for regenerative medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.61, p. 1020-1032, 2009.

LIU, D.; WEI, Y.; YAO, P.; JIANG, L. Determination of the degree of acetylation of chitosan by UV spectrophotometry using dual standards. **Carbohydrates Research**, v. 341, p.782-785, 2006.

MA, G.; YANG, D.; SU, D.; UM, X.; KENNEDY, J. F.; NIE, J. Preparation and properties of water-soluble chitosan and polyvinyl alcohol blend films as potencial bone tissue engineering matrix. **Polymers Advanced Technology**, v.21, p.189-195, 2009.

MÁRQUEZ, A. A. Los materiales y su compatibilidad: hidroxiapatita. **Materiales Avanzados**, n.4, p.43-48, 2005.

MAZEAU, K.; WINTER, W. T; CHANZY, H. Molecular and crystal structure of a high-temperature polymorph of chitosan from electron diffraction data. **Macromolecules**, v.27, p.7606-7612, 1994.

MONTEIRO JR., O. A. C.; AIROLDI, C. Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interactions in a homogeneous system. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 26, p.119-128, 1999.

NETO, C. G. da T. **Membranas de quitosana micro e macroporosas: preparo, caracterização e estudos de permeabilidade**. 2008. 128p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.

NGAH, W. S. W.; KAMARI, A.; KOAY, Y. J. Equilibrium and kinetics studies of adsorption of copper (II) on chitosan and chitosan/PVA beads. **Biological Macromolecules**, v.34, p.155-161, 2004.

OGAWA, K. Effect of heating na aqueous suspension of chitosan on the crystallinity and polymorphs. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, n.9, p.2375-2379, 1991.

OGAWA, K.; YUI, T.; OKUYAMA, K. Three D structures of chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 34, p.1-8, 2004.

OKUYAMA, K.; NOGUCHI, K.; MIYAZAWA, T. Molecular and crystal structure of hydrated chitosan. **Macromolecules**, v. 30, p.5849-5855, 1997.

ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. de M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006, 538p.

OSAWA, C. C.; GONÇALVES, L. A. G.; RAGAZZI, S. Titulação potenciométrica aplicada na determinação de ácidos graxos livres de óleos e gorduras comestíveis. **Química Nova**, v.29, n.3, p.593-599, 2006.

PARK, J.; LAKES, R. S. **Biomaterials: an introduction**. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Springer, 2007. 561p.

PASCHOAL, L. R.; FERREIRA, W. A.; PRADO, M. R. D.; VILELA, A. P. O. Aplicação do método da espectrofotometria de derivadas na identificação e doseamento simultâneo de sistemas multicomponentes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.39, n.1, 2003.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 700p.

PEDRONI, V. I.; GSCHAIDER, M. E.; SCHULZ, P. C. UV spectrophotometry: improvements in the study of the degree of acetylation of chitosan. **Macromolecular Bioscience**, v. 3, p.531-534, 2003.

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

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

RANGEL-MENDEZ, J. R.; ESCOBAR-BARRIOS, V. A.; DAVILA-RODRIGUEZ, J. L. Chitin based biocomposites for removal of contaminants from water: a case study of fluoride adsorption. InTech: **Biopolymers**, p.163-180, 2010.

RAO, S. B.; SHARMA, C. P. Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.34, p.21-28, 1997.

RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine**. 2<sup>nd</sup> ed. San Diego: Elsevier, 2004. 831p.

REN, D.; YI, H.; WANG, W.; MA, X. The enzymatic degradation and swelling properties of chitosan matrices with different degrees of N-acetylation. **Carbohydrate Research**, v. 340, p.2403-2410, 2005.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v.31, p.603-632, 2006.

SANTOS, J. E dos. **Preparação, caracterização e estudos termoanalíticos de bases de Schiff biopoliméricas e seus complexos de cobre**. 2004. 112f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

SCHWENDICKE, F. **Peptidische Inhibitoren einer Filarien-Chitinase: selection und charakterisierung**. 2009. 122p. Dissertação (Mestrado) – Aus dem Institut für Biochemie der Medizinischen Fakultät Charité Universitätsmedizin Berlin, Pasewalk, 2009.

SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R. dos; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v.29, n. 4, p.776-785, 2006.

SILVA, R. M.; SILVA, G. A.; COUTINHO, O. P.; MANO, J. F.; REIS, R. L. Preparation and characterization in simulated body conditions of glutaraldehyde crosslinked chitosan membranes. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.15, p. 1105-1112, 2004.

SILVA, R. M. P. da; MANO, J. F.; REIS, R. L. Straightforward determination of the degree of n-acetylation of chitosan by means of first-derivative UV spectrophotometry. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v.209, p.1463-1472, 2008.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Analytical chemistry: an introduction**. 7th. EUA: Thomson Learnig Brooks/Cole, 2000.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de química analítica**. São Paulo: Cengage Learning, 2006.

SUH, J.-K. F.; MATTHEW, H. W. T. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. **Biomaterials**, v.21, p.2589-2598, 2000.

SWEIDAN, K.; JABER, A.; AL-JABOUR, N.; OBAIDAT, R.; AL-REMAWI, M.; BADWAN, A. Further investigation on the degree of deacetylation of chitosan determined by potenciométrica titration. **Journal of Excipients and Food Chemicals**, v.2, n.1, p.16-25, 2011.

TAN, S. C.; KHOR, E.; TAN, T. K.; WONG, S. M. The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of determination. **Talanta**, v.45, p.713-719, 1998.

TONHI, E. PLEPIS, A. M. de G. Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 943-948, 2002.

TORRES, M. A.; VIEIRA, R. S.; BEPPU, M. M.; SANTANA, C. C. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.15, n. 4, p. 306-312, 2005.

TRIPATHI, S.; MEHROTRA, G. H.; DUTTA, P. K. Physicochemical and bioactivity of cross-linked chitosan-PVA film for food packaging applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.45, p.372-376, 2009.

TRUNG, T. S.; THEIN-HAN, W. W.; QUI, N. T.; NG, C.-H.; STEVENS, W. F. Functional characteristics of shrimp chitosan and its membranes as affected by the degree of deacetylation. **Bioresource Technology**, v. 97, p.659-663, 2006.

TUZLAKOGLU, K.; ALVES, C. M.; MANO, J. F.; REIS, R. L. Production and characterization of chitosan fibers and 3-D fiber mesh scaffold for tissue engineering applications. **Macromolecular Bioscience**, v.4, p.811-819, 2004.

VELDE, K. V. de; KIEKENS, P. Structure analysis and degree of substitution of chitin, chitosan and dibutylchitin by FTIR spectroscopy and solid state <sup>13</sup>C NMR. **Carbohydrate Polymers**, v.58, p.409-416, 2004.

VINSOVA, J.; VAVRIKOVA, E. Recent advances in drugs and prodrugs design of chitosan. **Current Pharmaceutical Design**, v.14, p.1311-1326, 2008.

WAN, Y.; CREBER, K. A. M.; PEPPLEY, B.; BUI, V. T. Ionic conductivity of chitosan membranes. **Polymer**, v.44, p.10-57-1065, 2003.

WANG, T.; TURHAN, M.; GUNASEKARAN, S. Selected properties of pH-sensitive, biodegradable chitosan-poly(vinyl alcohol) hydrogel. **Polymer International**, v.53, p.911-918, 2004.

WU, F.C.; TSENG, R.-L.; JUANG, R.-S. A review and experimental verification of using chitosan and its derivatives as adsorbents for selected heavy metals. **Journal of Environmental Management**, v.xxx, p.1-9, 2009.

WU, J.; WEI, W.; WANG, L.-Y.; SU, Z.-G.; MA, G.-H. A thermosensitive hydrogel based on quaternized chitosan and poly(ethylene glycol) for nasal drug delivery system. **Biomaterials**, v.28, p.2220-2232, 2007.

WU, T.; ZIVANOVIC, S. Determination of the degree of acetylation (DA) of chitin and chitosan by an improved first derivative UV method. **Carbohydrate Polymers**, v.73, p.248-253, 2008.

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

ZHANG, H.; NEAU, S. H. In vitro degradation of chitosan by bacterial enzymes from rat cecal and colonic contents. **Biomaterials**, v.23, p.2761-2766, 2002.

ZHANG, Y.; H. XIAOBO, H.; DUAN, B.; WU, L.; LI, S.; YUAN, X. Preparation of electrospun chitosan/poly(vinyl alcohol) membranes. **Colloid and Polymer Science**, v. 285, p. 855-863, 2007.

ZHANG, Y.; XUE, C.; XUE, Y.; GAO, R.; ZHANG, X. Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction. **Carbohydrate Research**, v. 340, p.1914-1917, 2005.

ZHANG, Y.; ZHANG, X.; DING, R.; ZHANG, J.; LIU, J. Determination of the degree of deacetylation of chitosan by potentiometric titration preceded by enzymatic pretreatment. **Carbohydrate Polymers**, v.83, p.813-817, 2011.