

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
GRUPO DE POLÍMEROS BERNHARD GROSS

ADRIANA PAVINATTO

**EFEITO DE CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DA QUITOSANA
SOBRE SUA INTERAÇÃO COM FILMES DE LANGMUIR COMO
MODELO DE BIOMEMBRANA**

SÃO CARLOS

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ADRIANA PAVINATTO

**EFEITO DE CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DA QUITOSANA
SOBRE SUA INTERAÇÃO COM FILMES DE LANGMUIR COMO
MODELO DE BIOMEMBRANA**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em Ciência e
Engenharia de Materiais, da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Mestre
em Ciência e Engenharia de Materiais.

Área de Concentração: Desenvolvimento,
Caracterização e Aplicação dos Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Jr.

São Carlos

2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação IFSC/USP

Pavinatto, Adriana.

Efeito de características estruturais da quitosana sobre sua interação com filmes de Langmuir como modelo de biomembrana / Adriana Pavinatto; orientador Osvaldo Novais de Oliveira Jr.-- São Carlos, 2009.

105 p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Interunidades Ciência e Engenharia de Materiais. Área de Concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais) – Escola de Engenharia de São Carlos, Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo.

1. Filmes de Langmuir. 2. Quitosana. 3. DMPA. 4. Modelos de membrana. I. Título.

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos amores
da minha vida; à Deus, meus pais
Antonio Tadeu e Maria Benedita,
meu irmão Felipe e ao meu
namorado Mardoqueu.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Júnior pela orientação e ao Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana-Filho pela co-orientação. Agradeço pelos ensinamentos, amizade e por sempre acreditarem no meu trabalho.

Em especial, agradeço ao Felipe José Pavinatto pela co-orientação no trabalho, pelos ensinamentos, pela amizade, por ser meu exemplo e querido irmão.

Ao Jorge Augusto de Moura Delezuk e a Dr. Débora Balogh, pelo auxílio no trabalho e pela amizade.

Aos meus pais Antonio Tadeu Pavinatto e Maria Benedita Silveira Pavinatto, pela educação, pelo apoio e por serem os melhores pais do mundo. Ao meu namorado Mardoqueu Martins da Costa pelo companheirismo e amor. A Thatyane Morimoto Nobre pelas discussões e dicas durante o trabalho e pela amizade. A todos os meus familiares e amigos pelo carinho e apoio.

Aos amigos do Grupo de Polímeros Bernhard Gross e em especial aos amigos da sala 18C: Analine, André, Andrei, Alexandre, Juliana, Rafael, Rodrigo Pagliai, Rodrigo (Guidoval), Valquíria, Vananélia e Washington, pela amizade, convívio, e por momentos de ajuda e distração.

Aos amigos do grupo de Físico-Química Orgânica, do Instituto de Química de São Carlos, pela amizade e acolhimento.

A Rosângela, Níbio, Bertho, Ademir, Felipe, Débora e Maria pelo indispensável apoio técnico e amizade.

A Deus pela vida, direção, proteção e sustentação. A Ele toda honra e toda glória.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

PAVINATTO, A. **Efeito de características estruturais da quitosana sobre sua interação com filmes de Langmuir como modelo de biomembrana.** 2009. 105 p. Dissertação (mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

As quitosanas são polissacarídeos usados em medicina, farmácia, odontologia e na inibição do crescimento de microrganismos, como agente bactericida. Nessas aplicações sua ação deve depender da interação com membranas celulares, o que é difícil de verificar uma vez que não se isola uma membrana facilmente. Uma alternativa é investigar a interação com modelos de membrana, como um filme de Langmuir de fosfolipídios, a partir do qual é possível obter informações no nível molecular. Nesta dissertação, é avaliada a influência do conteúdo médio de unidades N-acetilglucosamina (GlcNAc) de quitosanas e da massa molecular na interação com filmes de Langmuir do ácido fosfatídico de dipalmitoíla (DMPA). Quitosanas com diferentes graus médios de acetilação e de baixa massa molecular foram produzidas com auxílio de ultrassom de alta intensidade. As quitosanas afetam as isotermas de pressão e potencial de superfície em grandes áreas por molécula, em virtude de interações eletrostáticas e hidrofóbicas com o DMPA. Nos filmes condensados, localizam-se na subsuperfície, com pouco efeito nas isotermas. A quitosana com menos grupos GlcNAc induziu alterações maiores nas isotermas de pressão de superfície e na elasticidade dos filmes, provavelmente devido à maior interação eletrostática com um número maior de grupos amina na quitosana interagindo com as cabeças polares do DMPA. A quitosana com baixa massa molecular foi a mais eficaz para alterar as propriedades dos filmes de DMPA, o que pode ser atribuído à facilidade na adsorção. Um tamanho mínimo de cadeia parece ser essencial, entretanto, pois misturas das unidades repetitivas N-acetilglucosamina (GlcNAc) e glucosamina (GlcN) praticamente não alteraram as isotermas de pressão e a elasticidade dos filmes de DMPA, pela ausência de interações hidrofóbicas. Concluímos que quitosanas com grau de acetilação e massa molecular baixos têm efeitos maiores sobre um modelo de membrana e devem ser mais adequadas em aplicações biológicas que dependam dessa interação.

Palavras-chave: filmes de Langmuir, quitosana, DMPA, modelos de membrana

ABSTRACT

PAVINATTO, A. **Effects from the structural characteristics of chitosan on its interaction in Langmuir films as biomembrane models.** 2009. 105 p Dissertação (mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Chitosans are polysaccharides used in medicine, pharmacy, dentistry and in the inhibition of microorganisms growth (eg. as bactericidal agent). In these applications their action should depend on the interaction with cell membranes, which is difficult to verify because isolating a membrane is not easy. An alternative is to investigate the interaction with membrane models, such as a Langmuir film of phospholipids, from which information on the molecular level can be obtained. This dissertation evaluates the influence of the average content of N-acetylglucosamine units (GlcNAc) of chitosan and molecular interaction with Langmuir films of dipalmitoyl phosphatidic acid (DMPA). Chitosans with different average degrees of acetylation and low molecular weight were produced with the high-intensity ultrasound procedure. Chitosans affect the surface pressure and surface potential isotherms at large areas per molecule due to electrostatic and hydrophobic interactions with DMPA. In condensed films, they are located in the subsurface with little effect on the isotherms. The chitosan with fewer GLcNAc groups induced larger changes in the isotherms and in the film elasticity, probably due to stronger electrostatic interaction owing to a larger number of amine groups in chitosan interacting with the polar heads of DMPA. The most effective sample to induce changes in the DMPA monolayers was the low molecular weight chitosan, which can be attributed to the ease of adsorption. A minimum size chain seems essential, however, for mixtures of repeating units N-acetylglucosamine (GlcNAc) and glucosamine (GlcN) did not change the surface pressure isotherms and the elasticity of the DMPA films, owing to the absence of hydrophobic interactions. We conclude that the chitosan with better prospects for biological applications relying on the cell membrane interaction should have a low degree of acetylation and low molecular weight.

Keywords: Langmuir films, chitosan, DMPA, membrane models

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação das estruturas primárias idealizadas de quitina e quitosana, onde n é o grau de polimerização.	24
Figura 2 - Representação das ligações de hidrogênio intramoleculares nas cadeias de quitina (a) e intermoleculares (b) no arranjo antiparalelo das cadeias de α -quitina.	26
Figura 3 - Representação da ligação de hidrogênio intermolecular no arranjo paralelo das cadeias de β -quitina.	27
Figura 4 - Esquema das estruturas polimórficas de quitina. As setas representam as cadeias poliméricas no sentido do terminal não-redutor para o redutor.	28
Figura 5 - Propagação do ultrassom no líquido com formação e colapso de bolhas de cavitação ⁽⁴⁰⁾	31
Figura 6 - (a) Hidrólise ácida do grupo acetil; (b) Hidrólise ácida da ligação glicosídica, resultando em quebra da cadeia.....	34
Figura 7 - Isoterma de π -A para o ácido esteárico, e ilustração da estruturação das moléculas no filme durante os diferentes estágios de compressão. (•) = cabeça hidrofóbica e (I) cauda hidrofóbica.	37
Figura 8 - Esquema de formação de um filme Langmuir-Blodgett (LB).....	38
Figura 9 - Gládio de lula.	41
Figura 10 - Espécies: <i>Loligo plei</i> e <i>Loligo sp.</i>	42
Figura 11 - Localização do gládio na lula.	42
Figura 12 - Esquema experimental para as reações de desacetilação com 1) sonotrodo e 2) reator de vidro encamisado.....	44
Figura 13 - Espectro de RMN H^1 característico de quitosana, onde $R = COCH_3$ ou $R = H$ ⁽⁷⁸⁾	49
Figura 14 - Espectro no infravermelho para amostras de β -quitina, Q9_30_60 e 2XQ5_50_60.	55
Figura 15 - Espectro de RMN H^1 da amostra 2XQ5_50_60.	57
Figura 16 - Curva de titulação condutimétrica da amostra 2XQ5_50_60.....	58
Figura 17 - Cromatograma de distribuição de massas das amostras (a) 2XQ5_50_60 e (b) Q9_30_60.....	62
Figura 18 - Difrátogramas das amostras de β -quitina, 2XQ5_50_60 e Q9_30_60.....	64
Figura 19 - Micrografias das amostras (a) β -quitina e (b) 2XQ5_50_60, com ampliação de 75X.	65

Figura 20 -Micrografias das amostras (a) β -quitina e (b) 2XQ5_50_60, com ampliação de 5000X.	66
Figura 21 - Cromatografia de distribuição de massas da amostra QBMM.	68
Figura 22 - Cromatogramas com a distribuição de massas das amostras 2XQ5_50_60 e QBMM.....	69
Figura 23 - Espectro no infravermelho da amostra QBMM.....	70
Figura 24 - Espectro de H^1 -RMN da amostra QBMM.	71
Figura 25 - Isotermas de pressão (a) e de potencial de superfície (b) de monocamadas de DMPA puro e de DMPA sobre subfase contendo Q6 em diferentes concentrações.....	74
Figura 26 - Isotermas de pressão (a) e de potencial de superfície (b) de monocamadas de DMPA puro e de DMPA sobre subfase contendo Q27 em diferentes concentrações.....	76
Figura 27 - Comparativo da área por molécula de fosfolipídio (monocamadas de DMPA), na pressão de 10 mN/m, em função da concentração de Q6 e Q27 na subfase.....	77
Figura 28 - Área por molécula de fosfolipídio (monocamadas de DMPA), na pressão de 40 mN/m, em função da concentração de Q6 e Q27 na subfase.	78
Figura 29 - Módulo de elasticidade para filmes de Langmuir de DMPA sobre subfases contendo Q6 (a) e Q27 (b).....	79
Figura 30 - Isotermas de pressão (a) e de potencial de superfície (b) de monocamadas de DMPA puro e de DMPA sobre subfase contendo M6 em diferentes concentrações.....	82
Figura 31 - Isotermas de pressão (a) e de potencial de superfície (b) de monocamadas de DMPA puro e de DMPA sobre subfase contendo M27 em diferentes concentrações.....	84
Figura 32 - Isotermas de pressão (a) e de potencial de superfície (b) de monocamadas de DMPA puro e de DMPA sobre subfase contendo QBMM em diferentes concentrações.....	87
Figura 33 - Comparativo da área por molécula de fosfolipídio (monocamadas de DMPA), na pressão de 10 mN/m, em função da concentração de M6, Q6 ou QBMM na subfase.	88
Figura 34 - Módulo de elasticidade para as amostras M6 (a), M27 (b) e QBMM (c).....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Porcentagem de diferentes compostos de alguns resíduos da indústria pesqueira 22

Tabela 2 - Bandas de absorção e números de onda ($\bar{\nu}$ cm⁻¹) característicos de quitina e quitosana ⁽²⁹⁾ 47

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

GlcNAc - 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranoose;

GlcN - 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranoose;

FPT - “Freeze - pump out - thaw”;

\overline{GA} - Grau médio de acetilação;

\overline{M}_v - Massa molar média viscosimétrica;

\overline{M}_n - Massa molar média numérica;

\overline{M}_w - Massa molar média ponderal;

$\overline{M}_w / \overline{M}_n$ - Polidispersividade;

MEV - Microscopia eletrônica de varredura;

GPC - Cromatografia de permeação em gel;

FTIR – Espectroscopia na região do infravermelho

RMN H1 - Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio;

QBMM – Quitosana de baixa massa molecular.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 QUITINA E QUITOSANA	21
1.1.1 Características Físico-Químicas de Quitina e Quitosana	23
1.1.2 Obtenção de quitina.....	28
1.1.3 Métodos de desacetilação de quitina e produção de quitosana	29
1.1.4 Utilização do Ultrassom de Alta Intensidade	30
1.2 OLIGÔMEROS DE QUITOSANA	33
1.3 FILMES DE LANGMUIR E LANGMUIR BLODGETT (LB)	35
1.3.1 Filmes de Langmuir como modelos de membrana	38
2 OBJETIVOS.....	40
3 MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1 OBTENÇÃO DE B-QUITINA.....	41
3.2 PRODUÇÃO DE QUITOSANA ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE ALTA INTENSIDADE	43
3.3 PRODUÇÃO DE QUITOSANA DE BAIXA MASSA MOLECULAR E OLIGÔMEROS DE QUITOSANA ASSISTIDA POR ULTRASSOM	45
3.4 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS	46
3.4.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho.....	46
3.4.2 Grau Médio de Acetilação ($\overline{\%GA}$).....	47
3.4.3 Titulação condutimétrica	47
3.4.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (H^1 -RMN).....	48
3.4.5 Determinação da Massa Molar Média Viscosimétrica de Quitosana	49
3.4.6 Determinação da Massa Molar Média por Cromatografia de permeação em gel (GPC)	50
3.4.7 Difração de Raios X.....	51

3.4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	51
3.5 ESTUDOS DA INTERAÇÃO DA QUITOSANA COM ALTA E BAIXA MASSA MOLECULAR E UNIDADES REPETITIVAS DE QUITOSANA COM FILMES DE LANGMUIR DE FOSFOLIPÍDIO.....	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1 EXTRAÇÃO DA B-QUITINA.....	53
4.2 OBTENÇÃO DE QUITOSANA ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE ALTA INTENSIDADE	53
4.2.1 Caracterizações.....	54
4.2.1.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR).....	54
4.2.1.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN H^1)	56
4.2.1.3 Titulação Condutimétrica	58
4.2.1.4 Viscosimetria Capilar	59
4.2.1.5 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)	60
4.2.1.6 Difração de raios X.....	63
4.2.1.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	64
4.3 OBTENÇÃO DE QUITOSANA DE BAIXA MASSA MOLECULAR E OLIGÔMEROS DE QUITOSANA	67
4.4 ESTUDOS DA INTERAÇÃO DE QUITOSANA, UNIDADES REPETITIVAS DE QUITOSANA E QUITOSANA DE BAIXA MASSA MOLECULAR COM FILMES DE LANGMUIR DE FOSFOLIPÍDIOS	72
4.4.1 Estudo da influência do grau de acetilação de quitosana em modelos de membrana celular....	72
4.4.1.1 Isotermas de pressão de superfície e potencial de superfície	72
4.4.1.2 Elasticidade no plano.....	78
4.4.1.3 Conclusões.....	80
4.4.2 Influência da massa molecular de quitosana sobre modelos de membrana celular	80
4.4.2.1 Isotermas de pressão e potencial de superfície	81
4.4.2.2. Elasticidade no plano.....	89
4.4.2.3 Conclusões.....	91
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	93
REFERÊNCIAS	96

1 INTRODUÇÃO

1.1 QUITINA E QUITOSANA

O polímero quitina foi isolado pela primeira vez em 1811, pelo francês Henri Braconnot, extraída de fungos superiores e por isso denominada “fungina”. O termo quitina apareceu em 1823, com Odier que a extraiu das carapaças de insetos (besouros e escaravelhos), sendo derivado do grego “chiton”, que significa túnica ou cobertura ^(1,2). É o segundo polímero mais abundante na biosfera, atrás somente da celulose. É um componente dos exoesqueletos de alguns invertebrados (insetos, crustáceos e moluscos) e de paredes celulares de alguns fungos e algas, sendo produzida por biossíntese e apresentando taxa de reposição na biosfera que é aproximadamente o dobro daquela para celulose ⁽²⁾.

Por ser extraída de exoesqueletos de crustáceos e moluscos, a quitina pode ser obtida dos resíduos da indústria pesqueira. As alterações e os fenômenos ambientais gerados pelas atividades da indústria pesqueira são decorrentes da falta de planejamento e de interesse das indústrias em adequarem-se aos procedimentos de saúde, segurança e meio ambiente ⁽³⁾. Por isso, a obtenção da quitina e quitosana a partir dos rejeitos da indústria pesqueira são de interesse econômico e ambiental. De fato, a produção desses polímeros a partir da biomassa pode contribuir para reduzir o acúmulo de resíduos no meio ambiente. Na Tabela 1 é apresentada a porcentagem média de quitina em resíduos da indústria pesqueira, além de outros compostos como proteínas, sais minerais e lipídios.

Tabela 1 – Porcentagem de diferentes compostos em alguns resíduos da indústria pesqueira

Fontes	Compostos			
	Proteínas % ^(a)	Cinzas % ^(a)	Lipídeos % ^(a)	Quitina % ^(a)
Cascas de camarões	58,0 ± 2,8	24,2 ± 0,3	1,4 ± 0,02	16,4 ± 1,8
Carapaças de lagostas	23,1	33,7	2,2	20,2
Resíduos de krill	41	23,0	11,6	24,0
Cabeças de camarões	42,0 ± 1,8	20,5 ± 0,5	2,4 ± 0,02	35,5 ± 2,1
Gládios de lulas	55,3 ± 3,1	0,9 ± 0,04	0,6 ± 0,03	43,2 ± 2,4

(a) - % em base seca

Quitosana é um polissacarídeo derivado da desacetilação da quitina. Esta é formada majoritariamente por unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcNAc) unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$, enquanto a quitosana é composta predominantemente por unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcN) unidas pelo mesmo tipo de ligação⁽¹⁾. A diferenciação entre esses dois polissacarídeos é feita pela porcentagem de unidades GlcNAc e GlcN, sendo o grau médio de acetilação (\overline{GA}) um parâmetro estrutural importante para suas propriedades físico-químicas e aplicações.

Há várias aplicações de quitosana^(3,4), devido às suas propriedades peculiares que a diferenciam de outros polímeros, como a biocompatibilidade e biodegradabilidade^(5,4), atoxicidade e atividade antimicrobiana. Outra característica importante é ser um polieletrólito linear com alta densidade de carga positiva. Isso lhe confere capacidade de aderir a superfícies carregadas negativamente, podendo interagir com proteínas⁽⁶⁾, pesticidas, corantes, íons metálicos, superfícies celulares^(7,8), e formar géis com poliânions, filmes e membranas⁽⁹⁾. Essas propriedades permitem o uso de quitosana em formulações de cosméticos⁽¹⁰⁾, cremes e loções hidratantes, em medicamentos para emagrecimento⁽¹¹⁾, em sistemas de liberação controlada de fármacos⁽¹²⁾, como agente bactericida⁽¹³⁾, como agente floculante, e no tratamento de águas. Pode também atuar na remoção de íons metálicos, e ser usada na indústria têxtil para tecidos com atividade antimicrobiana.

Também vêm sendo estudadas biomoléculas oriundas de modificações estruturais da quitosana, destacando-se a carboximetil quitosana⁽¹⁴⁾, N,N,N-trimetilquitosana⁽¹⁵⁾, e os copolímeros glicosídicos enxertados⁽¹⁶⁾. Os oligômeros com massa inferior a 10.000 g/mol

também podem ser considerados derivados de quitosana, pois são produtos de reações químicas do polímero. Os quitooligômeros em algumas situações apresentam propriedades superiores às do polímero, como na atividade antimicrobiana. Para algumas bactérias, a atividade bactericida da quitosana aumenta com a diminuição da massa molar do polímero (17,18).

1.1.1 Características Físico-Químicas de Quitina e Quitosana

O que diferencia a quitina da quitosana é a porcentagem de unidades GlcNAc (grupos acetilados) em suas cadeias. De forma geral, quando o conteúdo médio de unidades GlcNAc é menor que 40% consideramos o polímero como quitosana, e quando a porcentagem é maior que 50% denominamos o polímero como quitina. Este parâmetro é denominado grau médio de acetilação (\overline{GA}). A Figura 1 mostra uma representação das estruturas idealizadas de quitina e quitosana.

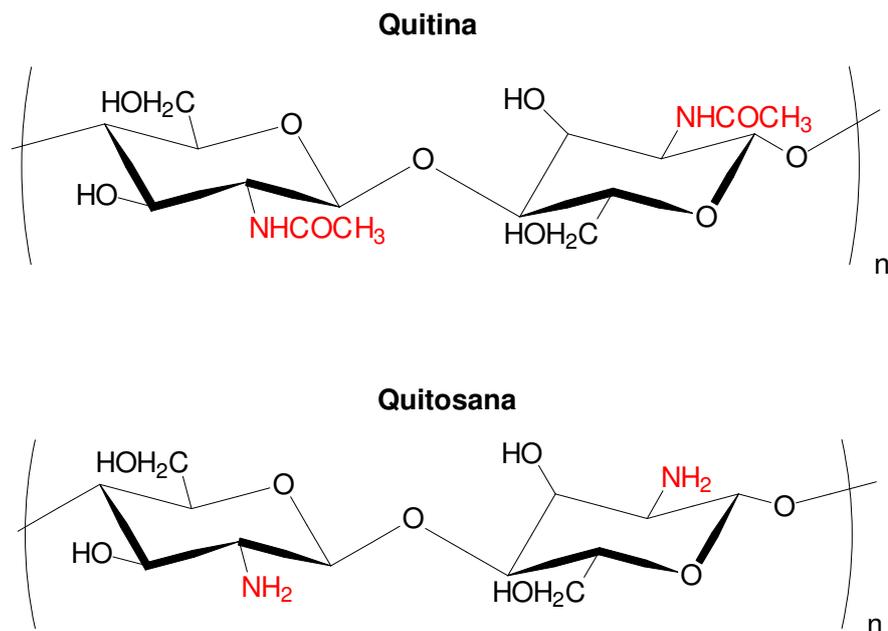


Figura 1 - Representação das estruturas primárias idealizadas de quitina e quitosana, onde n é o grau de polimerização.

Como a quitina é um produto natural, ocorrem variações estruturais em sua composição, tanto no tamanho das cadeias quanto na proporção das unidades GlcNAc e GlcN, além de diferentes distribuições dessas unidades ao longo das cadeias. Uma exceção é a quitina obtida a partir de diatomáceas (*Thalassiosira fluviales* e *Cyrtotella cryptica*), pois neste caso ocorrem exclusivamente as unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose⁽¹⁾.

A quitina é semicristalina com as cadeias organizadas em folhas (ou lamelas) paralelas. Nesses domínios cristalinos o arranjo das cadeias nas folhas possui variações. A quitina apresenta três polimorfos, denominados α , β e γ -quitina, que se diferenciam pela disposição relativa das extremidades redutora e não-redutora das cadeias nas folhas. Essas variações nos domínios cristalinos atribuem às polimorfos diferentes propriedades, devido às possibilidades de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares.

Na α -quitina as cadeias poliméricas estão antiparalelas, o que favorece ligações de hidrogênio inter e intramoleculares, além de inter e intrafolhas, resultando em um empacotamento denso. Das Figuras 2(a) e 2(b) notam-se quatro tipos de ligações de hidrogênio na estrutura da α -quitina: ligações intramoleculares O(3')-H...O(5) e O(6')-H...O(7); e ligações intermoleculares C=O(7)...H-N-C(2) e O(6)-H...O(6'). Uma vez que os grupamentos CH₂OH adotam conformações diferentes, as ligações de hidrogênio são distintas (O(6')-H...O(7) e O(6)-H...O(6')). As carbonilas dos grupamentos amida na α -quitina participam da ligação de hidrogênio intermolecular C=O(7)...H-N-C(2), sendo que uma fração

destes grupos também participa da ligação intramolecular O(6')-H...O(7). Os grupos hidroxila nos domínios cristalinos estabelecem ligações de hidrogênio, e as formadas entre cadeias de diferentes folhas são as responsáveis pela insolubilidade da α -quitina na maioria dos solventes.

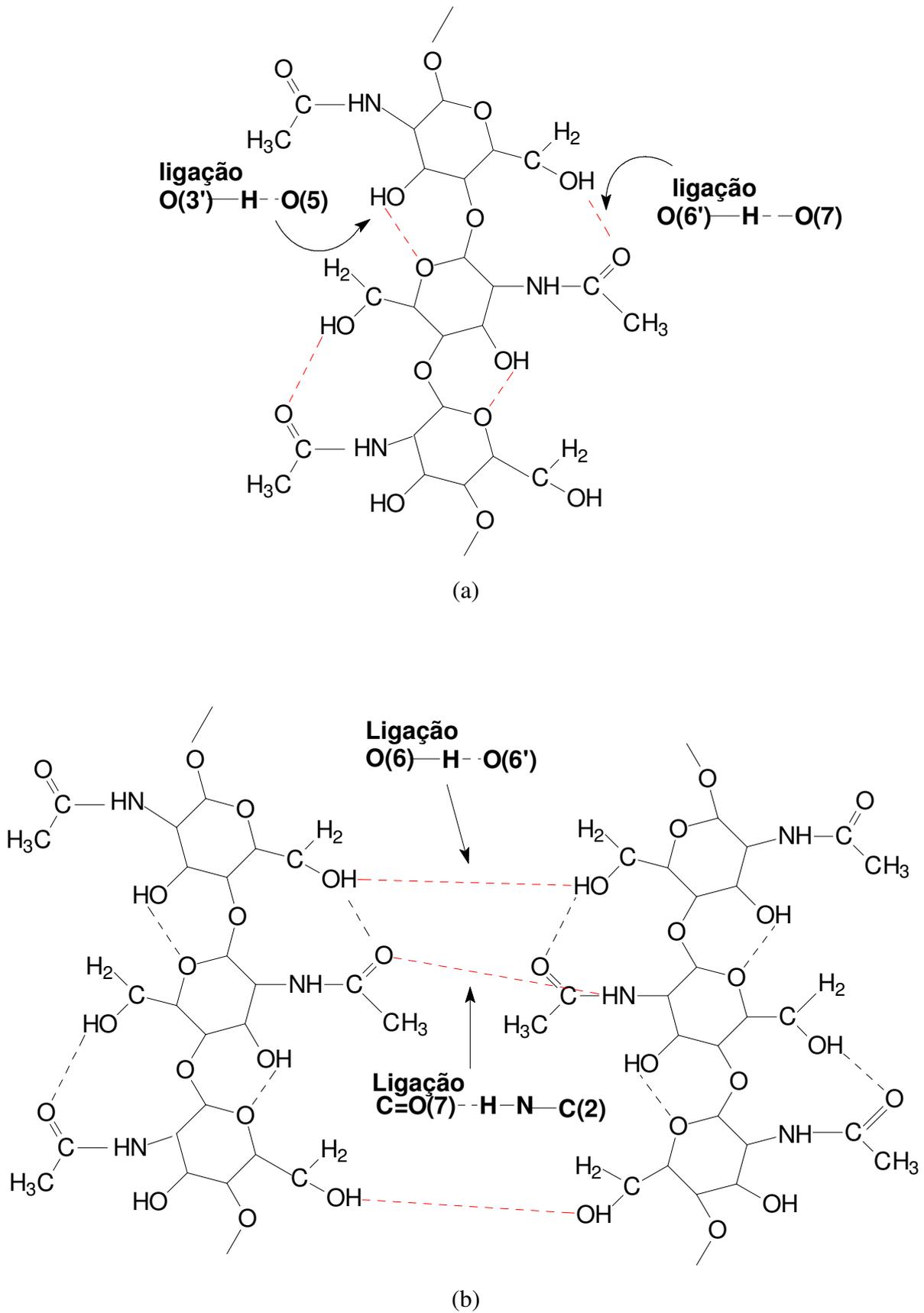


Figura 2 - Representação das ligações de hidrogênio intramoleculares nas cadeias de quitina (a) e intermoleculares (b) no arranjo antiparalelo das cadeias de α -quitina.

Na β -quitina as cadeias são paralelas, não favorecendo ligações de hidrogênio intermoleculares e interfolhas, resultando em empacotamento menos denso que para a α -quitina. Assim como na α -quitina, as cadeias da β -quitina possuem ligações intramoleculares $O(3')\text{-H}\cdots O(5)$ e $O(6')\text{-H}\cdots O(7)$, como mostrado na Figura 2(a). Apresentam também à semelhança da α -quitina, na Figura 3, ligações de hidrogênio intermoleculares $C=O(7)\cdots H\text{-N-C}(2)$. Os grupos CH_2OH formam ligações intermoleculares adicionais $O(6')\text{-H}\cdots O(7)$, unindo as cadeias na mesma folha. Devido a sua estrutura com cadeias paralelas, na β -quitina não há ligações de hidrogênio $O(6)\text{-H}\cdots O(6')$ intermoleculares entre cadeias de diferentes folhas, o que ocorre para a α -quitina. Por isso, a β -quitina exibe maior reatividade^(19,20), intumescimento em água^(21,22) e solubilidade⁽²³⁾ do que a α -quitina. Na γ -quitina a estrutura é composta por duas cadeias em disposição antiparalela intercaladas por uma cadeia paralela^(1,2). Ou seja, há uma combinação dos arranjos da α - e da β -quitina, mostrado na Figura 4, que resume as disposições das cadeias de quitina nas diferentes polimorfos⁽²⁴⁾.

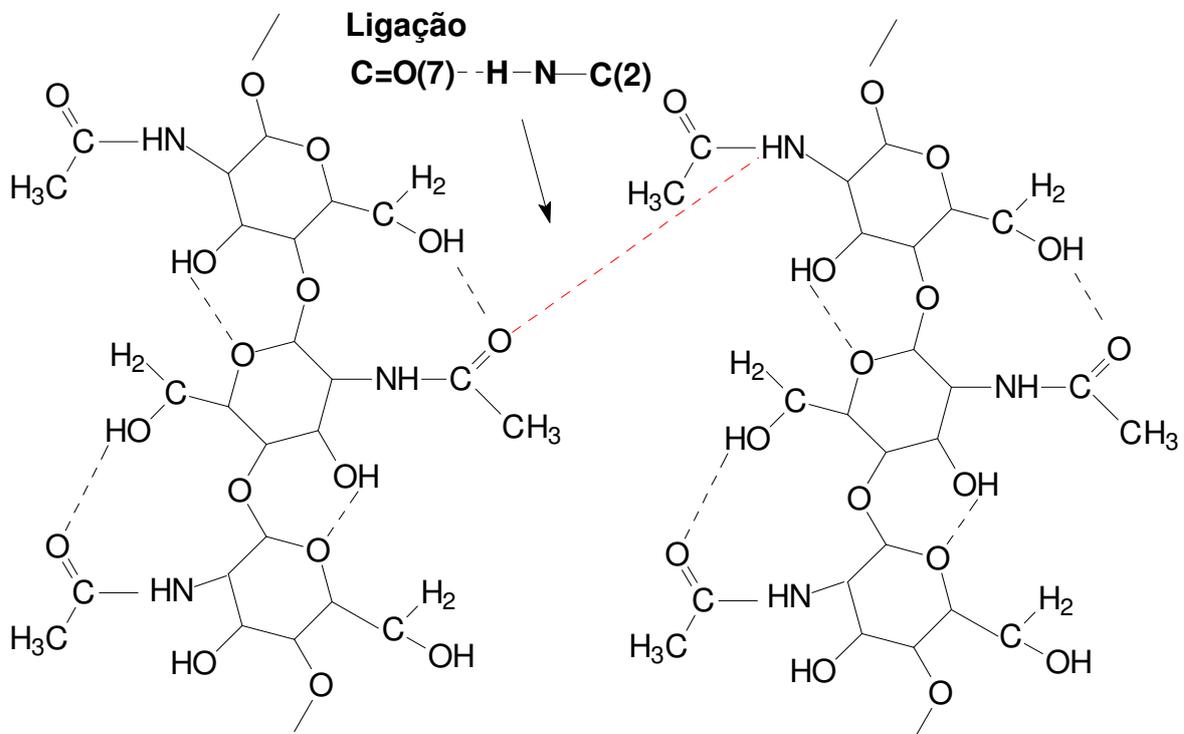


Figura 3 - Representação da ligação de hidrogênio intermolecular no arranjo paralelo das cadeias de β -quitina.

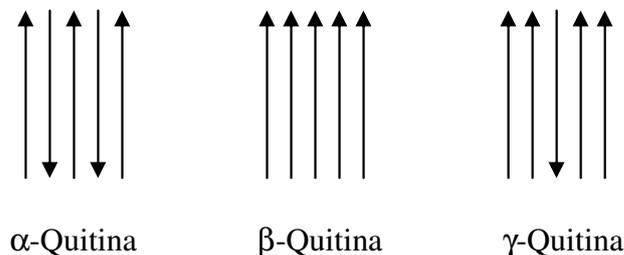


Figura 4 - Esquema das estruturas polimórficas de quitina. As setas representam as cadeias poliméricas no sentido do terminal não-redutor para o redutor.

1.1.2 Obtenção de quitina

O componente mais abundante na estrutura esquelética de muitas classes dos invertebrados é a quitina. Na indústria, a principal fonte de obtenção de quitina são as cascas de camarões e carapaças de caranguejos, que possuem além da quitina, proteínas, sais de cálcio (principalmente fosfatos e carbonatos), lipídios e pigmentos, como já comentado com a Tabela 1. Na extração da quitina a partir de cascas de camarões e carapaças de caranguejos, podem ser empregados vários procedimentos. Um dos mais comuns consiste de três etapas: desmineralização, desproteinização e despigmentação. Estas etapas servem para eliminar, respectivamente, carbonato e fosfato de cálcio e/ou magnésio, as proteínas e os pigmentos. Na desmineralização, o procedimento mais utilizado envolve soluções ácidas (HCl) para eliminar sais minerais; já a retirada das proteínas (desproteinização) é feita em soluções alcalinas. A eliminação dos pigmentos ocorre via extração por solventes orgânicos. As condições reacionais nessas etapas devem ser brandas, a fim de evitar a despolimerização e a desacetilação da quitina. Na extração da β -quitina de gládios de lula, apenas a etapa de desproteinização é necessária, pois a concentração de sais minerais e pigmentos é extremamente baixa⁽²³⁾.

1.1.3 Métodos de desacetilação de quitina e produção de quitosana

A quitosana é obtida principalmente por reação de hidrólise dos grupos acetamido da quitina, originando grupos amino, no que é conhecido como processo de desacetilação. A hidrólise das amidas pode ser feita, a princípio, tanto em condições ácidas quanto alcalinas. Entretanto, a hidrólise em meio ácido não é comum devido à susceptibilidade das ligações glicosídicas, o que desencadeia a despolimerização. Assim, geralmente a reação é realizada em solução aquosa alcalina, um processo heterogêneo que apresenta como variáveis a concentração do álcali, a temperatura e o tempo de reação. Como já mencionado, o produto da reação é denominado quitosana somente se $\overline{GA} \geq 40\%$ e, se o produto for solúvel em soluções aquosas diluídas de ácidos. Diferentemente da quitosana, a quitina é insolúvel nessas soluções ácidas, sendo solúvel apenas em solventes como N,N-dimetilacetamida/LiCl. Em soluções de ácidos diluídos a quitosana comporta-se como um polieletrólito catiônico, devido à protonação dos grupos amino das unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose.

Na desacetilação a quitosana completamente desacetilada é raramente obtida. Por isso, os polímeros gerados na desacetilação parcial de quitina são copolímeros com unidades GlcN e GlcNAc. A composição das quitosanas, quanto à porcentagem desses grupos, depende das condições da desacetilação. A massa molar média, o grau médio de acetilação e a distribuição das unidades GlcN e GlcNAc nas cadeias têm efeito marcante sobre a solubilidade da quitosana ⁽²⁵⁾. Essa solubilidade está relacionada com \overline{GA} , pois depende da quantidade de grupos aminos protonados ($-\text{NH}_3^+$) na cadeia polimérica; quanto maior a quantidade destes grupos, maior será a repulsão eletrostática entre as cadeias e maior a solubilidade ⁽¹⁾. Além disso, quanto maior a massa e maior a região da cadeia com poucos grupos GlcN, menor a solubilidade.

Nos laboratórios de pesquisa e nas indústrias, um dos métodos de desacetilação de quitina mais empregados é o tratamento com soluções concentradas de hidróxido de sódio em temperaturas elevadas por um longo período de tempo (várias horas). Nessas condições ocorre apenas a hidrólise parcial dos grupos acetamido, mas simultaneamente acentuada despolimerização. Além disso, como a reação se processa heterogeneamente, os produtos têm características estruturais não-uniformes e variações importantes de propriedades.

Outros processamentos têm sido propostos para aumentar a eficiência da reação e minimizar a despolimerização. Esses incluem: reação em atmosfera inerte⁽²⁷⁾, diluição com solventes⁽²⁸⁾, alteração nas condições de processamento com extrusão reativa⁽²⁹⁾, explosão de vapor (processo “flash”)⁽³⁰⁾, irradiação de ultrassom⁽³¹⁾ e microondas⁽³²⁾, uso de agentes redutores⁽³³⁾ e a execução de tratamentos sucessivos de desacetilação⁽³⁴⁾. Outro processo recente é o denominado como “freeze – pump out – thaw” (“FPT”). No processo uma suspensão de quitina em solução aquosa concentrada de hidróxido de sódio é submetida a sucessivos ciclos de congelamento à temperatura do nitrogênio líquido, sucção com bomba de vácuo e aquecimento lento até atingir a temperatura ambiente⁽³⁵⁾. Ao menos seis ciclos devem ser executados, como um pré-tratamento e então a suspensão de quitina é submetida à desacetilação em temperaturas no intervalo 80°C –110°C por tempos curtos (até 60 minutos). Assim, a execução de 3-4 processamentos sucessivos permite obter quitosana extensivamente desacetilada ($\overline{GA} < 0,2\%$) e de massa molar elevada ($\overline{M}_v \cong 4,5 \times 10^5$ g/mol). O processo “FPT” resulta na diminuição do tempo total de reação (entretanto se o tempo de pré-tratamento é levado em conta, o processo é mais demorado que o convencional) na produção de quitosana bastante desacetilada. Além disso, apresenta grau médio de polimerização 1,7 vezes aquele de quitosana por via de desacetilação convencional. Conforme os autores, o pré-tratamento no método “FPT” destrói as regiões cristalinas de quitina, aumentando a acessibilidade aos sítios reativos, renova a concentração das espécies mais reativas de hidróxido de sódio (mono e diidrato) no interior das partículas de quitina e exclui o oxigênio molecular do meio reacional, minimizando a despolimerização via hidrólise alcalina oxidativa⁽³⁶⁾.

1.1.4 Utilização do Ultrassom de Alta Intensidade

Ultrassom é definido como som com frequência acima da sensibilidade do ouvido humano, numa faixa de 20kHz a 100MHz. A área da Química que utiliza ultrassom em seus processos é chamada Sonoquímica^(37,38). Os principais usos da Sonoquímica são em síntese orgânica, emulsificação de soluções, degradação de polímeros, polimerização, sonoluminescência, sonólise (formação de radicais livres), formação de sonogéis e preparação de catalisadores⁽³⁹⁾.

O ultrassom é propagado via uma série de ondas de compressão e rarefação induzidas nas moléculas através do meio. A propagação dessas ondas acústicas em meios líquidos provoca cavitação. Na propagação, o líquido é submetido alternadamente à compressão e rarefação, sendo que se a energia aplicada for suficientemente elevada, durante a rarefação, ela pode superar as forças intermoleculares que mantêm a estrutura do líquido, formando bolhas cavitacionais. Estas bolhas crescerão durante os ciclos seguintes, adquirindo vapor ou gás do meio. Quando a amplitude atinge um valor crítico, dependendo da frequência, ocorre expansão súbita até que se atinja um tamanho instável e, conseqüentemente, um colapso violento, com liberação de grande quantidade de energia ⁽⁴⁰⁾. Na Figura 5 está representado um esquema do processo.

As bolhas cavitacionais colapsam em menos de 10^{-6} s durante a compressão. Segundo uma das teorias mais aceitas ^(41,42), denominada “Hot Spots”, gases e vapores nas cavidades são superaquecidos ($\cong 5000^{\circ}\text{C}$) e, ao mesmo tempo, submetidos a pressões elevadas ($\cong 2000$ atm). Quando uma bolha cavitacional colapsa, jatos de solventes são formados a velocidades elevadas, que fragmentam e limpam a superfície do particulado suspenso no meio irradiado. Diversos parâmetros influenciam a cavitação, sendo os principais: frequência, amplitude e duração da irradiação, natureza do meio líquido, temperatura e pressão externa. Para atingir os efeitos desejados com ultrassom em algum processo, uma relação entre estes parâmetros deve ser buscada.

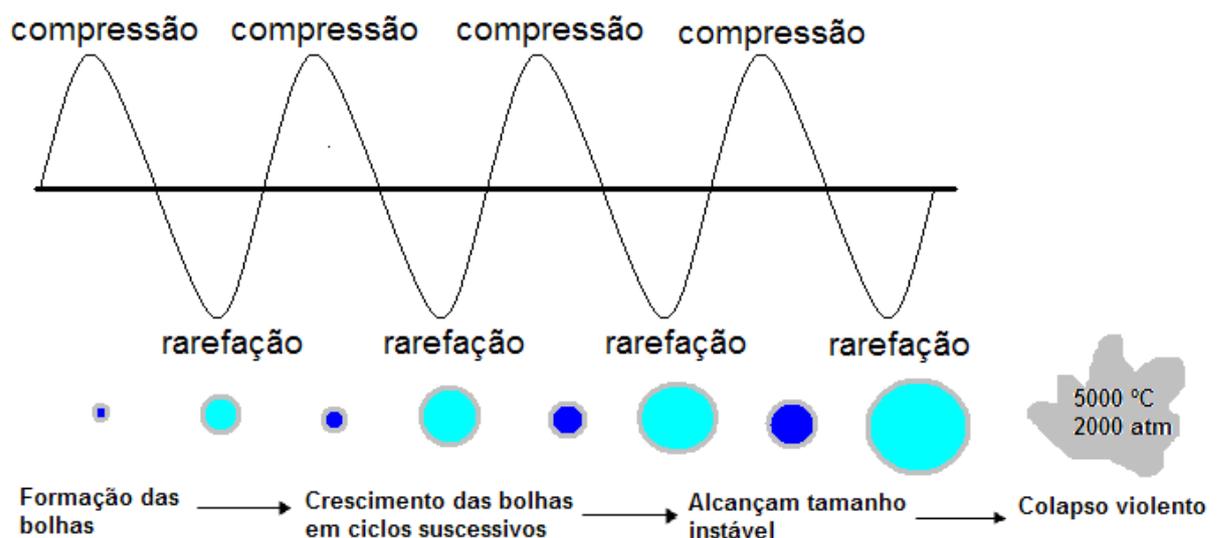


Figura 5 - Propagação do ultrassom no líquido com formação e colapso de bolhas de cavitação ⁽⁴⁰⁾.

O ultrassom de alta intensidade pode ser usado em reações químicas para facilitar o acesso a sítios reativos de difícil acesso. Esse é o caso das reações de desacetilação de quitina, nas quais o polímero em fase sólida é suspenso na fase líquida que contém hidróxido de sódio (ou outra base) responsável pela reação de hidrólise dos grupos acetamido das unidades GlcNAc de quitina. Um aumento da área superficial das partículas sólidas e do acesso aos sítios reativos é alcançado através da trituração do material via cavitação. A exposição prolongada de soluções contendo macromoléculas à radiação de ultrassom degrada os polímeros e conseqüentemente reduz a viscosidade da solução. Há evidências experimentais que essa degradação é causada por: (i) forças hidrodinâmicas da cavitação (isto é a energia de onda de choque produzida na implosão da bolha), (ii) tensão de cisalhamento na interface das bolhas pulsando, ou (iii) efeito térmico associado com efeito químico tanto da cavitação estável como da transitória⁽⁴³⁾.

Em estudos do Grupo de Físico Química Orgânica do Instituto de Química de São Carlos, USP,⁽⁴⁴⁾ o ultrassom de alta intensidade foi usado no tratamento prévio da quitina a ser desacetilada em solução de NaOH 40%, o que resultou em maior eficiência da desacetilação e quitosanas bastante desacetiladas ($\overline{GA} < 10\%$) com apenas uma etapa de reação. O tratamento prévio da quitina em suspensão aquosa com ultrassom não afetou a cristalinidade do polissacarídeo, embora tenha alterado a morfologia do material particulado^(45,31). O ultrassom também foi empregado na reação de desacetilação de quitina (suspensões aquosas de quitina em hidróxido de sódio 40% são irradiadas), ao invés de utilizá-la como pré-tratamento. O resultado foi a obtenção de quitosanas de baixo grau de acetilação ($\overline{GA} \approx 5\%$) e elevada massa molar em temperaturas mais brandas ($\cong 60^\circ\text{C}$), do que as reações de desacetilação já estudadas^(46,47). Estes resultados inovadores e com produtos com características inéditas deram origem a uma patente⁽⁴⁸⁾.

Para a quitina e quitosana, a sonicação também tem sido usada para degradar o polímero em ácido clorídrico concentrado, visando à produção de oligossacarídeos^(26,49). Neste caso a quitina é suspensa no meio ácido concentrado, que é resfriado a 5°C para minimizar a simultânea ocorrência de desacetilação. Esta suspensão é submetida à sonicação por tempos variáveis (até 3 horas) com temperatura controlada ($37\text{-}40^\circ\text{C}$) e os oligossacarídeos resultantes são isolados por cromatografia líquida de alto desempenho.

Neste trabalho, o ultrassom de alta intensidade foi usado para obter quitosana com baixo grau de acetilação e alta massa molecular, e quitosana com baixa massa molecular.

1.2 OLIGÔMEROS DE QUITOSANA

Oligômeros são cadeias com número pequeno de unidades repetitivas, podendo ser considerados também como polímeros de baixa massa molecular. São usualmente formados a partir da degradação de polímeros ou despolimerização. Para a quitosana, a cadeia polimérica pode ser despolimerizada por vários mecanismos, incluindo hidrólise ácida ⁽⁵⁰⁾, despolimerização enzimática ⁽⁵¹⁾ ou degradação por ultrassom ⁽⁴⁹⁾. Na hidrólise ácida utiliza-se principalmente HCl, num método simples com bons rendimentos. Mas não permite controlar a extensão da despolimerização e é difícil remover o ácido forte no final da reação ⁽⁵²⁾. Existem na unidade estrutural de quitosana dois grupos distintos passíveis de hidrólise via ácida: i) os grupos N-acetil da quitosana, e; ii) a ligação glicosídica da cadeia polimérica de quitosana. As reações nos dois sítios são esquematizadas na Figura 6 (a) e (b), respectivamente.

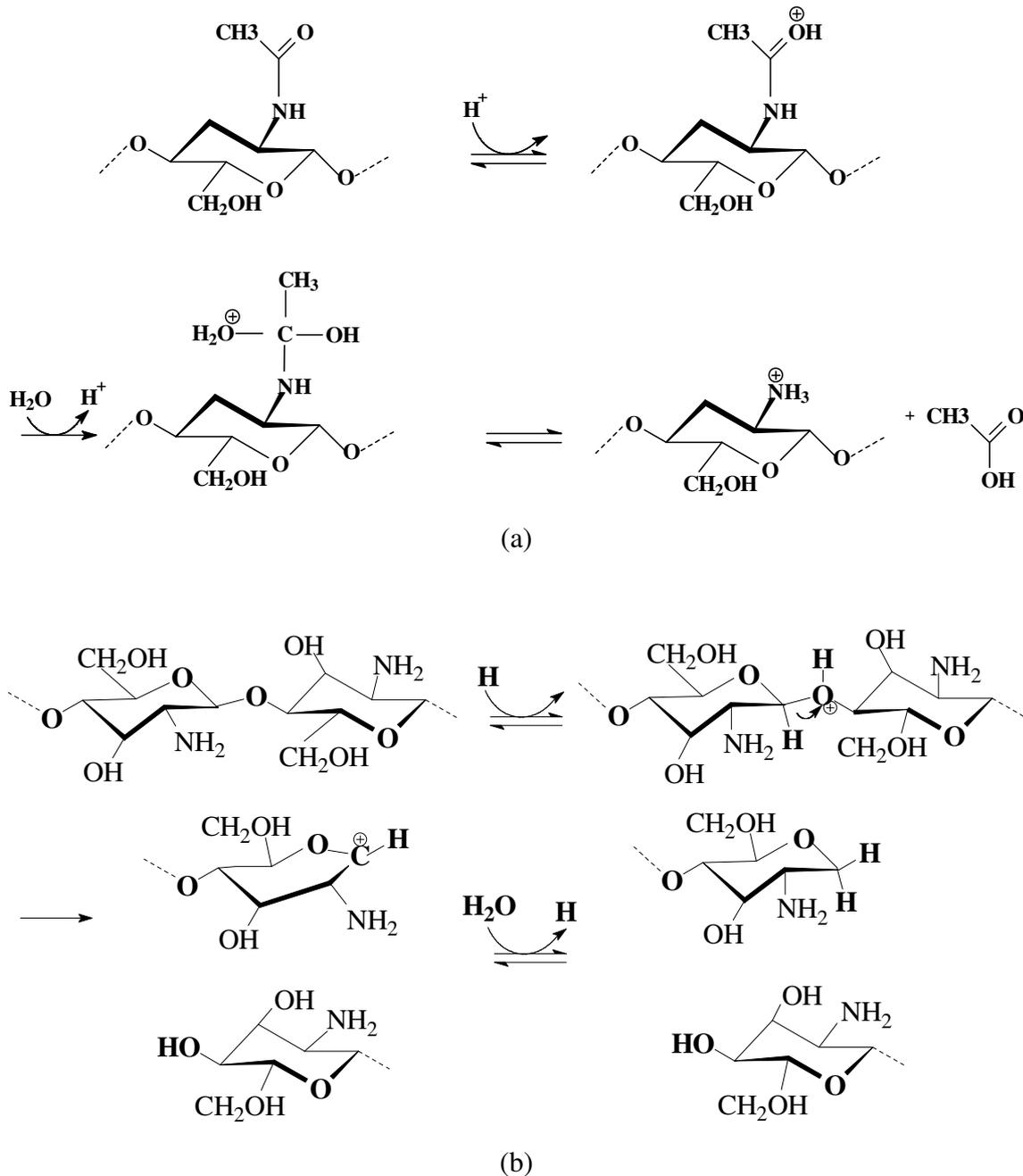


Figura 6 - (a) Hidrólise ácida do grupo acetil; (b) Hidrólise ácida da ligação glicosídica, resultando em quebra da cadeia.

Os métodos de despolimerização enzimática são específicos e facilmente controláveis, mas o uso comercial é limitado pelo alto custo e indisponibilidade de quitosanasas, enzimas para a quebra de cadeias de quitosana. Outras enzimas não específicas são estudadas, como proteases, hemicelulasas, lipases e pectinases ⁽⁵²⁾. Esses estudos estão centrados principalmente nos fatores que afetam a cinética de despolimerização enzimática, e na caracterização dos derivados de quitosanas de baixas massas moleculares. Entretanto, também

há a desvantagem da baixa disponibilidade de enzimas. A despolimerização enzimática e por hidrólise ácida requerem purificação dos produtos devido à presença de aditivos para iniciar a reação. Além disso, os produtos possuem baixa massa molecular, mas grande polidispersividade. Com o ácido nítrico a deaminação resulta na modificação das extremidades reductoras, e uma parte dessas extremidades é alterada⁽⁵³⁾.

Em estudos recentes oligômeros de quitosana foram produzidos com ultrassom de alta intensidade⁽⁴⁹⁾, em que os mecanismos foram identificados pela cinética da despolimerização. Se controladas as condições experimentais torna-se possível obter oligômeros de quitosana com grau de polimerização preciso e baixa polidispersividade. Em qualquer processo de despolimerização, e principalmente quando não se empregam os parâmetros reacionais bem controlados, obtêm-se produtos de alta polidispersividade, com quitosanas de baixa molecular misturadas a oligômeros. Assim, a separação dos quito-oligômeros é necessária, mas muitas vezes um processo difícil, realizado normalmente por precipitação seletiva, diálise, ultrafiltração ou por essas técnicas associadas. A análise estrutural de oligômeros de quitosana pode ser feita por técnicas de espectroscopia. Por exemplo, com espectroscopia de ressonância magnética nuclear de H^1 e C^{12} é possível obter informações sobre a redução ou não de açúcares e variações em estruturas vizinhas às terminações. A espectrometria de massa é usada para determinar a estrutura de lipoquitossacarídeos⁽⁵⁴⁾. Outras técnicas mais simples do ponto de vista experimental, como espectroscopia na região do infravermelho e titulação potenciométrica, podem ser usadas para avaliar parâmetros como a estrutura química dos oligômeros e seu grau médio de acetilação. A caracterização mais importante aplicada aos oligômeros (de qualquer material, não somente quitosana) é a de cromatografia por permeação em gel (GPC), pois é a maneira mais precisa de determinar o tamanho das cadeias após a despolimerização.

1.3 FILMES DE LANGMUIR E LANGMUIR BLODGETT (LB)

Benjamin Franklin foi o primeiro a fazer experimentos de formação de filmes na interface da água, espalhando óleo sobre ela, em 1765. Mais de um século mais tarde, em 1891 Pockels publicou seus trabalhos em que desenvolveu a técnica de confinar filmes

insolúveis entre barreiras numa cuba com água. Foi capaz de medir a relação entre a tensão superficial e a área. Em 1899, Lord Rayleigh mostrou que a tensão superficial cai acentuadamente somente quando a superfície fosse coberta com filme monomolecular. Em 1913, Sir William Hardy afirmou que as monocamadas eram formadas de materiais com uma parte hidrofóbica e outra parte hidrofílica, e que assim as moléculas poderiam ser orientadas na interface com a parte polar, hidrofílica, voltada para a água e a parte apolar, hidrofóbica, voltada para o ar. Irving Langmuir (1881-1957) em 1917 confirmou essa orientação das moléculas e explicou os fenômenos na interface ar-água, na formação dos filmes finos. Com os estudos na formação dos filmes monomoleculares na interface ar-água, Irving Langmuir foi agraciado com o prêmio Nobel de Química em 1932⁽⁵⁵⁾.

Monocamadas de Langmuir, como hoje são conhecidas, são formadas ao espalhar uma solução de um material anfifílico na interface ar-água, dando origem a um filme de espessura monomolecular⁽⁵⁶⁾. Tais filmes são preparados em cubas de Langmuir, que são compartimentos que permitem, através do fechamento de barreiras móveis, variar a área ocupada pelo filme. A variação da área permite alterar o grau de compactação da monocamada, e então as propriedades do filme podem ser estudadas por diversas técnicas para vários estágios da compressão.

Entre as técnicas para caracterização de monocamadas, as mais empregadas são as medidas de pressão (π) e potencial (ΔV) de superfície. A pressão de superfície (π) é a diminuição da tensão superficial da subfase aquosa devido à presença do filme, ou seja: $\pi = \gamma - \gamma_0$, onde γ é a tensão superficial com a presença do tensoativo, e γ_0 é a tensão superficial da água pura. O potencial de superfície (ΔV) é a diferença de potencial entre a superfície e a subfase com (ΔV_2) e sem tensoativo (ΔV_1), ou seja, $\Delta V = \Delta V_2 - \Delta V_1$. A interface ar-água é naturalmente polarizada devido à orientação espontânea das moléculas de água nas proximidades da interface, com os átomos de oxigênio voltados para o ar e os átomos de hidrogênio voltados para a água, originando uma diferença de potencial através da interface. Essa diferença de potencial varia com a presença da monocamada e depende da componente normal à interface do momento de dipolo médio das moléculas do filme, e também da reorientação e polarização das moléculas da subfase próximas à interface. Outras técnicas mais sofisticadas podem ser empregadas para caracterizar os filmes de Langmuir, incluindo microscopias e técnicas espectroscópicas.

Uma curva característica de pressão-área, obtida para o ácido esteárico (um ácido graxo), é mostrada na Figura 7. Os estados superficiais da monocamada podem ser analisados

a partir do perfil da curva e interpretados de forma análoga aos estados tridimensionais da matéria (gasoso, líquido, sólido). A relação entre as regiões da isoterma de $\pi \times A$ com a compactação das moléculas do filme também é mostrada na Figura 7. Além de ácidos graxos, fosfolípidios são moléculas ideais para a formação de filmes de Langmuir.

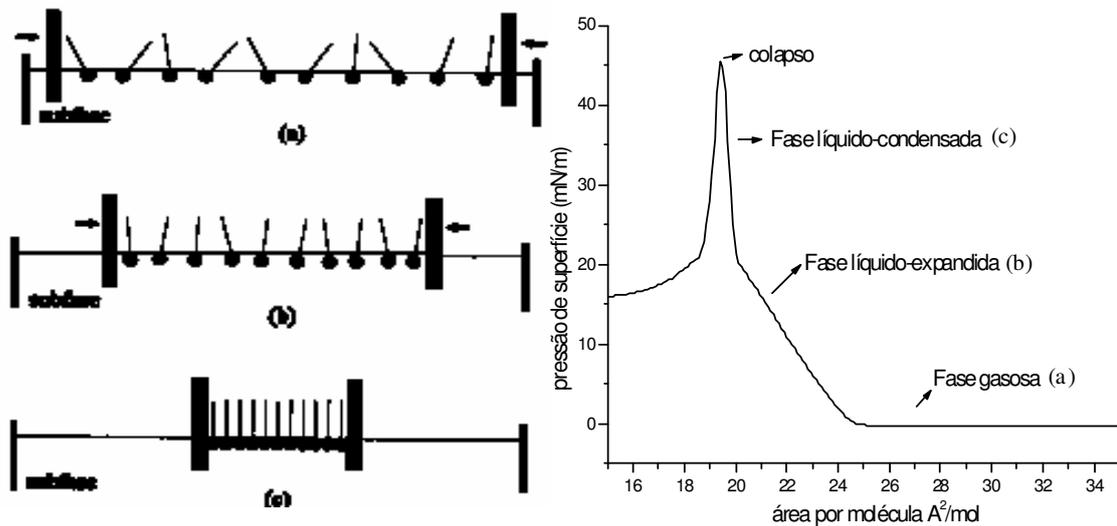


Figura 7 - Isoterma de π -A para o ácido esteárico, e ilustração da estruturação das moléculas no filme durante os diferentes estágios de compressão. (•) = cabeça hidrofóbica e (I) cauda hidrofóbica.

Em 1930, Katherine Blodgett - em colaboração com Irving Langmuir - começou testes de deposição dos filmes monomoleculares da interface ar-água para substratos sólidos, o que é hoje conhecido como filmes Langmuir-Blodgett (LB) ⁽⁵⁷⁾. Filmes LB são obtidos atravessando-se um suporte sólido perpendicularmente à interface ar-água, como ilustrado na Figura 8. Em cada imersão ou emersão na subfase aquosa uma camada é transferida para o suporte sólido ⁽⁵⁸⁾. Filmes podem então ser construídos com o número de camadas, e conseqüentemente a espessura, controlado, tendo elevado grau de orientação molecular. Para tanto, é necessário que a monocamada adquira um grau de compactação razoável (pressões usualmente acima de 20 mN/m) ⁽⁵⁸⁾.

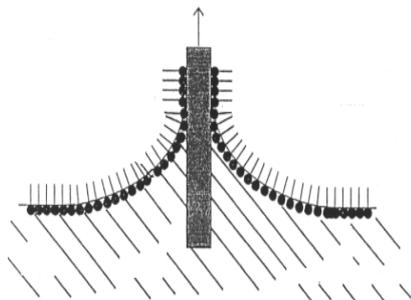


Figura 8 - Esquema de formação de um filme Langmuir-Blodgett (LB).

Em relação aos filmes de Langmuir, os filmes LB podem ser caracterizados com mais técnicas espectroscópicas e ópticas. A massa de material depositada por camada, usualmente na ordem de nanogramas, pode ser estimada com uma microbalança a cristal de quartzo (QCM). A morfologia pode ser estudada por técnicas microscópicas como microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (AFM), entre outras. Os filmes podem ser usados em diversos dispositivos ópticos e eletrônicos, bem como em sensores (59,60).

Embora as propriedades de soluções diluídas de quitosana sejam bem conhecidas, pouco tem sido investigado sobre as propriedades do polímero na interface ar-água (61,62). Isso se deve, especialmente, à falta de atividade superficial do polissacarídeo (62). Em trabalhos de nosso grupo (7,8,63,64), observou-se que a quitosana pode ter atividade superficial induzida por monocamadas de lipídios, seja com colesterol (63) ou fosfolipídios neutros e carregados negativamente (7,8). Essa atividade superficial induzida pelas moléculas de lipídios aponta para fortes interações entre os materiais, que podem ser responsáveis por algumas propriedades da quitosana.

1.3.1 Filmes de Langmuir como modelos de membrana

As membranas celulares têm como arcabouço uma bicamada fluída com espessura de 6 - 8 nm, composta por lipídios, proteínas e alguns polissacarídeos. A porcentagem de cada componente varia com o tipo de célula; nas células animais os componentes mais numerosos

são os lipídios, de 30 a 80%, as proteínas, de 20 a 60% e os polissacarídeos, de 0 a 10%^(65,66). Os lipídios na membrana incluem ácidos graxos, fosfolipídios (glicerofosfolipídios), glicolipídios (glicosil-diacilgliceróis), esfingolipídios, esteróis e lipo-polissacarídeos. Nas células animais, o tipo de lipídio mais abundante são os fosfolipídios, seguido pelos esfingolipídios. São importantes também os esteróis, especialmente o colesterol que é relevante para a estruturação e controle da fluidez das membranas^(65,66,67). Devido à dificuldade em caracterizar células diretamente, alguns sistemas que mimetizam uma membrana foram desenvolvidos. Destacam-se os lipossomos, vesículas unilamelares de diversos tamanhos, e os filmes negros de lipídios (bicamadas lipídicas aderidas a dois eletrodos espaçados de Teflon). Nesses sistemas são formadas bicamadas que permitem o estudo de mecanismos de interação de moléculas como polímeros, peptídeos, proteínas e drogas com a superfície dos filmes, podendo ser usadas também para simular fenômenos de transporte de material através da membrana^(65,66).

As monocamadas de Langmuir e os filmes LB são importantes modelos^(68,69), alternativos aos modelos de bicamadas. Os filmes de Langmuir, em especial, não mimetizam a membrana como um todo, mas modelam apenas metade dela. Possuem, entretanto, algumas vantagens: i) permitem controle rigoroso da composição das membranas; ii) permitem controle do estado de compactação, e, assim, da estruturação da monocamada, e; iii) há planaridade, que se aproxima ao formato de uma superfície celular, ao contrário de lipossomos, por exemplo, que tem grande curvatura na superfície. A formação de monocamadas traz também algumas desvantagens como a inviabilidade de estudos de transporte através da membrana e no carreamento de moléculas. Entretanto, há correlações importantes entre as monocamadas e bicamadas^(70,71). Diversos grupos de pesquisa usam filmes de Langmuir para estudar a interação de membranas com biomoléculas, tais como peptídeos⁽⁷²⁾, enzimas e polieletrólitos^(68,69). Filmes de Langmuir são utilizados neste trabalho para mimetizar uma membrana celular e estudar a interação com quitosana^(7,8,63).

2 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho é avaliar a influência do conteúdo médio de unidades N-acetilglucosamina e da massa molecular de quitosana na interação com modelos de membranas celulares. A obtenção de derivados de quitosana com diferentes graus de acetilação e de quitosana com baixa massa molecular é almejada para posterior estudo na interação com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett de fosfolipídio, mimetizando uma membrana celular.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DE B-QUITINA

Os gládios de lula mostrados na Figura 9 e usados na extração de β -quitina, também denominados penas ou plumas, foram cedidos pela empresa Miami Pescados (Cananéia/SP). As lulas são das espécies *Loligo plei* e *Loligo sampaulensis*, representadas na Figura 10, identificadas pelo Instituto de Pesca do Estado de São Paulo (base de Cananéia/SP). No detalhe na Figura 11, vê-se a região em que é localizado o gládio, composto por aproximadamente 40% de β -quitina.



Figura 9 - Gládio de lula.

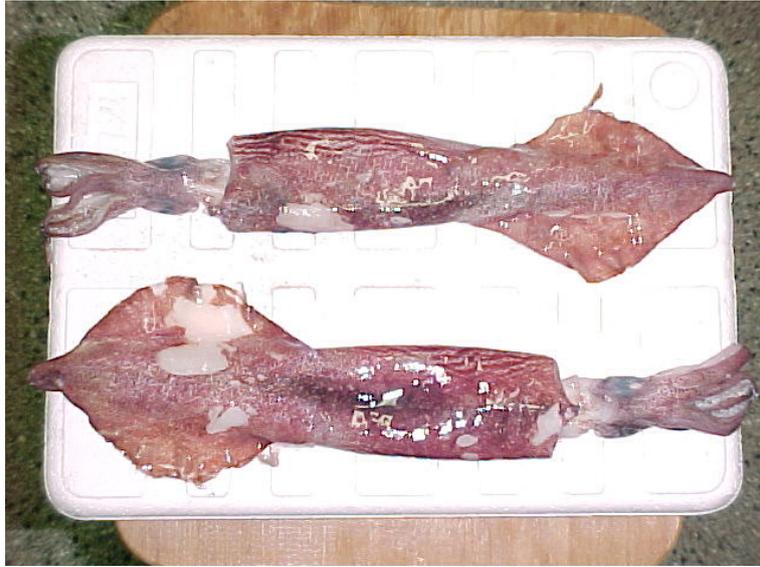


Figura 10 - Espécies: *Loligo plei* e *Loligo sp.*

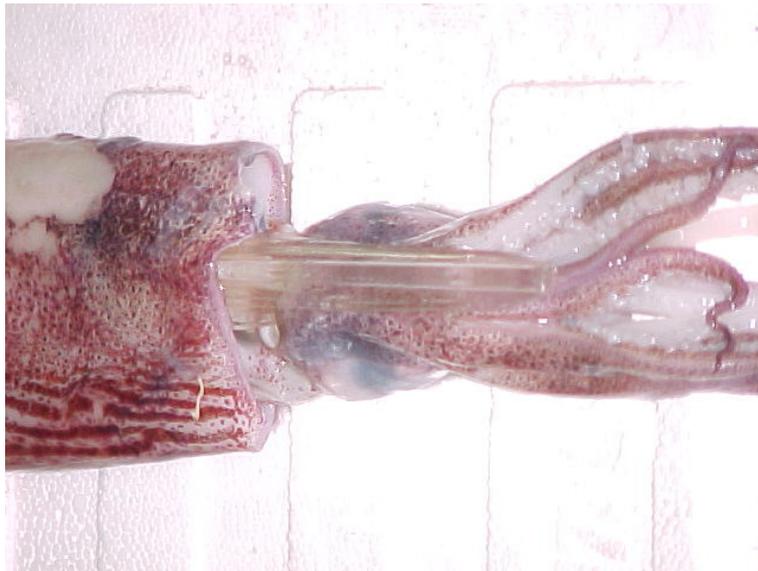


Figura 11 - Localização do gládio na lula.

Primeiramente foi feita a limpeza desses gládios lavando-os manualmente em água corrente a fim de retirar os resíduos de carne. Em seguida foram enxaguados com água destilada e secos em estufa com circulação e renovação de ar durante 24h, a 30°C. Após secos, os gládios foram moídos em um moinho (MA-048, Micromoinho de rotor vertical com facas móveis, Marconi) e depois da moagem o material foi peneirado. De acordo com Kurita e colaboradores ⁽⁷³⁾ e trabalhos do Grupo de Físico-Química Orgânica ⁽²³⁾, os gládios não

contêm sais minerais em quantidades significativas, o que permite dispensar a etapa de desmineralização. Para remover as proteínas dos gládios utilizou-se o método descrito por Chaussard ⁽⁷⁴⁾. A reação de desproteínização foi feita com 267g dos gládios moídos suspensos em 4L de uma solução aquosa de NaOH (1M) (Synth – Brasil), por 22 horas sob agitação mecânica e temperatura ambiente. A suspensão foi então filtrada e o sólido lavado com água destilada até o pH neutro. A β -quitina resultante foi seca em estufa com circulação e renovação de ar durante 24h a 30°C. Os gládios e a β -quitina foram armazenados em freezer a -20°C para evitar possível degradação enzimática.

3.2 PRODUÇÃO DE QUITOSANA ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE ALTA INTENSIDADE

Inicialmente a solução de NaOH 40% foi borbulhada com N₂ por aproximadamente 30 minutos com agitação magnética constante. A β -quitina foi suspensa em solução de NaOH 40%, e a suspensão foi transferida para um béquer dentro de uma caixa de isolamento acústico do equipamento de ultrassom (BRANSON Sonifier modelo 450, frequência de 20kHz). O sonotrodo foi imerso, com aproximadamente 2/3 do comprimento, na suspensão de β -quitina, mantida sob agitação magnética constante. Uma foto do sistema experimental está na Figura 12.

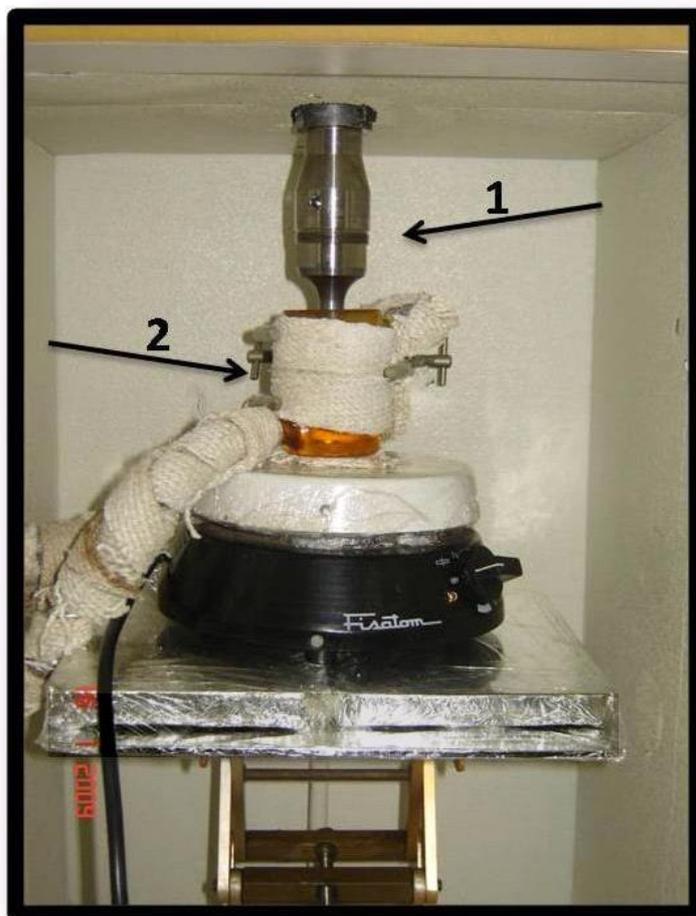


Figura 12 - Esquema experimental para as reações de desacetilação com 1) sonotrodo e 2) reator de vidro encamisado.

Nas reações variamos a intensidade do ultrassom e tempo de reação para obter produtos com diferentes graus de desacetilação. Os produtos foram nominados segundo suas condições de reação. A amostra Q9_30_60 designa a escala do equipamento de ultrassom 9 (intensidade de $32,7 \text{ W/cm}^2$), tempo de reação de 30 minutos e temperatura de 60°C . Para esta amostra utilizamos 1,1 g de β - quitina em 25 mL de NaOH. A segunda amostra, 2xQ5_50_60, passou pelo procedimento duas vezes, escala do equipamento em 5 ($16,96 \text{ W/cm}^2$), tempo de reação de 50 minutos e temperatura de 60°C , em que foram utilizados 4,4 gramas em 50 mL de NaOH.

Após o tempo de reação, o produto foi colocado em um béquer de polipropileno com cubos de gelo de água destilada e num banho com água e gelo, para interromper a desacetilação. A suspensão foi neutralizada com ácido clorídrico concentrado em pequenas

porções até pH 8,0, em seguida filtrada em filtro de pressão positiva, lavado abundantemente com etanol 80%, até que o excesso de cloreto de sódio fosse eliminado. O produto foi seco em estufa de circulação e renovação de ar durante 48h a 30°C.

3.3 PRODUÇÃO DE QUITOSANA DE BAIXA MASSA MOLECULAR E OLIGÔMEROS DE QUITOSANA ASSISTIDA POR ULTRASSOM

Na produção de oligômeros de quitosana e/ou quitosana de baixa massa molecular, utilizamos como material de partida a quitosana posteriormente produzida com grau de acetilação próximo de 6%, denominada 2XQ5_50_60. O procedimento ⁽⁷⁵⁾ utilizado foi: como um pré-tratamento 1g de quitosana foi hidratado em 180 mL de água aquecida até 60°C em agitação magnética, a dispersão foi resfriada até a temperatura ambiente. Após resfriada, 20 mL de uma solução de ácido acético 10% foram adicionados, gerando uma solução total de ácido acético 1%, que ficou em agitação por 24h. A solução foi então transferida para um béquer na caixa de isolamento acústico do equipamento de ultrassom. O sonotrodo foi imerso na solução de quitosana, mantida sob agitação magnética constante por 4h com a intensidade do ultrassom de 16,96 W/cm². A temperatura ficou em 33°C regulada por banho térmico. A sonicação era feita em 100 mL da solução por vez, respeitando o volume máximo do reator.

Após a sonicação, a solução de quitosana era transferida em membrana de diálise da marca Spectra Por, com poro de exclusão de 2kDa. A membrana foi colocada num recipiente com água destilada, sob agitação mecânica. A água foi trocada duas vezes e a solução obtida nesse recipiente, que teoricamente continha a quitosana com massa molecular menor que 2kDa (excluída pela membrana utilizada), foi liofilizada e o produto obtido. A sonicação, separação e liofilização foram realizadas repetidas vezes para aumentar o rendimento (em torno de 15%). O produto foi caracterizado por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN H¹) e cromatografia de permeação em gel (GPC).

3.4 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS

As características principais das amostras de quitosana são o grau médio de acetilação (\overline{GA}), a massa molar média ponderal (\overline{M}_w), a massa molar média viscosimétrica (\overline{M}_v), a massa molar média numérica (\overline{M}_n) e a polidispersividade ($\overline{M}_w/\overline{M}_n$). São importantes também a cristalinidade e a morfologia das quitosanas, que podem ser determinadas por difração de raios X e microscopia eletrônica de varredura (MEV), respectivamente. Tais características exercem grande influência sobre as propriedades do polímero.

3.4.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho é usada na caracterização de quitinas e quitosanas, tanto com caráter quantitativo quanto qualitativo. As bandas de absorção características são indicadas na Tabela 2. Os espectros foram obtidos com pastilhas de KBr (grau espectroscópico) na proporção de 1:100 amostra/KBr. Tanto o KBr como as amostras de quitosana foram previamente secas em estufa a vácuo a 30°C por 24 h e depois foram misturadas e trituradas em cadinho de porcelana. As amostras trituradas foram novamente secas em estufa a vácuo a 30°C, por 24h. Após este período as pastilhas foram preparadas através de prensa e novamente colocadas em estufa nas mesmas condições. As análises foram realizadas em equipamento Thermo Nicolet Nexus 470 com transformada de Fourier, com acúmulo de 48 varreduras, no intervalo de 4000 – 500cm⁻¹.

Tabela 2 - Bandas de absorção e números de onda ($\bar{\nu}$ cm⁻¹) características de quitina e quitosana ⁽²⁹⁾

Banda	$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)	Banda	$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)
Amida I (-C=O-NH ₂)	≈ 1 650 e 1 630	Amida II (-C=O-NH ₂)	≈ 1 550 e 1 560
Amida III (-C=O-NH ₂)	≈ 1 310	-N-H ₃ ⁺ (s)	≈ 3 350-3 100 e 2 100 ^t
-N-H ₂ (s)	≈ 3 250-3 350	-N-H ₂ (b)	≈ 1 590-1 630
-O-H (s)	≈ 3 450	-O-H (b)	≈ 1 260 ^j
-C-OH (s)	≈ 1 030 e 1 070	-C-H ₂ (b, sc)	≈ 1410-1 420
-NH-C(O)-C-H ₃ (s)	≈ 1 380	-NH-C(O)-C-H ₃ (b)	≈ 2 860-2 910

(a) s = estiramento ("stretching"); b = torção ("bending"); sc = ("scissor")

3.4.2 Grau Médio de Acetilação (% \bar{GA})

Os valores de grau médio de acetilação das amostras de quitosana foram determinados por titulação condutimétrica e confirmados pelos espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN H¹).

3.4.3 Titulação condutimétrica

As amostras para titulação foram preparadas com aproximadamente 100mg de quitosana, previamente seca em estufa a vácuo a 30°C, solubilizada em 50 mL de solução aquosa de HCl 0,05M e mantida sob agitação magnética constante durante 24h à temperatura ambiente. A solução foi então transferida para balão volumétrico de 110 mL e o seu volume foi ajustado com água destilada. Alíquotas de 50 mL da solução resultante foram tituladas

com solução de hidróxido de sódio 0,1M, previamente padronizada com biftalato de potássio. A neutralização da solução de quitosana foi acompanhada por medidas de condutividade com um condutivímetro modelo Handylab LF1 e titulador automático Titronic Universal, ambos da Schott-Geräte. A condutividade foi medida durante as titulações à temperatura de $25,0 \pm 0,1$ °C.

3.4.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (H^1 -RMN)

Os espectros de (RMN H^1) são úteis para determinar a estrutura química de polímeros em geral, e quitosanas em particular^(30,76). Na preparação das amostras foram dissolvidos 10 mg de quitosana em 1 mL de solução de HCl/D₂O 1% (v/v), sob agitação magnética constante, durante 24h, à temperatura ambiente. As soluções foram transferidas para tubos de quartzo (Aldrich 527-PP, $\phi = 5$ mm) e os espectros obtidos em espectrômetro BRUKER AC200 a 80°C; o pulso utilizado foi de 8,2mS (90°), acumulando 16 varreduras e o parâmetro LB (alargamento de banda) foi de 0,2Hz. Os espectros foram calibrados a partir dos sinais da água em 4,1ppm⁽⁷⁷⁾. Um espectro característico de ressonância magnética nuclear (RMN H^1) de alta resolução para a quitosana é mostrado na Figura 13.

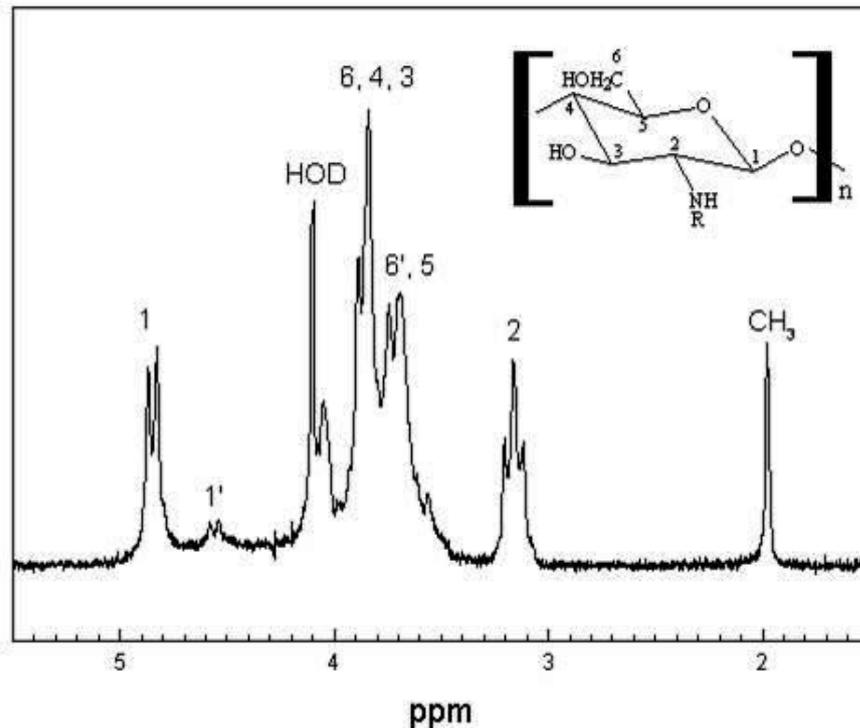


Figura 13 - Espectro de RMN H^1 característico de quitosana, onde $R = COCH_3$ ou $R = H$ ⁽⁷⁸⁾.

3.4.5 Determinação da Massa Molar Média Viscosimétrica de Quitosana

Para polieletrólitos, como uma solução de quitosana em ácido diluído ou em tampão, a viscosidade pode ser descrita como função de sua viscosidade intrínseca e de sua concentração, quando não ocorrerem interações macromoleculares (sistema diluído) e com excesso de sal. A viscosidade intrínseca ($[\eta]$), por sua vez, é determinada pela extrapolação à diluição infinita da viscosidade reduzida versus concentração. A viscosidade intrínseca satisfaz a relação de Mark-Houwink, na Equação 1, ^(79,80) e assim a massa molar média viscosimétrica (\overline{M}_v) do polieletrólito pode ser determinada.

$$[\eta] = K' \overline{M}_v^\alpha \quad (1)$$

onde K' e α são constantes para um dado solvente e temperatura.

Em especial para a quitosana, α e K' dependem do grau médio de acetilação ^(81,82). As amostras para determinar a viscosidade intrínseca foram preparadas com 20mg de quitosana dissolvidas em 25mL de solução de ácido acético 0,6M sob agitação magnética constante

durante 24h. Foram então adicionados 25mL de acetato de sódio 0,4M, e a solução permaneceu em agitação por mais 24 horas. A solução resultante foi filtrada sob pressão positiva em membrana com diâmetro de poros de 0,45 μ m (Millipore – White SCWP). Alíquotas de 15mL desta solução foram transferidas para um viscosímetro capilar de vidro (do tipo Ubbelohde, $\phi=0,53$ mm) e as medidas de tempo de escoamento foram determinadas em viscosímetro AVS-350 acoplado a um módulo diluidor automático AVS-20, ambos da Schott-Geräte. A viscosidade foi medida a $25,00 \pm 0,01^\circ\text{C}$ e para as diluições foi empregado tampão ácido acético 0,3M/acetato de sódio 0,2M (pH = 4,5), de modo a assegurar que a força iônica das soluções fosse mantida. Os tempos de escoamento correspondem à média de três determinações independentes.

3.4.6 Determinação da Massa Molar Média por Cromatografia de permeação em gel

(GPC)

Para determinar a massa molar média das amostras foi utilizada a cromatografia de permeação em gel, num sistema cromatográfico Shimadzu (CTO – 10A), com detecção por índice de refração, modelo RID – 6A. As condições para as análises foram: Pré-coluna Shodex Ohpak SB-G (50 X 6mm) (10 μ) + Shodex Ohpak SB-803-HQ (8mm DI x 300mm) (6 μ) + Shodex Ohpak SB-805-HQ (8mm DI x 300mm) (13 μ), fase estacionária: gel de poli hidroximetacrilato; eluente: tampão ácido acético 0,3M/acetato de sódio 0,2M (pH=4,5), fluxo: 0,6 mL/min; pressão: 28 Kg/cm²; temperatura: 35°C. A concentração das amostras injetadas no cromatógrafo foi 4 mg/mL em tampão ácido acético 0,3M/acetato de sódio 0,2M. A curva de calibração das colunas foi construída a partir da injeção com soluções de padrões monodispersos de polimaltose (pullulan) de massas molares 1.600.000, 788.000, 404.000, 212.000, 112.000, 47.300, 22.800, 11.800, 5.900, 738, 342 e 180 g/mol.

3.4.7 Difração de Raios X

As medidas de difração de raios X foram realizadas em difratômetro RIGAKU com tubo de cobre ($\lambda = 1,54\text{\AA}$), no intervalo de $3\text{-}50^\circ$, empregando varredura contínua com velocidade de $1^\circ/\text{min}$. A tensão e a corrente foram 50kV e 100mA, respectivamente.

3.4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia superficial da β -quitina e das amostras de quitosanas (Q9_30_60 e 2XQ5_50_60) foi investigada empregando microscópio eletrônico de varredura LEO-440. As amostras foram previamente secas em estufa a vácuo a 60°C por 6h e recobertas com uma camada de ouro de 20nm de espessura. A tensão e a corrente do feixe foram 20kV e 2,85pA, respectivamente. As imagens foram tratadas digitalmente utilizando o programa *Image J*.

3.5 ESTUDOS DA INTERAÇÃO DA QUITOSANA COM ALTA E BAIXA MASSA MOLECULAR E UNIDADES REPETITIVAS DE QUITOSANA COM FILMES DE LANGMUIR DE FOSFOLIPÍDIO

Para estudar a interação das quitosanas com diferentes graus de acetilação, quitosana com baixa massa molecular e das unidades repetitivas de quitosana (acetil-glucosamina (GlcNAc) e glucosamina (GlcN)), com modelos de membrana celular, filmes de Langmuir do fosfolipídio ácido dimiristoilfosfatídico (DMPA) foram confeccionados. As unidades

repetitivas de quitosana (GlcNAc e GlcN) foram compradas da Sigma e o fosfolipídio DMPA da Avanti Polar Lipids. Os filmes foram formados nas cubas de Langmuir KSV 5000 ou Mini-KSV, localizadas em sala limpa classe 10 000. As cubas de Langmuir possuem sensor de pressão de superfície Wilhelmy e prova Kelvin para medidas de potencial de superfície. O fosfolipídio DMPA foi dissolvido em clorofórmio na concentração de 0,5 mg/ mL. Para materiais que formam filmes de Langmuir ideais, como os ácidos graxos ou fosfolipídios, nessa concentração de solução (0,5 mg/mL) o volume espalhado para as cubas Mini-KSV (com área superficial de 24.225,00 mm²) e para KSV 5000 (área de 78.000,00) é de 50µL e 150µL, respectivamente, para obtenção de uma curva padrão de pressão de superfície. Os filmes foram produzidos sobre subfase de tampão Theorell, composto por NaOH, ácido cítrico, ácido bórico, ácido fosfórico e o pH é ajustado para 3,0 com adição de HCl 2M. Água Milli-Q foi usada no tampão com sistema Millipore de purificação, resistividade 18,2 MΩ.cm e pH 6,0.

As amostras de quitosana com diferentes graus de acetilação, a quitosana com baixa massa molecular e as unidades repetitivas de quitosana foram dissolvidos na subfase de tampão Theorell sobre a qual foram formadas as monocamadas de fosfolipídio. As concentrações na subfase variaram de 0.05 a 0.300 mg/mL. As barreiras móveis da cuba de Langmuir comprimiram os filmes com velocidade constante de 10 mm/min. A temperatura da subfase foi mantida em 20°C ± 1°C.

Cálculos do módulo de compressibilidade (C_s^{-1}) das monocamadas permitiram verificar os efeitos da quitosana e das unidades repetitivas de quitosana sobre a elasticidade dos filmes de DMPA. O C_s^{-1} indica o estado em que a monocamada tem compressibilidade máxima. Além disso, transições de fase, como a de líquido-expandida para líquido-condensada, podem ser identificadas. O módulo de compressibilidade foi obtido das isotermas de pressão de superfície ($\pi \times A$), dado pela Equação (2) ⁽⁵⁵⁾.

$$C_s^{-1} = -A \left(\frac{d\pi}{dA} \right) \quad (2)$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXTRAÇÃO DA B-QUITINA

A extração da β -quitina dos gládios de lula foi feita com 267g de gládios limpos, moídos e secos. Como já mencionado, na extração da β -quitina de gládios de lula, apenas a etapa de desproteínização é necessária, visto que a quantidade de minerais é baixa ($\sim 0,9\% \pm 0,04$). Ao final da desproteínização, foram obtidos 112,0 g de β -quitina seca, o que corresponde a um rendimento de aproximadamente 42% em massa do total dos gládios. Esse resultado era esperado, pois da tabela 1 sabe-se que $43,2 \pm 2,4\%$ dos gládios são compostos por quitina. A β -quitina extraída foi usada para obter quitosana com ultrassom de alta intensidade. As medidas que caracterizam a β -quitina serão apresentadas na próxima seção, juntamente com as de quitosana.

4.2 OBTENÇÃO DE QUITOSANA ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE ALTA INTENSIDADE

Para produzir a amostra de quitosana Q9_30_60, foram utilizados 13,2g de β -quitina e após reação foram obtidos 10,58g de quitosana seca, ou seja, o rendimento da reação foi 80,2% em massa. Para a amostra 2XQ5_50_60 usou-se 7,7g de β -quitina e após reação foram obtidos 6,1 g de quitosana seca, com rendimento de 79,2% em massa. As amostras foram caracterizadas quanto à massa molecular, grau médio de acetilação, morfologia e estrutura química. Os resultados estão descritos a seguir.

4.2.1 Caracterizações

4.2.1.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)

Os espectros da Figura 14 correspondem às amostras de β -quitina e quitosanas dela derivadas, amostras Q9_30_60 e 2XQ5_50_60. As principais bandas são:

3600-3000 cm^{-1} - deformações axiais de O-H e N-H,

2980-2800 cm^{-1} - deformações axiais de C-H,

1660-1550 cm^{-1} - deformações axiais de C=O e angulares de N-H,

1450-1370 cm^{-1} - deformações angulares de C-H,

1300-1315 cm^{-1} - deformação axial de CN,

1150-1155 cm^{-1} - deformação axial de O-H em ligação de hidrogênio

1020-1080 cm^{-1} - deformação angular de C-O.

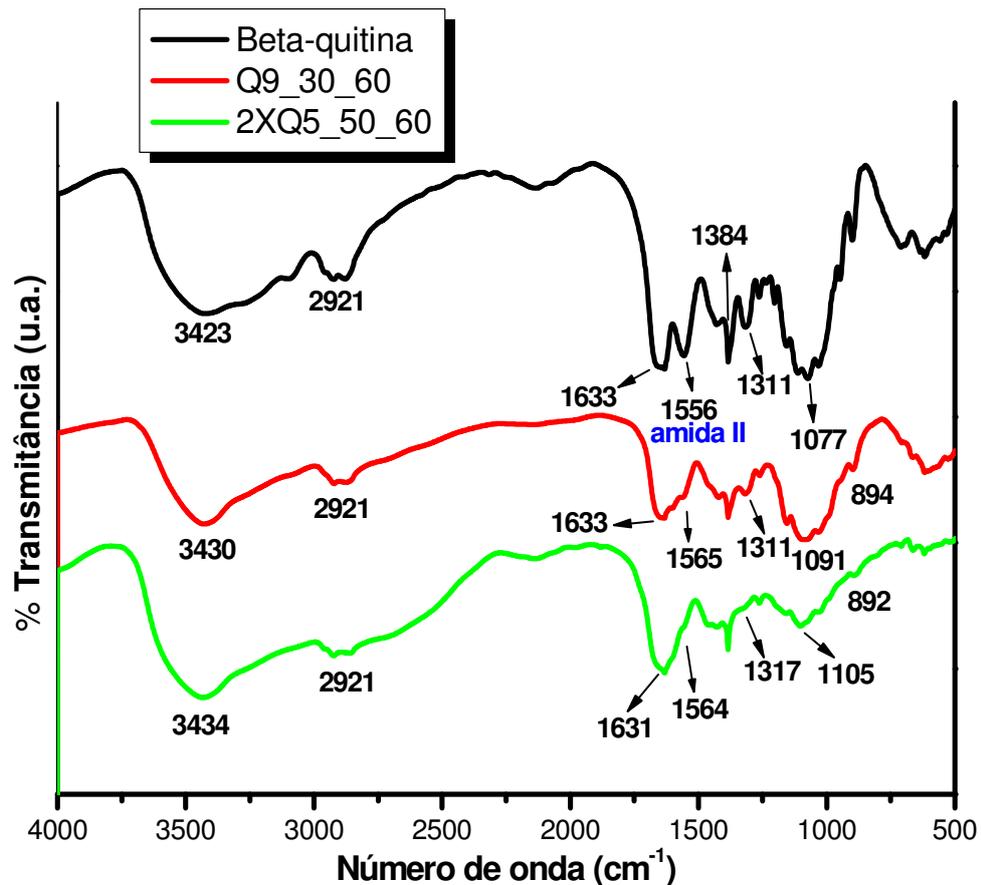


Figura 14 - Espectro no infravermelho para amostras de β -quitina, Q9_30_60 e 2XQ5_50_60.

Os espectros são semelhantes, mas informações importantes podem ser inferidas das diferenças. A diminuição do teor de grupos acetamida, e portanto da quantidade de unidades GlcNAc, da β -quitina em relação às amostras Q9_30_60 e 2XQ5_50_60, determina mudanças significativas. Para a β -quitina foram identificadas as bandas de deformação axial NH e OH (aproximadamente em 3400 e 3450 cm^{-1}) correspondentes às ligações de hidrogênio intermoleculares $\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{N}$, a deformação angular de NH (amida II, em 1550 cm^{-1}) e a deformação axial CO (amida I, em 1630 cm^{-1}) atribuídas apenas ao grupo $\text{C}=\text{O}$ em ligação de hidrogênio intermolecular com grupos N-H. Para as amostras de quitosana, as principais bandas foram: deformação axial de amida I ($-\text{C}=\text{O}-\text{NH}_2$), em 1630 cm^{-1} , deformação axial amida II ($-\text{C}=\text{O}-\text{NH}_2$) em 1560 cm^{-1} , deformação axial de amida III ($-\text{C}=\text{O}-\text{NH}_2$) em 1315 cm^{-1} , além das bandas de estruturas polissacarídicas entre 890 cm^{-1} a 1156 cm^{-1} .

Na comparação dos espectros é importante ressaltar a diminuição de intensidade da banda em 1550 cm^{-1} referente ao grupo amida II. A intensidade dessas bandas diminui

concomitantemente com o decréscimo da porcentagem dos grupos acetamida, expresso pelo valor de \overline{GA} , visto que para as amostras os respectivos valores de \overline{GA} são: β -quitina $\cong 81,1\%$ ⁽⁴⁶⁾, Q9_30_60 $\overline{GA} \cong 27\%$ e 2XQ5_50_60 $\overline{GA} \cong 6\%$. O grau médio de acetilação foi determinado por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN H^1) e titulação condutimétrica, cujos resultados serão mostrados a seguir.

4.2.1.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN H^1)

Nos espectros de RMN H^1 das amostras de desacetilação de β -quitina assistida por ultrassom de alta intensidade, observaram-se os sinais característicos da quitosana. Em 2,0 ppm aparecem os sinais de hidrogênios metílicos do grupo acetamida, no intervalo de deslocamento químico entre 3 – 4,2 ppm estão os sinais dos hidrogênios ligados aos carbonos 2 a 6 do anel de glicopirranose e em aproximadamente 4,9 ppm aparecem os sinais do hidrogênio ligado ao carbono 1. A Figura 15 mostra o espectro de RMN H^1 para a 2XQ5_50_60, onde estão assinalados os picos. Para a amostra Q9_30_60 o espectro é semelhante a menos da integração dos picos, não mostrada na figura.

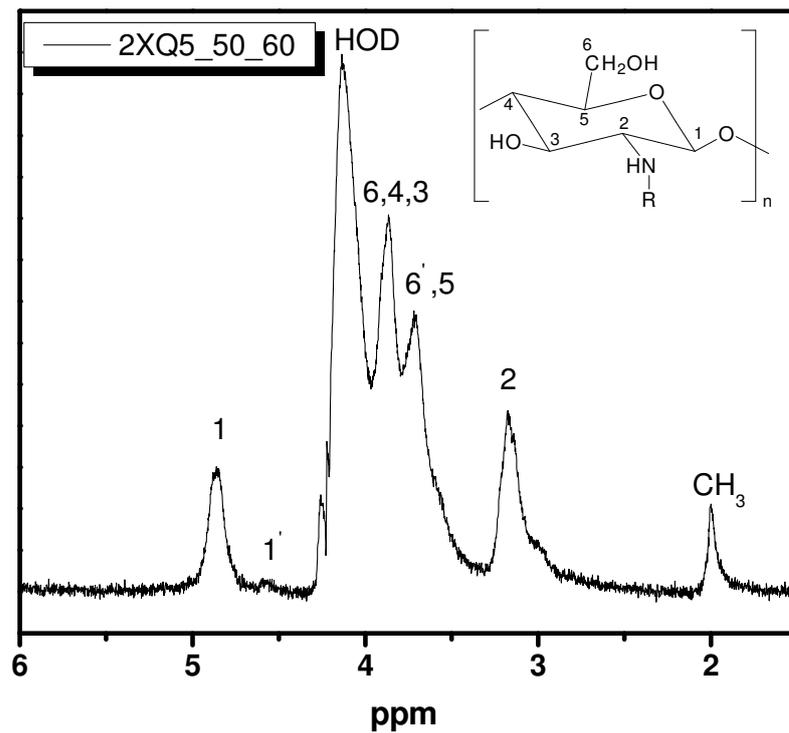


Figura 15 - Espectro de RMN H^1 da amostra 2XQ5_50_60.

Integrando-se os picos para as amostras Q9_30_60 e 2XQ5_50_60 e com a Equação (3) determinamos a porcentagem de grupos acetamidas, ou o grau médio de acetilação (\overline{GA}).

$$\% \overline{GA} = \frac{ACH_3 / 3}{AH_2} \times 100 \quad (3)$$

onde ACH_3 corresponde à integral da área do pico em 2 ppm referente aos hidrogênios metílicos do grupo acetamida, e AH_2 é a integral da área do pico próximo a 3 ppm, referente ao hidrogênio ligado ao carbono 2. O \overline{GA} foi 26,8% e 6,45% para as amostras Q9_30_60 e 2XQ5_50_60, respectivamente.

4.2.1.3 Titulação Condutimétrica

A titulação condutimétrica também foi usada para determinar o grau médio de acetilação das amostras. Trata-se de titulação de uma mistura de ácido forte/ ácido fraco (quitosana em HCl) usando uma base forte como titulante. Por isso, a resposta é uma curva típica desse tipo de titulação, como na Figura 16 para a amostra 2XQ5_50_60. Nota-se a neutralização do ácido clorídrico empregado em excesso para garantir a solubilização da quitosana. Os íons H^+ do ácido clorídrico são substituídos pelos íons Na^+ do NaOH, com brusca redução da condutividade da solução. No ponto V_1 há a neutralização total do ácido clorídrico. Com a adição do hidróxido de sódio, inicia-se em V_1 a desprotonação dos grupos amônio da quitosana, resultando em um ligeiro aumento na condutividade do meio. Em V_2 há a total desprotonação dos grupos amino da quitosana e a adição de excesso de base resulta no aumento da concentração de íons hidroxila na solução e na elevação brusca da condutividade.

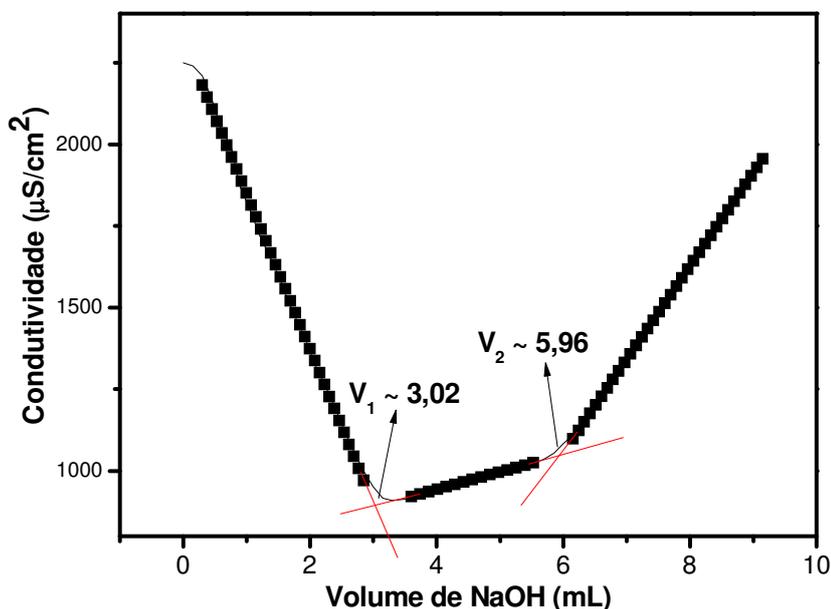


Figura 16 - Curva de titulação condutimétrica da amostra 2XQ5_50_60.

A partir dos volumes nos pontos de equivalência (V_1 e V_2), o grau médio de acetilação das amostras de quitosana analisadas foi determinado com a Equação 4:

$$\% \overline{GA} = \left(1 - \frac{161 * (V_2 - V_1) * [NaOH]}{m} \right) * 100 \quad (4)$$

onde:

$\% \overline{GA}$ = Grau médio de acetilação;

161 = Massa molar média da unidade repetitiva de quitosana (g/mol);

$(V_2 - V_1)$ = Volume de solução de hidróxido de sódio consumido para neutralizar a quitosana (mL);

$[NaOH]$ = Concentração da solução de hidróxido de sódio (M);

m = Massa de quitosana na alíquota titulada (g).

Para cada amostra a titulação foi feita em duplicata, obtendo-se a média aritmética. O \overline{GA} para Q9_30_60 foi 27,4% e para 2XQ5_50_60 5,6%. Assim, com o valor de \overline{GA} obtido por H^1 -RMN e por titulação condutimétrica, atribuímos às amostras o \overline{GA} como a média entre esses valores, para Q9_30_60 $\overline{GA} \cong 27\%$ $(27,4 + 26,8 / 2)$ e para 2XQ5_50_60 $\overline{GA} \cong 6\%$ $(5,6 + 6,45 / 2)$.

4.2.1.4 Viscosimetria Capilar

A viscosidade de soluções diluídas é função do volume hidrodinâmico do soluto na solução, isto é, sua massa molar. Quanto maior o volume hidrodinâmico, mais viscosa será a solução. Medidas da viscosidade de soluções poliméricas diluídas permitem o cálculo de uma massa molar média dita viscosimétrica (\overline{M}_v), Equação 5.

$$\overline{M}_v = \left(\frac{\sum Ni(Mi)^{1+\alpha}}{\sum NiMi} \right)^{1/\alpha} \quad (5)$$

onde M_i é a massa molar de todas as cadeias, N_i é o número total de cadeias e α é uma constante (Mark-Houwink) que depende do polímero, do solvente e da temperatura.

As massas molares médias viscosimétricas (\overline{M}_v) das amostras foram determinadas com a Equação de Mark-Houwink (Equação 1), utilizando os valores das constantes de Mark-Houwink (α e K) propostos por Rinaudo e colaboradores ⁽⁸²⁾, a partir dos valores de viscosidade intrínseca ($[\eta]$) das amostras obtidas experimentalmente e com o valor de grau médio de acetilação (\overline{GA}). Para a amostra Q9_30_60 $\overline{M}_v \cong 275.000$ g/mol e para 2XQ5_50_60 $\overline{M}_v \cong 622.000$ g/mol.

4.2.1.5 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A técnica de cromatografia de permeação em gel (GPC) foi usada para determinar os valores de massa molecular. As massas médias obtidas por GPC são: a massa molar numérica média \overline{M}_n e a massa molar ponderal média \overline{M}_w , além da relação entre $\overline{M}_w / \overline{M}_n$, que é conhecida como polidispersividade. Os dados sobre a polidispersividade propiciam avaliar a amplitude da distribuição das massas molares de um polímero. As expressões matemáticas para \overline{M}_n e \overline{M}_w são:

$$\overline{M}_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i} \quad (6)$$

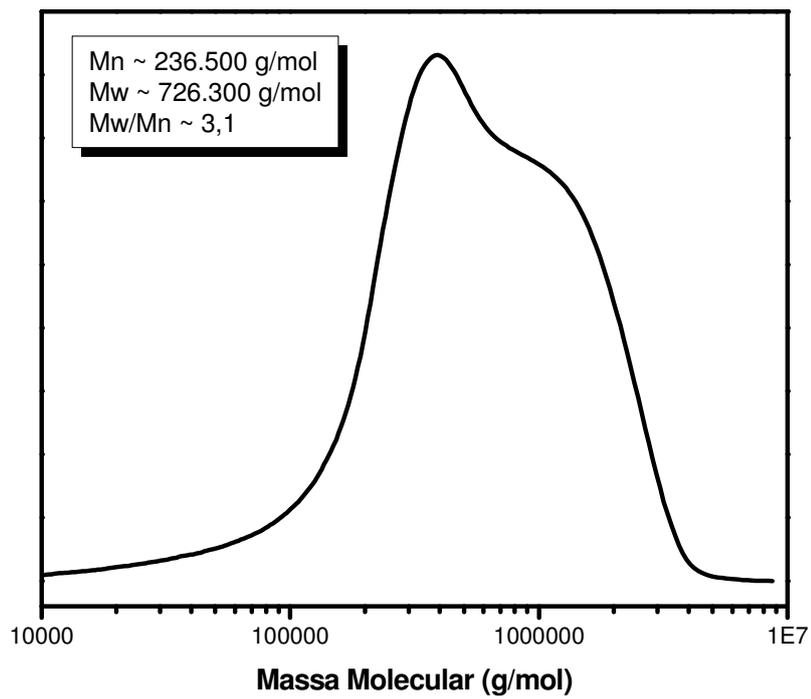
A \overline{M}_n da Equação 6 é definida como a massa molar de todas as cadeias (M_i), dividida pelo número total de cadeias (N_i), isto é, uma média numérica. Esta massa molar leva em conta mais fortemente o número de cadeias.

$$\overline{M}_w = \frac{\sum w_i N_i}{\sum w_i} \quad (7)$$

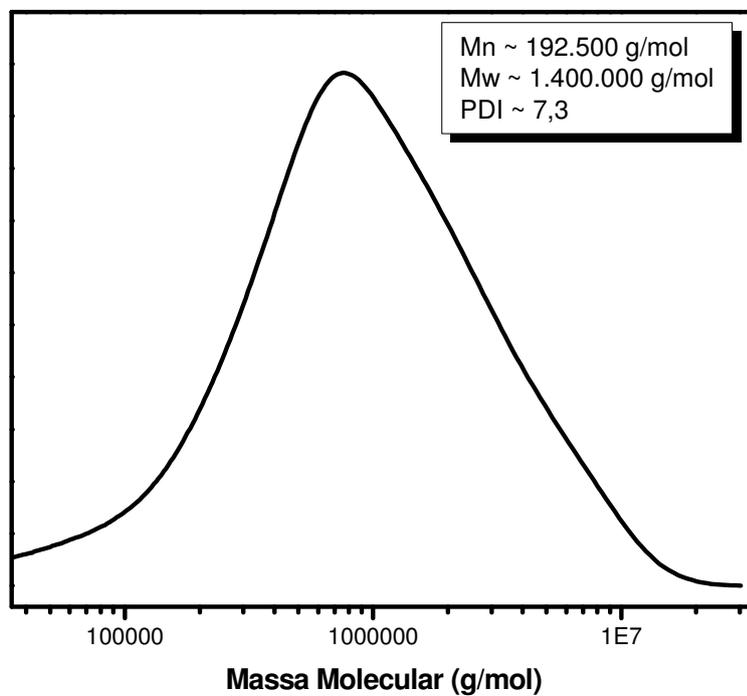
onde w_i é a massa da fração i .

A \overline{M}_w na Equação 7 é a massa molar ponderal média onde a massa das cadeias poliméricas em cada fração é levada em conta. Ou seja, em \overline{M}_w a massa molar de cada fração contribui de maneira ponderada para o cálculo da média total.

As curvas de distribuição de massas obtidas por cromatografia de permeação em gel para as amostras Q9_30_60 e 2XQ5_50_60 estão na Figura 17 (a) e (b). No detalhe dos cromatogramas são fornecidas as massas moleculares \overline{M}_n e \overline{M}_w e a polidispersividade. Para 2XQ5_50_60 a $\overline{M}_w \sim 726.300$ g/mol, enquanto que para Q9_30_60 é $\sim 1.400.000$ g/mol. O que pode explicar a massa molecular maior para a última é o tempo de sonicação menor e conseqüente menor despolimerização da β -quitina.



(a)



(b)

Figura 17 - Cromatograma de distribuição de massas das amostras (a) 2XQ5_50_60 e (b) Q9_30_60.

Nos polímeros monodispersos e nos casos em que a polidispersividade se aproxima de um, a massa molar média ponderal se aproxima da viscosimétrica. Isto é visto aqui, pois a amostra 2XQ5_50_60 possui polidispersividade baixa de ~ 3 , e assim, sua massa molar viscosimétrica se aproxima da ponderal, sendo ~ 622.000 g/mol e ~ 726.300 , respectivamente. Para a amostra Q9_30_60 as massas moleculares viscosimétrica e ponderal são muito diferentes (275.000 g/mol e $1.400.000$ g/mol, respectivamente), pois o índice de polidispersividade é alto, $\sim 7,3$.

4.2.1.6 Difração de raios X

Medidas de difração de raios X foram obtidas para verificar se a cristalinidade das amostras diferia daquela para a β -quitina. A β -quitina dos gládios de lulas apresenta dois picos cristalinos em aproximadamente 8 e 20° , referentes aos planos (010) e (020,110), respectivamente. A comparação dos difratogramas de β -quitina com as amostras Q9_30_60 e 2XQ5_50_60 da Figura 18 indica que a reação de desacetilação assistida por ultrassom de alta intensidade resulta em menor cristalinidade, pois ambas as amostras perdem um dos picos da β -quitina.

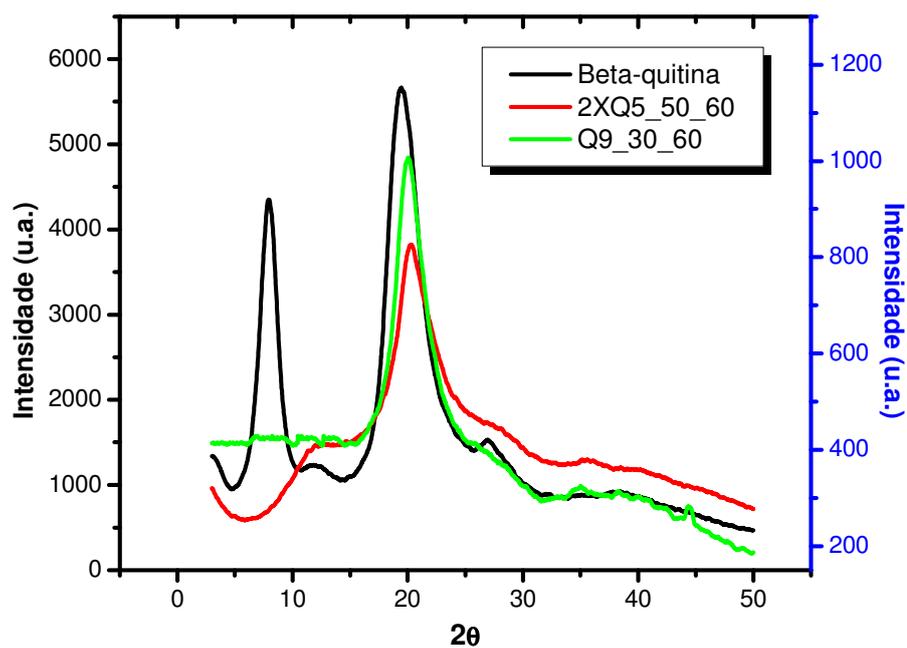
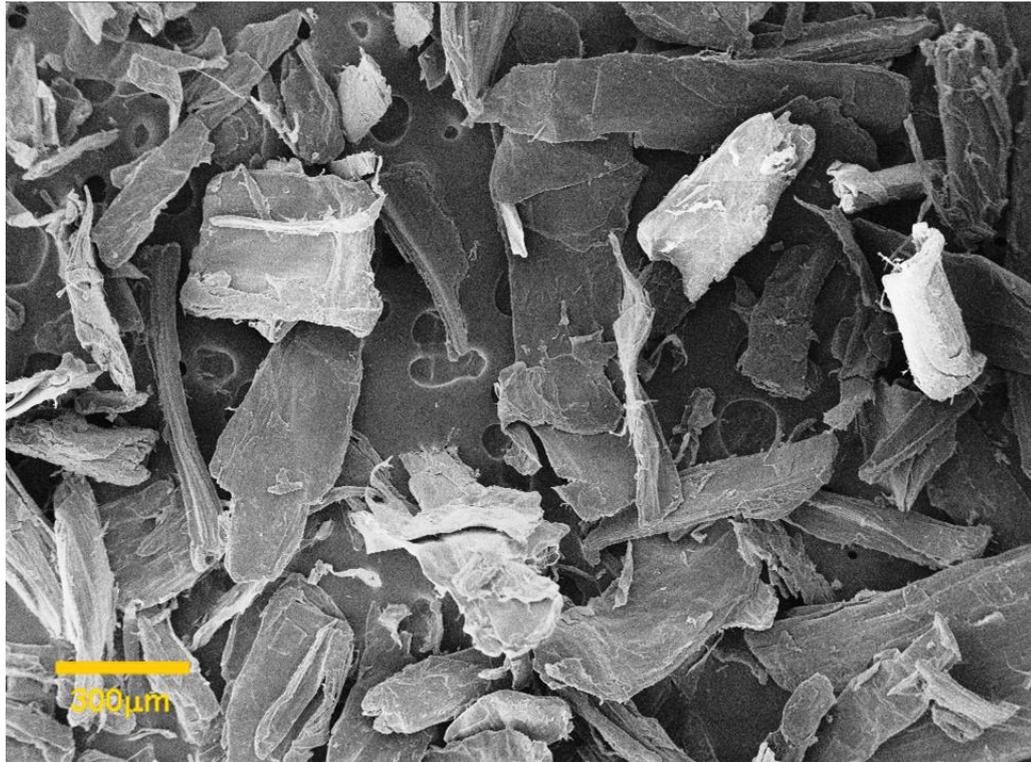


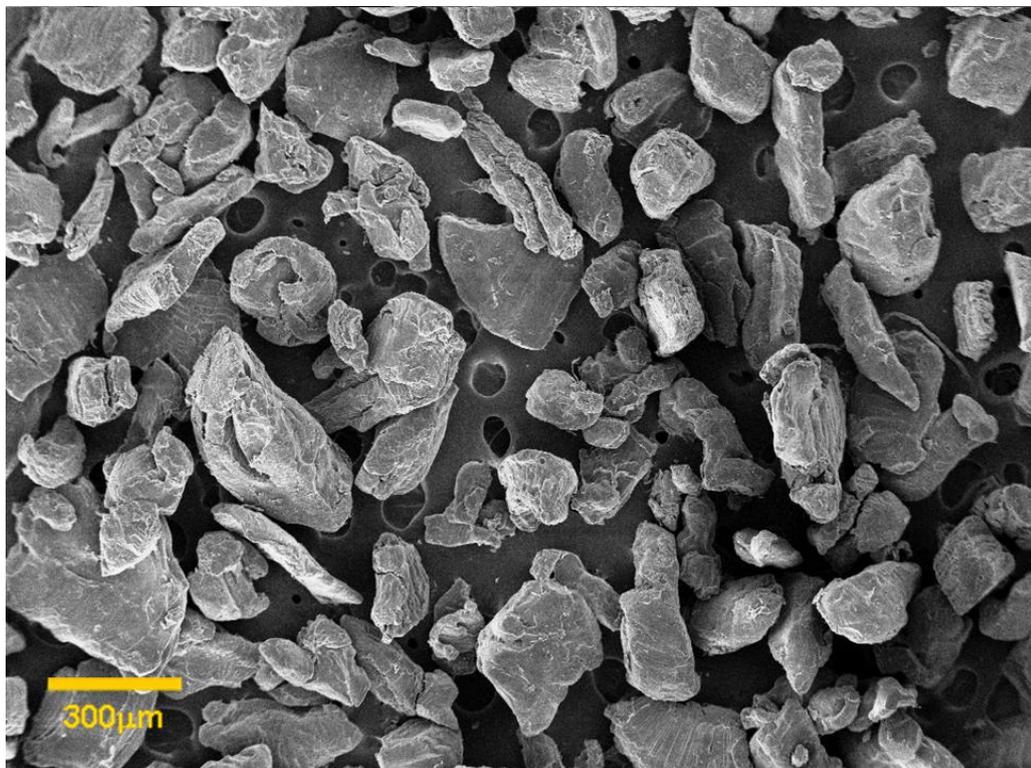
Figura 18 - Difratogramas das amostras de β -quitina, 2XQ5_50_60 e Q9_30_60.

4.2.1.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias da β -quitina e da amostra 2XQ5_50_60 são mostradas nas Figuras 19 e 20, respectivamente. A rugosidade é maior para a quitosana extensivamente desacetilada, obtida com auxílio de ultrassom de alta intensidade (amostra 2XQ5_50_60), na Figura 19 (b) e Figura 20 (b), enquanto a β -quitina tem superfície relativamente lisa, como mostram as Figura 19 (a) e Figura 20 (a). Além disso, na quitosana há uma redução das dimensões médias e um aumento da área superficial das partículas.

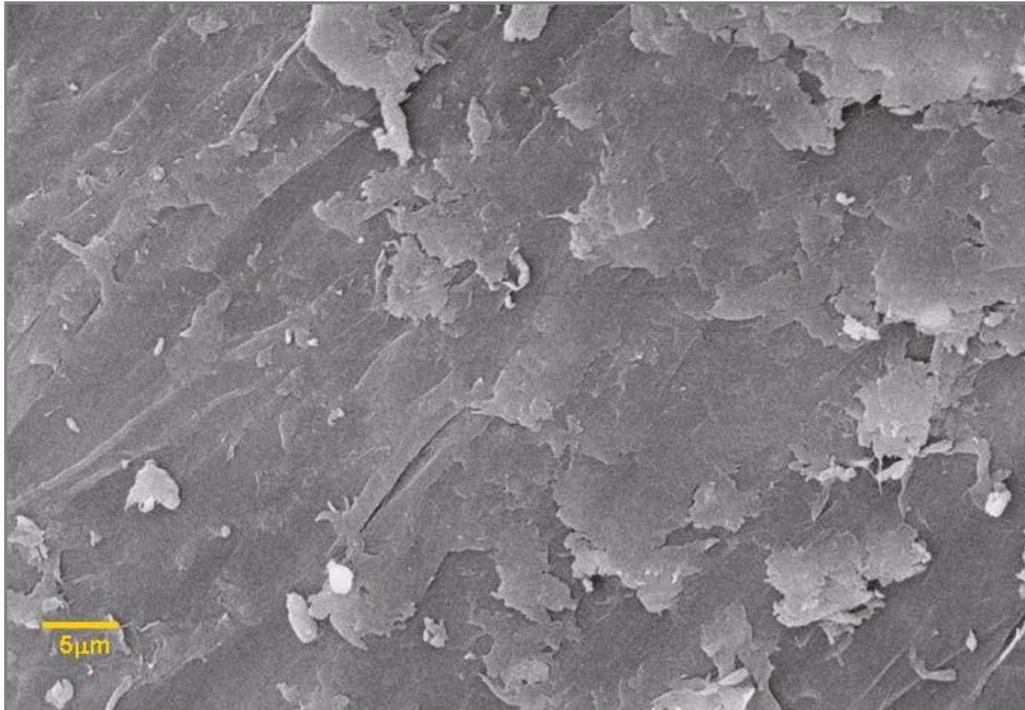


(a)

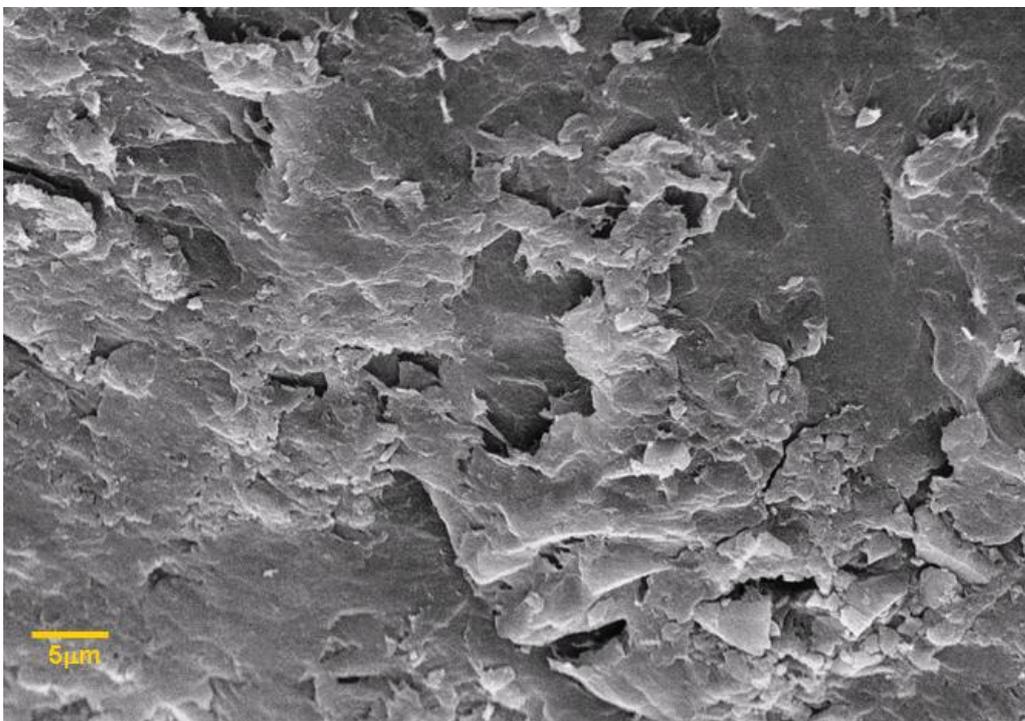


(b)

Figura 19 - Micrografias das amostras (a) β -quitina e (b) 2XQ5_50_60, com ampliação de 75X.



(a)



(b)

Figura 20 - Micrografias das amostras (a) β -quitina e (b) 2XQ5_50_60, com ampliação de 5000X.

Estas características na morfologia são atribuídas ao efeito da cavitação no processo de desacetilação da β -quitina, que aumenta a acessibilidade aos sítios reativos do polímero ^(31,45). A diminuição da área média das partículas está associada à energia fornecida durante a irradiação da suspensão de β -quitina com ultrassom de alta intensidade. Estudos mostram que a energia fornecida aumenta com a amplitude e tempo de irradiação, favorecendo a pulverização das partículas através da cavitação ⁽⁴⁷⁾. Nas Figuras 19 (b) e 20 (b), observa-se acentuado desgaste e descamação da superfície das partículas da amostra de quitosana, evidências dos “Hot Spots” ⁽⁴⁰⁾ causadas pela cavitação.

Para a amostra Q9_30_60 não foi possível realizar medidas de microscopia eletrônica de varredura, pois durante o processo de purificação a superfície deste foi modificada pela solubilização em ácido.

4.3 OBTENÇÃO DE QUITOSANA DE BAIXA MASSA MOLECULAR E OLIGÔMEROS DE QUITOSANA

Cadeias são consideradas poliméricas quando a massa molecular é superior a 10.000 g/mol; valores de massa molecular entre 1.000 e 10.000 g/mol são considerados oligômeros e cadeias poliméricas com massa molecular superior a 250.000 g/mol são consideradas de alta massa molecular ⁽⁸³⁾. Empregamos o ultrassom de alta intensidade na produção de oligômeros de quitosana, para obter um produto sem aditivos, ao contrário da produção de oligômeros por despolimerização enzimática e por hidrólise ácida. Com isso, não é necessária a purificação ao final da reação. A sonicação foi realizada por 4h, após o que a solução foi colocada em membrana de diálise com poro de exclusão de 2.000 g/mol, como modo de separação por tamanho das cadeias do produto. A intenção era separar as cadeias até essa massa molecular, correspondendo a oligômeros. A quitosana de partida para produção foi a amostra 2XQ5_50_60, extensivamente desacetilada. O rendimento da reação foi baixo, 2g da amostra 2XQ5_50_60 foram usados na sonicação e somente 300 mg do produto foram obtidos, com rendimento de 15%. O produto foi caracterizado por cromatografia de permeação em gel, espectroscopia na região do infravermelho e ressonância magnética nuclear de hidrogênio.

A Figura 21 mostra o cromatograma de distribuição de massas, e no detalhe estão os resultados das massas moleculares \overline{M}_w , \overline{M}_n e da polidispersividade, sendo 77.000 g/mol, 12.400 g/mol e 6,2, respectivamente. O produto é uma mistura com cadeias típicas de polímeros com baixa massa molecular e oligômeros (abaixo de 10.000 g/mol). Por isso, denominamos a amostra como quitosana com baixa massa molecular (QBMM), pois segundo o cromatograma a porção maior das cadeias se encontra nessa faixa de massa molecular.

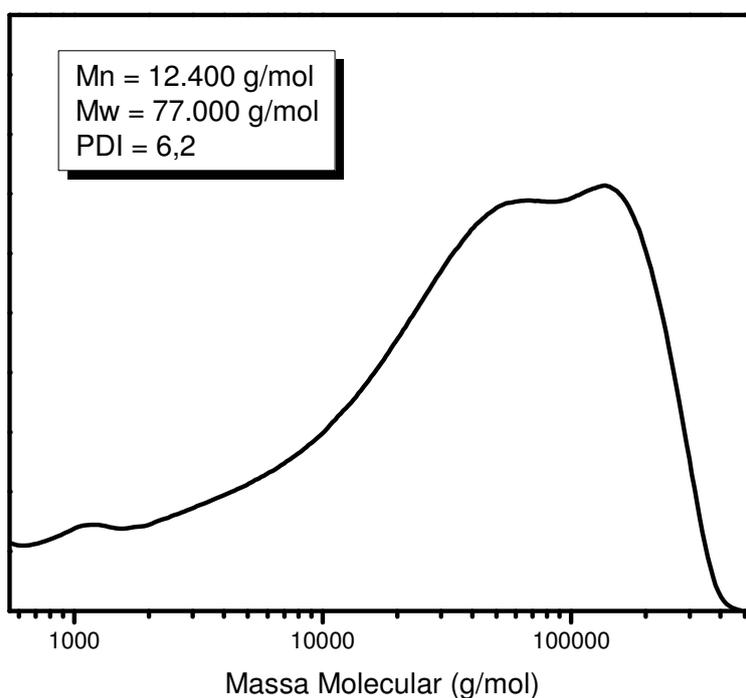


Figura 21 - Cromatografia de distribuição de massas da amostra QBMM.

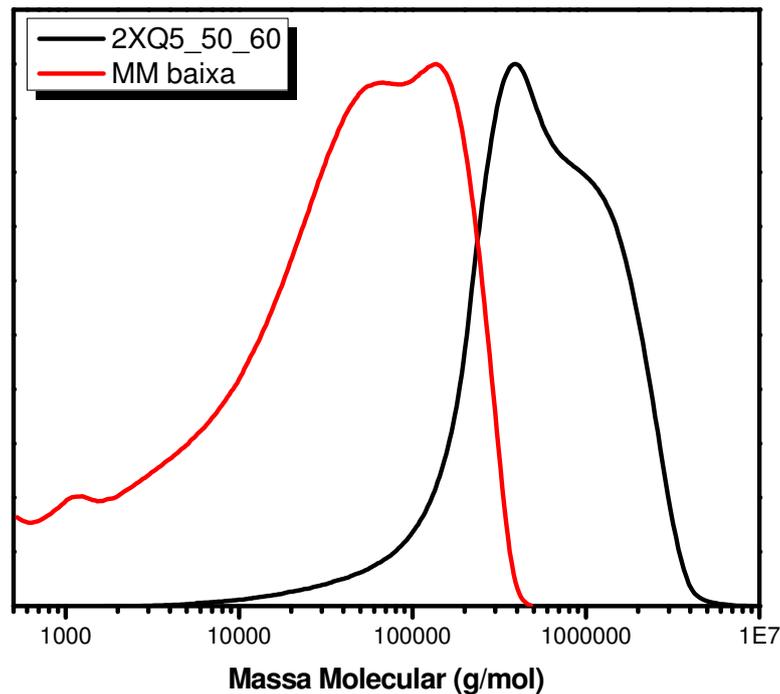


Figura 22 - Cromatogramas com a distribuição de massas das amostras 2XQ5_50_60 e QBMM.

Na figura 22 estão comparados os cromatogramas da quitosana precursora 2XQ5_50_60 e da QBMM. A sonicação reduziu a massa molecular ponderal média em 10X, de aproximadamente 700.000 g/mol na precursora, para 77.000 g/mol em QBMM. Quanto mais o cromatograma é deslocado para a esquerda, menor é a massa molar. Essas medidas de GPC indicam que o produto da sonicação não tem a massa molecular esperada, a de oligômeros. Acreditamos que o método empregado na separação (diálise) não teve a eficiência esperada. Como descrito no tópico 2.2 deste trabalho, a separação de oligômeros é muitas vezes difícil. Para maior eficácia na separação poderíamos utilizar outros métodos como a precipitação seletiva, a ultrafiltração, colunas cromatográficas de exclusão de tamanho ou uma associação dessas técnicas. O que inviabilizou a utilização de outras técnicas foi o baixo rendimento da QBMM.

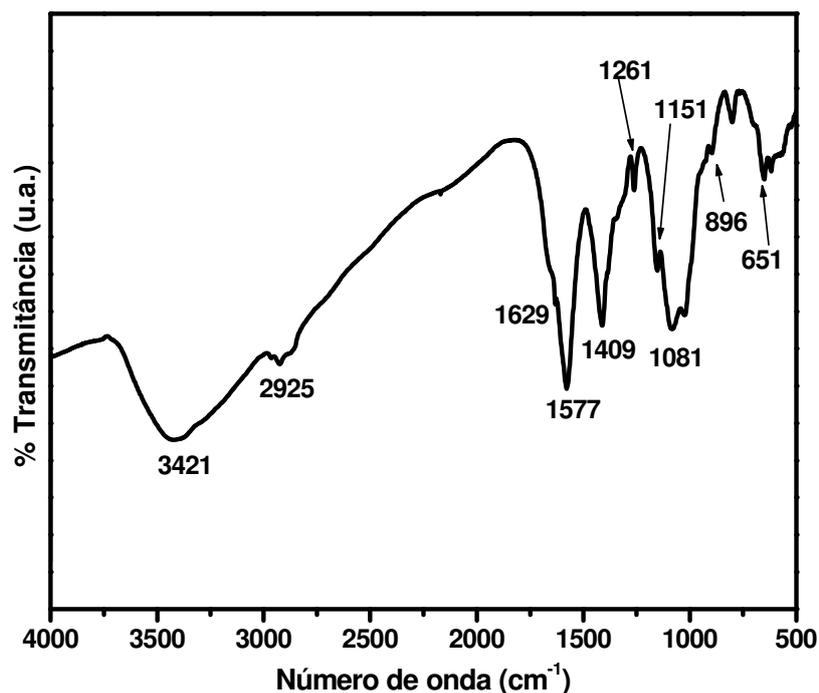


Figura 23 - Espectro no infravermelho da amostra QBMM.

O espectro de infravermelho da amostra QBMM não difere muito daquele da quitosana precursora. Mesmo no caso de oligômeros, alguns autores afirmam ⁽⁸⁴⁾ que as bandas de absorção são semelhantes para quitosana e oligômeros. Isso é esperado, pois com a sonicação apenas o tamanho das cadeias é reduzido, mas a composição química (grupos químicos) não muda. As principais bandas do espectro são:

3421 cm⁻¹ - deformações axiais de O-H e N-H,

2925 cm⁻¹ - deformações axiais de C-H,

1629 cm⁻¹ deformações axiais de C=O e angulares de N-H,

1409 cm⁻¹ - deformações angulares de C-H,

1151 cm⁻¹ - deformação axial de O-H em ligação de hidrogênio,

1081 cm⁻¹ - deformação axial de C-N,

651 cm⁻¹ - deformação angular de N-H.

895 cm⁻¹ - vibração da ligação C-H β-pirranose.

Esta última banda indica que as condições da reação não provocam quebra do anel de glicopironose.

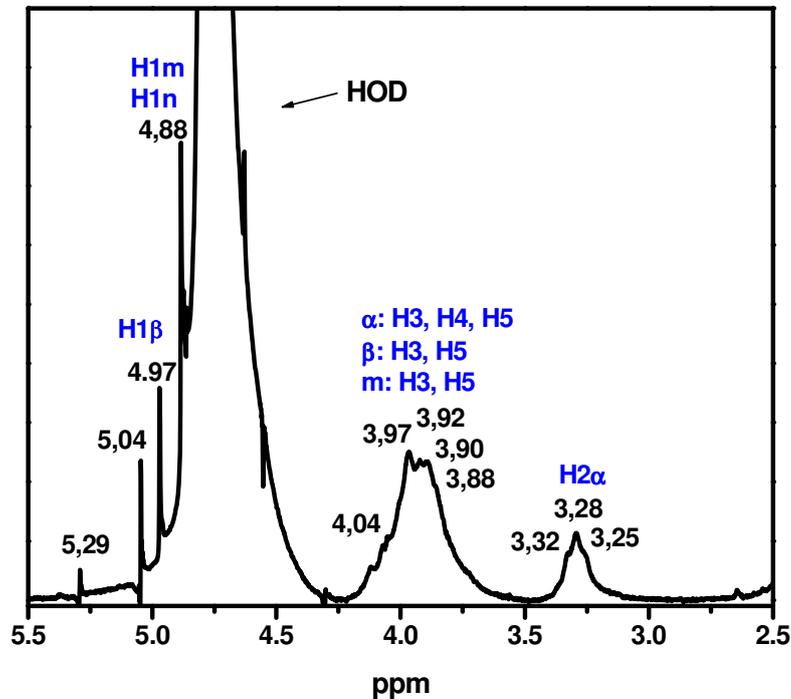


Figura 24 - Espectro de H¹-RMN da amostra QBMM.

O espectro de H¹-RMN da Figura 24 foi obtido com uma solução da QBMM. As atribuições dos picos foram feitas com base nas referências ^(49,85), que indicam a quebra das cadeias e aparecimento do sinal de hidrogênios nas extremidades de redução das cadeias. Nas atribuições as siglas α ou β significam redução final α ou β , m significa resíduo do meio e n resíduo terminal.

4.4 ESTUDOS DA INTERAÇÃO DE QUITOSANA, UNIDADES REPETITIVAS DE QUITOSANA E QUITOSANA DE BAIXA MASSA MOLECULAR COM FILMES DE LANGMUIR DE FOSFOLIPÍDIOS

Como o objetivo é verificar a influência do grau de acetilação e da massa molecular da quitosana na interação com modelos de membrana celular, os resultados estão dispostos de maneira a facilitar a comparação.

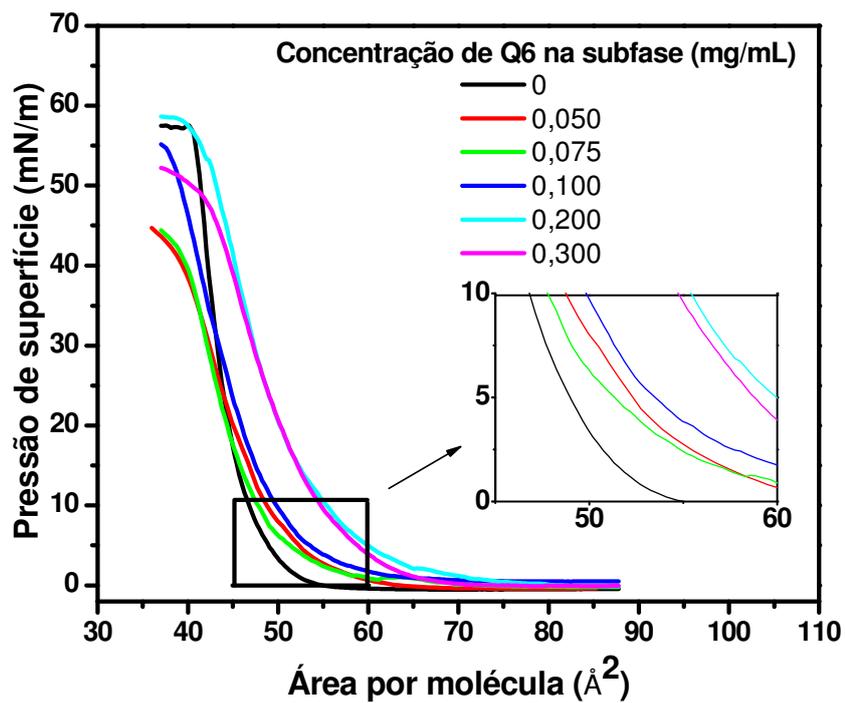
4.4.1 Estudo da influência do grau de acetilação de quitosana em modelos de membrana celular

As amostras 2XQ5_50_60 e Q9_30_60 são quitosanas com diferentes graus de acetilação usadas para estudar a influência dos grupos acetilados, e por isso são agora denominadas pelo grau de acetilação. A amostra 2XQ5_50_60 passa a ser Q6 (grau de acetilação de 6%) e a amostra Q9_30_60 é agora denominada Q27 (grau de acetilação de 27%). Filmes de Langmuir de DMPA foram obtidos sobre subfase tampão que continha as quitosanas Q6 e Q27 ou somente sobre o tampão Theorell (pH 3,0). As concentrações de quitosana variaram entre 0,050 mg/mL e 0,300 mg/mL. Os filmes foram caracterizados com isotermas de pressão e de potencial de superfície.

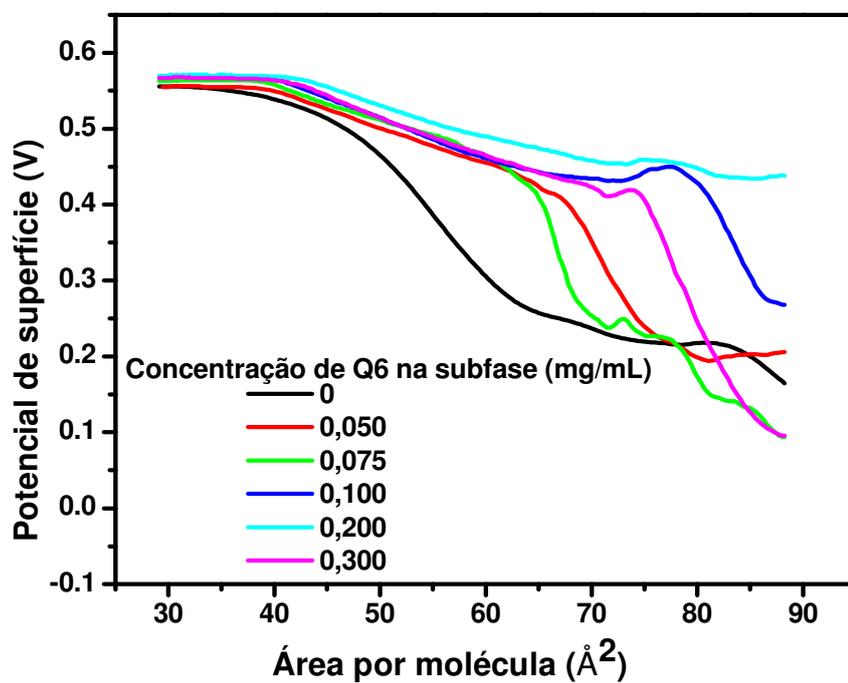
4.4.1.1 Isotermas de pressão de superfície e potencial de superfície

Nas figuras 25 e 26 estão as isotermas de pressão e de potencial de superfície de monocamadas de DMPA, com e sem Q6 e Q27, respectivamente. A isoterma de pressão de superfície para o fosfolipídio DMPA puro sobre Theorell, a $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, apresenta pequena

variação de pressão de 1 a 2 mN/m quando comprimida em grandes áreas até atingir aproximadamente $60 \text{ a } 50 \text{ \AA}^2$, onde aparece a fase líquido-condensada, e colapso em pressões de aproximadamente 55 mN/m. A área mínima ocupada pelo fosfolípido é 45 \AA^2 . Esta isoterma se diferencia daquela do fosfolípido DMPA em água pura, que apresenta um patamar de transição de fase entre 0-10 mN/m de pressão e área de $70\text{-}40 \text{ \AA}^2$ ⁽⁸⁶⁾. O desaparecimento da transição é devido provavelmente aos íons no tampão e à diferença de pH (de ~ 6,0 para água pura e 3,0 para o Theorell), uma vez que as isotermas podem ser afetadas por alterações de temperatura e/ou de pH da subfase ^(86,87,88,89).



(a)



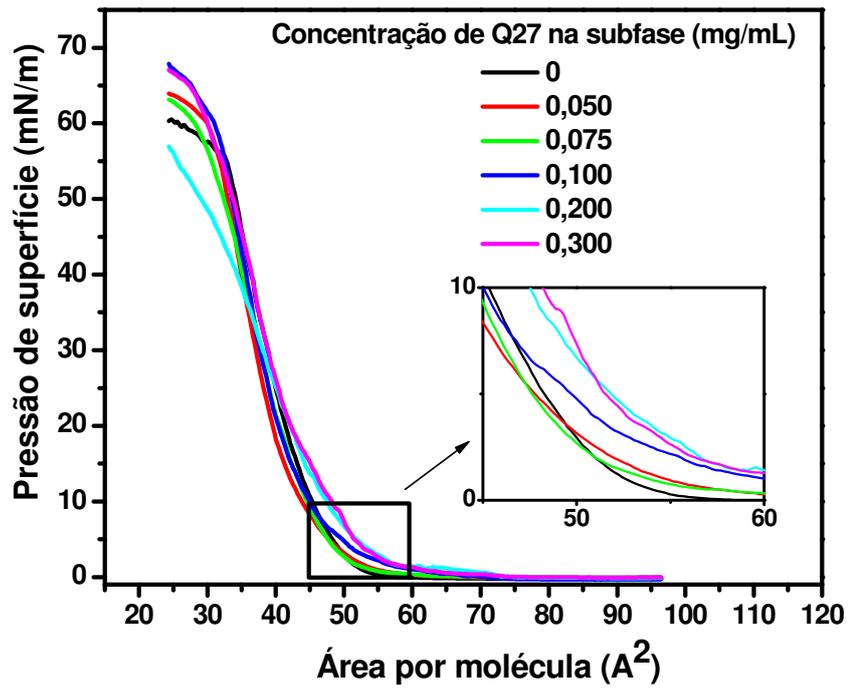
(b)

Figura 25 - Isothermas de pressão (a) e de potencial de superfície (b) de monocamadas de DMPA puro e de DMPA sobre subfase contendo Q6 em diferentes concentrações.

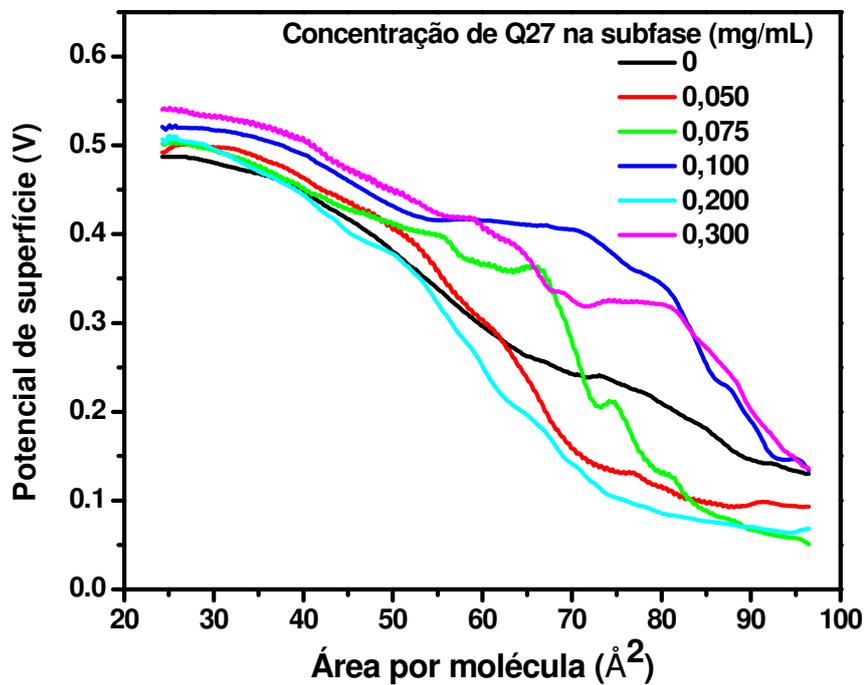
Nas isotermas de pressão de superfície para DMPA em subfase contendo Q6 (figura 25(a)) pode-se ver no detalhe (ampliação), que a expansão é crescente para maiores concentrações de quitosana até a saturação^(7,8), numa concentração de 0,200 mg/mL acima da qual as isotermas não mais se alteram. A expansão das monocamadas confirma a interação do polímero com as monocamadas lipídicas, que pode ser atribuída às interações eletrostáticas entre a carga positiva dos grupos amina da quitosana em subfase ácida e a carga negativa da cabeça polar do fosfolípido, a ligações de hidrogênio e forças hidrofóbicas^(7,8). A área mínima das isotermas com quitosana na subfase é aumentada em relação à isoterma do DMPA.

O potencial de superfície depende fortemente da carga das monocamadas ou de cargas incorporadas na subfase⁽⁹⁰⁾, que podem contribuir positiva ou negativamente. Para o DMPA sobre água pura, ou em pHs altos, o potencial de superfície é negativo ($\sim -0,1$ V) para grandes áreas por molécula, devido à dissociação dos seus grupos polares⁽⁹¹⁾. Já nas monocamadas de DMPA sobre tampão Theorell, o potencial é positivo (0,1 V para grandes áreas) devido à neutralização das cargas em pH 3,0. O aumento no potencial induzido por quitosana na subfase se deve provavelmente à contribuição das cargas positivas da quitosana, alterando o potencial da dupla camada na subsuperfície. O potencial para os filmes de Langmuir no estado condensado é praticamente independente da concentração de Q6, e muito similar ao de DMPA puro. Isso indica que as moléculas de Q6 são expulsas da interface, pelo menos em parte⁽⁸⁾.

Na figura 26 (a) e (b) são mostrados os resultados para DMPA sobre subfase contendo quitosana com 27% de grupos acetilados, Q27. As isotermas de pressão de superfície são também expandidas para áreas maiores em relação à isoterma do DMPA, mas como mostra a ampliação na figura, a expansão é menor do que a causada por Q6. A saturação do efeito de expansão ocorre em 0,200 mg/mL. A presença de Q27 na subfase também afeta o potencial de superfície, mas não há uma tendência clara de aumento ou diminuição para grandes áreas quando a concentração de Q27 é variada. No estado condensado, entretanto, a presença de Q27 sempre causa aumento do potencial, embora pequeno. Este último resultado poderia indicar que a Q27 permanece na interface mesmo próximo do colapso. Mas o aumento no potencial é pequeno, e levando-se em conta também as isotermas de pressão, pode-se concluir que a Q27 deve ser expulsa da interface, analogamente ao observado para Q6.



(a)



(b)

Figura 26 - Isothermas de pressão (a) e de potencial de superfície (b) de monocamadas de DMPA puro e de DMPA sobre subfase contendo Q27 em diferentes concentrações.

O maior efeito de expansão induzido por Q6 é mais bem visualizado na Figura 27, com gráficos de área por molécula vs. concentração para uma pressão fixa de 10 mN/m. Essa maior expansão é atribuída ao fato de Q6 ser uma amostra com apenas 6% de grupos acetilados, i.e. 94% das suas cadeias possuem o grupamento amina passível de protonação e interagir eletrostaticamente com os grupos fosfato do DMPA. Na amostra Q27, apenas 73% dos grupos são desacetilados.

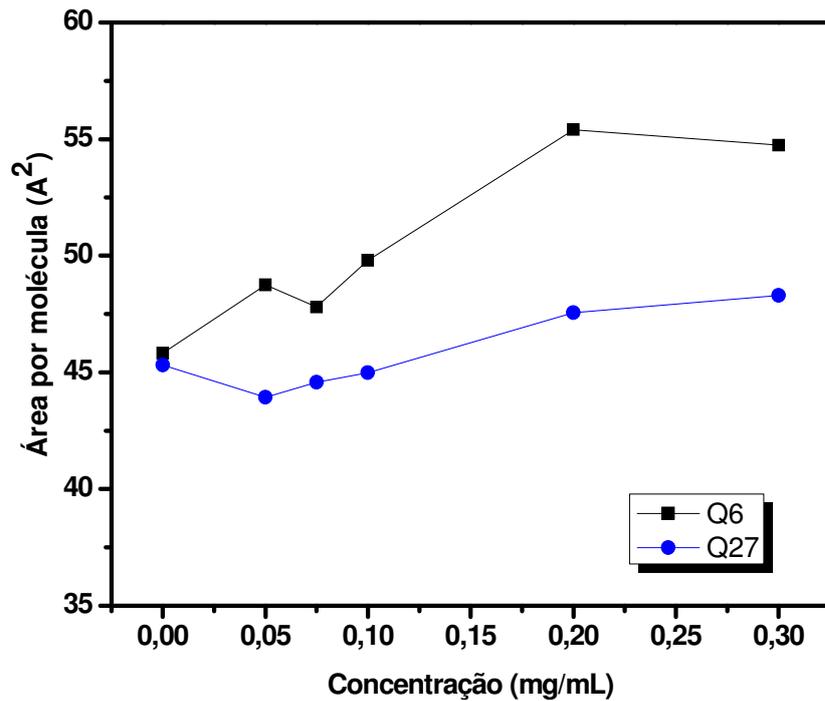


Figura 27 - Comparativo da área por molécula de fosfolipídio (monocamadas de DMPA), na pressão de 10 mN/m, em função da concentração de Q6 e Q27 na subfase.

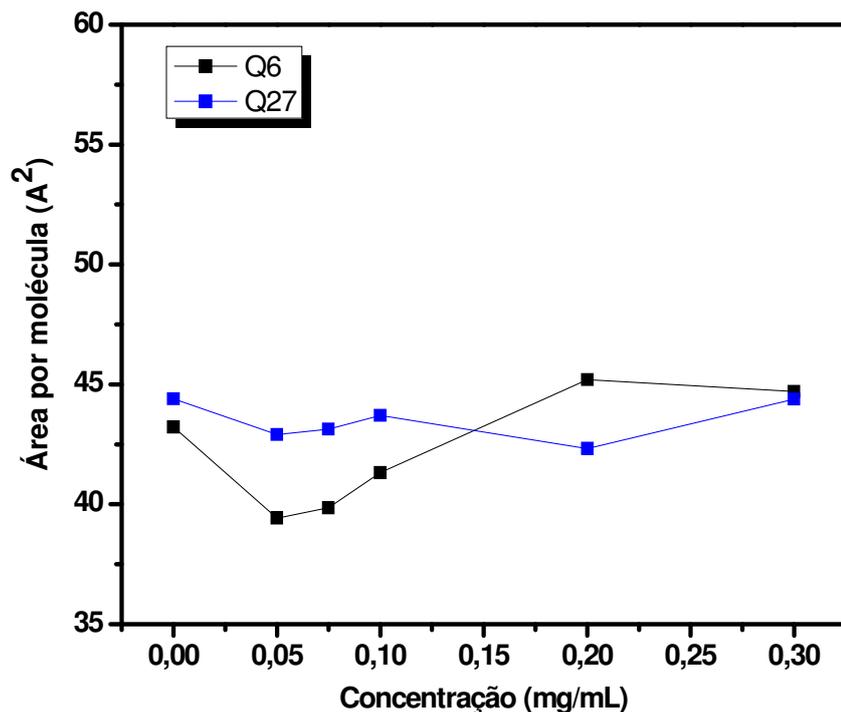


Figura 28 - Área por molécula de fosfolípido (monocamadas de DMPA), na pressão de 40 mN/m, em função da concentração de Q6 e Q27 na subfase.

Como se verifica na Figura 28, para uma alta pressão de 40 mN/m, portanto na fase líquido-condensada, a alteração na área induzida pelas quitosanas Q6 e Q27 é bem menor do que em pressões menores. Isso pode ser inferido das isotermas, uma vez que as moléculas de quitosana devem ser expulsas da interface, contribuindo pouco para a área por molécula. Nesta situação, não é surpreendente que não haja uma dependência clara com a concentração de quitosana, como mostra a Figura 28. Ainda sobre a possível expulsão das moléculas de quitosana, estudos anteriores mostraram ^(7,8) que o mais provável é que as moléculas estejam numa subsuperfície, sem contribuir para as isotermas, mas ainda interagindo com o fosfolípido do filme de Langmuir.

4.4.1.2 Elasticidade no plano

Os maiores efeitos provocados por Q6 sobre as propriedades mecânicas das monocamadas de DMPA foram confirmados na análise do módulo de compressão, ou de

elasticidade no plano. A figura 29(a) mostra que a amostra Q6 afeta a elasticidade das monocamadas de DMPA, com uma diminuição no pico de elasticidade para todas as concentrações de Q6 na subfase. Para as concentrações maiores, 0,200 mg/mL e 0,300 mg/mL, além da diminuição há um deslocamento do pico para áreas maiores. Para a Q27 o pico de compressão da maioria das monocamadas coincide com o da monocamada de DMPA sobre subfase tampão, como indica a figura 29(b). Apenas para as concentrações de 0,200 mg/mL e 0,300 mg/mL, percebe-se um pequeno deslocamento para menores pressões e maiores áreas, indicando diminuição da elasticidade no plano das monocamadas de DMPA. Isso pode ser explicado por uma maior contribuição de grupos amina protonados na Q27 nas maiores concentrações (0,200 mg/mL e 0,300 mg/mL), que tenderiam a aumentar a interação eletrostática com as moléculas de DMPA.

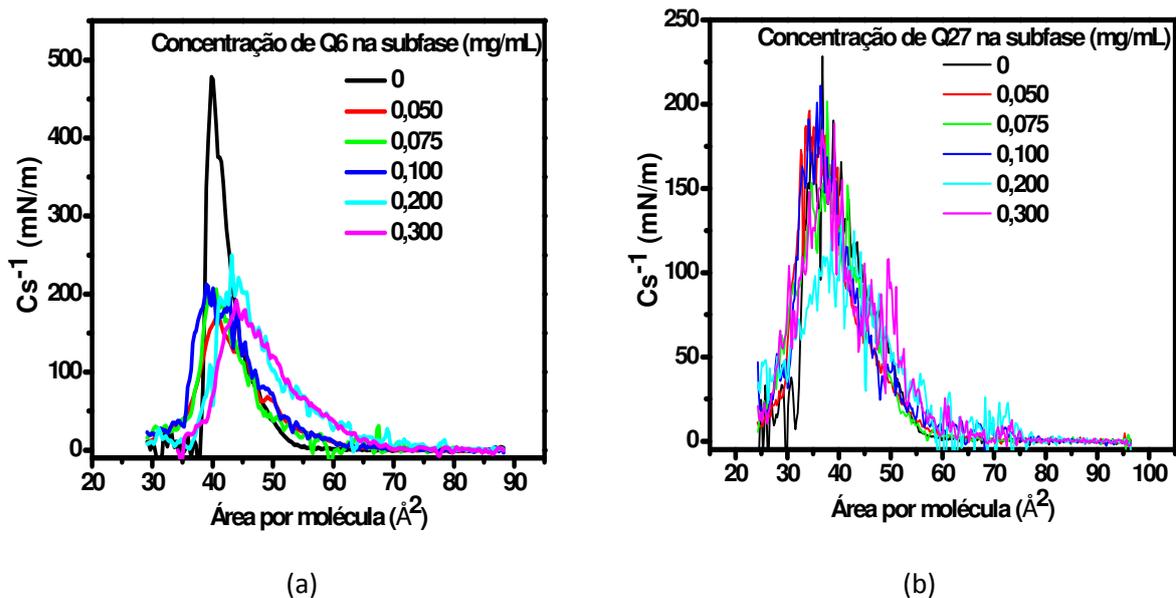


Figura 29 - Módulo de elasticidade para filmes de Langmuir de DMPA sobre subfases contendo Q6 (a) e Q27 (b).

4.4.1.3 Conclusões

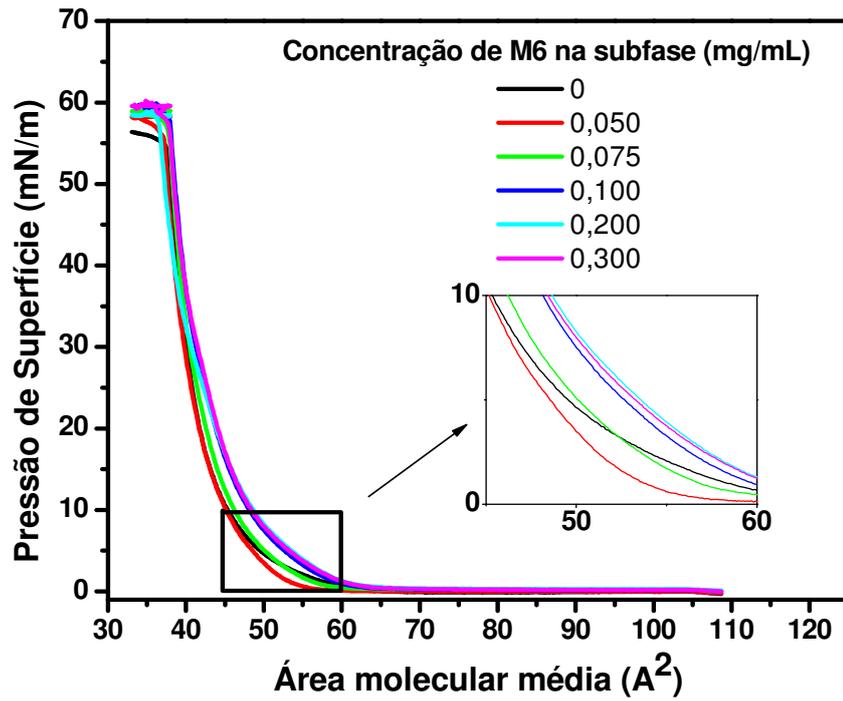
A comparação das isotermas de pressão e de potencial de superfície das monocamadas de DMPA sobre tampão e sobre tampão contendo Q6 ou Q27 permitiu verificar a influência do grau de acetilação. Foram também avaliados os efeitos sobre a elasticidade dos filmes de DMPA. Os resultados indicam que, quanto menor o grau de acetilação da quitosana, ou seja, maior a porcentagem de grupos amina passíveis de protonação, maior é a interação com as monocamadas de fosfolipídios, e maior o efeito sobre a elasticidade do filme. Isso pode ser atribuído principalmente à forte atração eletrostática entre quitosana e as cargas negativas do fosfolipídio DMPA e também às interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio.

4.4.2 Influência da massa molecular de quitosana sobre modelos de membrana celular

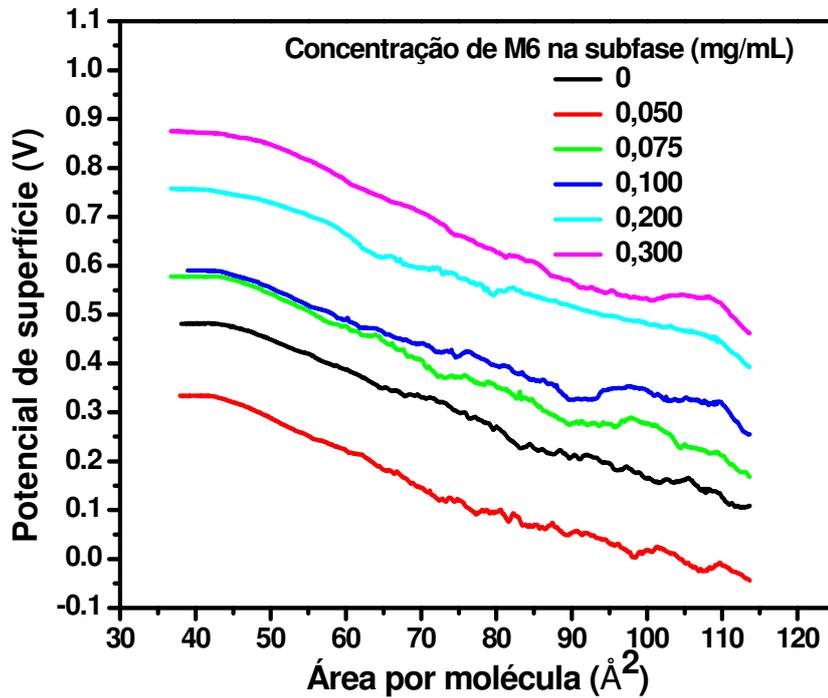
Para estudar a influência da massa molecular de quitosana sobre os modelos de membrana, filmes de Langmuir de DMPA sobre subfase tampão e contendo unidades repetitivas de quitosana e quitosana de baixa massa molecular foram confeccionados. A quitosana com baixa massa molecular ($M_w \sim 77.000$ g/mol), denominada QBMM, foi sintetizada com ultrassom de alta intensidade. Já as soluções contendo as unidades repetitivas acetilglucosamina e glucosamina foram obtidas com proporções que simulassem o grau de acetilação das amostras de quitosana Q6 e Q27. Ou seja, as unidades repetitivas foram misturadas na proporção 94% glucosamina + 6% acetilglucosamina, denominada amostra M6, simulando o grau de acetilação da Q6, e na proporção 73% glucosamina + 27% acetilglucosamina, denominada amostra M27, simulando a Q27. As amostras de QBMM, M6 e M27 foram solubilizadas em tampão Theorell (pH 3,0) em concentrações de 0,050 mg/mL a 0,300 mg/mL.

4.4.2.1 Isotermas de pressão e potencial de superfície

Nas figuras 30, 31 e 32 estão as isotermas de pressão e de potencial de superfície de monocamadas de DMPA e de DMPA sobre subfase contendo M6, M27 e QBMM, respectivamente. As concentrações estão detalhadas nos gráficos. Para as maiores concentrações de M6 na subfase as monocamadas de DMPA são levemente expandidas, em relação à área do DMPA puro. A expansão provocada por M6 é menor do que a induzida por Q6 (figura 25(a)). A área mínima para as isotermas que contêm M6 na subfase é praticamente a mesma para as monocamadas de DMPA sobre tampão, sendo de 42 \AA^2 . Já para as isotermas contendo Q6 na subfase a área mínima é deslocada de 42 \AA^2 para monocamadas de DMPA sobre tampão para 55 \AA^2 na concentração de $0,200 \text{ mg/mL}$. Provavelmente M6 se mantém na subfase não penetrando nas monocamadas de DMPA e não provocando expansão, devido principalmente a sua alta solubilidade em tampão Theorell e à diminuição (ou inexistência) de interações hidrofóbicas.



(a)



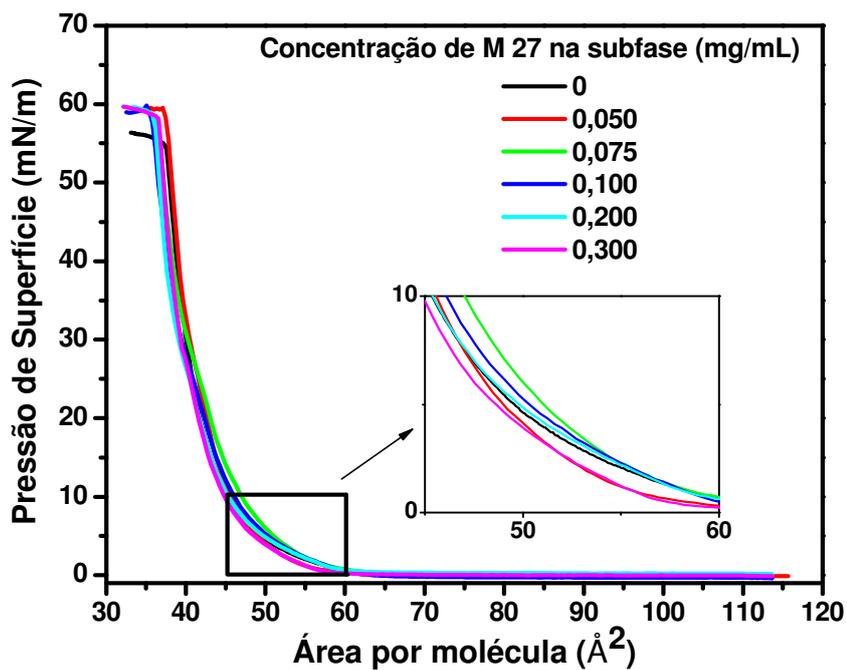
(b)

Figura 30 - Isothermas de pressão (a) e de potencial de superfície (b) de monocamadas de DMPA puro e de DMPA sobre subfase contendo M6 em diferentes concentrações.

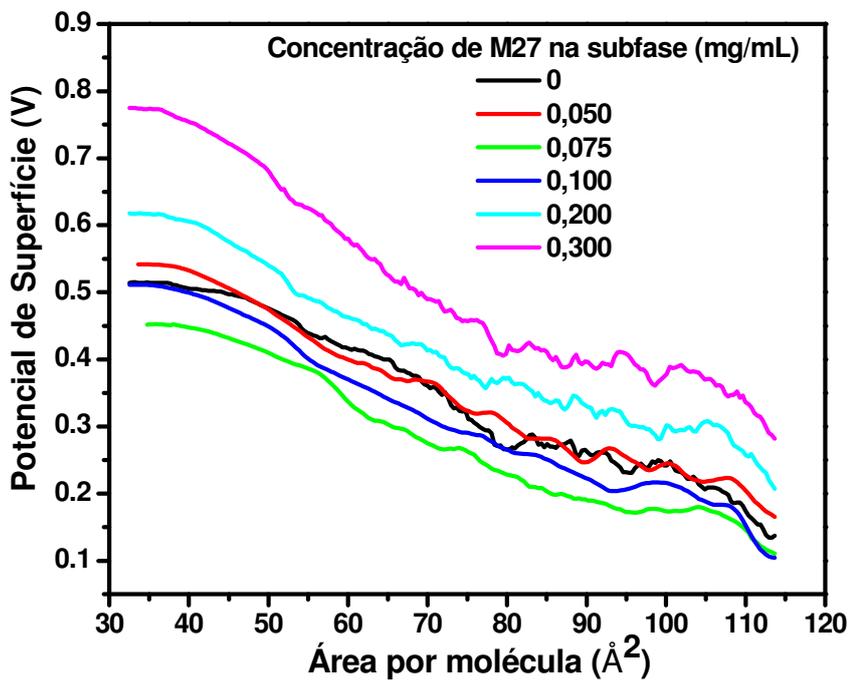
Apesar de o efeito de M6 ser pequeno para as isotermas de pressão, há um aumento considerável no potencial de superfície, mostrado na figura 31(b). Esse aumento se deve à adsorção das unidades repetitivas de quitosana na subsuperfície das monocamadas lipídicas, principalmente dos grupos glucosamina, em maior proporção em M6 (94%). Os grupos glucosamina em solução ácida (tampão Theorell pH 3,0) estão protonados e por isso adsorvem por atração eletrostática ao grupo polar negativo do DMPA, contribuindo para o potencial de superfície. Mencione-se também que mesmo para menores áreas, onde se dá o colapso das monocamadas, o potencial de superfície atinge valores altos, 0,85 V, ao passo que para a monocamada de DMPA é 0,45 V, assim como para as monocamadas com Q6. Ocorre que M6 se mantém na subsuperfície contribuindo para o potencial de superfície.

As figuras 32 (a) e (b) mostram as isotermas para monocamadas de DMPA sobre subfase contendo M27, proporção de unidades repetitivas com 27% de acetilglucosamina e 73% de glucosamina. Observa-se na ampliação que a expansão promovida por M27 é muito pequena, desprezível se comparada à expansão provocada por Q27. Por exemplo, para a pressão de 5 mN/m e concentração de 0,200 mg/mL, a expansão é de aproximadamente 3,6 Å² na área, enquanto que para as mesmas condições em subfase com M27 a expansão é de 0,3 Å² (dentro do erro experimental, obviamente). A área mínima das monocamadas sobre subfase com M27 na concentração de 0,200 mg/mL é 42 Å², o mesmo valor que para as monocamadas de DMPA sobre subfase tampão. Já para as mesmas condições de Q27 a área mínima é 48 Å².

A não expansão das monocamadas de DMPA por M27 e M6 indica que as amostras se mantêm na subfase, não penetrando nas monocamadas de DMPA. Isso é devido à alta solubilidade em tampão Theorell e uniformidade (não há interferência de conformação de cadeias ou enovelamentos) na adsorção das unidades repetitivas carregadas positivamente na monocamada de DMPA. Por outro lado, para Q27 e Q6, polímeros de alta massa molecular, as longas cadeias parecem ter penetração facilitada nas monocamadas de DMPA, provavelmente por interações hidrofóbicas.



(a)



(b)

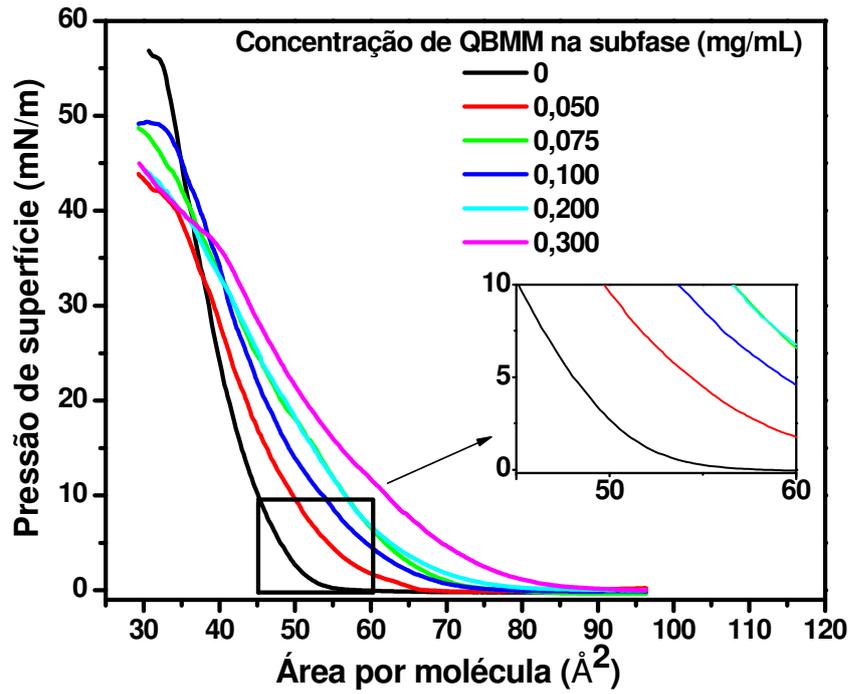
Figura 31 - Isothermas de pressão (a) e de potencial de superfície (b) de monocamadas de DMPA puro e de DMPA sobre subfase contendo M27 em diferentes concentrações.

Apesar da não expansão das monocamadas nas isotermas de pressão de superfície com M27 na subfase, o potencial de superfície é muito afetado, aumentando especialmente para altas concentrações de M27. Esse aumento no potencial de superfície se deve à adsorção das unidades repetitivas na subsuperfície das monocamadas lipídicas, principalmente dos grupos glucosamina protonados. De forma semelhante a M6, para M27 mesmo em menores áreas, (áreas do colapso das monocamadas) o potencial de superfície atinge valores altos de aproximadamente 0,77 V. Como já comentado, as unidades repetitivas (M27) se mantêm adsorvidas na subsuperfície mesmo em áreas por moléculas pequenas contribuindo para o potencial de superfície.

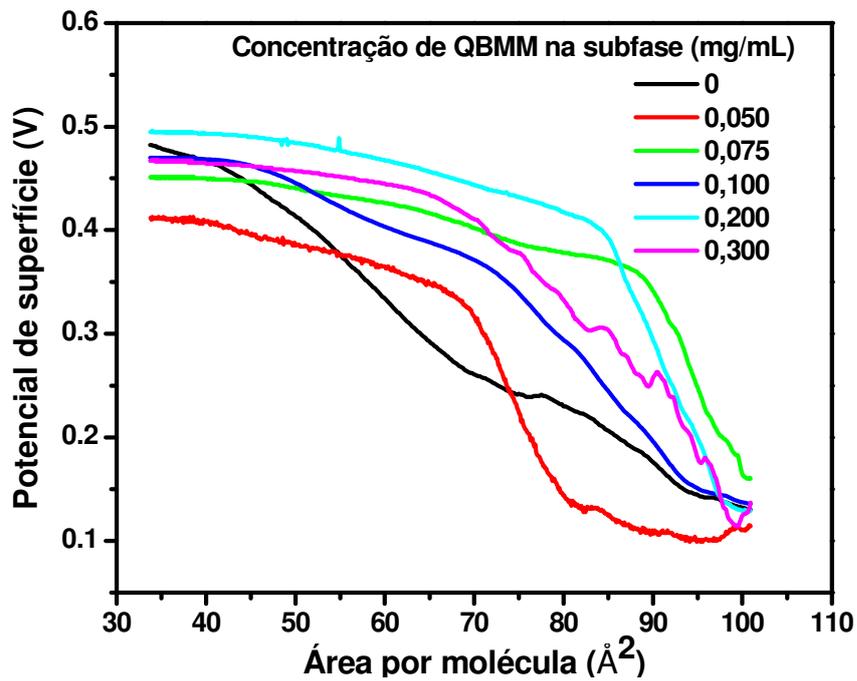
A comparação das isotermas de potencial de superfície das monocamadas de DMPA sobre subfase de M6, ou sobre subfase de M27, mostra algumas diferenças. Para subfase com M27 somente a partir da concentração de 0,200 mg/mL há um considerável aumento no potencial, enquanto que para M6 o aumento é percebido mesmo em concentrações de 0,100 mg/mL. Isto se deve à M6 ter 21% a mais de glucosamina em sua composição, tendo assim maior densidade de carga para adsorção na subsuperfície das monocamadas lipídicas. O maior aumento no potencial ocorre para M6. Nas figuras 31(b) e 32(b), nota-se que o potencial de superfície para a monocamada de DMPA sobre subfase com pequenas concentrações de M6 e M27 é até menor do que para o DMPA puro. Este resultado não é consistente com o aumento esperado com a contribuição positiva das cargas de M6 ou M27 adsorvidas na monocamada. Pode ser que a contribuição da reorientação das moléculas de água seja predominante nestes casos, mas os resultados apresentados aqui não permitem verificar esta hipótese. Mais estudos serão necessários com baixas concentrações para tentar explicar este resultado inesperado.

Os efeitos da quitosana de baixa massa molecular (QBMM) estão ilustrados nas figuras 33 (a) e (b). Há grande expansão nas isotermas de pressão de superfície em relação à de DMPA formada em subfase tampão, um efeito que aumenta com a concentração de QBMM na subfase. A expansão é mais evidente quando, na ampliação, delimitamos a área de 45 \AA^2 a 60 \AA^2 e pressão de 0 mN/m a 10 mN/m (como para todas as outras isotermas mostradas neste trabalho). Para a concentração de 0,300 mg/mL, a isoterma é tão expandida que não aparece na área delimitada. Para QBMM não se observa uma concentração de saturação na faixa utilizada, diferentemente do que ocorre para Q6 e Q27. Nas isotermas de potencial de superfície, os maiores efeitos da QBMM na subfase aparecem em grandes áreas por molécula, sendo muito pequenos para as monocamadas de DMPA no estado líquido-condensado. Assim como para outras quitosanas, aparentemente as moléculas de QBMM se localizam na subsuperfície. A curva de potencial para a menor concentração de QBMM

também levou a um potencial menor do que o DMPA puro, como já havia sido observado com as unidades repetitivas.



(a)



(b)

Figura 32 - Isotermas de pressão (a) e de potencial de superfície (b) de monocamadas de DMPA puro e de DMPA sobre subfase contendo QBMM em diferentes concentrações.

Da comparação entre Q6 e M6 ou Q27 e M27, observa-se que a expansão das monocamadas é maior para o polímero na subfase (Q6 ou Q27), sendo que o efeito maior é causado por Q6, que tem grau de acetilação menor. Na comparação entre Q6 e QBMM, esta última provoca maior expansão. Por exemplo, para 0,200 mg/mL e pressão de 5 mN/m, a área por molécula de DMPA é aumentada em $11,0 \text{ \AA}^2$ para Q6 e $14,6 \text{ \AA}^2$ para QBMM. Observam-se também diferenças na área mínima, que na concentração de 0,200 mg/mL é de 55 \AA^2 para DMPA com Q6 na subfase e 63 \AA^2 para QBMM.

Na figura 34 é mostrado um gráfico comparativo da área por molécula vs. concentração, na pressão de 10 mN/m, que ilustra a maior expansão das monocamadas provocada por QBMM do que por Q6 ou M6. A monocamada é mais afetada por QBMM, depois por Q6 (seguida de Q27) e então por M6 (seguida de M27). Para M6 a variação da área em função das concentrações é igual a $2,5 \text{ \AA}^2$; para Q6 a variação é de $8,92 \text{ \AA}^2$ e para QBMM a variação é de $14,7 \text{ \AA}^2$.

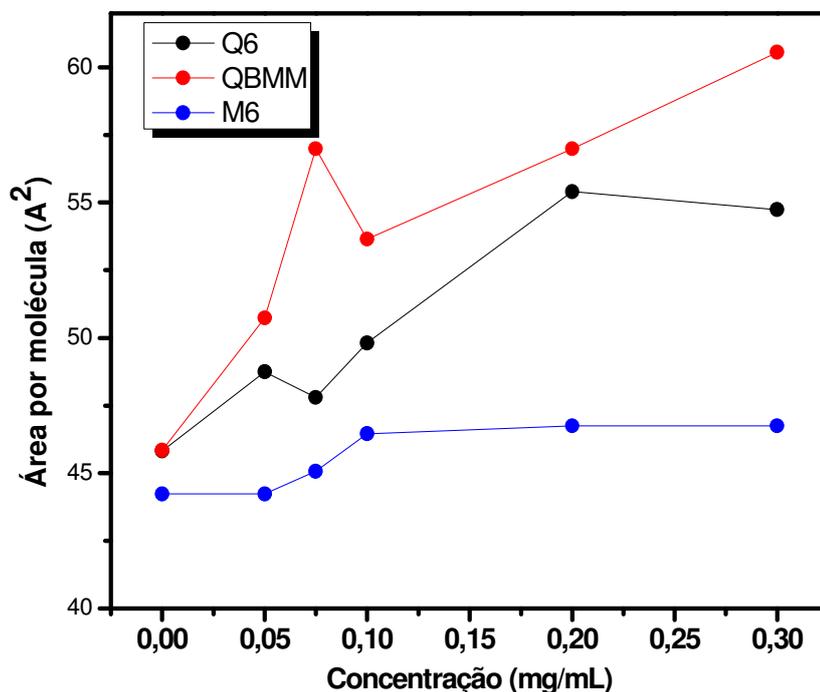


Figura 33 - Comparativo da área por molécula de fosfolípido (monocamadas de DMPA), na pressão de 10 mN/m, em função da concentração de M6, Q6 ou QBMM na subfase.

4.4.2.2. Elasticidade no plano

As figuras 35 (a), (b) e (c) mostram o módulo de compressibilidade (Cs^{-1}), ou, elasticidade no plano, para o DMPA em subfases contendo M6, M27 e QBMM, respectivamente. A elasticidade não é afetada por M6 ou M27. O pico que indica a máxima compressão das monocamadas coincide tanto para DMPA sobre tampão, quanto para DMPA sobre subfase com M6 e M27.

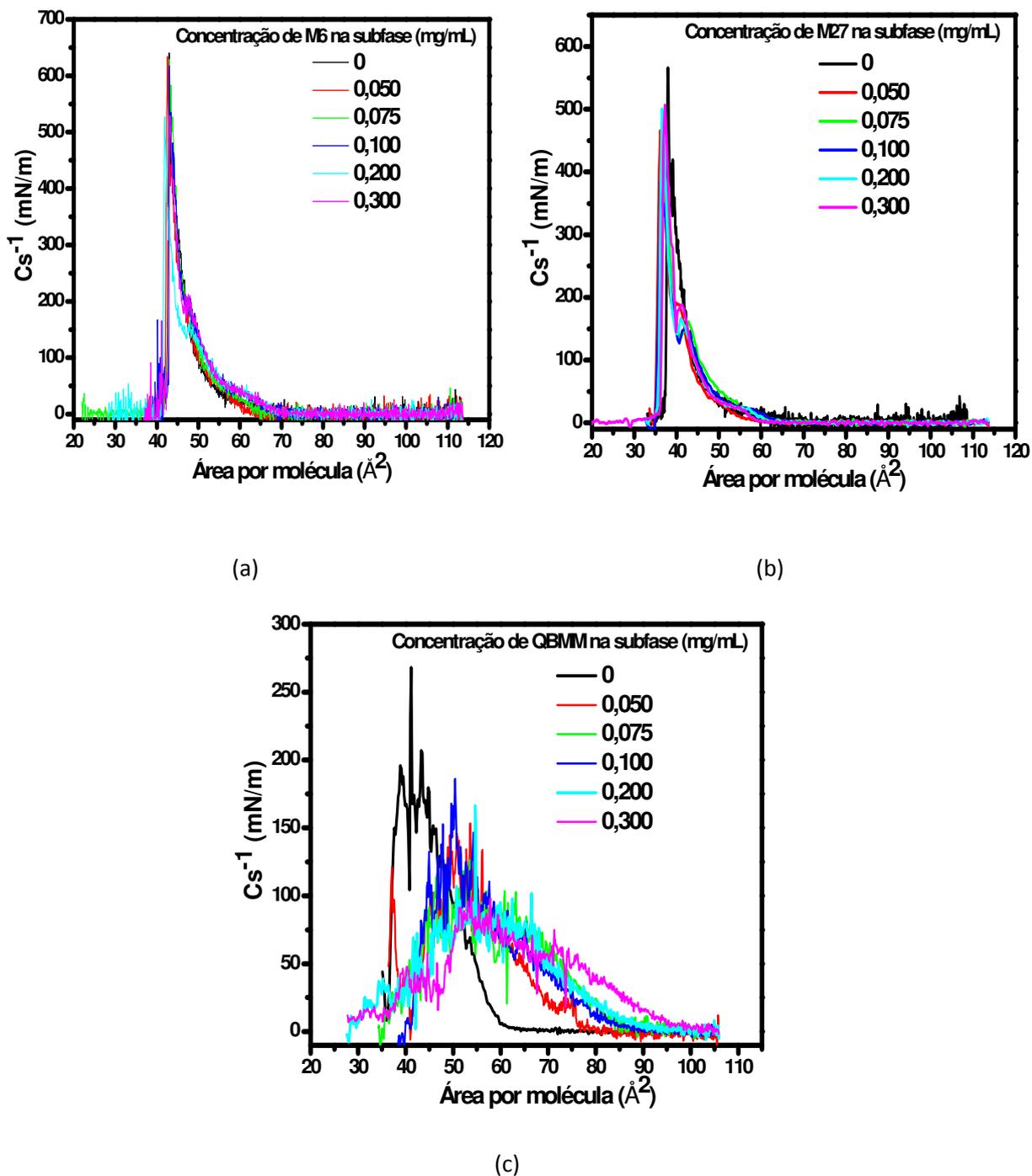


Figura 34 - Módulo de elasticidade para as amostras M6 (a), M27 (b) e QBMM (c).

A figura 35 (c) mostra o efeito de QBMM sobre a elasticidade dos filmes de DMPA. QBMM afeta claramente a elasticidade das monocamadas de DMPA, que tem uma diminuição no seu pico máximo para todas as concentrações na subfase. Causa uma redução na compressibilidade de 250 mN/m para 150 mN/m em concentrações menores (0,050mg/mL – 0,100mg/mL) de QBMM e 100 mN/m para as concentrações maiores (0,200mg/mL –

0,300mg/mL), demonstrando que a presença de QBMM na subfase torna as monocamadas mais flexíveis. Além da diminuição do pico máximo, há um deslocamento para áreas maiores, de 42 \AA^2 para 55 \AA^2 nas concentrações maiores. As mudanças causadas por QBMM nas propriedades mecânicas das monocamadas de DMPA evidenciam a forte interação dessa quitosana com os modelos de membrana. Os efeitos provocados na elasticidade do filme por Q6 e Q27 apresentados na figura 29 (a) e (b) são menores do que os provocados por QBMM e maiores do que aqueles por M6 e M27.

4.4.2.3 Conclusões

A comparação das isotermas de pressão e de potencial de superfície das monocamadas formadas por DMPA sobre subfase com M6, M27, Q6, Q27 e QBMM permitiu investigar a influência da massa molecular de quitosana sobre os modelos de membrana celular. Os efeitos sobre a elasticidade de DMPA também foram avaliados. Observou-se que M6 e M27 não apresentam efeitos significativos sobre a pressão de superfície do DMPA, mas grande efeito sobre o potencial de superfície, devido à densidade de cargas positivas que adsorvem nas monocamadas lipídicas por atração eletrostática. Já Q6 e Q27 possuem efeito sobre a pressão de superfície, supondo penetração nas monocamadas lipídicas, provocando diminuição da elasticidade (portanto maior flexibilidade). A QBMM possui grande efeito sobre a pressão de superfície e elasticidade das monocamadas. Em contrapartida, as amostras Q6, Q27 e QBMM induzem alterações menores no potencial de superfície das monocamadas, em comparação com M6 e M27.

A QBMM, como mostrado nas caracterizações, é uma mistura de quitosana de baixa massa molecular e oligômeros. Na literatura há relatos de que oligômeros e quitosana com baixa massa molecular possuem maior eficiência, por exemplo, como agente bactericida, se comparados com quitosana de alta massa molecular^(92,93). Os maiores efeitos são atribuídos ao fato de a mobilidade, atração e interação iônica serem facilitadas no caso de cadeias menores⁽⁹⁴⁾. Em polímeros com alta massa molecular há maior probabilidade de enovelamentos em solução, o que dificulta a mobilidade e portanto a adsorção e interação. Isso é consistente com o grande efeito no potencial das misturas das unidades repetitivas M6 e

M27, que, todavia não causam efeitos na pressão e elasticidade porque não conseguem penetrar na monocamada. Do ponto de vista de ação biológica, portanto, não se espera que essas unidades repetitivas possam ser eficazes, porque apenas alteram o potencial elétrico da membrana.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O estudo da ação de quitosana no nível molecular sobre membranas celulares é importante, pois o conhecimento do seu mecanismo de ação pode explicar muitas de suas aplicações biológicas em que há interação com membranas. Este é o caso da liberação controlada de drogas, no recobrimento de ferimentos e no uso de suas propriedades muco adesivas. Essas aplicações, assim como a de quitosana como agente bactericida, são a motivação do presente trabalho. Na função bactericida de quitosana três hipóteses de ação sobre as bactérias são aceitas: i) a quitosana penetra na célula da bactéria e provoca disfunção celular; ii) a quitosana envolve a célula da bactéria e impede a troca de sais e nutrientes com o meio, e, iii) a quitosana envolve a célula da bactéria e rompe sua membrana. Em qualquer das hipóteses certamente há interação com a membrana celular das bactérias, e, portanto a ação sobre a membrana pode explicar a função bactericida. Ressalte-se que pouco se sabe sobre os efeitos de quitosana nas membranas celulares em nível molecular, sendo este trabalho pioneiro no estudo da influência do grau de acetilação de quitosana e de sua massa molecular.

Em trabalhos anteriores observou-se que a quitosana interage com os modelos de membrana celular ^(7,8), principalmente por atração eletrostática. Além desta, ligações de hidrogênio e hidrofóbicas são importantes. Nosso objetivo então foi estudar outras características estruturais de quitosana que poderiam ser responsáveis pelas alterações induzidas sobre os modelos de membrana, no caso a porcentagem de grupos acetilados e a massa molecular.

Para avaliar a influência dos grupos acetilados, quitosanas com diferente graus de acetilação foram produzidas. Foi empregado um método inovador de desacetilação de quitina, denominado método DAIUS, em que a quitina é desacetilada em meio básico com auxílio de ultrassom de alta intensidade, desenvolvido no Grupo de Físico-Química Orgânica do IQSC-USP, pelo Prof. Sérgio Paulo Campana-Filho⁽⁴⁸⁾. Com o método DAIUS foram obtidas as amostras de quitosana Q6 e Q27, com grau de acetilação de 6% e 27%, respectivamente, determinadas por titulação condutimétrica e confirmadas por H¹-RMN. A espectroscopia de infravermelho mostrou a diferença no grau de acetilação das amostras através da intensidade dos picos. O que determinou a diferença no grau de acetilação das amostras foram o tempo de reação e a intensidade do ultrassom. Para tempos maiores e intensidades menores de reação diminui-se o grau de acetilação. Os resultados de difração de raios X das amostras sonicadas e

da quitina precursora mostraram diminuição da cristalinidade com a aplicação do ultrassom. A morfologia das quitosanas, analisada por MEV, era relativamente rugosa, enquanto que a superfície da quitina era lisa. As massas moleculares M_w , M_v , M_n e o índice de polidispersividade foram determinados por GPC e por viscosimetria capilar.

A QBMM foi produzida em solução ácida, com auxílio do ultrassom de alta intensidade. Do cromatograma de GPC notou-se que o produto é uma mistura de quitosana com baixa massa molecular e oligômeros de quitosana. A estrutura química de QBMM foi determinada por FTIR e H^1 -RMN. O processo DAIUS foi eficiente na desacetilação de quitina e produção de quitosana com baixo e médio grau de acetilação e alta massa molecular em curto período de sonicação (1h 40' e 30''), o que é inédito na literatura. A produção de quitosana de baixa massa molecular com ultrassom não foi tão eficiente devido ao rendimento de apenas 15%. A separação dos oligômeros de quitosana por diálise também não foi eficaz, obtendo-se uma mistura no produto final.

A formação de filmes de Langmuir do fosfolipídio DMPA mimetizando uma membrana celular foi essencial para elucidar as influências de quitosana e de suas unidades repetitivas. Na comparação dos resultados das amostras Q6 e Q27, verificamos a influência do grau de acetilação de quitosana. Observou-se que quanto menor o grau de acetilação da quitosana, maior foi a interação com as monocamadas de fosfolipídios, e maior o efeito sobre sua elasticidade. Isso foi atribuído à maior porcentagem de grupos amina passíveis de protonação, que possibilita forte atração eletrostática entre a quitosana e as cargas negativas das “cabeças” polares do DMPA. Com as isotermas de potencial de superfície, verificamos que provavelmente o polímero (Q6 ou Q27) expande as monocamadas fosfolipídicas por penetração e é expulso em pequenas áreas por molécula, ficando localizado na subsuperfície.

Na comparação das isotermas das monocamadas de DMPA sobre subfase tampão e contendo as amostras M6, M27, Q6, Q27 e QBMM, verificamos a influência da massa molecular de quitosana. As misturas de unidades repetitivas M6 e M27 praticamente não afetaram a pressão de superfície das monocamadas de DMPA e nem sua elasticidade. Têm, por outro lado, grande efeito sobre o potencial de superfície devido à densidade de cargas positivas que adsorvem nas monocamadas lipídicas, mesmo para áreas por molécula pequenas. As quitosanas Q6, Q27 e QBMM afetam as isotermas de pressão, com penetração nas monocamadas lipídicas, expandindo-as e provocando conseqüente aumento na área mínima e diminuição da compressibilidade (aumento na flexibilidade), conforme o aumento da concentração do polímero na subfase. As quitosanas de alta massa molecular (Q6 e Q27) provocam menor efeito nas monocamadas do que a de baixa massa molecular (QBMM). Para

derivados de quitosana com baixa massa molecular ou oligômeros de quitosana, acreditamos que as interações eletrostáticas, principais responsáveis pela ação da quitosana, sejam facilitadas pela baixa massa. A adsorção é favorecida e então maior quantidade de quitosana interage. Já com o polímero de alta massa, a interação é dificultada provavelmente pelos possíveis enovelamentos das cadeias em solução. A comparação com as unidades repetitivas também indica que interações hidrofóbicas devem ser importantes. A QBMM influencia o potencial de superfície apenas em grandes áreas por molécula. Em pressões próximas do colapso os valores de potencial de superfície são próximos independente da concentração de quitosana usada, o que indica expulsão do polímero da interface, localizando-se na subsuperfície.

Inferimos que quitosanas com grau de acetilação baixo e com massa molecular baixa (de 25.000 g/mol a 250.000 g/mol) interagem mais fortemente com a membrana celular e devem ser mais adequadas em aplicações biológicas que dependam dessa interação.

Com este trabalho concluímos que a massa molecular de quitosana, ou sua disposição em cadeias poliméricas e a quantidade de grupos amina, são essenciais para a interação com as membranas. Assim, abre-se a perspectiva de avaliar a conformação dessas cadeias em solução, na presença ou não dos fosfolipídios e também de uma possível orientação preferencial do polímero na adsorção nos modelos de membrana. O comportamento das cadeias em solução pode ser a explicação para os efeitos de quitosana. Outra meta para trabalhos futuros é a quantificação de grupos amina adsorvidos nos grupos negativos dos fosfolipídios, com a possibilidade de obter informações adicionais sobre as atrações eletrostáticas, sobre as interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio na interação entre quitosana e membranas. Isso será possível através da síntese de derivado hidrofóbico de quitosana solúvel em clorofórmio e produção de filmes de Langmuir mistos de fosfolipídios e derivados de quitosana.

REFERÊNCIAS

- 1 ROBERTS, G. A. F. **Chitin chemistry**. London: Mc Millan Press, 1992. 350p.
- 2 AGULLÓ, E. P. C.; TAPIA, C.; HERAS, Á.; ROMÁN, J. S.; ARGÜLLES, W.; GOYCOOLEA, F.; MAYORGA, A.; NAKAMATSU, J.; ABRAM, A. P. **Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones**. Perú: Pontificia Universidad Católica Del Perú/ Fondo Editorial, 2004. 312p.
- 3 KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers**, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.
- 4 SYNOWIECKI, J.; AL-KHATEEB, N. A. production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 2, p. 145-171, 2003.
- 5 RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006.
- 6 CASELI, L.; PAVINATTO, F. J.; NOBRE, T. M.; ZANIQUELLI, M. E. D.; VIITALA, T.; OLIVEIRA JR., O. N. Chitosan as a removing agent of beta-lactoglobulin from membrane models. **Langmuir**, v. 24, n. 8, p. 4150-4156, 2008.
- 7 PAVINATTO, F. J.; PAVINATTO, A.; CASELI, L.; DOS SANTOS, D. S.; NOBRE, T. M.; ZANIQUELLI, M. E. D.; OLIVEIRA JR., O. N. Interaction of chitosan with cell membrane models at the air-water interface. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 5, p. 1633-1640, 2007.
- 8 PAVINATTO, F. J.; CASELI, L.; PAVINATTO, A.; DOS SANTOS, D. S.; NOBRE, T. M.; ZANIQUELLI, M. E. D.; SILVA, H. S.; MIRANDA, P. B.; OLIVEIRA JR., O. N. Probing chitosan and phospholipid interactions using Langmuir and Langmuir-Blodgett films as cell membrane models. **Langmuir**, v. 23, n. 14, p. 7666-7671, 2007.
- 9 YANG, F.; CUI, X. Q.; YANG, X. R. Interaction of low-molecular-weight chitosan with mimic membrane studied by electrochemical methods and surface plasmon resonance. **Biophysical Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 99-106, 2002.

10 AUGUSTIN, C.; COLLOMBEL, C.; DAMOUR, O. Use of dermal equivalent and skin equivalent models for identifying phototoxic compounds in vitro. **Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine**, v. 13, n. 1-2, p. 27-36, 1997.

11 SUMIYOSHI, M.; KIMURA, Y. Low molecular weight chitosan inhibits obesity induced by feeding a high-fat diet long-term in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, n. 2, p. 201-207, 2006.

12 HEJAZI, R.; AMIJI, M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 89, n. 2, p. 151-165, 2003.

13 RABEA, E. I.; BADAWY, M. E. T.; STEVENS, C. V.; SMAGGHE, G.; STEURBAUT, W. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 6, p. 1457-1465, 2003.

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

15 DE BRITTO, D.; CAMPANA-FILHO, S. P.; DE ASSIS, O. B. G. Mechanical properties of N,N,N-trimethylchitosan chloride films. **Polímeros: ciência e tecnologia**, v. 15, n. 2, p. 142-145, 2005.

16 YALPANI, M.; HALL, L. D. Some chemical and analytical aspects of polysaccharide modifications. III. formation of branched-chain, soluble chitosan derivatives. **Macromolecules**, v. 17, n. 3, p. 272-281, 1984.

17 ZHENG, L. Y.; ZHU, J. A. F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 4, p. 527-530, 2003.

18 JEON, Y. J.; PARK, P. J.; KIM, S. K. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, n. 1, p. 71-76, 2001.

19 GARDNER, K. H.; BLACKWELL, J. Refinement of Structure of Beta-Chitin. **Biopolymers**, v. 14, n. 8, p. 1581-1595, 1975.

20 KURITA, K.; ISHII, S.; TOMITA, K.; NISHIMURA, S. I.; SHIMODA, K. Reactivity characteristics of squid beta-chitin as compared with those of shrimp chitin - high potentials of squid chitin as a starting material for facile chemical modifications. **Journal of Polymer Science Part A - polymer chemistry**, v. 32, n. 6, p. 1027-1032, 1994.

21 SAITO, Y.; SUGIYAMA, J.; OKANO, T.; CHANZY, H.; PUTAUX, J. L. Structural aspects of alpha and beta chitin crystals. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 213, p. 115-CELL, 1997.

22 SAITO, Y.; OKANO, T.; GAILL, F.; CHANZY, H.; PUTAUX, J. L. Structural data on the intra-crystalline swelling of beta-chitin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 28, n. 1, p. 81-88, 2000.

23 LAVAL, R. L. **Estudos de obtenção, desacetilação e caracterização físico-química de β -quitina dos gládios de lulas do gênero loligo**. 2003. 151 f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

24 CAMPANA-FILHO, S. P.; DE BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R. L. Extraction, structures and properties of alpha- and beta-chitin. **Quimica Nova**, v. 30, n. 3, p. 644-650, 2007.

25 CAMPANA-FILHO, S. P.; CAVALHEIRO, É. T. G.; SANTOS, J. E.; SOARES, J. P.; DOCKAL E. R. Caracterização de Quitosanas Comerciais de Diferentes Origens. **Polímeros: ciências e tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

26 SIGNINI, R.; DESBRIERES, J.; CAMPANA-FILHO, S. P. On the stiffness of chitosan hydrochloride in acid-free aqueous solutions. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, n. 4, p. 351-357, 2000.

27 CAMPANA-FILHO, S. P.; SEGNINI, R. Efeito de aditivos na desacetilação de quitina. **Polímeros: ciência e tecnologia**, v. 11, n. 4, p. 169-173, 2001.

28 SANNAN, T.; KURITA, K.; IWAKURA, Y. Studies on chitin .2 - effect of deacetylation on solubility. **Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 177, n. 12, p. 3589-3600, 1976.

29 ROGOVINA, S. Z.; AKOPOVA, T. A.; VIKHOREVA, G. A. Investigation of properties of chitosan obtained by solid-phase and suspension methods. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 70, n. 5, p. 927-933, 1998.

30 FOCHER, B.; BELTRAME, P. L.; NAGGI, A.; TORRI, G. Alkaline N-deacetylation of chitin enhanced by flash treatments - reaction-kinetics and structure modifications. **Carbohydrate Polymers**, v. 12, n. 4, p. 405-418, 1990.

31 CARDOSO, M. B.; SIGNINI, R.; CAMPANA-FILHO, S. P. On the sonication of chitin: effects on its structure and morphology and influence on its deacetylation. **Polymer Bulletin**, v. 47, n. 2, p. 183-190, 2001.

32 GOYCOOLEA, F. M.; HIGUERA-CIAPARA, I.; HERNÁNDEZ, G.; LIZARDI, J.; GARCIA, K. D. Preparation of chitosan from quid (*Loligo* spp.) pen by microwave-accelerated thermochemical process. In: DOMARD, A.; ROBERTS, G. A. F.; VÅRUM, K. M. (Eds.). **Advances in Chitin Science**. Lyon: Jacques Andre publisher, 1998. v. 2, p. 78-83.

33 CAMPANA-FILHO, S. P.; SEGNINI, R. Effects of additives and inert gas bubbling on the deacetylation of chitosan. **International Journal of Polymeric Materials**, v. 51, n. 8, p. 701-709, 2002.

34 ROBERTS, G. A.; WOOD, F. A. Inter-source reproducibility of the chitin deacetylation process. In: PETER, M. G. DOMARD, A.; MUZZARELLI, R. A. A. (Eds.). **Advances in Chitin Science**. Potsdam: Universitat Potsdam, 2000. v. 4, p. 34-39.

35 LAMARQUE, G.; CRETENET, M.; VITON, C.; DOMARD, A. New route of deacetylation of alpha- and beta-chitins by means of freeze-pump out-thaw cycles. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 3, p. 1380-1388, 2005.

36 LAMARQUE, G.; CHAUSSARD, G.; DOMARD, A. Thermodynamic aspects of the heterogeneous deacetylation of beta-chitin: reaction mechanisms. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 6, p. 1942-1950, 2007.

37 MARGULIS, M. A.; MARGULIS, I. M. Contemporary review on nature of sonoluminescence and sonochemical reactions. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2002.

38 RAJA, M.; RYU, S. H. Synthesis of carbon nanotube through sonochemical process under ambient conditions. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 9, n. 10, p. 5940-5945, 2009.

39 MASON, T. J. A general introduction to sonochemistry. In: MASON, T. J. (Ed.), **Sonochemistry: the uses of ultrasound in chemistry**. London: The Royal Society of Chemistry, 1990. cap.1, p. 1-18.

40 MASON, T. J. Ultrasound in synthetic organic chemistry. **Chemical Society Reviews**, v. 26, n. 6, p. 443-451, 1997.

- 41 PETERS, D. Ultrasound in materials chemistry. **Journal of Materials Chemistry**, v. 6, n. 10, p. 1605-1618, 1996.
- 42 SUSLICK, K. S.; HAMMERTON, D. A.; CLINE, R. E. The sonochemical hot-spot. **Journal of the American Chemical Society**, v. 108, n. 18, p. 5641-5642, 1986.
- 43 PRICE, G. J.; HEARN, M. P.; WALLACE, E. N. K.; PATEL, A. M. Ultrasonically assisted synthesis and degradation of poly(dimethyl siloxane). **Polymer**, v. 37, n. 12, p. 2303-2308, 1996.
- 44 CARDOSO, M. B. **Estudo dos efeitos da irradiação de quitina com ultra-som sobre sua desacetilação**. 2003. 67 f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.
- 45 CAMPANA-FILHO, S. P.; SEGNINI, R.; CARDOSO, M. B. Effects of sonication on the reactivity of chitin towards its deacetylation. **International Journal of Polymeric Materials**, v. 51, n. 8, p. 695-700, 2002.
- 46 CARDOSO, M. B. **Contribuição ao estudo da reação de desacetilação de quitina: estudos da desacetilação assistida por ultra-som de alta potência**. 2008. 96 f. Tese (Doutorado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
- 47 DELEZUK, J. A. D. M. **Desacetilação de beta-quitina assistida por ultra-som de alta intensidade: estudo dos efeitos da amplitude e do tempo de irradiação e da temperatura de reação**. 2009. 97f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.
- 48 UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Instituto de Química de São Carlos. Jorge Augusto de Moura Delezuk; Márcia Cardoso Barreto; Alain Domard; Sérgio Paulo Campana-Filho. **Processo para preparação de quitosana por meio de desacetilação de quitina**. Protocolo nº 018090022335, 4 maio de 2009.
- 49 POPA-NITA, S.; LUCAS, J. M.; LADAVIERE, C.; DAVID, L.; DOMARD, A. Mechanisms involved during the ultrasonically induced depolymerization of chitosan: characterization and control. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 5, p. 1203-1211, 2009.
- 50 VARUM, K. M.; OTTOY, M. H.; SMIDSRØD, O. Acid hydrolysis of chitosans. **Carbohydrate Polymers**, v. 46, n. 1, p. 89-98, 2001.

51 QIN, C. Q.; GAO, J. N.; WANG, L. S.; ZENG, L. T.; LIU, Y. Safety evaluation of short-term exposure to chitooligomers from enzymic preparation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 6, p. 855-861, 2006.

52 CABRERA, J. C.; VAN CUTSEM, P. Preparation of chitooligosaccharides with degree of polymerization higher than 6 by acid or enzymatic degradation of chitosan. **Biochemical Engineering Journal**, v. 25, n. 2, p. 165-172, 2005.

53 TOMMERAAS, K.; VARUM, K. M.; CHRISTENSEN, B. E.; SMIDSROD, O. Preparation and characterization of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerization of chitosans. **Carbohydrate Research**, v. 333, n. 2, p. 137-144, 2001.

54 VAN DER DRIFT, K. M. G. M.; OLSHOORN, M. M. A.; BRULL, L. P.; BLOK-TIP, L.; THOMAS-OATES, J. E. Mass spectrometric analysis of lipo-chitin oligosaccharides - signal molecules mediating the host-specific legume-rhizobium symbiosis. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 17, n. 2, p. 75-95, 1998.

55 DAVIES, J. T.; RIDEAL, E.K. **Interfacial Phenomena**. New York: Academic Press, 1963. v. 1. 265p.

56 LANGMUIR, I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. liquids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 39, n. 9, p. 1848-1906, 1917.

57 ROBERTS, G. **Langmuir-Blodgett films**. New York: Plenum Press, 1990, 425p.

58 BLODGETT, K. B. Monomolecular films of fatty acids on glass. **Journal of the American Chemical Society**. v. 56, n. 2, p. 495-495, 1934.

59 GIRARD-EGROT, A. P.; GODOY, S.; CHAUVET, J. P.; BOULLANGER, P.; COULET, P. R. Preferential orientation of an immunoglobulin in a glycolipid monolayer controlled by the disintegration kinetics of proteo-lipidic vesicles spread at an air-buffer interface. **Biochimica et Biophysica Acta - biomembranes**, v. 1617, n. 1-2, p. 39-51, 2003.

60 OLIVEIRA JR., O. N.; DOS SANTOS JR., D. S.; BALOGH, D. T.; ZUCOLOTTO, V.; MENDONCA, C. R. Optical storage and surface-relief gratings in azobenzene-containing nanostructured films. **Advances in Colloid and Interface Science**., v. 116, n. 1-3, p. 179-92, 2005.

61 FANG, N.; CHAN, V. Interaction of liposome with immobilized chitosan during main phase transition. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 3, p. 581-588, 2003.

- 62 BABAK, V.; LUKINA, I.; VIKHOREVA, G.; DESBRIERES, J.; RINAUDO, M. Interfacial properties of dynamic association between chitin derivatives and surfactants. **Colloids and Surfaces a-physicochemical and engineering aspects**, v. 147, n. 1-2, p. 139-148, 1999.
- 63 PAVINATTO, F. J.; DOS SANTOS JR., D. S.; OLIVEIRA JR., O. N. Interaction between cholesterol and chitosan in Langmuir monolayers. **Polímeros: ciência e tecnologia**, v. 15, n. 2, p. 91-94, 2005.
- 64 PAVINATTO, F. J.; PACHOLATTI, C. P.; MONTANHA, E. A.; CASELI, L.; SILVA, H. S.; MIRANDA, P. B.; VIITALA, T.; OLIVEIRA JR., O. N. Cholesterol mediates chitosan activity on phospholipid monolayers and Langmuir-Blodgett films. **Langmuir**. v. 25, n. 17, p. 10051-10061, 2009.
- 65 YEAGLE, P. **The membranes of cells**. San Diego: Academic Press, 1993. 349 p.
- 66 PETTY, H. R. **Molecular biology of membranes: structure and function**. New York: Plenum Press, 1993. 404 p.
- 67 FINEGOLD, L. **Cholesterol in membrane models**. Boca Raton: CRC Press, 1993. 274 p.
- 68 BREZESINSKI, G.; MOHWALD, H. Langmuir monolayers to study interactions at model membrane surfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 100-102, p. 563-584, 2003.
- 69 LEBLANC, R. M. Molecular recognition at Langmuir monolayers. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, n. 6, p. 529-536, 2006.
- 70 FENG, S. S. Interpretation of mechanochemical properties of lipid bilayer vesicles from the equation of state or pressure-area measurement of the monolayer at the air-water or oil-water interface. **Langmuir**, v. 15, n. 4, p. 998-1010, 1999.
- 71 BROCKMAN, H. Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions? **Current Opinion in Structural Biology**, v. 9, n. 4, p. 438-443, 1999.

72 MAGET-DANA, R. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1462, n. 1-2, p. 109-140, 1999.

73 KURITA, K.; NISHIMURA, S. I.; ISHII, S.; TOMITA, K.; TADA, T.; SHIMODA, K. Characteristic properties of squid chitin. In: BRINE, C. J.; SANDFORD, P. A.; ZIKAKIS, J. (Ed). **Advances in Chitin and Chitosan**, London: Elsevier Applied Science, 1992. p. 188-195.

74 CHAUSSARD, G.; DOMARD, A. New aspects of the extraction of chitin from squid pens. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 2, p. 559-564, 2004.

75 BAXTER, S.; ZIVANOVIC, S.; WEISS, J. Molecular weight and degree of acetylation of high-intensity ultrasonicated chitosan. **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 5, p. 821-830, 2005.

76 KASAAI, M. R. Various methods for determination of the degree of N-acetylation of chitin and chitosan: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 5, p. 1667-1676, 2009.

77 SIGNINI, R. **Estudos das relações estruturas/propriedades de quitina e quitosana**. 2002. 168 f. Tese (Doutorado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

78 SIGNINI, R. **Estudos de obtenção, purificação e caracterização de quitosana**. 1998. 110f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1998.

79 SLADE JUNIOR, P. E. Polymer molecular weights. part II. In: SLADE JUNIOR, P. E.; JENKINS, L. T. (Eds). **Techniques and methods of polymer evaluation**. New York: Marcel Dekker, 1975, 592 p.

80 FLORY, P. J. **Principles of polymer chemistry**. New York: Cornell University Press, 1953. 672 p.

81 SIGNINI, R.; CAMPANA-FILHO, S. P. On the preparation and characterization of chitosan hydrochloride. **Polymer Bulletin**, v. 42, n. 2, p. 159-166, 1999.

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

83 CANEVAROLO JÚNIOR, S. V. **Ciência dos polímeros**: um texto básico para tecnólogos e engenheiros. São Paulo: Artiller editora, 2002. 183p.

84 XING, R. E.; LIU, S.; YU, H. H.; GUO, Z. Y.; WANG, P. B.; LI, C. P.; LI, Z.; LI, P. C. Salt-assisted acid hydrolysis of chitosan to oligomers under microwave irradiation. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 13, p. 2150-2153, 2005.

85 SUGIYAMA, H.; HISAMICHI, K.; SAKAI, K.; USUI, T.; ISHIYAMA, J. I.; KUDO, H.; ITO, H.; SENDA, Y. The conformational study of chitin and chitosan oligomers in solution. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 211-216, 2001.

86 PITTLER, J.; BU, W.; VAKNIN, D.; TRAVESSET, A.; MCGILLIVRAY, D. J.; LOESCHE, M. Charge inversion at minute electrolyte concentrations. **Physical Review Letters**, v. 97, n. 4, p. 046102-1-046102-4, 2006.

87 VOLLHARDT, D.; FAINERMAN, V. B.; SIEGEL, S. Thermodynamic and textural characterization of DPPG phospholipid monolayers. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, n. 17, p. 4115-4121, 2000.

88 MINONES, J.; DYNAROWICZ-LATKA, P.; MINONES, J.; PATINO, J. M. R.; IRIBARNEGARAY, E. Orientational changes in dipalmitoyl phosphatidyl glycerol Langmuir monolayers. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 265, n. 2, p. 380-385, 2003.

89 CASELI, L.; MORAES, M. L.; ZUCOLOTTI, V.; FERREIRA, M.; NOBRE, T. M.; ZANIQUELLI, M. E. D.; RODRIGUES, U. P.; OLIVEIRA JR., O. N. Fabrication of phytic acid sensor based on mixed phytase-lipid Langmuir-Blodgett films. **Langmuir**, v. 22, n. 20, p. 8501-8508, 2006.

90 OLIVEIRA JR., O. N.; TAYLOR, D. M.; MORGAN, H. Modeling the surface-potential area dependence of a stearic-acid monolayer. **Thin Solid Films**, v. 210, n. 1-2, p. 76-78, 1992.

91 KOZARAC, Z.; MOBIUS, D. Protamine-induced adsorption of sodium pyrene-3-sulphonate (NaPyS) on the lipid monolayers. **Colloids and Surfaces a-physicochemical and engineering aspects**, v. 135, n. 1-3, p. 165-174, 1998.

92 LIN, S. B.; CHEN, S. H.; PENG, K. C. Preparation of antibacterial chito-oligosaccharide by altering the degree of deacetylation of beta-chitosan in a *Trichoderma harzianum* chitinase-hydrolysing process. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, n. 2, p. 238-244, 2009.

93 RUNARSSON, O. V.; HOLAPPA, J.; NEVALAINEN, T.; HJALMARSDDOTTIR, M.; JARVINEN, T.; LOFTSSON, T.; EINARSSON, J. M.; JONSDOTTIR, S.; VALDIMARSDOTTIR, M.; MASSON, M. Antibacterial activity of methylated chitosan and chitooligomer derivatives: synthesis and structure activity relationships. **European Polymer Journal**, v. 43, n. 6, p. 2660-2671, 2007.

94 GOY, R. C.; DE BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. A review of the antimicrobial activity of chitosan. **Polimeros-ciencia e tecnologia**, v. 19, n. 3, p. 241-247, 2009.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)