



**AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**IMOBILIZAÇÃO DA QUITOSANA DA CARAPAÇA DE SIRI CHARYBDIS  
HELLERII EM FILMES POLIMÉRICOS A PARTIR DE SUA OBTENÇÃO COM O  
USO DA RADIAÇÃO IONIZANTE**

**MAIARA SALLA FERREIRA**

**Dissertação apresentada como  
parte dos requisitos para  
obtenção do Grau de Mestre em  
Ciências na Área de Tecnologia  
Nuclear – Aplicações**

**Orientador:  
Prof. Dr. Áurea Beatriz  
Cerqueira Geraldo**

**São Paulo**

**2016**

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**  
**Autarquia associada à Universidade de São Paulo**

**IMOBILIZAÇÃO DA QUITOSANA DA CARAPAÇA DE SIRI CHARYBDIS  
HELLERII EM FILMES POLIMÉRICOS A PARTIR DE SUA OBTENÇÃO COM O  
USO DA RADIAÇÃO IONIZANTE**

**MAIARA SALLA FERREIRA**

**Dissertação apresentada como  
parte dos requisitos para  
obtenção do Grau de Mestre em  
Ciências na Área de Tecnologia  
Nuclear – Aplicações**

**Orientador:**

**Prof. Dr. Áurea Beatriz  
Cerqueira Geraldo**

**São Paulo**

**2016**

Aos meus pais Waldyr e  
Rosa Maria por todo amor e  
compreensão, sempre, em  
todos os momentos.

## **Agradecimentos:**

Em primeiro lugar, quero agradecer a Rosa e ao Waldyr por terem decidido se casar. Sem eles, eu não existiria e muito menos esse trabalho. Gostaria de agradecer por todo o carinho com o qual eu fui criada, os valores familiares que me foram ensinados e principalmente a entender que a vida é feita de altos e baixos e que não devemos desistir na primeira queda. Eles foram fortes e seguraram uma barra gigantesca permitindo que eu me dedicasse aos meus estudos. O meu verdadeiro e emocionado obrigada!

Ao meu namorado Clovis. Conheceu-me no meio dessa jornada e aceitou ser meu companheiro. Entendeu meus muitos momentos de concentração. As tantas vezes que eu disse não, pois precisava estudar. Obrigada pela compreensão e paciência. E por seu amor tão puro e genuíno.

A minha querida orientadora e amiga, Áurea. Aprendi tanta coisa com ela. Coisas de química, radiação e da vida. Ensinou-me como realmente se faz pesquisa. Que não é algo rápido e exato. Mas que quando você alcança seu objetivo, a sensação é indescritível.

Aos meus vários amigos de pesquisa e laboratório, Eduardo, Luis, Jéssica, Leandro, Mariana, Bruna entre outros. Tantos jovens com tantos sonhos parecidos com os meus.

Ao pessoal do irradiador, Bete e Carlos, pela disposição, paciência e ajuda com a irradiação das minhas amostras.

A dra. Marina, do centro de radiobiologia, por acreditar no meu trabalho e aceitar o desafio que lhe foi proposto. Sem ela, esse trabalho estaria incompleto.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa concedida para a realização deste trabalho.

E por último, mas não menos importante, a Deus. Pedi orientação e ele colocou no meu caminho as pessoas exatas nos momentos certos. Ele fez com que eu trilhasse um caminho difícil e tortuoso, para que eu realmente entendesse o sentido da vida e o porquê de certas coisas acontecerem. Como filha, às vezes falhei, mas ele nunca me deixou a própria sorte.

Obrigada a todos de que alguma maneira fizeram parte da minha vida e deste trabalho. A você que está lendo essa dissertação, que ela possa te ajudar e servir de inspiração para sua pesquisa. Ela foi feita com muito carinho e dedicação.

Eu sei o preço do sucesso:  
Dedicação, trabalho duro e uma incessante devoção às coisas que você quer ver  
acontecer.

Frank Lloyd Wright.

# IMOBILIZAÇÃO DA QUITOSANA DA CARAPAÇA DE SIRI CHARYBDIS HELLERII EM FILMES POLIMÉRICOS A PARTIR DE SUA OBTENÇÃO COM O USO DA RADIAÇÃO IONIZANTE

## RESUMO

A quitosana é um polisacarídeo obtido pela desacetilação das moléculas de quitina, principal constituinte de alguns fungos e do exoesqueleto de crustáceos e insetos. Os grupos amino presentes na quitosana conferem-lhe importantes propriedades biológicas, como a biodegradação, biocompatibilidade, atividade/efeitos imunológicos e atividade antibacteriana. A desacetilação da quitina é um processo cuja conversão é agressiva, já que exige o ataque da quitina em solução de álcalis em alta concentração e à quente, com duração de 6 a 8 horas. Neste trabalho, carapaças de siri da espécie *Charybdis hellerii* foi fragmentada e pré-tratada para a obtenção da quitosana e cada etapa, desde o pré-tratamento do material *in natura* à sua conversão em quitosana, foi investigada detalhadamente. Observou-se que dose e taxa de dose não influenciaram no pré-tratamento ou na etapa de desacetilação da quitina; na dose de 20 kGy (gama ou feixe de elétrons), o processo de conversão teve duração de 60 minutos. A quitosana obtida teve baixa massa molar e grau de desacetilação comparável à quitosana padrão (SA), dependendo das condições de irradiação. Além disso, apresentou inibição da atividade bacteriana tanto livre como imobilizada em substratos poliméricos de polipropileno e de polietileno processados também por radiação ionizante.

**Palavras-chaves:** Quitosana, inativação bacteriana, imobilização.

## DETENTION OF CHITOSAN OF CRAB SHELL OF CHARYBDIS HELLERII IN MOVIES POLYMERIC OBTAINED FROM USE WITH RADIATION IONIZING

### ABSTRACT

Chitosan is a polysaccharide obtained from chitin's molecule deacetylation, which is the main composition of certain fungi species and crustaceans and insects exoskeleton. The amino groups present in chitosan give it important biological properties such as biodegradability and biocompatibility, activity/immunological effects and antibacterial healing. The deacetylation of chitin is an aggressive process, which reaction processes in 6 to 8 hours under hot concentrated alkali solution. In this work, *Charybdis hellerii* crab shell's was fragmented and pre-treated for chitosan obtention and each conversion step, from *in natura* material pre-treatment to final chitosan, were investigated in details. It was observed dose and dose rate have not influence neither pre-treatment nor chitin deacetylation steps; at 20 kGy (from gamma or electron beam sources), the conversion process was performed in 60 minutes. The obtained chitosan presented low weight and deacetylation degree compared to standard chitosan, considering specific irradiation conditions. Also, obtained chitosan presented bacterial inactivity as a free compoud as immobilized onto polymeric substrates such polypropylene and polyethylene, also processed by ionizing radiation.

**Key-Words:** Chitosan, bacterial inactivation, immobilization.



## SUMÁRIO

|  |  |
|--|--|
| 1. INTRODUÇÃO .....  |  |
| 1.1. Rejeito biológico das atividades pesqueiras.....      |  |
| 2. OBJETIVO .....  |  |
| 2.1. Geral .....   |  |
| 2.2. Específicos.....                                      |  |
| 3. CONSIDERAÇÕES GERAIS .....                              |  |
| 3.1. Polímeros naturais .....                              |  |
| 3.2. Quitina.....  |  |
| 3.3. Quitosana.....  |  |
| 3.4. Propriedades físico-químicas da quitosana.....        |  |
| 3.4.1. Grau de desacetilação .....                         |  |
| 3.4.2. Massa molar.....                                    |  |
| 3.4.3. Massa molar viscosimétrica .....                    |  |
| 3.4.4. Cristalinidade .....                                |  |
| 3.4.5. Atividade antimicrobiana .....                      |  |
| 3.4.6. Membranas de quitosana.....                         |  |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS .....                               |  |
| 4.1. Quitina.....  |  |
| 4.2. Irradiação das amostras.....                          |  |
| 4.3. Purificação da quitina.....                           |  |
| 4.3.1. Processo de desmineralização .....                  |  |
| 4.3.2. Processo de desproteinização.....                   |  |
| 4.4. Síntese da quitosana - processo de desacetilação..... |  |
| 4.5. Processo de purificação da quitosana .....            |  |

|   |  |
|---|--|
| 4.6. Preparação dos filmes poliméricos .....  |  |
| 4.7. Caracterização .....   |  |
| 4.7.1. Análise do material inorgânico .....   |  |
| 4.7.2. Análise do teor proteico .....   |  |
| 4.7.3. Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) .....   |  |
| 4.7.4. Análise Termogravimétrica .....  |  |
| 4.7.5. Difração de raios x (DRX) .....  |  |
| 4.7.6. Viscosimetria .....  |  |
| 4.7.7. Avaliação da atividade inibitória do crescimento bacteriano em filmes poliméricos enxertados com quitosana ..... |  |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   |  |
| 5.1. Obtenção da quitosana .....  |  |
| 5.1.1. Purificação da quitina – etapa de desmineralização .....   |  |
| 5.1.1.1. Otimização da relação casca/volume de ácido .....  |  |
| 5.1.1.2. Cinética da desmineralização .....   |  |
| 5.1.1.3. Análise de inorgânicos na casca do siri .....  |  |
| 5.1.1.4. Rendimento .....   |  |
| 5.1.1.5. Avaliação dos processos .....  |  |
| 5.1.2. Purificação da quitina – etapa de desproteínização .....   |  |
| 5.1.2.1. Otimização da relação casca/volume de ácido .....  |  |
| 5.1.2.2. Cinética da desproteínização .....   |  |
| 5.1.2.3. Rendimento .....   |  |
| 5.1.3. Síntese da quitosana - desacetilação .....   |  |
| 5.2. Purificação da quitosana .....   |  |
| 5.3. Caracterização da quitosana .....  |  |

|  |  |
|--|--|
| 5.3.1. Espectrometria no infravermelho (FTIR).....                                     |  |
| 5.3.2. Grau de desacetilação .....   |  |
| 5.3.3. Massa molar viscosimétrica.....   |  |
| 5.3.3.1. Teste de hipótese para avaliação da massa molar.....                          |  |
| 5.3.3.2. Avaliação dos processos .....   |  |
| 5.3.3.3. Teste T-Student .....   |  |
| 5.3.3.4. Teste Z.....  |  |
| 5.3.3.5. Intervalo de confiança para variância.....                                    |  |
| 5.3.4. Grau de cristalinidade .....  |  |
| 5.3.5. Termogravimetria.....   |  |
| 5.4. Imobilização da quitosana em filmes poliméricos .....                             |  |
| 5.4.1. Espectrometria no infravermelho (FTIR).....                                     |  |
| 5.4.2. Termogravimetria.....   |  |
| 5.5. Estudo da atividade antimicrobiana .....  |  |
| 5.5.1. Obtenção do número padronizado de unidades formadoras de colônia<br>(UFC) ..... |  |
| 5.5.2. Concentração mínima inibitória do crescimento bacteriano (CMI).....             |  |
| 5.5.3. Confirmação da capacidade de inibição das quitosanas .....                      |  |
| 5.5.4. Ensaio de solubilidade da quitosana depositada nos filmes .....                 |  |
| 5.5.5. Difusão da quitosana no meio e capacidade de inibição .....                     |  |
| 6. CONCLUSÃO .....   |  |
| 7. TRABALHOS FUTUROS .....   |  |
| REFERÊNCIAS.....   |  |

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

- GD% - Grau de desacetilação
- IPEN – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
- CNEN/SP – Comissão Nacional de Energia Nuclear / São Paulo
- EB – Irradiação acelerador de elétrons
- $\gamma$  – Irradiação gama
- PE – Polietileno
- PP – Polipropileno
- PEv – Polietileno virgem
- PPv – Polipropileno virgem
- PEi – Polietileno irradiado
- PPI – Polipropileno irradiado
- PE/Quito SA – Polietileno enxertado com quitosana Sigma-Aldrich
- PE/Quito EB - Polietileno enxertado com quitosana irradiada via acelerador de elétrons
- PE/Quito Gama - Polietileno enxertado com quitosana irradiada Gama
- PP/Quito SA – Polipropileno enxertado com quitosana Sigma-Aldrich
- PP/Quito EB - Polipropileno enxertado com quitosana irradiada via acelerador de elétrons
- PP/Quito Gama - Polipropileno enxertado com quitosana irradiada Gama
- Quito SA – Quitosana utilizada como padrão da Sigma-Aldrich

## LISTA DE FIGURAS

|  |  |
|--|--|
| FIGURA 1: Estrutura da quitina (KUMAR, 2000) .....   |  |
| FIGURA 2: Estrutura da quitosana (KUMAR, 2000) .....   |  |
| FIGURA 3: Localização da captura dos siris.....  |  |
| FIGURA 4: Armadilha da captura dos siris .....   |  |
| FIGURA 5: Processo de obtenção da quitosana proveniente do siri .....  |  |
| FIGURA 6: Processo de desmineralização da casca do siri .....  |  |
| FIGURA 7: Processo de desacetilação da casca do siri .....   |  |
| FIGURA 8: Cinética da primeira etapa de purificação – desmineralização da casca do siri .....  |  |
| FIGURA 9: Teor de espécies inorgânicas avaliadas – casca do siri tamisada a 32 mesh e em 60 minutos.....                                       |  |
| FIGURA 10: Teor de espécies inorgânicas avaliadas (32 mesh; 20 g/L).....   |  |
| FIGURA 11: Teor de espécies inorgânicas avaliadas (32 mesh; 60 minutos) .....  |  |
| FIGURA 12: Teor proteico como primeira etapa no processo de purificação da quitina irradiada e não irradiada em granulometrias distintas ..... |  |
| FIGURA 13: Teor proteico como segunda etapa no processo de purificação da quitina (32 mesh) .....  |  |
| FIGURA 14: Teor proteico como segunda etapa no processo de purificação da quitina (100 mesh) .....   |  |
| FIGURA 15: Cinética da desproteínização como segunda etapa de purificação da quitina .....   |  |
| FIGURA 16: Espectro FTIR da quitina do siri <i>in natura</i> .....   |  |
| FIGURA 17: Espectros FTIR da quitosana SA e do siri irradiada e não irradiada  |  |

|  |  |
|--|--|
| FIGURA 18: Cálculo do grau de desacetilação através da proposição da linha de base .....                                       |  |
| FIGURA 19: Determinação da viscosidade intrínseca da quitosana.....  |  |
| FIGURA 20: Difratoograma das quitosanas SA e do siri.....  |  |
| FIGURA 21: Termograma e DTG da quitosana SA .....  |  |
| FIGURA 22: Termograma e DTG da quitosana do siri sem irradiação (0 kGy).....   |  |
| FIGURA 23: Termograma e DTG da quitosana do siri irradiada (20 kGy Gama) .   |  |
| FIGURA 24: Espectro FTIR do PPv e do PPI.....  |  |
| FIGURA 25: Espectro FTIR do PP/Quito SA, PP/Quito 0 kGy e PP/Quito 20 kGy gama.....  |  |
| FIGURA 26: Espectro FTIR do PEv e PEi .....  |  |
| FIGURA 27: Espectro FTIR do PE/Quito SA, PE/Quito 0 kGy e PE/Quito 20 kGy gama.....  |  |
| FIGURA 28: Termograma (TGA e DSC) do PP virgem .....   |  |
| FIGURA 29: Termograma (TGA e DSC) do PP irradiado .....  |  |
| FIGURA 30: Termograma (TGA e DSC) da amostra de quitosana SA imobilizada no substrato de PP.....                               |  |
| FIGURA 31: Termograma (TGA e DSC) da amostra de quitosana do siri irradiada (20 kGy Gama) imobilizada no substrato de PP ..... |  |
| FIGURA 32: Termograma (TGA e DSC) do PE virgem .....   |  |
| FIGURA 33: Termograma (TGA e DSC) do PE irradiado .....  |  |
| FIGURA 34: Termograma (TGA e DSC) da amostra de quitosana SA imobilizada no substrato de PE.....                               |  |
| FIGURA 35: Termograma (TGA e DSC) da amostra de quitosana do siri irradiada 20 (kGy Gama) imobilizada no substrato de PE ..... |  |

FIGURA 36: Diminuição da turbidez em função da concentração de quitosana...

FIGURA 37: Teste de lixiviação .....

FIGURA 38: Filmes com quitosana posicionados na superfície de placa placa LB+Ágar inoculada com  $8 \times 10^3$  UFC de E. coli (W3110). (1) PP EB, (2) PE EB, (3) PP gama e (4) PE gama. ....

FIGURA 39: Filmes com quitosana depositados sobre placa contendo meio LB+Ágar com inoculação de aproximadamente  $8 \times 10^3$  UFC de Staphylococcus aureus. (1) PP EB, (2) PP gama, (3) PE EB e (4) PE gama. ....

FIGURA 40: Estudo da difusão da quitosana em meio LB+ágar. - Comparação entre soluções preparadas com padrão Aldrich e com quitosana de carangueijo produzida no IPEN. 50ul/poço. (1) 1,25ug/mL (IPEN), (2) 1,25ug/mL (Aldrich), (3) 0,75ug/mL (IPEN) e (4) 0,75ug ug/mL (Aldrich).....

## LISTA DE TABELAS

|   |  |
|---|--|
| TABELA 1: Proporção de quitina em recursos vivos.....   |  |
| TABELA 2: Definição dos diferentes tipos de viscosidade.....  |  |
| TABELA 3: Condições de irradiação das amostras .....  |  |
| TABELA 4: Soluções utilizadas no ensaio de Bradford.....  |  |
| TABELA 5: Porcentagem de resíduo do material inorgânico nas amostras após etapa de desmineralização .....   |  |
| TABELA 6: Rendimento das amostras da casca do siri não irradiada e irradiada após etapa de desmineralização.....  |  |
| TABELA 7: Rendimento da desproteínização nas amostras da casca do siri irradiada e não irradiadas .....   |  |
| TABELA 8: Rendimento da desacetilação nas amostras da casca do siri irradiadas e não irradiada .....  |  |
| TABELA 9: Rendimento da purificação das quitosanas da casca do siri irradiadas e não irradiada .....  |  |
| TABELA 10: Grau de desacetilação das amostras .....   |  |
| TABELA 11: Massas molares médias viscosimétricas das quitosanas SA e obtidas da casca do siri .....   |  |
| TABELA 12: Medidas de viscosidade inerente e viscosidade específica reduzida e seus parâmetros estatísticos para a determinação da massa molecular média viscosimétrica da quitosana SA ..... |  |



|   |  |
|---|--|
| TABELA 13: Medidas de viscosidade inerente, cálculo dos limites para a diferença das médias e outros parâmetros estatísticos para a avaliação dos processos de obtenção da massa molar média para as quitosanas SA e do siri..... |  |
| TABELA 14: Intervalo de confiança (teste t-student) e seus limites para as massas moleculares médias viscosimétricas das quitosanas SA e do siri.....   |  |
| TABELA 15: Intervalo de confiança (teste z) e seus limites para as massas moleculares médias viscosimétricas das quitosanas SA e do siri.....   |  |
| TABELA 16: Intervalo de confiança para a variância e seus limites para as massas moleculares médias viscosimétricas das quitosanas SA e do siri .....   |  |
| TABELA 17: Índice de cristalinidade da quitosana SA e do siri .....   |  |
| TABELA 18: Resultados de TG/DTG das amostras de quitosana .....   |  |
| TABELA19: Resultados de TG/DTG das amostras dos filmes puros e imobilizados com quitosana.....  |  |

## 1. INTRODUÇÃO

A biomassa (material produzido por seres vivos) é uma fonte de energia renovável e tem sido um assunto de grande interesse para os cientistas nos últimos anos (GUPTA e JABRAIL, 2006). A celulose é um polissacarídeo e compõe a maior parte (cerca de 50 %) da biomassa total.

A quitina, cujo nome químico oficial é [(1 → 4) -2-acetamido-2-desoxi-d-β-glucano (Figura 1), é o polissacarídeo mais importante depois da celulose e é encontrado em crustáceos, insetos e fungos (MATHUR e NARANG, 1990).

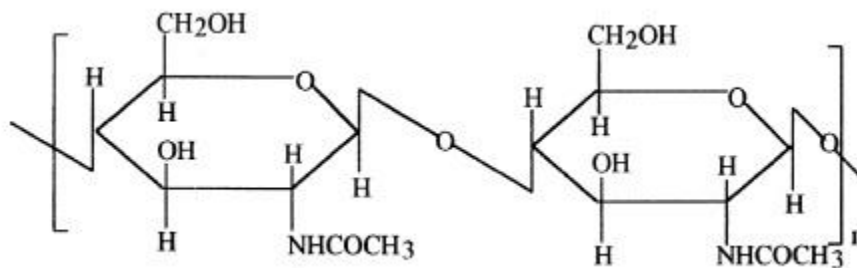


Figura 1. Estrutura da quitina (KUMAR, 2000).

Este polissacarídeo foi isolado em 1884 (MATHUR e NARANG, 1990) e desde então se tem descoberto propriedades muito importantes, como a não toxicidade, a inércia fisiológica, propriedades antibacterianas, hidrofiliidade, propriedades de formação de gel e afinidade à proteínas, encontrando aplicações principalmente na área médica/farmacêutica, destacando-se (RINAULDO, 2006):

- como curativo e carreador para a liberação de drogas em feridas e queimaduras (CAMPANA-FILHO et al., 2007).
- na forma de pasta endurecida da mistura hidroxiapatita-quitina-quitosana em tratamento de defeitos e regeneração de tecidos ósseos (KUMAR, 2000).

A quitina apresenta baixa solubilidade em sistemas aquosos, podendo ser dissolvida em ácidos inorgânicos como os ácidos clorídrico, fosfórico e sulfúrico; a dissolução é muito lenta e causa severa degradação ao polímero

(RINAULDO, 2006; SASHIWA e AIBA, 2004). Além disso, é praticamente insolúvel em solventes orgânicos.

O derivado mais importante da quitina é a quitosana, oficialmente chamada  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4)-2-amino-2-desoxi-D-glicose (Figura 2). Embora seja encontrada naturalmente em certas espécies de fungos, a quitosana é obtida principalmente pelo processo de desacetilação da molécula de quitina, ou seja, a remoção do grupo acetil presente nesta molécula.

A desacetilação pode ser realizada por processos químicos ou enzimáticos. No processo químico, a quitosana é obtida a partir da reação da quitina em soluções altamente concentradas de soda cáustica e à quente; esse processo dura de 6 horas a 12 horas. O processo enzimático é menos agressivo, porém possui elevado custo de produção.

Dimzon *et al.* (2015) demonstraram que a ausência do grupo acetil na quitosana é determinante nas propriedades específicas do material (biológicas, químicas e mecânicas).

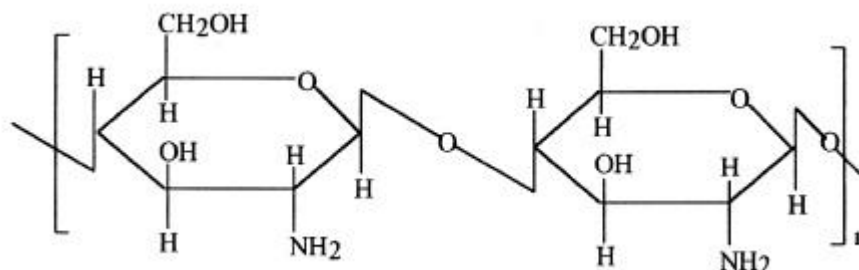


Figura 2. Estrutura da quitosana (KUMAR, 2000).

Os grupos amino presentes na quitosana conferem-lhe solubilidade em soluções aquosas de ácido (como os ácidos acético e clorídrico). A quitosana é insolúvel em água e em soluções alcalinas (ZIVANOVIC *et al.*, 2007).

Estudos com a quitosana foram intensificados na década de 1990 devido às suas propriedades biológicas, tais como a biodegradação e biocompatibilidade, atividades imunológica e antibacteriana, além do poder cicatrizante (ZIVANOVIC *et al.*, 2007). A quitosana apresenta aplicações em áreas semelhantes às da quitina, embora sua interação química seja distinta, como:

- remoção de metais pesados por quelação, quando do tratamento de resíduos industriais (CHIOU et al., 2004).
- aplicação na indústria de cosméticos, onde é adicionada à xampus, protetores solares e cremes, sendo usada também em tratamentos de acne (BEZERRA, 2011).
- agente imobilizante na liberação controlada de fármacos, no tratamento da obesidade, para a produção de membranas, pele artificial, lentes de contato e outros produtos devido a sua afinidade à gorduras (LARANJEIRA e FÁVERE, 2009).
- agente hemostático, sendo usada em curativos para agilizar o tratamento de feridas e queimaduras (LARANJEIRA e FÁVERE, 2009).

Tahtat et al. (2007) estudaram o processo de desacetilação da quitina por irradiação e verificaram que o grau de desacetilação foi maior do que na quitina não irradiada. Mesmo em baixas doses de radiação, foi observado que a quitina fica mais suscetível à desacetilação.

Com o uso da radiação há a redução da concentração de reagentes e do tempo. A irradiação é um método conhecido para a modificação e desenvolvimento de materiais poliméricos, já que fomenta processos clássicos de polimerização (cura), enxertia, reticulação e degradação. As vantagens do uso da radiação ionizante em processos tecnológicos: inclui a ausência de iniciadores químicos, o processo pode ser realizado à temperatura ambiente, não há a necessidade de utilizar solventes, o que confere ao processo à diminuição de passivos laboratoriais (GOULAS et al., 2003; NOGUEIRA, 2006; RATNAM et al., 2007).

A melhoria das propriedades térmica e mecânica superior à obtida por procedimentos convencionais é um dos efeitos macroscópicos do uso da radiação em polímeros (NOGUEIRA, 2006).

### **1.1. Rejeito biológico das atividades pesqueiras**

A quitina, na forma de exoesqueleto de crustáceos, é desperdiçada pela indústria e pelo comércio de pescados.

O Brasil, com a sua costa litorânea em dimensões continentais e sua hidrografia classificada entre uma das maiores do mundo, apresenta grande atividade pesqueira e que segundo o último “Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura” (MINISTÉRIO DA PESCA E AGRICULTURA, 2011) ocupa o 19º lugar entre os trinta maiores produtores de pescados no mundo, com uma produção de 1.264.765 toneladas, o que representa 0,75 % da produção mundial em relação à China, que ocupa o primeiro lugar, com uma produção de 63.495.197 (37,5 % da produção mundial).

Nesse panorama, em 2011 (MINISTÉRIO DA PESCA E AGRICULTURA, 2011), a pesca extrativa marinha de crustáceos atingiu 57.344,8 toneladas, sendo 67 % deste valor representado por distintas espécies de camarão e 3,5 % representado pela pesca de siri; a pesca extrativa continental de crustáceo (camarão) foi de 5.779,5 toneladas (MINISTÉRIO DA PESCA E AGRICULTURA, 2011), além das 65.670,6 toneladas de camarões provenientes da aquicultura marinha (carcinicultura) (MINISTÉRIO DA PESCA E AGRICULTURA, 2011).

Sabendo que 40 % do peso do camarão e que cerca de 70 % - 80 % do peso do siri (NACZK et al., 2004) representa o rejeito de biomassa (casca, cabeça e patas), pode-se ter ideia da quantidade de resíduos sólidos que são gerados nesta atividade pesqueira.

A reutilização do rejeito da biomassa proveniente do setor pesqueiro então se faz importante e urgente, pois reduz o impacto ambiental causado por esse passivo da ordem de toneladas (MATHUR e NARANG, 1990).

No Brasil há cerca de 20 espécies nativas de siri, no entanto a sua continuidade está ameaçada pela presença de espécies exóticas invasoras como o siri bidu também chamado de siri de espinho ou siri capeta (*Charybdis hellerii*) (JUNQUEIRA et al., 2009).

Essa espécie de siri, da fauna asiática (oceano Indo-Pacífico), penetra no litoral brasileiro (JUNQUEIRA et al., 2009; CEPAN, 2009) através da água de lastro dos navios e torna-se uma ameaça para a fauna marinha local e conseqüentemente para as atividades de pesca das espécies nativas, concorrendo vantajosamente na disputa da alimentação e também por se reproduzir mais rapidamente. O siri bidu não tem valor comercial por ter pequena dimensão e por sua carne ter pouco sabor.

Segundo a legislação ambiental (IBAMA, 2008), toda espécie invasora capturada não deve ser retornada ao meio ambiente; o seu direcionamento para institutos de pesquisa é uma das opções previstas na legislação (IBAMA, 2008), além de a espécie poder ser submetida ao óbito, se comprovado o seu potencial de causar danos (fauna, flora, ecossistemas, saúde pública, agricultura e pecuária) (IBAMA, 2008).

Nesta dissertação serão apresentados no primeiro capítulo – Introdução - os aspectos gerais sobre a quitina e quitosana, o processo de irradiação e a problemática do passivo de biomassa do setor pesqueiro e no segundo, os objetivos deste trabalho. No terceiro capítulo, Considerações Gerais, os conceitos mais aprofundados sobre essas matérias primas e processos, bem como seus avanços científicos e tecnológicos até o tempo atual estarão descritos. No quarto capítulo será apresentada a metodologia experimental usada para atingir os objetivos ora propostos. Os resultados das sínteses e das técnicas utilizadas para elaborar esse trabalho serão apresentados e discutidos no quinto capítulo. O último capítulo trará as conclusões e perspectivas para o desenvolvimento de trabalhos futuros. As referências bibliográficas e anexos serão apresentados no final deste trabalho.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Gerais**

- obter quitosana a partir da quitina bruta presente na casca do siri através do uso da radiação ionizante (feixe de elétrons e gama).
- incorporar a quitosana obtida via as distintas fontes de radiação em filmes poliméricos.

### **2.2. Específicos**

- avaliar parâmetros de pré-tratamento da matéria usada, tais como granulometria, tempo de reação dos reagentes, dose e taxa de dose da radiação absorvida;
- avaliar a síntese da quitosana a partir da quitina pré-tratada, segundo os parâmetros de tempo de reação e dose absorvida;
- caracterizar físico-quimicamente a quitosana obtida, assim como o substrato polimérico enxertado com a quitosana;
- avaliar a atividade antibacteriana da quitosana obtida, assim como o substrato polimérico enxertado com a quitosana.

### 3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os polissacarídeos, também conhecidos como glicânios, são polímeros naturais formados pela repetição de unidades de monossacarídeos ligados entre si pelo que se chama ligação glicosídica – ligação entre o grupo  $\alpha$ -carbonila ( $-C=O$ ) de uma molécula monossacarídea com o grupo hidroxila ( $-OH$ ) de uma outra. Os polissacarídeos de importância primordial para a humanidade são a celulose e o amido, ambos sintetizados naturalmente a partir da fotossíntese dos vegetais verdes: a celulose tem função estrutural, conferindo rigidez e forma aos vegetais; o amido é a reserva energética das plantas e concentra-se nas sementes dos vegetais (LIBERATO, 2013).

De forma correlata, a quitina é o polissacarídeo natural responsável pela função estrutural em invertebrados, formando o exoesqueleto de crustáceos, insetos e aracnídeos, mas também sendo encontrado como componente formador da parede celular em algas e em fungos. A quitina é o segundo polímero estrutural mais importante, que igualmente à celulose, é um homopolissacarídeo, porém formado por unidades de  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4)N-acetil-D-glucosamina (2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranoose) (BATTISTI e CAMPANA-FILHO, 2008).

Neste capítulo serão mostrados os demais conceitos e aspectos do desenvolvimento científico-tecnológico sobre os polissacarídeos utilizados neste trabalho, bem como a descrição conceitual e tecnológica dos processos aqui aplicados.

#### 3.1. Polímeros naturais

Polímeros são macromoléculas orgânicas formadas pela repetição de unidades moleculares denominadas meros originando moléculas longas e de alta massa molecular (CANEVAROLO, 2010; MANO e MENDES, 1999). As propriedades físicas e químicas dos materiais, como viscosidade, elasticidade ou dureza, resistência a abrasão, calor ou umidade (LUCAS et al., 2001) estão relacionadas à estrutura macromolecular da cadeia.

Polímeros de origem natural como a borracha natural, a celulose, os polissacarídeos têm como fonte animais e plantas. A necessidade de se lançar mão de fontes naturais e renováveis tem fundamentação nas dificuldades da atual



indústria de polímeros onde a fonte de monômeros encontra-se basicamente no petróleo e seus derivados.

Atualmente, polímeros e monômeros podem ser extraídos de microorganismos em uma simples reação de fermentação; a produção de monômeros de origem microbiana pode estar ligada a mecanismos de defesa ou de estoque de material por parte desses organismos (KESHAVARZ et al., 2015).

### 3.2. Quitina

A quitina foi isolada pela primeira vez em 1811 pelo químico francês Henri Braconnot a partir de amostras de algumas espécies de fungos e nessa ocasião foi chamada “fungina” (KNORR et al., 1992).

O nome quitina apareceu alguns anos mais tarde, somente em 1823 quando foi isolada de fato em insetos. Odier foi quem observou que a quitina estava presente na carapaça de siris e que talvez ela fosse o material formador do exoesqueleto de insetos. Posteriormente, em 1843, Payen esclareceu a presença de nitrogênio na estrutura da quitina (ROBERTS, 1992).

A quitina se apresenta como microfibrilas cristalinas altamente organizadas, formando o exoesqueleto de artrópodes, conferindo-lhe resistência, rigidez e impermeabilidade. A parte externa do exoesqueleto é impermeável e composta por proteínas e cera; já a interna contém camadas de quitina, carbonato de cálcio e pigmentos, tornando-a mais espessa. Há ainda na composição do exoesqueleto animal carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ), lipídios, proteínas, pigmentos e outras substâncias orgânicas. Dependendo da origem, a quitina pode apresentar-se nas formas  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -quitina e que podem ser identificadas por infravermelho e espectroscopia NMR (ABREU et al., 2013; DIAS et al., 2013).

A  $\alpha$ -quitina é encontrada em estruturas rígidas e resistentes, tais como a cutícula de artrópodes, e nesses casos ocorre fortemente associada a proteínas, materiais inorgânicos ou ambos. A  $\alpha$ -quitina é a forma mais abundante e também é considerada a mais estável. As formas de  $\beta$ - e  $\gamma$ -quitina ocorre em estruturas mais flexíveis, como por exemplo, o casulo de alguns insetos. A  $\gamma$ -quitina ainda é pouco conhecida (CAMPANA-FILHO et al., 2007).

A proporção de quitina nos exoesqueletos varia com o tipo de ser vivo, de espécie para espécie e da região onde são encontradas. A Tabela 1 apresenta essas proporções [THATTE et al., 2001]:

Tabela 1: Proporção de quitina em recursos vivos.

| <b>Tipo de ser vivo</b> | <b>% de Quitina</b> |
|-------------------------|---------------------|
| Fungos                  | 5 – 20 %            |
| Camarão                 | 22 %                |
| Polvo/Lula              | 3 – 20 %            |
| Escorpião               | 30 %                |
| Aranha                  | 38 %                |
| Barata                  | 35 %                |
| Bicho da seda           | 44 %                |
| Caranguejo Hermit       | 69 %                |
| Caranguejo Edible       | 70 %                |

### 3.3. Quitosana

A quitosana foi isolada em 1859 pelo aquecimento da quitina em solução concentrada de hidróxido de potássio. Os estudos sobre esses materiais foram intensificados a partir da década de 90, devido à sua atividade antibactericida e biodegradabilidade (ZIVANOVIC et al., 2007).

Esse polímero natural de baixa toxicidade possui importantes propriedades biológicas, farmacológicas e fisiológicas, atuando como agente cicatrizante, anticoagulante, antitumoral, hemostático, hipolipêmico. É um material que pode ser manufaturado em forma filmes, fibras, lâminas e gel (AZEVEDO et al., 2007; DODANE e VILIVALAM, 1998; KURITA, 2006).

A palavra quitosana descreve uma série de polímeros derivados da quitina, com diferentes graus de desacetilação (40 % – 90 %) e massas moleculares entre 50 kDa e 2.000 kDa (ILLUM et al., 1998).

A quitosana apresenta uma estrutura semicristalina; o grau de cristalinidade está diretamente ligado ao grau de desacetilação. Os principais

fatores que afetam a eficiência da desacetilação e conseqüentemente as características da quitosana obtida são (ROBERTS, 1992):

- temperatura e tempo de reação
- tamanho das partículas de quitina
- concentração de álcali
- razão quitina/álcali

Existem outros fatores além do grau de desacetilação que atuam nas características do produto obtido e que determinam sua utilização. São esses: pureza, massa molecular e viscosidade.

Ainda não existe um padrão internacional de obtenção da quitosana. Conhece-se que altas temperaturas e altas concentrações de reagentes podem acarretar danos à qualidade do material, modificando o grau de desacetilação, massa molecular e viscosidade (HIRANO et al., 1989; KUBOTA e KIKUCHI, 1992; KNAUL et al., 1998).

As nanopartículas de quitosana, estudadas na área farmacêutica, são sistemas carreadores de fármacos. As principais vantagens de se utilizar nanopartículas de quitosana são a sua simplicidade e baixo custo de preparação, não necessitando de calor e solventes orgânicos; são reprodutíveis e estáveis; e aplicáveis a uma grande categoria de substâncias: moléculas pequenas, proteínas e polinucleotídeos (TIYBOONCHAI, 2003). Nanopartículas de quitosana são partículas sólidas coloidais com diâmetros variando entre 1 – 1000 nm. Estas são preparadas a partir de macromoléculas e podem ser utilizadas terapêuticamente como um adjuvante em vacinas e carreadores de substâncias, onde o composto ativo está dissolvido, retido, encapsulado, adsorvido ou quimicamente ligado (TIYABOONCHAI, 2003).

As nanopartículas constituídas de polímeros biodegradáveis têm atraído mais atenção dos pesquisadores em relação aos lipossomas, devido às suas potencialidades terapêuticas, a sua maior estabilidade nos fluidos biológicos e durante o armazenamento (SOPPIMATH et al., 2001).

Os métodos de preparação de nanopartículas devem ser estudados cuidadosamente, pois deles resultam as propriedades desejadas. Diferentes técnicas são empregadas de acordo com o polímero utilizado: polimerização,

polímeros pré-formados e geleificação iônica, sendo este último, o método mais adequado para polímeros hidrofílicos como quitosana (YADAV et al., 2012).

Aplicações de nanopartículas de quitosana estão presentes em diversos campos da ciência. Além da liberação controlada de fármacos, nanopartículas de quitosana tem sido utilizada para regeneração tecidual, particularmente para cartilagens, e em sistemas de imobilização de células em gel (LARANJEIRA e FÁVERE, 2009).

Mattoso et al. (2009) desenvolveram filmes protetores em alimentos, utilizando nanopartículas de quitosana, as quais apresentaram boa estabilidade, contribuindo para a melhora das propriedades funcionais dos filmes. Luzardo-Álvarez et al. (2012) inseriram nanopartículas de quitosana ao cimento endodôntico AH PLUSTM, verificando que suas propriedades não são alteradas, sendo esta técnica de grande potencial no tratamento endodôntico, porém, necessitando de avanços nesses estudos.

### **3.3.1. Irradiação no processo de obtenção da quitosana**

Trabalhar com a quitina bruta torna-se muito difícil, em decorrência da sua baixa solubilidade e baixa reatividade. Por isso, faz-se necessário a modificação desse polissacarídeo, obtendo-se assim a quitosana.

A reação de desacetilação da quitina para sua conversão em quitosana normalmente ocorre utilizando uma solução de hidróxido de sódio (40 – 60 %) por determinado tempos (30 minutos a 24 horas) e temperatura relativamente elevada entre 50 a 130°C (De Moura et al., 2011). A radiação ionizante utilizada previamente ao processo de desacetilação visa otimizar tempo e energia no processo em relação ao processo convencional (Mahlous et al., 2007).

O uso da radiação gama foi estudado por Uzun et al. (2007). A quitina proveniente da casca do siri foi irradiada a 20 kGy e submetida a desacetilação utilizando solução de hidróxido de sódio (40 % e 60 %) por uma hora a 60°C – 100°C. Utilizando a técnica de infravermelho foram calculados os graus de desacetilação e observou-se que a amostra irradiada apresentou um maior %GD (60%) que a amostra não irradiada (38 %).

### 3.4. Propriedades físico-químicas da quitosana

#### 3.4.1. Grau de desacetilação

Grau de desacetilação (GD) corresponde a fração dos grupos amino, e o grau de acetilação (GA) é a fração dos grupos acetamido. O grau de N-acetilação (DA) influencia as características físico-químicas tais como densidade de carga, cristalinidade, solubilidade e a propensão a degradação enzimática (AMARAL et al., 2005).

O grau de desacetilação é um parâmetro muito importante principalmente pela sua influência nas propriedades físico-químicas e na aplicabilidade da quitosana (SORLIER et al., 2002).

Schatz et al. (2003) apresentaram leis de comportamento relacionadas às propriedades físico-químicas da quitosana em solução aquosa de ácido acético em função apenas do grau de acetilação. Foram observados três comportamentos para amostras com diferentes GA:

- I. para amostras com GA abaixo de 20 % a quitosana comportou-se como um polieletrólito catiônico e predominância de interações eletrostáticas.
- II. para valores de GA entre 20 e 50 %, interações hidrofílicas e hidrofóbicas encontraram-se em equilíbrio.
- III. GA acima de 50 % houve predomínio das interações hidrofóbicas e associações entre as cadeias do polímero.

A completa desacetilação da quitina raramente é alcançada, pois são necessárias muitas reações consecutivas e condições severas de processamento, levando à total despolimerização da amostra. Estudos mais recentes já consideram ser o material quitosana quando apresenta grau de desacetilação (GD) a partir de 50 %. Dependendo da metodologia utilizada, o GD varia de 70 % -95 %.

Existem várias técnicas propostas para determinar o GD como: análise elementar, espectroscopia na região do infravermelho (IV) (DOMSZY e ROBERTS, 1985), titulometria com ninhidrina e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RNM) (RINAUDO et al., 1994). Outros métodos como titulação condutimétrica, espectrofotometria no UV, cromatografia à gás, hidrólise ácida,

HPLC, também são citados na literatura (BROUSSIGNAC et al., 1968; RAYMOND et al., 1993; MUZZARELLI, 1998). Cada método tem suas vantagens e desvantagens. A escolha de uma técnica depende da natureza da amostra (solubilidade e pureza) e da disponibilidade do equipamento.

A técnica de espectroscopia no IV é útil para comprovar a hidrólise dos grupamentos acetila da estrutura da quitina, através da redução da banda de estiramento da carbonila da amida. A principal vantagem desta técnica é a rapidez e facilidade de execução da análise, que pode ser feita sob a forma de filme ou pastilha de KBr e não necessita que a amostra seja extremamente pura (ROBERTS et al., 1992; CANELLA e GARCIA, 2001). Todavia, a principal desvantagem está na absorção atribuída à deformação da água a  $1640\text{ cm}^{-1}$  interferindo na resolução das bandas de amida I e II, impossibilitando a determinação da absorbância a  $1655\text{ cm}^{-1}$ . A escolha correta da linha de base também é essencial. Outra técnica onde não ocorre essas incertezas é a Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN- $^1\text{H}$ ), a qual não foi realizada em função da disponibilidade do equipamento.

### **3.4.2. Massa molar**

A importância da determinação da massa molar de polímeros está intimamente relacionada ao tamanho da cadeia, que é um fator controlador na evolução da solubilidade, elasticidade, formação de fibras e as propriedades de resistência mecânica.

Os métodos usados para determinar a massa molar podem ser relativos ou absolutos. Métodos relativos necessitam de calibração com amostras de massa molar conhecida como a viscosimetria, enquanto que métodos absolutos não a necessitam como a osmometria. Outros métodos descritos na literatura incluem (BERTH et al., 1998): medidas de espalhamento de luz (EL), cromatografia de permeação a gel (CPG) ou cromatografia por exclusão de tamanho (SEC).

Grau de desacetilação e a massa molar influenciam na dissolução de ácidos orgânicos diluídos, viscosidade, reatividade com dialdeídos para reticulação e formação de hidrogéis, propriedades mecânicas e atividade microbiana.

Além da massa molar, a concentração também é um fator importante nas propriedades da quitosana, como por exemplo, a atividade bacteriana. Existem alguns estudos que mostram que o uso da quitosana é mais eficiente na inibição das bactérias do que o uso dos oligômeros formadores da mesma (NO et al., 2002; HIRANO et al., 1989) e que a massa molar necessária para a inibição de microrganismos deve ser maior que 10000 Da (SHAHIDI et al., 2000). A concentração inibitória mínima de quitosana varia de 0,005 – 0,1 % e depende das espécies de bactérias, da massa molar e do pH da preparação da quitosana (GUAN et al., 2001, NO et al., 2002).

Kienzle-Sterzer et al. (1985) constataram que a quitosana proveniente do carabguejo quando solubilizada em HCl apresenta um comportamento pseudoplástico e que a viscosidade é proporcional a concentração da quitosana.

Mucha (1997) verificou que com o aumento da concentração da quitosana, ocorreu aumento da viscosidade devido ao maior emaranhamento das cadeias macromoleculares.

### **3.4.3. Massa molar viscosimétrica (Mw)**

A viscosidade é uma medida da resistência de um líquido à deformação ou ao fluxo sob tensão de cisalhamento. Observa-se aumento de viscosidade em soluções poliméricas devido às macromoléculas do soluto. O valor do aumento na viscosidade depende do tamanho e da forma das moléculas do polímero. Devido à alta massa molecular e a sua estrutura linear, a quitosana confere viscosidade a soluções em meio ácido. Ela também apresenta um comportamento pseudoplástico, onde se observa diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento.

O método da viscosimetria capilar é o mais utilizado para determinar a massa molar viscosimétrica média por ser um método simples e rápido. Segundo Peter e Franco (2001), a viscosidade intrínseca pode ser medida utilizando-se um viscosímetro Ubbelohde ou Cannon-Fenske. Os vários tipos de viscosidade ( $\eta$ ) são calculados medindo-se o tempo de escoamento, através das equações na Tabela 2:

Tabela 2: Definição dos distintos tipos de viscosidade (LUCAS et al., 2001).

| Tipo de viscosidade                                   | Definição matemática   | Unidades     |
|---|--|--------------|
| Viscosidade relativa ( $\eta_{rel}$ )                 | $\eta_{rel} = \frac{t}{t_0}$   | Adimensional |
| Viscosidade específica ( $\eta_{esp}$ )               | $\eta_{esp} = \eta_{rel} - 1 = \left(\frac{t - t_0}{t_0}\right)$   | Adimensional |
| Viscosidade específica reduzida ( $\eta_{esp\ red}$ ) | $\eta_{espred} = \frac{\eta_{esp}}{C} = \left(\frac{t - t_0/t_0}{C}\right)$  | d litro/g    |
| Viscosidade inerente ( $\eta_{iner}$ )                | $\eta_{iner} = \ln\left(\frac{\eta_{rel}}{C}\right)$   | d litro/g    |
| Viscosidade intrínseca ( $[\eta]$ )                   | $[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \left(\frac{\eta_{espred}}{C}\right) = \lim_{C \rightarrow 0} \left(\frac{\eta_{iner}}{C}\right)$ | d litro/g    |

A viscosidade intrínseca é obtida empiricamente a partir das equações empíricas de Huggins (1) e de Kraemer (2).

$$\ln(\eta_{espred}) = [\eta] + K_a [\eta]^2 C \quad (1)$$

$$\ln(\eta_{iner}) = [\eta] + K_b [\eta^2] C \quad (2)$$

Onde a solução polimérica é diluída e a cada novo valor da concentração é determinado um novo valor de viscosidade. Esses parâmetros são expressos em um gráfico  $\eta_{espred}$  x concentração (g/L) ou  $\eta_{iner}$  x concentração (g/L). A extrapolação do comportamento linear nessas condições, quando a concentração é zero (condição de diluição infinita), permite determinar a viscosidade intrínseca ( $[\eta]$ ).

A massa molecular é determinada a partir dos valores de viscosidade intrínseca obtidos segundo a relação empírica das equações 1 e 2, na Equação de Mark-Houwink-Sakurada (Equação 3):

$$[\eta] = KM^a \quad (3)$$

Onde  $K$  e  $a$  são constantes viscosimétricas as quais são dependentes do solvente, temperatura e estrutura química dos polímeros. Vários autores



reportaram que os valores de  $K$  e  $a$  dependem também do grau de desacetilação (SINGLA e CHAWLA, 2001).

#### 3.4.4. Cristalinidade

A cristalinidade da quitosana depende de vários parâmetros, tais como: origem, grau de desacetilação e processo de dissolução (JAWORSKA et al., 2003). Quanto mais alto for o grau de desacetilação da quitosana, mais alta será sua cristalinidade.

Várias técnicas de determinação da cristalinidade são descritas na literatura, sendo a difração de raios X, a mais popular.

Os raios X são de natureza eletromagnética; em planos cristalinos, ocorre a sua difração se a distância entre os mesmos for da mesma ordem de magnitude do comprimento de onda deste tipo de radiação. De acordo com Bragg, a posição da reflexão é dada pelo comprimento de onda ( $\lambda$ ) do feixe de raios X incidente, pela distância ( $d$ ) entre os planos paralelos e pelo ângulo ( $\theta$ ) entre o raio incidente e o plano de rede de difração, conforme Equação 4:

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (4)$$

Onde  $n$  é a ordem da reflexão.

Para o estudo de materiais poliméricos por difração de raios-X, há duas regiões de interesse:

1. A região de altos ângulos, que corresponde aos ângulos de  $2\theta$  de Bragg até  $30^\circ - 50^\circ$ .
2. A região de baixos ângulos que corresponde aos ângulos de  $2\theta$  de Bragg até  $1^\circ$ .

No estado sólido a quitosana é um polímero semicristalino. Sua morfologia foi investigada e seu polimorfismo é mencionado na literatura (CLARK e SMITH, 1936; OGAWA, 1991; OGAWA et al., 1992; OKUYAMA, 1999; OGAWA et al., 2004).

Existem quatro cristais polimorfos relacionados a quitosana: “tendão” (CLARK e SMITH, 1936), “L-2” e “recozido (annealed)”. As duas primeiras formas

são cristais hidratados, ou seja, quando moléculas de água são adicionadas a eles. Já o cristal “recozido” se encontra na forma de anidro, quando este é aquecido para a retirada de água (OGAWA et al., 1992).

A quitosana por si só não apresenta padrão de cristalinidade absoluta, por isso, a partir dos dois picos de maior intensidade da difratometria de raios X desse material foi determinado os índices de cristalinidade. O índice de cristalinidade (ICR) pôde ser determinado com o emprego da Equação 5 (YU et al., 2007):

$$I_{CR} = \frac{I_C - I_A}{I_C} \times 100 \quad (5)$$

IC e IA as Intensidades dos sinais das regiões cristalinas ( $2\theta \approx 20^\circ$ ) e amorfas ( $2\theta \approx 10$  a  $13^\circ$ ), respectivamente. A relação entre o grau de desacetilação (GD) e o índice de cristalinidade relativo é inversa, quanto maior índice de cristalinidade menor será o grau de desacetilação, já que é característica das quitinas possuírem elevado grau de cristalinidade (YU et al., 2007).

### 3.4.5. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana da quitosana vem sendo investigada por diversos pesquisadores contra uma ampla gama de organismos, como fungos, bactérias e até algas, em experimentos *in vivo* e *in vitro*.

Nesses experimentos, a quitosana pode se apresentar em diferentes formas (soluções, filmes, complexos), mas o exato mecanismo de ação antibacteriana da quitosana ainda não é compreendido (GOY et al., 2009). Estudos revelaram que o mecanismo de atividade antimicrobiana da quitosana é devido às propriedades físico-químicas do polímero, ao tipo de quitosana, ao grau de desacetilação, entre outros e às características da membrana do microrganismo (SILVA et al., 2006).

Um dos mecanismos aceitos é que a parte catiônica da quitosana combina-se com os sítios aniônicos das proteínas resultando assim numa atividade seletiva sobre as bactérias (RAFIEE-TEHRANI et al., 2004; TSAI et al., 2002; BAUTISTA-BANÑOS et al., 2004). Na literatura, são apresentados três possíveis mecanismos de ação antibacteriana:

1. Inibição da síntese de mRNA e proteínas: a quitosana atravessa a membrana celular da bactéria, entra no núcleo e liga-se ao DNA, impedindo a síntese de mRNA e proteínas (GOY et al., 2009).
2. Complexação de metais: sabe-se que a quitosana apresenta uma grande capacidade de se ligar à metais, já que o grupamento amino é o responsável pela adsorção de cátions metálicos. A quitosana forma uma barreira externa, complexando metais e dessa maneira suprimindo nutrientes essenciais para o crescimento microbiano (DU et al., 2005).
3. Interação iônica na superfície da célula resultando em ruptura da parede celular: esse modelo é baseado na interação eletrostática, o qual supõe-se que quanto maior for o número de amins catiônicas, maior será a atividade antimicrobiana. Foi também observado que a quantidade de policátions disponíveis para interagir na superfície bacteriana é aparentemente reduzida quando se aumenta a quantidade de quitosana. Isso se deve provavelmente ao elevado número de pontos carregados que faz com que as cadeias formem aglomerados devido a agregação de moléculas. Atualmente, este mecanismo ação antibacteriana da quitosana tem sido o mais aceito.

Vários fatores influenciam na atividade antimicrobiana e por enquanto ainda não existe um padrão de concentração necessária para que ocorra a inibição desses microrganismos estudados, entretanto os autores são unânimes em relação ao potencial da quitosana como agente antimicrobiano.

No estudo de Wang (1992), foi observado que para uma completa inativação de *Staphylococcus aureus* foram necessárias concentrações de quitosana entre 1 – 1,5 %, em um período de dois dias de incubação. De acordo com Chang et al. (1989) concentrações maiores ou iguais a 0,005 % já foram suficientes para o mesmo efeito sobre o mesmo microrganismo.

Para a *Escherichia coli*, foi observado que para inibir por completo seu efeito, foram necessárias concentrações de quitosana de 0,5 % a 1 %, segundo Wang (1992).

Darmadji e Izumimoto (1994) relataram que para a inibição da *Escherichia coli* são necessárias concentrações maiores que 0,1 % e Simpson et

al. (1997) reportaram ser preciso somente 0,0075 – 0,01 % de quitosana para inibir o crescimento desse mesmo organismo.

Zheng e Zhu (2003) observaram a atividade antimicrobiana de quitosanas com diferentes massas molares. Para a *S. aureus*, uma bactéria Gram-positiva, o efeito inibitório se tornou mais efetivo com o aumento da massa molar da quitosana. A principal razão pode ser o fato de a quitosana com alta massa molar formar uma espécie de película impedindo que a bactéria absorva seus nutrientes. Já para a *E. coli*, bactéria Gram-negativa, quitosanas de baixa massa molar apresentaram um melhor desempenho na inibição. Isso se deve talvez ao fato de que quitosanas com baixa massa molar penetrem na célula microbiana mais facilmente, perturbando o metabolismo da célula.

Segundo Thatte et al. (2001), a quitosana e alguns dos seus derivados têm mostrado excelentes propriedades antimicrobianas. A ação antimicrobiana é rápida e elimina a bactéria dentro de algumas horas. Sua ação é de amplo espectro, incluindo tanto bactérias Gram-positivas como bactérias Gram-negativas.

#### **3.4.6. Membranas de quitosana**

A quitosana é solúvel em ácidos orgânicos, formando uma solução viscosa. Ela possui boa miscibilidade com outros polímeros, formando compostos. Devido a essa sua versatilidade, pode ser conformada em formas variadas como fibras, filmes, géis, microesferas e membranas. As aplicações desses compostos englobam cápsulas, sistemas de liberação controlada de fármacos e curativos, entre outras (Niekraszewicz, 2005; Berger et al., 2004a; Berger et al., 2004b).

Além da área médica, podemos destacar o uso desses compostos na remoção de metais e corantes em soluções aquosas. A capacidade da quitosana de formar complexos com íons metálicos tem despertado o interesse de muitos pesquisadores. Isso se deve ao percentual elevado de grupos amino na cadeia polimérica que confere a este biopolímero características de uma polibase, neutralizando soluções ácidas, precipitando os íons metálicos presentes (MATHUR e NARANG, 1990; FÁVERE et al., 2006).

Por exemplo, Fávere (2006) fez um estudo para avaliar o potencial da quitosana reticulada com tripolifosfato de sódio ( $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ ), na forma de

microesferas, na remediação de águas contaminadas pela mineração de carvão. Foi feita a dissolução do tripolifosfato (TPF) em uma solução de quitosana, induzindo uma reticulação iônica entre os íons tripolifosfato e os grupos amino protonados da quitosana.

Godoi (2013) apresentou em sua tese membranas de quitosana com nanopartículas metálicas, mais precisamente o cobre. Ela estudou a influência da presença dessas nanopartículas na adsorção do Cromo (IV) e (V). Foi observado que a quitosana pode atuar como um agente redutor e estabilizante dessas nanopartículas.

Na área farmacêutica, membranas desenvolvidas para o tratamento de lesões de pele podem ser constituídas por vários tipos de polímeros, sendo a quitosana um dos mais estudados. Uma vez colocado sobre a lesão, ao filme de quitosana aderem fibroblastos, favorecendo a proliferação de queratinócitos, e assim, a regeneração epidérmica (CHIELLINI et al., 2011). Diversos tipos de lesão tratadas com quitina e quitosana, apresentaram diminuição no tempo de tratamento.

Diversos polissacarídeos como alginato, xantana, pectina e goma arábica, são capazes de formar complexos com a quitosana, podendo tal combinação contribuir para a melhoria das propriedades das membranas usadas como curativos. Um dos compostos mais estudados é o alginato-quitosana. A quitosana deriva da quitina enquanto o alginato provém de algas. Ambos são atóxicos, biocompatíveis e facilitam a cicatrização. A partir de alguns estudos, observou-se que membranas de quitosana-alginato em determinados casos podem atuar como uma barreira protetora contra a entrada de bactérias, além de acelerar o processo de cicatrização (RODRIGUES, 2008).

Outra aplicação muito comum da quitosana são os compósitos biodegradáveis hidroxiapatita-quitosana usados na regeneração óssea. a hidroxiapatita já é bastante conhecida por apresentar uma formulação físico-química semelhante à dos ossos. Já a quitosana é extraída da quitina, que vem ganhando destaque em pesquisas médicas nos últimos anos, apresenta uma possível capacidade reparadora tecidual (KHAN e PEH, 2003; AZEVEDO et al., 2013). Experimentos realizados apontam que a quitosana tem capacidade de favorecer neoformação óssea por estimular a liberação de citocinas, favorecendo

a angiogênese e osteogênese (UENO et al., 2001; SCHNEIDER et al., 2010; WANG et al., 2002).

Azevedo et al. (2013) teve como objetivo avaliar o processo de regeneração óssea em coelhos através da utilização da hidroxiapatita e da quitosana isoladas e associadas à medula óssea (MO), observando qual dos tratamentos empregados estimula uma maior e mais rápida neoformação óssea. Foram confeccionadas mantas de hidroxiapatita, colágeno e quitosana. A quitosana isoladamente e em associação com medula óssea estimulou uma maior deposição de tecido ósseo. Esse fato é explicado pelas características da quitosana, que é um polissacarídeo catiônico que apresenta estrutura semelhante aos glicosaminoglicanos, os quais se apresentam como principais componentes da matriz extracelular de cartilagens e ossos. Além disso, a quitosana também atua atraindo íons cálcio, favorecendo dessa forma o processo de cicatrização óssea (KHOR E LIM, 2003). Dessa forma, evidenciou-se que a quitosana acelerou e maximizou o reparo ósseo, apresentando grande potencial osteogênico.

A quitosana apresenta alta densidade de cargas positivas, podendo interagir com polímeros de carga oposta para a constituição de novas matrizes. Há relatos na literatura sobre a preparação de complexos polieletrólitos contendo quitosana e diversos poliânions naturais como carboximetilcelulose, alginato, sulfato de dextrana, heparina, carboximetildextrana, carragena, pectina, colágeno e xantana (DUMITRIU e CHORNET, 1997; MARTÍNEZ-RUVALCABA et al., 2007). Frente a isto, é de grande relevância o estudo sistemático da complexação de quitosana com outros polissacarídeos na área de biomateriais.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Quitina

A quitina utilizada neste estudo foi proveniente de cascas de siri da espécie *Charybdis hellerii*, mais conhecido como Siri Bidu. É uma espécie invasora que ameaça nossa fauna, já que eles não possuem predadores e competem com os siris nativos por alimento. Este material foi gentilmente cedido pela equipe de técnicos do IP-SP (Instituto de Pesca do Estado de São Paulo) e pela Dr. Renata Bazante Yamaguishi (pesquisadora voluntário do Ipen e professora assistente na UNIP).

Quarenta e um siris foram capturados na costa litorânea, na cidade de Santos (SP) cujas coordenadas geográficas são: 23 ° 99,1 'S (latitude) e 46o 30,4' W (longitude). Foram usadas armadilhas comerciais de siri (Figura 3); as armadilhas, contendo pedaços de carcaças de frango foram imersas em água. Todos os siris capturados foram colocados em caixas apropriadas com água do mar e enviados para o local final (IPEN) onde foram congelados.

Após o congelamento e posterior remoção da carne, as carapaças dos siris foram moídas em moedor mecânico de ferro e o material obtido separado em nove granulometrias: 9, 14, 20, 32, 42, 48, 100, 250 e < 250 mesh. Dentre esses nove tamanhos de partículas, foram selecionados os seguintes: 32, 100 e < 250 mesh, segundo o critério de maior quantidade de material peneirado em função dos tamanhos dos grânulos (grande, médio e pequeno).

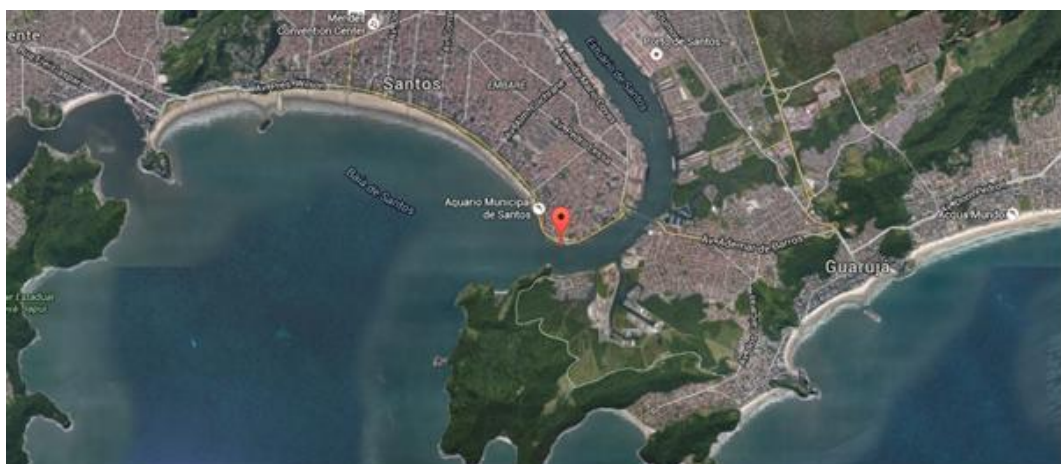


Figura 3. Localização de captura dos siris.



Figura 4. Armadilha da captura.

#### 4.2. Irradiação das amostras

As amostras nas granulometrias escolhidas foram submetidas ao processo de radiação, utilizando raios gama e acelerador de elétrons.

Neste trabalho estão sendo apresentados os resultados provenientes da irradiação nas seguintes condições:

Tabela 3: Condições de irradiação das amostras.

| Fonte de radiação             | Dose (kGy) | Taxa de dose (kGy/s) |
|-------------------------------|------------|----------------------|
| Acelerador de elétrons        | 10         | 22,4                 |
|                               | 20         |                      |
|                               | 70         |                      |
| <sup>60</sup> Co – Gamma Cell | 20         | 0,47                 |

#### 4.3. Purificação da quitina

A obtenção da quitosana é apresentada no fluxograma abaixo:



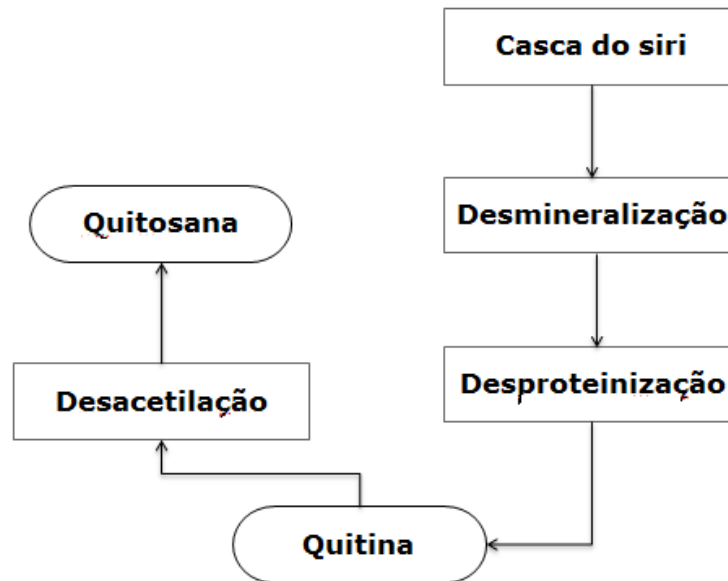


Figura 5. Processo de obtenção da quitosana proveniente do siri

#### 4.3.1. Processo de desmineralização

Esta primeira etapa do pré-tratamento das carapaças de siri visa reduzir o teor de ions inorgânicos a partir de sua dissolução em ácido clorídrico. O tratamento pode ser realizado em diferentes condições de temperatura e tempo que segundo a literatura variam respectivamente de 0°C a 100°C e de 10 minutos a 48 horas. No entanto, as condições rigorosas devem ser evitadas porque podem causar degradação molecular da quitina (DESBRIERES et al., 2003).

Neste trabalho, foi verificada avaliada a relação quantitativa ideal de casca em função da solução HCl 1 mol/L (5 g/L, 20 g/L, 25g/L e 100 g/L) para efetuar plenamente o processo de desmineralização. Foi avaliada também a cinética de desmineralização a partir dos seguintes tempos para a dissolução da casca de siri em HCl 1 mol/L: 10, 30, 60 e 120 minutos. O processo foi realizado sob agitação em temperatura ambiente (Figura 6). Em cada tempo, a quitina desmineralizada foi lavada, seca e pesada. Alíquotas de cerca de 5 mg foram destinadas à análise termogravimétrica para a avaliação da remoção da fração inorgânica do material.



Figura 6. Processo de desmineralização da casca do siri.

#### **4.3.2. Processo de desproteínização**

A desproteínização neste trabalho foi realizada utilizando solução de hidróxido de sódio 1 mol/L, sob agitação, a 70°C. Foi estudada a remoção das proteínas do material, a partir da melhor relação massa de casca em função do volume de solução alcalina (concentrações na mesma faixa de valores da etapa de desmineralização). Além disso, avaliou-se a ordem de precedência dessa etapa na sistemática do pré-tratamento da amostra.

A avaliação da cinética nessa etapa do processo foi realizada nos seguintes tempos: 10, 30, 60 e 120 minutos. Em cada etapa, alíquotas da solução alcalina foram submetidas à dosagem proteica.

Finalmente foi calculado o rendimento do processo.

#### **4.4. Síntese da quitosana - processo de desacetilação**

O processo de obtenção da quitosana foi realizado nas seguintes condições: dissolução da quitina pré-tratada em NaOH 60 % sob refluxo por 1 h (amostras irradiadas) e 6 h (amostra não irradiada).



Figura 7. Processo de desacetilação da quitina pré-tratada.

#### **4.5. Processo de purificação da quitosana**

Após a obtenção da quitosana foi realizado o processo de purificação da amostra. As quitosanas foram solubilizadas em ácido acético (0,25 mol/L) e precipitadas com NaOH 1 mol/L. Formou-se um colóide e esse foi filtrado com uso de chapa aquecedora.

#### **4.6. Preparação dos filmes poliméricos**

Filmes poliméricos de polietileno (PE) e polipropileno (PP) de dimensões 20 x 20 x 0,200 mm foram irradiados na presença de ar atmosférico, nas seguintes condições: irradiação feixe de elétrons, dose 50 kGy e taxa de dose de 22,4 kGy/s.

Os filmes poliméricos irradiados foram colocados em tubos e submersos em uma solução de quitosana. Após esse processo, os filmes poliméricos foram retirados dos tubos e lavados em água destilada e secos em temperatura ambiente. Detalhes desse processo estão protegidos sob sigilo de patente.

## 4.7. Caracterização

A caracterização dos materiais (casca do siri, quitosana e filmes) foi realizada por meio das seguintes análises:

### 4.7.1. Análise do material inorgânico

A técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) foi utilizada para a determinação dos elementos: Al, Ba, Ca, Fe, Mg, Sr e Zn. Após a reação de desmineralização, a casca de siri solubilizada em HCl (1 M) foram encaminhadas para análise em um Espectrômetro de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado do Laboratório de Análises Química e Ambiental – LAQA, localizado no CQMA/IPEN. O equipamento utilizado foi Spectro Flame M 120 E – Spectro.

Utilizou-se argônio para a formação do plasma. Nesta técnica a amostra é introduzida no plasma, onde ocorre a evaporação do solvente, formando partículas sólidas e em seguida ocorre uma dissociação para formar os átomos e íons livres.

### 4.7.2. Análise do material protéico

O teste utilizado para verificar o teor de proteína extraída foi o ensaio de Bradford (Coomassie Brilliant Blue). Foram feitas três soluções conforme descrito na tabela 4:

Tabela 4: Soluções utilizadas no ensaio de Bradford.

| Reagente Bradford                       | Solução salina (tampão)    | Solução mãe de albumina |
|---|----------------------------|-------------------------|
| Comassie Blue = 1,02 g/L                | Acetato de sódio = 0,013 M | 10 g/L                  |
| Etanol = 50 % v/v                       | Ácido acético = 0,005 M    |                         |
| H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> = 0,41 M | NaCl = 0,015 M             |                         |

Foi obtida uma curva padronizada a partir de distintas diluições de albumina bovina utilizada como padrão (seis pontos - Figura 7) em reação com o reagente de Bradford na presença do tampão. A absorbância de cada diluição padrão foi medida no comprimento de onda da radiação visível em 580 nm, utilizando um espectrofotômetro de UV-vis, Genesys 20 - Thermo, (Centro de Tecnologia das Radiações - IPEN/CNEN-SP).

As amostras provenientes da etapa de desproteinização foram preparadas a partir da mesma metodologia usada pelos padrões diluídos e suas absorbâncias foram medidas no mesmo comprimento de onda. O cálculo da concentração de proteína foi realizado a partir da curva padrão, segundo a lei de Lambert-Beer.

#### **4.7.3. Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)**

A avaliação da quitina da casca do siri foi realizada em um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) modelo Nexus 670, da Nicolet (Centro de Ciência e Tecnologia dos Materiais (CCTM) – IPEN/CNEN-SP). As amostras foram examinadas em pastilhas de KBr no modo transmissão.

As amostras de quitosana (padrão e da quitina de siri após processo de desacetilação) e da quitosana imobilizada nos filmes poliméricos tiveram seus espectros obtidos a partir do espectrômetro de infravermelho (FTIR) modelo Spectrum 100 da Perkin Elmer (Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) - IPEN/CNEN-SP).

Os espectros foram obtidos em modo de transmissão. As amostras de quitosana foram examinadas a partir de sua dispersão em pastilhas de KBr e a quitosana imobilizada nos filmes poliméricos não necessitaram preparo prévio, sendo analisadas diretamente.

Todos os espectros foram obtidos na frequência da radiação infravermelha média ( $4.000\text{ cm}^{-1}$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ ), após 16 varreduras.

#### 4.7.4. Análise termogravimétrica

*Termogravimetria* (TG) é uma técnica analítica usada para determinar a estabilidade térmica de um material e a sua fração de componentes voláteis, a partir de alterações da massa durante a sua degradação. A medida é realizada na presença de ar ou atmosfera de gás inerte (He ou Ar), e o peso é registrado em função da temperatura.

As curvas da decomposição térmica da casca do siri, quitosana e filmes foram obtidas em um aparelho TGA modelo TAA -100, (Centro de Tecnologia das Radiações - IPEN-CNEN-SP). Amostras de 5 a 10 mg foram colocadas em cadinho de alumina. Os experimentos foram efetuados entre 20°C a 800°C, sob atmosfera de ar comprimido (vazão de 100 mL/min) a uma taxa constante de aquecimento de 20°C/min.

#### 4.7.5. Difração de raios-x (DRX)

A difração foi aplicada para determinar a estrutura do material polimérico. Dependendo da origem do polímero e do tratamento utilizado em sua obtenção, a estrutura pode sofrer variações (ARANAZ et al., 2009).

Os difratogramas foram obtidos em um difratômetro de raios X de baixo ângulo (WAXD) da marca Rigaku, modelo DMAX-2100 com acessório multipurpose, (CCTM-IPEN/CNEN-SP), a partir da radiação da raia Cu K $\alpha$  ( $\lambda$  = 1.54 nm) operado em 40 kV e 40 mA; a varredura do ângulo ( $2\theta$ ) teve valor de 1°/min. na faixa de 2 $\theta$  a 30°.

O grau de cristalinidade foi obtido a partir da relação entre as áreas atribuídas às regiões cristalina e amorfa a partir da relação de Bragg.

#### 4.7.6. Viscosimetria

As medidas viscosimétricas das quitosanas foram feitas num viscosímetro capilar Cannon-Fenske, a 25  $\pm$  0,1°C.

Preparou-se uma solução estoque de quitosana de cada amostra, a qual foi preenchido o capilar do viscosímetro até o primeiro menisco e mediu-se o

tempo de escoamento entre o menisco inicial e o final. Essa operação foi realizada quatro vezes para a medida dos tempos.

Para cada amostra foram realizadas quatro diluições para que se pudesse fazer a extrapolação e determinar a viscosidade intrínseca. A massa molar viscosimétrica média ( $M_w$ ) foi determinada através da Equação de Mark-Houwink-Sakurada:  $[\eta] = KM^a$ .

#### **4.7.7. Ensaio biológico para a avaliação da atividade inibitória do crescimento bacteriano pela quitosana**

Todos os insumos e reagentes utilizados foram esterilizados usando autoclave ou chama e manipulados em fluxo laminar após desinfecção com luz ultravioleta.

Bactérias:

- *Escherichia coli* (W3110 viáveis) provenientes de seedbank de frações de 200 $\mu$ L estocado em tubos eppendorf, à  $-800^{\circ}\text{C}$ , em meio Luria-Bertami (LB)+glicerol (2010). Procedência: Laboratório de Hormônios (CB-IPEN).
- *Staphilococcus aureus* congeladas em tubo eppendorf cedidas pela Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).
- Meio LB autoclavado preparado com reagentes Becton, Dickinson & Co (BD).
- Meio LB+15% de ágar (BD).

Antibióticos:

- Ampicilina (0,10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) Sygma-Aldrich.
- Tetraciclina (0,012 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) Sygma-Aldrich.
- Quitosana SA nas diluições: 2,5; 2,0; 1,5; 1,9; 0,5; 0,25 e 0,125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .
- Quitosana IPEN nas diluições: 2,5; 2,0; 1,5; 1,9; 0,5; 0,25 e 0,125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Equipamentos:

Autoclave, estufas ( $300^{\circ}\text{C}$  e  $370^{\circ}\text{C}$ ), Freezers  $-800^{\circ}\text{C}$  e  $-200^{\circ}\text{C}$ , refrigerador, capela de fluxo laminar, vórtex, microndas, incubadora com controle de

temperatura e agitação Technal TE-421, agitador de bancada Biomix TS-2000A VDRL, espectrofotômetro UV/ visível Amersham Biosciences 2100PRO.

Foram preparadas soluções mães da quitosana padrão (SA) e da quitosana de siri (IPEN) na concentração final de 10µg/mL (quitosana/solução de ácido acético).

Os cristais de quitosana SA e as escamas de quitosana IPEN e foram colocados no fundo de tubos falcon de 15mL de capacidade. A cada tubo se adicionou 1mL de ácido acético (0,25 mol/L) aquecido em micro ondas até a ebulição.

Os tubos foram agitados em vórtex até a solubilização parcial das quitosanas. Na sequência, foram adicionadas a cada tubo três séries de 2,5 mL de água em ebulição, sempre seguidas de agitação por vórtex, até a concentração final de 10µg/mL.

Nessas condições, as soluções de quitosana ainda apresentavam partículas não solubilizadas. Para completar a dissolução, os tubos foram deixados em estufa à 370°C por 22 horas (modificado de CHUNG et al.), com homogeneização em vórtex a cada hora durante o período diurno.

Foram preparadas 10 alíquotas de 1mL das quitosanas IPEN e SA, na concentração de 10µg/mL, estocadas em tubos eppendorf à -200°C para uso posterior.

A viabilidade das bactérias foi testada antes do preparo dos seedbanks de trabalho.

Bactérias *E. coli* e *S. aureus* foram retiradas dos tubos contendo os seedbanks CB e UNIFESP originais e semeadas em placas de cultura preparadas com meio LB+ágar com e sem antibiótico usando alça de metal esterilizada na chama. Foi testada a resistência aos antibióticos rotineiramente usados no CB.

As placas preparadas foram: LB+ágar, LB+ágar+Ampicilina (0,10µg/mL) e LB+ágar+Tetraciclina (0,012µg/mL). As placas inoculadas com *E. coli* foram incubadas em estufa à 300C/18h. As placas inoculadas com *S. aureus* foram incubadas em estufa à 370°C/14h.

Para o preparo dos seedbanks, de cada placa de cultura LB+ágar onde cresceram as bactérias, foram escolhidas três colônias isoladas de *E. coli* e três colônias isoladas de *S. aureus* e inoculadas em tubos falcon de 15mL contendo



5mL de meio LB: 3 tubos de *E. coli* e 3 tubos de *S. aureus*. Os tubos foram incubados nas seguintes condições: *E. coli* a 300°C, 150rpm e *S. aureus* a 370°C, 150rpm.

A concentração das bactérias nos caldos de cultura foi monitorada pela tomada de alíquotas que tiveram a densidade óptica medida no comprimento de onda de 600nm (DO600) em espectrômetro de luz visível, em intervalos de meia hora, após a sexta hora de incubação.

Quando a concentração de bactérias em cada tubo atingiu valores correspondentes à DO600~ 0,3, foi retirado um tubo cultura de *E. coli* e um tubo de cultura de *S. aureus* para preparo dos respectivos seedbanks para serem usados exclusivamente nos ensaios com quitosana:

- 5 tubos eppendorf de 600µl: caldo de cultura LB + *E. coli* (DO600~0,3) + 20 % glicerol.
- 5 tubos eppendorf de 600µl: caldo de cultura LB + *S. aureus* (DO600~0,3) +20 % glicerol.

Os seedbanks foram estocados à -800°C para uso posterior.

As culturas de *E. coli* e *S. aureus* continuaram a serem monitoradas durante 24 horas pela tomada de alíquotas em intervalos de tempo selecionados para obtenção das suas respectivas curvas de crescimento até a concentração de bactérias que correspondia à densidade óptica de aproximadamente 1,0 (DO600~1) .

Um segundo tubo de caldo de cultura de *E. coli* e outro de *S. aureus* foram retirados da incubadora. As DO medidas para as ambas as culturas de *E. coli* e *S. aureus* foram corrigidas por diluição com meio LB, até o valor exato de DO600 = 1,0 (8.106UFC), em um volume total de 1mL e homogeneizadas manualmente.

A partir dessa diluição foram preparadas duas concentrações de trabalho: (8.104UFC) e (8.102UFC). Tubos com as três diluições do caldo de cultura de *E. coli* e de *S. aureus* (8.106, 8.104 e 8.102UFC) foram estocados sob refrigeração à 40°C para futura utilização.

#### **4.7.7.1. Concentração Mínima Inibitória do Crescimento Bacteriano (MIC)**

Reagentes:

- Meio LB.
- Quitosana SA nas diluições: 2,5; 2,0; 1,5; 1,9; 0,5; 0,25 e 0,125 µg/mL.
- Quitosana IPEN nas diluições: 2,5; 2,0; 1,5; 1,9; 0,5; 0,25 e 0,125 µg/mL.

Placa de cultura com 96 poços.

Agitador horizontal de bancada Biomix TS-2000A VDRL

Espectrômetro Thermo Multiskan EX acoplado a PC, usando o software Ascent v. 2.6 para aquisição e análise de dados.

As concentrações de quitosana usadas nas curvas de diluição foram escolhidas considerando o trabalho de Goy et al. (2008), que apresenta uma tabela descrevendo a sensibilidade de vários microrganismos à quitosana.

As medidas foram feitas em duplicata para a quitosana produzida no IPEN e para a quitosana de médio peso molecular produzida pela Sygma-Aldrich.

Foram feitas curvas de diluição em duplicata para os dois produtos utilizando meio LB estéril e considerando como volume final de cada poço da placa de cultura de 200µL. Sendo 190µL das quitosanas nas diluições das curvas descritas abaixo para posterior adição de 10µL de caldo de cultura LB contendo quantidade de bactérias padronizadas de *E. coli* e *S. aureus*, correspondente a 8UFC.

As séries de diluição para verificar a MIC e a influência da concentração de quitosana na turbidez do meio LB puro foram:

- Quitosana IPEN: 0, 2,5; 2,0; 1,5; 1,9; 0,5; 0,25 e 0,125 µg/mL.
- Quitosana SA: 0, 2,5; 2,0; 1,5; 1,9; 0,5; 0,25 e 0,125 µg/mL.
- Poços considerados brancos: Meio LB puro (n = 3)
- Poços considerados crescimento máximo: meio LB + 8UFC (sem adição de quitosana) (n = 3).

A placa de 96 poços contendo as curvas de diluição adicionadas de bactérias foi colocada em agitador horizontal à temperatura ambiente (Temperatura média = 240°C), condição aeróbica durante 27 horas com medidas da turbidez nos intervalos tempo adequados ao acompanhamento do crescimento da massa de bactérias de cultura.

O crescimento das bactérias foi medido no espectrômetro com scanner para placa de cultura de 96 poços em tempos de: 18, 20, 24 e 27 horas (*E. coli*) e 16, 17, 18, 22, 24 e 27 horas (*S.aureus*).

Com os dados adquiridos com o software Avaste foram construídas curvas de turbidez em função da concentração de quitosana para cada tempo de medida. A partir de 20 horas de crescimento as curvas de turbidez (DO 440nm) em função da concentração de quitosana já apresentavam aspecto bem definido. Sendo observada a contaminação do meio LB considerado branco nos tempos a partir de 24 horas, com contaminação maior nas placas contendo *S. aureus*. Assim, para a quantificação do estudo de concentração mínima capaz de inibição do crescimento bacteriano pela quitosana IPEN foi escolhido o tempo de incubação de 22 horas à temperatura ambiente para *E. coli* e *S. aureus* para construção de dois tipos curvas:

-Turbidez (490nm) em função da concentração de quitosana.

-Fração de inibição do crescimento bacteriano em função da concentração de quitosana.

#### **4.7.7.2. Confirmação da capacidade de inibição das quitosanas Sygma-Aldrich e IPEN**

Foram preparadas:

- Duas placas LB+ágar contendo a concentração de 1,0µg/mL de quitosana Sygma-Aldrich. Uma placa semeada com 100µl de caldo de cultura contendo 8x10<sup>3</sup> UFC de *E. coli* e uma placa semeada com 100µl de caldo de cultura contendo 8x10<sup>3</sup> UFC de *S. aureus*.
- Duas placas LB+ágar contendo a concentração de 1,0µg/mL de quitosana IPEN. Uma placa semeada com 100µl de caldo de cultura contendo 8x10<sup>3</sup> UFC de *E. coli* e uma placa semeada com 100µl de caldo de cultura contendo 8x10<sup>3</sup> UFC de *S. aureus*.

As placas semeadas com *E. coli* foram incubadas em estufa à 300°C por 24 horas em condição aeróbica. As placas semeadas com *S. aureus* foram incubadas em estufa à 370°C por 24 horas em condição aeróbica.

#### **4.7.7.3. Ensaio de solubilidade da quitosana imobilizada nos filmes irradiados (modificado de Goy et al., 2016)**

Filmes contendo quitosana imobilizada recortados em forma de disco de cerca de 12 cm de diâmetro foram apenas desinfetados: PP gama, PP EB, PE gama, PE EB, PP virgem, PE virgem e padrão irradiado.

Os filmes foram apenas desinfetados porque suas características não permitiam esterilização. A desinfecção foi feita por lavagem com álcool 70% e enxague com água destilada estéril em ebulição em fluxo laminar.

Cada filme foi colocado em um tubo falcon de 15mL contendo 10mL de meio LB e incubados em condição aeróbica, inclinação de 300, nas temperaturas de 300°C e 370°C, 150rpm, durante 72 horas com coleta de alíquotas de 300µl nos tempos de 0, 1h, 4h, 8h, 24h, 48h e 72h. As alíquotas coletadas foram acondicionadas em tubos eppendorf e armazenadas sob refrigeração a 40°C.

Em placa de cultura de 96 poços foram pipetadas 190µl do meio LB onde os filmes: PP gama, PP EB, PE gama, PE EB, PP virgem, PE virgem e padrão irradiado ficaram incubados. A cada poço foram adicionados 10µl de meio LB contendo 8UFC de *E. coli* ou *S.aureus*. A placa foi colocada em agitador horizontal à temperatura ambiente (Temperatura média = 240°C), condição aeróbica durante 27 horas com medidas da turbidez nos intervalos tempo adequados ao acompanhamento do crescimento da massa de bactérias de cultura. O crescimento das bactérias foi medido no espectrômetro com scanner para placa de cultura de 96 poços em tempos de: 18, 20, 24 e 27 horas (*E. coli*) e 16, 17, 18, 22, 24 e 27 horas (*S.aureus*).

#### **4.7.7.4. Difusão da quitosana no meio LB+ágar e capacidade de inibição do crescimento bacteriano**

Os ensaios foram adaptados de trabalhos da literatura que testaram a quitosana na forma de gel puro ou aplicado em tecidos (Goy et al., 2016; Goy e Assis, 2014; No et al., 2002.; Noel et al., 2008). Esses autores trabalharam com técnicas usadas no ensaio clássico de zona de inibição que é usual para testes com antibióticos solúveis no gel de ágar..

Duas placas de cultura LB+ágar foram inoculadas com  $8 \times 10^3$  UFC de *E. coli* e outras duas com  $8 \times 10^3$  UFC de *S. aureus*. Sobre as placas inoculadas foram depositadas os filmes virgem ou com quitosana apenas desinfetados conforme descrito anteriormente (item 4.7.7.3).

Essas placas foram colocadas para incubar em estufa, em condição aeróbica por 24 horas: *E. coli* ( $300^\circ\text{C}$ ) e *S. aureus* ( $370^\circ\text{C}$ ).

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. Obtenção da quitosana**

#### **5.1.1. Purificação da quitina – etapa de desmineralização**

##### **5.1.1.1. Otimização da relação casca/volume**

A Tabela 5 mostra a quantidade do resíduo de material inorgânico contida nas amostras submetidas à primeira etapa de purificação da casca de siri - o processo de desmineralização - em função da concentração casca/volume de HCl. Segundo esses resultados, observamos que:

a) já nos primeiros ensaios a concentração de 100 g/L apresentou valores altos de resíduo inorgânico e por isso essa concentração não foi avaliada em todas as amostras; o alto teor de casca em função do volume do ácido não permitiu a dissolução plena do material inorgânico;

b) as amostras cujos grânulos passaram pela peneira de abertura 250 mesh apresentaram também valores altos de resíduo inorgânico. Embora seja a amostra que ficou mais finamente dividida, observamos que é a amostra que provavelmente possui maior contaminação proveniente do processo de moagem, já que a amostra foi fragmentada em um moedor mecânico de ferro. Sendo assim somente algumas amostras com essa granulometria foram avaliadas, porém não foram mais consideradas no decorrer do estudo;

c) Não houve diferenças significativas dos resíduos de material inorgânico nas amostras provenientes da tamisação em 32 e 100 mesh. As amostras com esses tamanhos de grânulos foram as avaliadas no desenvolvimento deste estudo.

Tabela 5: Porcentagem de resíduo de material inorgânico nas amostras após etapa de desmineralização.

| <b>Concentração Casca/HCl (m/v)</b> | <b>32</b> | <b>100</b> | <b>&lt; 250</b> |
|-------------------------------------|-----------|------------|-----------------|
| 5 g/L                               | 2         | 5          | 10              |
| 20 g/L                              | 2         | 2          | 10              |
| 25 g/L                              | 5         | 2          | 10              |
| 100 g/L                             | 40        | 35         | 40              |

#### 5.1.1.2. Cinética da desmineralização

Segundo os resultados da cinética da desmineralização (Figura 8) como primeira etapa na purificação da casca do siri, os primeiros 30 minutos mostram resultados esperados: a medida que o material permanece em contato com a solução de HCl 1 mol/L há maior dissolução do material inorgânico e isso resulta em menor quantidade de resíduo na amostra, esteja ela irradiada ou não. No entanto, em tempos maiores não há uma correlação plausível da cinética de desmineralização, sendo que esses resultados devem ser reavaliados.

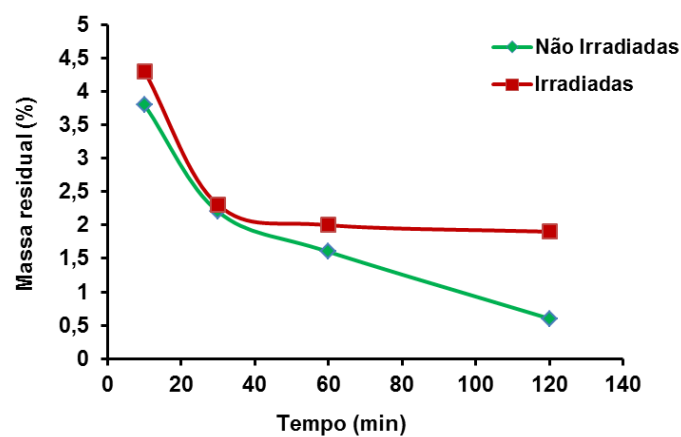


Figura 8. Cinética da primeira etapa de purificação - desmineralização da casca de siri.

### 5.1.1.3. Análise de inorgânicos da casca do siri

A literatura (AFONSO, 2008; BEZERRA, 2011) apresenta o cálcio como o maior constituinte da carapaça do siri. Pela técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) foi comprovada essa afirmação. O cálcio se encontra em maior quantidade seguida pelo magnésio. A carapaça é constituída por quitina, várias proteínas e inclusões minerais como carbonato de cálcio e fosfato de cálcio (HALASZ et al., 2012). O carbonato de cálcio é o responsável pela estrutura rígida do exoesqueleto dos crustáceos, servindo como proteção ao animal (CHEN et al., 2008). A Figura 8 confirma que as amostras de casca de siri apresentam o cálcio como a espécie química presente em maior concentração no material, seguido do magnésio, em relação às demais espécies analisadas; o teor de cálcio é cerca de 5 vezes maior na relação casca/ácido 25 g/L, o que é um resultado esperado comparado à relação casca/ácido 5 g/L.

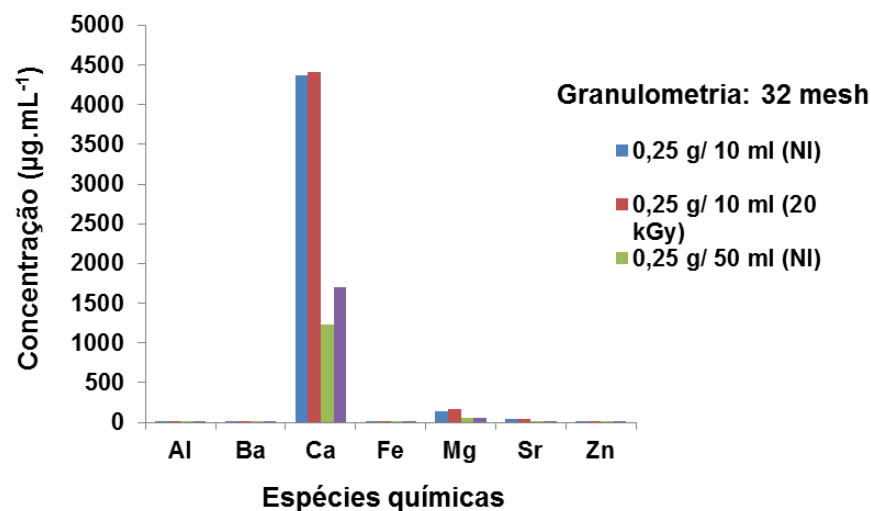


Figura 9. Teor das espécies inorgânicas avaliadas: casca do siri tamisada a 32 mesh e em 60 minutos.

A Figura 10 apresenta resultados coerentes com o comportamento cinético de dissolução (Figura 8), onde nos primeiros 10 minutos há um teor maior de cálcio nas amostras irradiadas, mas que após 30 minutos de dissolução os teores dessa espécie química são semelhantes; após esse tempo, o teor de cálcio



é maior nas amostras não irradiadas, mas que tende a ficar constante a partir de 120 minutos e nas amostras irradiadas a saturação da concentração de cálcio ocorre a partir de 60 minutos de dissolução.

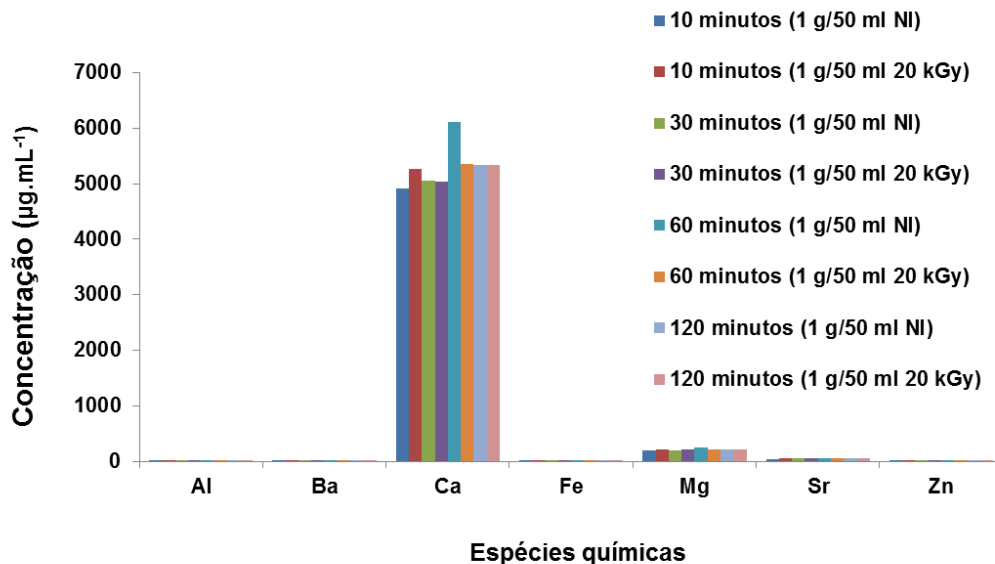


Figura 10. Teor das espécies inorgânicas nas amostras desmineralizadas (32 mesh, 20 g/L).

Na Figura 11, a liberação de cálcio ocorreu em teores semelhantes quando a amostra é irradiada em 10 kGy EB e 20 kGy, porém observa-se um pequeno aumento relativo quando as amostras são irradiadas em 30 kGy EB e 50 kGy EB; em 70 kGy EB as amostras analisadas apresentaram maior liberação desta espécie cuja a presença é significativa. Estes resultados mostram que a irradiação em doses de até 50 kGy EB não há aumento significativo no teor da principal espécie química presente nas amostras. Com este resultado foi decidido que as avaliações deste ponto em diante seriam realizadas nas amostras irradiadas em baixas doses como 10 kGy EB e 20 kGy e seriam comparadas às de 70 kGy EB, dose mais alta, onde provavelmente há a degradação destas amostras que contém o biopolímero alvo deste estudo.

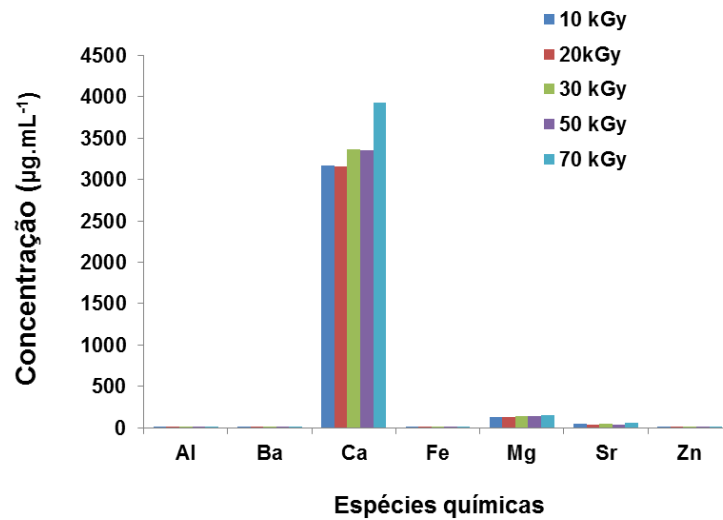


Figura 11. Teor das espécies inorgânicas nas amostras desmineralizadas (32 mesh – 1 g/50 mL – 60 minutos).

#### 5.1.1.4. Rendimento

O rendimento da quitina pré-tratada na etapa de desmineralização está apresentado na tabela 6.

Tabela 6: Rendimento das amostras da casca de siri não irradiada e irradiada após a etapa de desmineralização

| Não Irradiada | 10 kGy EB | 20 kGy Gama | 20 kGy EB | 70 kGy EB |
|---------------|-----------|-------------|-----------|-----------|
| 17,73%        | 17,22%    | 20%         | 17,76%    | 19,4%     |

Este parâmetro está na mesma ordem de grandeza tanto para a amostra não irradiada como para as irradiadas e indica que o material inorgânico faz parte de cerca de 80 % a 82 % da casca deste tipo de siri.

## 5.1.2. Purificação da quitina – etapa de desproteíntização

### 5.1.2.1. Otimização da relação casca/volume de ácido

Segundo a literatura (BATTISTI, M.V. e CAMPANA-FILHO, S.P., 2008), a obtenção de uma quitosana mais pura e cristalina depende das etapas do pré-tratamento e da desacetilação e que consiste em inicialmente dissolver o carbonato de cálcio do material *in natura* (etapa de desmineralização) e em seguida, efetuar a extração alcalina para solubilizar as proteínas.

A etapa de desproteíntização neste trabalho foi verificada em dois modos:

- Como primeira etapa no processo (Figura 12);
- Como segunda etapa de purificação da quitina (Figuras 13 e 14).

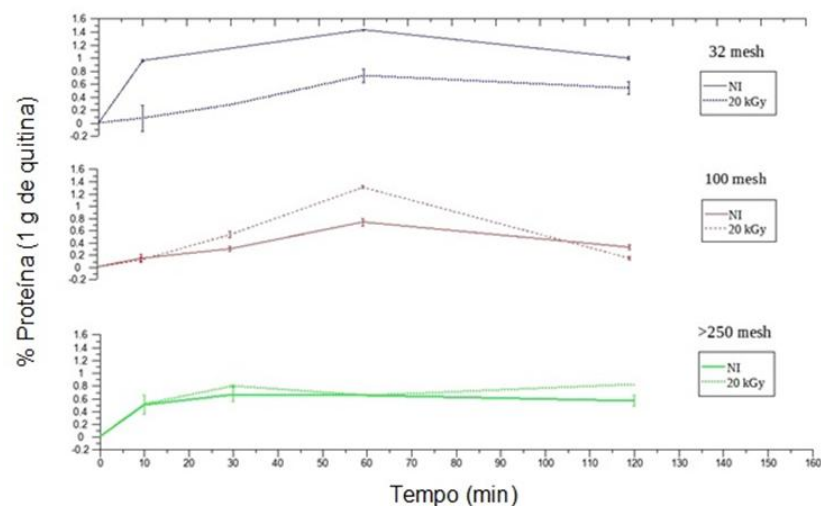


Figura 12. Teor proteico como primeira etapa no processo de purificação da quitina não irradiada e irradiada (20 kGy gama) em distintas granulometrias.

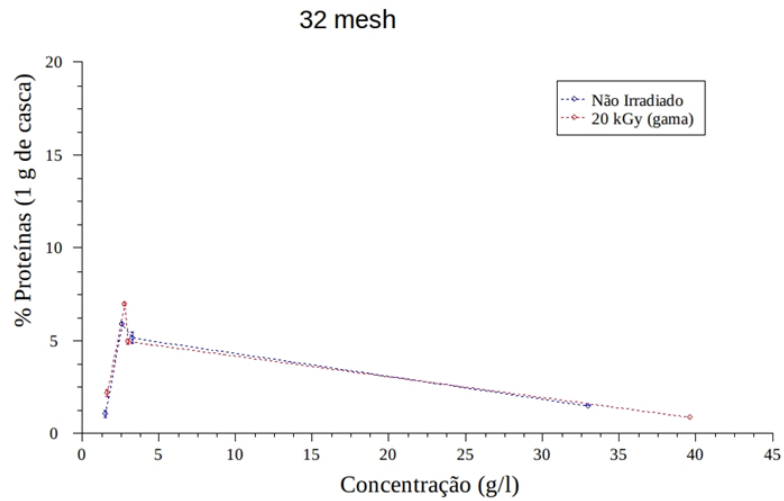


Figura 13. Teor proteico como segunda etapa do processo de purificação da quitina (32 mesh) não irradiada e irradiada (20 kGy gama).

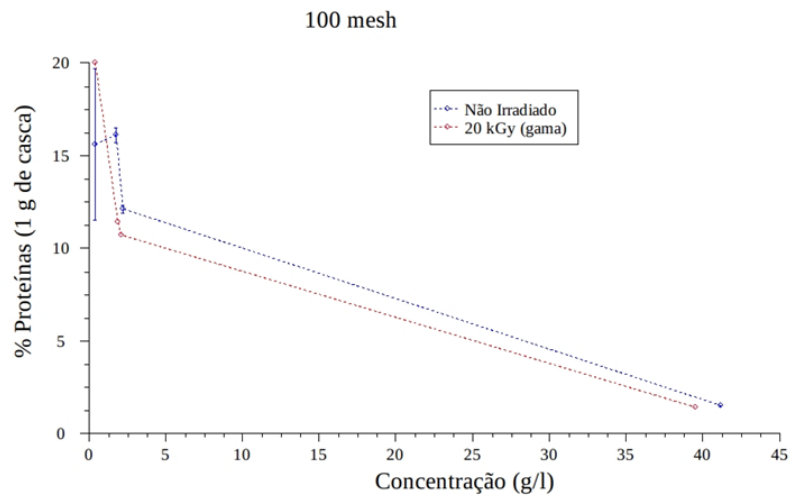


Figura 14. Teor proteico como segunda etapa do processo de purificação da quitina (100 mesh) não irradiada e irradiada (20 kGy gama).

No caso de o processo de desmineralização ocorrer como primeira etapa do pré-tratamento, as amostras não irradiadas com granulometria igual ou superior a 32 mesh tiveram remoção máxima 1,5 % de proteínas por grama de casca em 60 minutos e as amostras irradiadas com a mesma dimensão de grão apresentaram resultado inferior: 0,6 % de proteínas em 1 g de casca.

A diminuição do tamanho do fragmento da amostra (100 mesh) não apresentou melhoria nos resultados: houve remoção máxima em média de 0,5 % de proteína em 1 g de casca nas amostras não irradiadas e uma média de 1,1 % de proteínas removidas nas amostras irradiadas, também em 60 minutos.

As amostras de casca de siri com o menor tamanho de fragmentos tiveram como quantidade máxima de proteínas removidas os valores médios de 0,5 % (não irradiada) e de 0,6 % (irradiada) em 1 g de casca em um tempo menor (30 minutos). Apesar de a remoção máxima ocorrer em um baixo período de tempo, a quantidade de proteína removida foi baixa, além disso, vale as mesmas considerações feitas no item 5.5.1, onde amostras com essa granulometria não foram mais consideradas neste trabalho.

Quando o processo de remoção de proteínas ocorre após a desmineralização das amostras, o teor de proteínas aumenta. Amostras provenientes da tamisação em 100 mesh (Figura 14) apresentaram teor de proteínas de 15 % (não irradiada) e 20 % (irradiada) por 1 grama de casca e das com fragmentos em tamanhos igual ou maior a 32 mesh (Figura 13), tiveram removidos 6 % (não irradiado) e 7 % (irradiado) de proteínas em cada 1 grama de casca.

Esses resultados sugerem que as proteínas devem estar intimamente misturadas ao material fibroso (quitina) e carbonato de cálcio presentes na amostra e que prejudicam a sua liberação no caso de o processo de desproteínização acontecer previamente ao de desmineralização. Além disso, há uma tendência de o material irradiado liberar mais proteínas do que as amostras que não passaram por esse processo, sugerindo que a desagregação do material fibroso promovida pela radiação, permite maior liberação de proteínas.

#### **5.1.2.2. Cinética da desproteínização**

A avaliação da cinética de desproteínização é mostrada na Figura 15. Observa-se que as proteínas são liberadas nas amostras não irradiadas já em 30 minutos de reação (16 % em 1 g de casca); nas amostras irradiadas, o mais alto teor de proteínas é liberado após 60 minutos (19 % em 1 g de casca). Esses resultados mostram que praticamente não há diferenças entre a quantidade de proteínas liberadas no material irradiado e no não irradiado, embora a tendência

em maior liberação de proteínas esteja no material irradiado, como já foi mencionado.

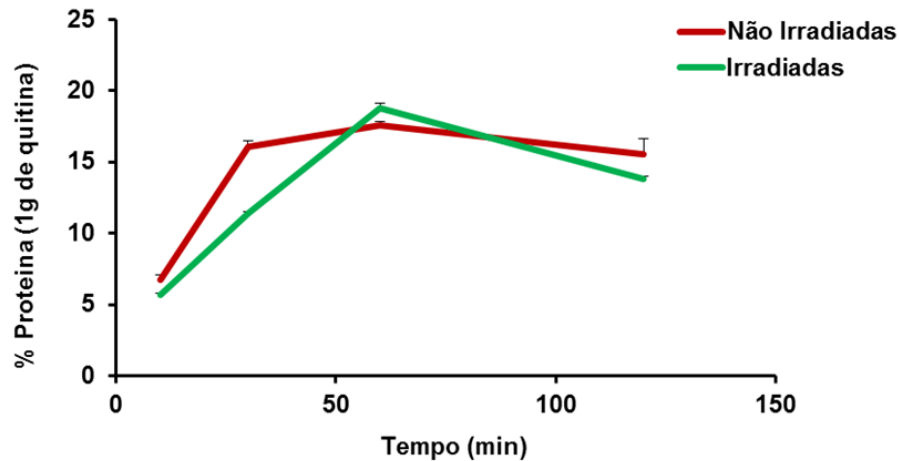


Figura 15. Cinética da desproteínização como segunda etapa do pré-tratamento das amostras.

### 5.1.2.3. Rendimento

A Tabela 7 mostra o rendimento da desproteínização como segunda etapa do pré-tratamento da casca de siri. Observa-se que as amostras irradiadas sob 10 kGy EB e a não irradiada apresentaram rendimento máximo em relação às demais doses avaliadas. Este resultado sugere a preponderância da degradação de proteínas promovida pela radiação em doses acima de 10 kGy EB.

Uma vez completa essa etapa de pré-tratamento, as amostras já são consideradas como quitina. É importante ressaltar que a partir de 1 g de casca bruta, conseguiu-se somente aproximadamente 14 % de quitina após o pré-tratamento.

Tabela 7: Rendimento da desproteínização nas amostras da casca de siri não irradiada e irradiadas

| Não Irradiada | 10 kGy EB | 20 kGy Gama | 20 kGy EB | 70 kGy EB |
|---------------|-----------|-------------|-----------|-----------|
| 87,3 %        | 88,8 %    | 80 %        | 82,3 %    | 80,6 %    |

### 5.1.3. Síntese da quitosana - Desacetilação

A Tabela 8 mostra o rendimento do processo de desacetilação das amostras de quitina de siri não irradiadas e irradiadas. Com a amostra não irradiada, obteve-se 71 % de quitosana após 6 horas de processo.

As amostras irradiadas obtiveram rendimentos decrescentes em função do aumento da dose absorvida de radiação após 1 hora de processo. Esses resultados mostram que o processo de degradação pela irradiação existe e tem um efeito determinante no rendimento da quitosana quando comparado à obtenção desse produto pelo método clássico.

Tabela 8: Rendimento da desacetilação nas amostras da casca de siri não irradiada e irradiadas

| Amostra             | Rendimento Desacetilação |
|---------------------|--------------------------|
| Quitina 0 kGy       | 71 %                     |
| Quitina 10 kGy EB   | 86 %                     |
| Quitina 20 kGy EB   | 70 %                     |
| Quitina 20 kGy Gama | 74 %                     |
| Quitina 70 kGy EB   | 56 %                     |

### 5.2. Purificação da quitosana

O processo de purificação permite remover impurezas do material sintetizado como subprodutos de reação e material inicial que porventura não conseguiu efetivamente ser convertido.

Nesse sentido, obteve-se um rendimento alto (75 %) na purificação da quitosana obtida pelo método clássico (não irradiada), sugerindo que a metodologia aplicada permitiu efetividade na conversão da quitina em quitosana. Já com as quitosanas obtidas a partir das amostras de quitina das cascas irradiadas, observou-se que o rendimento é crescente com o aumento da dose absorvida de radiação. A quitosana obtida a partir da amostra irradiada em 10 kGy EB apresentou o valor mais baixo (60 %), o que sugere a não efetividade de

conversão quitina-quitosana em 1 hora de reação. Esse fator deverá ser investigado em trabalhos futuros.

Já as quitosanas obtidas a partir dos distintos processos de irradiação na dose de 20 kGy obtiveram praticamente o mesmo valor de rendimento (90 - 91 %), sugerindo que o processo de conversão foi efetivo e os eventuais subprodutos foram removidos com eficiência. A quitosana obtida a partir da amostra irradiada em 70 kGy EB obteve aparentemente o maior rendimento na purificação, apesar do seu valor estar na mesma faixa de grandeza do rendimento das amostras irradiadas em 20 kGy. Este resultado sugere que em termos efetivos o rendimento foi semelhante nessa faixa de dose (20 kGy a 70 kGy EB).

É importante ressaltar a dimensão quantitativa da conversão da amostra deste tipo de siri: partindo-se de 1 g de casca bruta obtém-se aproximadamente 0,07 g de quitosana.

Tabela 9: Rendimento da purificação da quitosana nas amostras da casca de siri não irradiada e irradiadas

| Amostra           | Rendimento Purificação |
|-------------------|------------------------|
| Quito 0 kGy       | 75 %                   |
| Quito 10 kGy EB   | 60 %                   |
| Quito 20 kGy EB   | 91 %                   |
| Quito 20 kGy Gama | 90 %                   |
| Quito 70 kGy EB   | 93 %                   |

### 5.3. Caracterização da quitosana

Nesse item serão mostrados os resultados da caracterização da substância considerada padrão e daquelas provenientes da casca de siri.

#### 5.3.1. Espectrometria no infravermelho (FTIR)

O espectro do material de partida, quitina de siri *in natura*, está mostrado na Figura 16. Esse espectro mostra uma banda na região de  $3.470\text{ cm}^{-1}$  relacionada a vibração de deformação axial da ligação N-H, uma banda na região



de  $1.660\text{ cm}^{-1}$  relacionada à deformação angular do N-H (banda amida II), uma banda na região de  $1.390\text{ cm}^{-1}$  relacionada à deformação angular simétrica do -CH<sub>3</sub> do grupo acetil e uma banda em  $718\text{ cm}^{-1}$  relacionada à deformação angular simétrica fora do plano do grupo N-H.

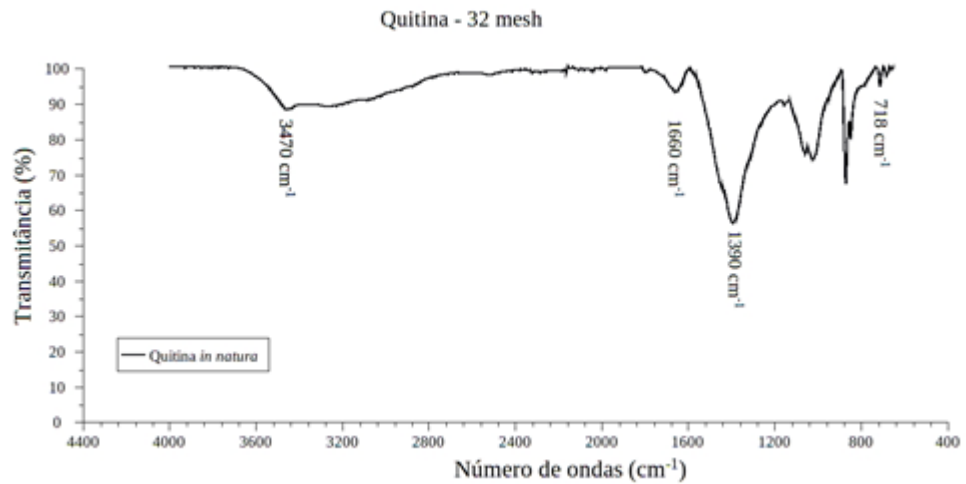


Figura 16. Espectro de FTIR da quitina de siri *in natura*.

A quitosana tem o espectro FTIR distinto (Figura 17): a banda larga na região de  $3.453\text{ cm}^{-1}$  está relacionada à vibração de deformação axial da ligação -O-H como à vibração de deformação axial da ligação -N-H; a banda em  $1.643\text{ cm}^{-1}$  que está relacionada à deformação angular do N-H (banda amida II) é mais intensa e as demais bandas encontradas na quitina inexistem ou têm intensidades mais fracas.

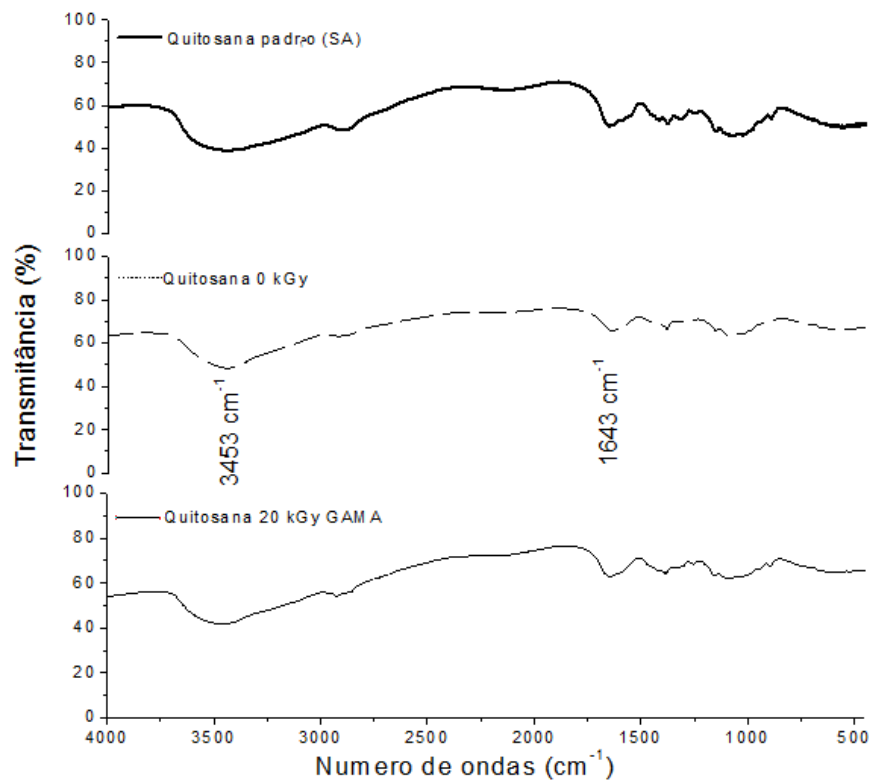


Figura 17. Espectros FTIR da quitosana SA e do siri não irradiada e irradiada a 20 kGy Gama.

Observa-se na Figura 17 a semelhança entre os espectros das quitosanas SA com as obtidas a partir da quitina do siri: quitosana não irradiada (0 kGy) e irradiada (20 kGy gama), o que indica que a desacetilação da quitina ocorreu, dando origem ao produto de interesse.

### 5.3.2. Grau de desacetilação

Diversas técnicas podem ser usadas para calcular o grau de desacetilação, sendo a mais utilizada a espectroscopia de infravermelho (IV). Nesta técnica o grau de desacetilação é calculado segundo equações provenientes de estudos empíricos que estão relacionadas aos grupos carbonila ( $-C=O$ ), N-acetil e hidroxila (OH) presentes na quitosana. As equações propostas, geralmente utilizam os valores de absorbância nas bandas em  $1655\text{ cm}^{-1}$  e  $3450\text{ cm}^{-1}$ , associadas respectivamente a carbonila e hidroxila (Figura 18).

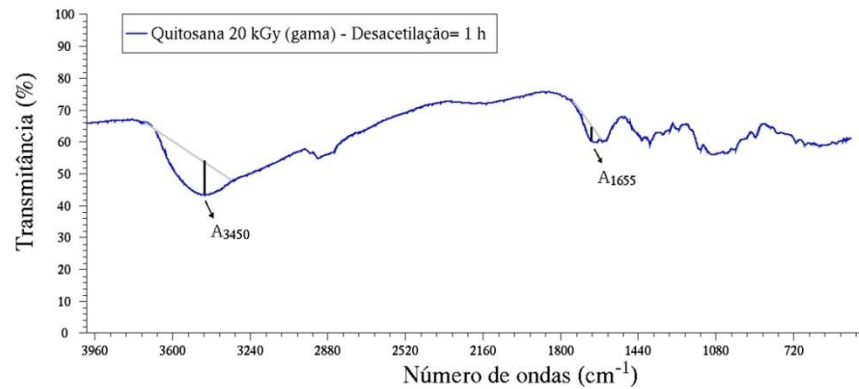


Figura 18. Cálculo do grau de desacetilação através da altura das bandas na região do infravermelho nas frequências  $A_{3450}$  e  $A_{1655}$ .

Os espectros da quitosana obtida através da casca do siri foram comparados com o espectro da quitosana SA. Observou-se que a quitosana apresenta picos relevantes na região de  $3570 - 3200 \text{ cm}^{-1}$  e  $3450 \text{ cm}^{-1}$ , relacionados aos estiramentos dos grupos  $-O-H$  e  $-NH$ , aproximadamente em  $1650 \text{ cm}^{-1}$  ( $-C=O$ ) e  $1380 \text{ cm}^{-1}$  ( $-C-H$ ). Com os valores extraídos do espectro de infravermelho foi possível calcular a porcentagem de desacetilação de cada amostra a partir das seguintes referencias:

- I. Baxter (BAXTER et al., 1991):  $GD = 100x \left( \frac{A_{1665}}{A_{3450}} \right)$
- II. Rojas (ROJAS et al., 2014):  $GD = 100x \left[ 1 - 1,33x \left( \frac{A_{1665}}{A_{3450}} \right) \right]$
- III. Rashid (RASHID et al., 2012):  $GD = 100x \left[ 1 - 1,15x \left( \frac{A_{1665}}{A_{3450}} \right) \right]$

Tabela 10: Grau de desacetilação (%) das amostras de quitosana

| Amostra              | A <sub>1655</sub> | A <sub>3450</sub> | Baxter (%) | Rojas (%) | Rashid (%) |
|----------------------|-------------------|-------------------|------------|-----------|------------|
| Quito AS             | 6,41              | 15,61             | 41         | 69        | 53         |
| Quito 0 kGy          | 2,74              | 7,32              | 37,5       | 72        | 57         |
| Quito 10 kGy         | 3,20              | 8,92              | 36         | 73        | 58         |
| Quito 20 kGy EB      | 4,34              | 8,01              | 54         | 59        | 37,5       |
| Quito 20 kGy<br>Gama | 4,34              | 10,76             | 40         | 70        | 53,5       |
| Quito 70kGy          | 0,82              | 2,23              | 37         | 72        | 57,5       |

O grau de desacetilação da quitosana afeta suas propriedades físicas químicas, como solubilidade, reatividade e conseqüentemente suas aplicações. Quanto maior o grau de desacetilação melhor a qualidade da amostra. Para se obter uma quitosana com %GD mais elevado, pode-se aumentar o tempo de reação ou realizar um pré-tratamento em NaOH a temperatura ambiente por 24 horas antes da reação de aquecimento como descrito em Abdou et al. (2008) e Al-Sagheer et al. (2009).

A Tabela 10 mostra os valores de grau de desacetilação obtido para a quitosana SA pela técnica de espectroscopia no infravermelho (GD = 41 – 69 %). Esses valores não estão no limite fornecido pelo fabricante do produto (GD = 75 – 85 %), sendo que o valor mais próximo é o dado pela metodologia de ROJAS et al. (2014). Essa discrepância pode estar relacionada com os métodos usados, já que o fabricante não menciona como foi obtida a informação para esse parâmetro. No entanto, consideramos esses valores como os valores de referência somente para comparar com os obtidos pela mesma metodologia para as amostras desse trabalho.

O valor desse parâmetro obtido para a quitosana sem irradiação após 6 horas de desacetilação da quitina da casca do siri foi semelhante ao obtido para a quitosana SA e nesse caso considerou-se que o tempo de conversão foi adequado para essa amostra.

A amostra irradiada na dose de 10 kGy apresentou resultado semelhante à da quitosana SA, indicando que nesta dose de irradiação

conseguiu-se obter a quitosana em menor tempo de desacetilação em relação à amostra não irradiada e a menor relação A1655/A3450.

O aumento da dose para 20 kGy conduz à diminuição do grau de desacetilação quando o processo de irradiação é por feixe de elétrons; quando a amostra é irradiada nessa mesma dose por radiação gama, os valores de grau de desacetilação tornam-se semelhantes àqueles da quitosana não irradiada. Esses resultados sugerem que há uma diferença entre os métodos de irradiação com relação à quebra de ligação do grupo acetil ligado ao anel glicosídico: por feixe de elétrons parece haver maior degradação promovida pela alta taxa de dose, o que explica a baixa intensidade das bandas, sendo que o material restante sofre a desacetilação. A menor taxa de dose do processo por radiação gama parece promover maior quebra dos grupos acetil, o que faz diminuir a relação  $A_{1655}/A_{3450}$  e aumentar o grau de desacetilação, sendo que esse processo acontece sem haver maior degradação.

Em doses mais altas (70 kGy EB), apesar de a amostra apresentar grau de desacetilação semelhante ao da amostra não irradiada, a intensidade dos grupos avaliados pelas equações é muito baixa, sugerindo que houve degradação do material, restando uma pequena quantidade que sofreu a desacetilação.

### **5.3.3. Massa molar média viscosimétrica**

As massas molares médias viscosimétricas (viscosidade inerente) das quitosanas SA e proveniente das cascas de siri estão apresentadas na Tabela 21. Esse parâmetro pode ser obtido a partir de duas metodologias: através da viscosidade inerente e da viscosidade específica reduzida (Figura 19). Uma ou ambas as metodologias podem ser utilizadas para a obtenção da massa molar. Neste trabalho, os dados para a viscosidade inerente tiveram melhor resposta estatística como revela o teste de hipóteses para a média descrito no item 5.4.2.1.1 e a avaliação dos métodos em 5.4.2.1.2.

Tabela 11: Massas molares médias viscosimétricas (viscosidade inerente) das quitosanas SA e obtidas da casca do siri

| Amostra           | Média <sub>pm</sub> (KDa) | Desvio Padrão (DP) |
|-------------------|---------------------------|--------------------|
| Quito AS          | 211,66                    | 129,10             |
| Quito 0 kGy       | 27,09                     | 3,58               |
| Quito 10 kGy EB   | 25,15                     | 6,44               |
| Quito 20 kGy EB   | 16,53                     | 2,99               |
| Quito 20 kGy Gama | 6,48                      | 1,66               |
| Quito 70 kGy EB   | 12,90                     | 2,09               |

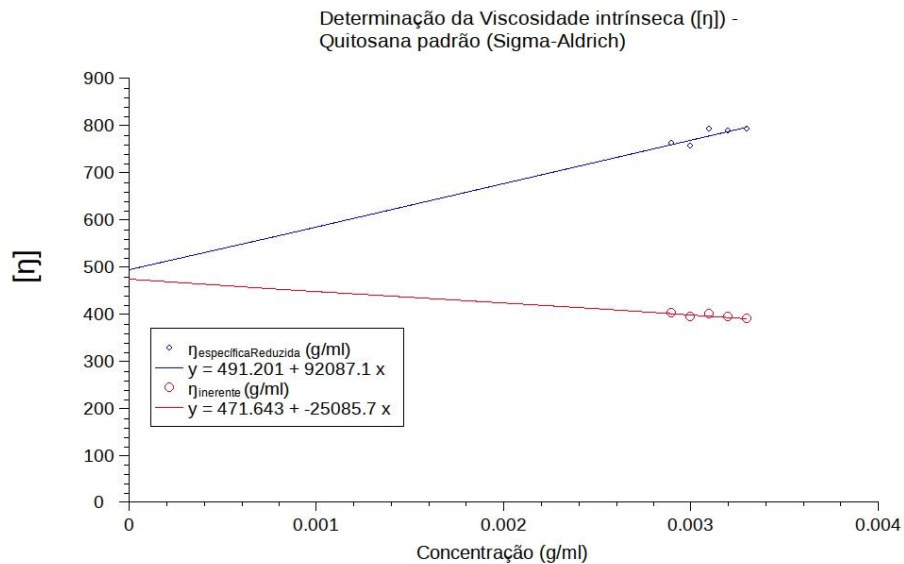


Figura 19. Determinação da viscosidade intrínseca.

Estes resultados mostram que a quitosana SA realmente é de baixa massa molar, como descrito em seu rótulo, porém o alto valor do desvio padrão sugere que esse produto apresente polidispersão.

A quitosana proveniente da casca do siri também é de baixa massa molar, com valor cerca de 10 vezes menor quando comparado com o padrão. A quitosana obtida com o uso da irradiação por feixe de elétrons apresenta diminuição da massa molar em função do aumento da dose de radiação absorvida.

A quitosana obtida com o uso da radiação gama na dose de 20 kGy apresentou o menor valor de massa molar em relação às demais amostras; na faixa do valor apresentado esse produto é considerado como um oligômero e não mais como um polímero. A quebra de moléculas parece ter ocorrido mais intensamente nesse caso, indicando que o efeito da baixa taxa de dose no processo de irradiação gama promove maior cisão das cadeias.

### 5.3.3.1. Teste de hipóteses para a avaliação do valor do massa molar média da quitosana padrão

Segundo as especificações da quitosana da marca Sigma-Aldrich contidas no CAS RN (Chemical Abstracts Service Registry Number), a massa molar média do produto está apresentado a partir de duas séries de valores: a) entre 50 kDa e 190 kDa (média é 120 kDa –  $\mu$ ), obtido a partir do método viscosimétrico e b) entre 190 kDa e 310 kDa (média 250 kDa –  $\mu'$ ), obtido por outros métodos.

Sendo assim, estabeleceram-se as seguintes hipóteses para um nível de significância de 95 % ( $\alpha=0,05$ ):

- a) que a média é igual a 120 kDa ( $\mu = 120$  kDa ou  $H_0=120$ );
- a') que a média é diferente de 120 kDa ( $\mu \neq 120$  kDa ou  $H_1 \neq 120$  – abrange as duas extremidades da curva de probabilidade);
- b) que a média é igual a 250 kDa ( $\mu' = 250$  kDa ou  $H'_0=250$ );
- b') que a média é diferente de 250 kDa ( $\mu' \neq 250$  kDa ou  $H'_1 \neq 250$  – abrange as duas extremidades da curva de probabilidade);

Calcula-se então a probabilidade de uma dada hipótese ter significância de acordo com o teste t-student:

$$t = \sqrt{n} \left( \frac{X - \mu}{s} \right) \quad (6)$$

Onde X é a média das medidas,  $\mu$  é a média da população (valor a ser avaliado), s é o desvio padrão das medidas e n é o número de medidas (graus de liberdade).

As medidas foram realizadas a partir de duas metodologias de cálculo: a partir da viscosidade inerente ( $\eta_{\text{inerente}}$ ) e a partir da viscosidade específica reduzida ( $\eta_{\text{EspecíficaReduzida}}$ ) e estes resultados estão na Tabela 12.

Tabela 12: Medidas de viscosidade inerente e viscosidade específica reduzida e seus parâmetros estatísticos para a determinação da massa molar média viscosimétrica da quitosana SA.

| Parâmetros e Medidas                             | Metodologias para a determinação da massa molar média viscosimétrica |   |
|--|--|---|
|  | $\eta_{\text{EspecíficaReduzida}}$                                   | $\eta_{\text{inerente}}$                          |
| Massa molar medida (kDa)                         | 106,9<br>946,9<br>90,7<br>886,1                                      | 101,3<br>325,7<br>98,3<br>321,4                   |
| Média (X) (kDa)                                  | 506,4  | 211,7   |
| Desvio padrão (s)                                | 473,6  | 129,2   |
| Graus de liberdade (n)                           | 4  | 4   |
| t (com relação à $H_0=120$ e $H_1 \neq 120$ )    | 1,64   | 1,42  |
| t' (com relação à $H'_0=250$ e $H'_1 \neq 250$ ) | 1,09   | -10,49  |
| Valor p  | t      0,20 < p < 0,10<br>t'      0,40 < p < 0,30                    | t      0,30 < p < 0,2<br>t'      0,01 < p < 0,001 |



### 5.3.3.2. Avaliação dos processos

Os processos de obtenção da massa molar média viscosimétrica também foram avaliados estatisticamente tanto para as medidas obtidas para a quitosana SA, como para a quitosana obtida da casca de siri.

Para essas medidas foi estabelecido também um intervalo de confiança de 95 % (ou  $1-\alpha = 0,95$  onde  $\alpha$  é 0,05 e  $\alpha/2$  são as extremidades da curva de probabilidade), a partir de 4 repetibilidades para cada amostra.

Então:

$n_p = 4$  (número de medidas do padrão)

$n_{sb} = 4$  (número de medidas da quitosana do siri)

Logo:  $v = n_p + n_{sb} - 2 = 6$

Procura-se na tabela t-student o valor que define essas condições:  $t(v, \alpha/2) = 2,447$  (valor tabelado).

E calcula-se o limite da diferença entre as médias das quitosanas SA ( $X_p$ ) e do siri ( $X_{sb}$ ):

$$X_p - X_s \pm t(v, \alpha/2) \frac{\sqrt{(n_p - 1) \times \sigma_p^2 + (n_s - 1) \times \sigma_s^2}}{(n_p + n_s) \times \sqrt{\left(\frac{1}{n_p} + \frac{1}{n_s}\right)}} \quad (7)$$

Onde  $\sigma^2$  é a variância das amostras das quitosanas SA (p) e de siri (sb). Nesse caso a variância é desconhecida, mas em uma aproximação pode-se substituir esse parâmetro pelo quadrado do desvio padrão das medidas (s).

Os resultados das medidas de viscosidade intrínseca, cálculo desses limites e demais parâmetros estão mostrados na Tabela 13.

Tabela 13: Medidas de viscosidade inerente, cálculos dos limites para a diferença das médias e outros parâmetros estatísticos para a avaliação dos processos de obtenção da massa molar média para as quitosanas SA e do siri.

| Parâmetros e Medidas     | Metodologias para a determinação da massa molar média viscosimétrica |                                       |                                    |                              |
|--------------------------|--|---------------------------------------|------------------------------------|------------------------------|
|                          | Quitosana padrão (SA)  |                                       | Quitosana de siri                  |                              |
|                          | $\eta_{\text{EspecíficaReduzida}}$                                   | $\eta_{\text{inerente}}$              | $\eta_{\text{EspecíficaReduzida}}$ | $\eta_{\text{inerente}}$     |
| Massa molar medida (kDa) | 106,9<br>946,9<br>90,74<br>886,12                                    | 101,3<br>325,669<br>98,312<br>321,362 | 38,1<br>32,5<br>27,9<br>25,9       | 31,7<br>28,0<br>24,9<br>23,7 |
| Média (X) (kDa)          | 506,42   | 211,66                                | 31,1                               | 27,1                         |
| Desvio padrão (s)        | 473,59   | 129,18                                | 5,4                                | 3,6                          |
| Graus de liberdade (n)   | 4  | 4                                     | 4                                  | 4                            |
| Limite inferior          | -102,2   | 120,0                                 | -                                  | -                            |
| Limite superior          | 1056,8   | 342,7                                 | -                                  | -                            |

A diferença entre as médias das quitosanas SA e do siri ( $X_p - X_{sb}$ ) é 184,6 kDa. Esse valor fica melhor ajustado dentro dos limites calculados para o método de viscosidade inerente.

Concluindo, o método viscosimétrico aplicado tem confiabilidade dentro do intervalo proposto quando as massas moleculares médias são provenientes da metodologia de determinação da viscosidade inerente. Esse é o método que apresenta a melhor resposta do parâmetro (massa molecular média).

Os testes a seguir referem-se à confiabilidade dos resultados de massa molecular média viscosimétrica com 95 % de confiança, a partir das determinações de viscosidade inerente.

### 5.3.3.3. Teste T-Student

Nesse teste de confiabilidade de resultados, o número de medidas (n) foi 4 para cada tipo de amostra. Propondo-se que os resultados devem ter um nível de confiabilidade de 95 %, temos que:

$$t(n-1; \alpha) \longrightarrow t(3; 0,05) = 3,182 \text{ (valor extraído da tabela)}$$

Onde  $\alpha$  corresponde aos limites das duas extremidades da curva de probabilidade:  $(1-0,95) = 0,05$  quando a distribuição para a média é  $X=N(\mu, \sigma^2)$ , onde  $\mu$  é a média populacional e  $\sigma^2$  é a variância populacional.

A avaliação da confiabilidade (intervalo de confiança – IC) dos resultados é obtida a partir de:

$$IC = \frac{t_{(3; 0,05)} \times s}{\sqrt{(n-1)}} \quad (8)$$

Onde s é o desvio padrão das medidas, substituindo em aproximação o  $\sigma$ .

Os limites do intervalo de confiança são expressos como  $X-IC$  (limite inferior) e  $X+IC$  (limite superior), onde X é a média das medidas. Esses valores estão descritos na Tabela 14.

Tabela 14: Intervalo de confiança (teste t-student) e seus limites para as massas molares médias viscosimétricas das quitosanas SA, de siri não irradiada e irradiada.

| Amostra           | $t_{3;0,05} \alpha/n$ (%) | Limite Inferior (%) | Limite Superior (%) |
|-------------------|---------------------------|---------------------|---------------------|
| Quito AS          | 237,31                    | -25,65              | 448,97              |
| Quito 0 kGy       | 6,57                      | 20,51               | 33,66               |
| Quito 10 kGy EB   | 11,83                     | 13,32               | 36,98               |
| Quito 20 kGy EB   | 5,49                      | 11,03               | 22,02               |
| Quito 20 kGy Gama | 3,04                      | 3,43                | 9,52                |
| Quito 70 kGy EB   | 3,84                      | 9,05                | 16,75               |

Os resultados da Tabela 14 devem ser comparados aos da Tabela 11. O intervalo de confiança da quitosana SA ficou muito grande devido ao alto desvio padrão das medidas. Nesse caso, um número maior de medidas (n) deveria ter sido realizado; esse grande desvio padrão pode estar relacionado a polidispersão da amostra.

Os demais resultados apresentam suas médias dentro dos limites, onde se conclui que as medidas realizadas estão dentro do intervalo de confiança calculado.

#### 5.3.3.4. Teste Z

O teste z é realizado quando a variância das medidas é conhecida. Nesse caso foi feita uma aproximação a partir do quadrado do desvio padrão das medidas.

Para esse teste de confiabilidade de resultados, o número de medidas (n) foi 4 para cada tipo de amostra. Propondo-se que os resultados devem ter um nível de confiabilidade de 95 %, temos que:

$$z(n; \alpha) \longrightarrow z(4; 0,975) = 1,96 \text{ (valor extraído da tabela)}$$

Onde  $\alpha$  corresponde aos limites uma das extremidades da curva de probabilidade:  $(1-0,975) = 0,0025$ , já que no teste z a distribuição de probabilidade é normal.

A avaliação da confiabilidade (intervalo de confiança – IC) dos resultados é obtida a partir de:

$$IC = z_{(0,975)} \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (9)$$

Os limites do intervalo de confiança são expressos como X-IC (limite inferior) e X+IC (limite superior), onde X é a média das medidas. Esses valores estão descritos na tabela 15.

Tabela 15: Intervalo de confiança (teste z) e seus limites para as massas molares médias viscosimétricas das quitosanas SA, de siri não irradiada e irradiada

| Amostra           | $Z_{0,975} \sigma/\sqrt{n}$ (%) | Limite Inferior (%) | Limite Superior (%) |
|-------------------|---------------------------------|---------------------|---------------------|
| Quito AS          | 126,59                          | 80,06               | 338,25              |
| Quito 0 kGy       | 3,50                            | 23,58               | 30,59               |
| Quito 10 kGy EB   | 6,31                            | 18,84               | 31,46               |
| Quito 20 kGy EB   | 2,92                            | 13,60               | 19,45               |
| Quito 20 kGy Gama | 1,62                            | 4,85                | 8,10                |
| Quito 70 kGy EB   | 2,05                            | 10,85               | 14,95               |

Intervalos com 95% de confiança

Os resultados da Tabela 15 devem ser comparados aos da Tabela 11. O intervalo de confiança da quitosana SA não teve valor negativo como o apresentado pelo limite inferior no cálculo dos limites usando o teste t-student (tabela 20); os seus limites estão mais próximos do valor médio em relação ao do teste anterior, mesmo considerando o grande desvio padrão das medidas.

Os demais resultados apresentam suas médias dentro dos limites e igualmente aos resultados desses parâmetros para a quitosana SA, apresentaram os limites mais ajustados à média amostral.

Conclui-se que as medidas realizadas estão dentro do intervalo de confiança calculado e que essas medidas obedecem a uma distribuição normal de probabilidade.

### 5.3.3.5. Intervalo de confiança para a variância

A variância é uma medida de dispersão e significa o quanto as medidas estão dispersas da média.

Nas medidas apresentadas nesse trabalho foi proposto o cálculo da variância das medidas considerando 95 % de confiabilidade e quatro medidas de valores para cada amostra.

Considerando uma distribuição normal, tem-se que o intervalo de confiança para a variância é:

$$\frac{(n-1) \cdot s^2}{\chi^2_{\left(\frac{\alpha}{2}; (n-1)\right)}}; \frac{(n-1) \cdot s^2}{\chi^2_{\left(1-\frac{\alpha}{2}; (n-1)\right)}} \quad (10)$$

Onde  $\chi^2 (\alpha/2; (n-1)) = \chi^2 (0,025; 3) = 0,216$  e  $\chi^2 (1-\alpha/2; (n-1)) = \chi^2 (0,975; 3) = 9,35$ , ambos valores extraídos da tabela  $\chi^2$ .

A Tabela 16 mostra os resultados do intervalo de confiança para a variância das medidas de massa molecular média viscosimétrica das quitosanas utilizadas nesse trabalho.

Tabela 16: Intervalo de confiança da variância para as massas moleculares médias viscosimétricas das quitosanas SA, de siri não irradiada e irradiada

| Amostra           | $\chi^2 (0,025)$ | $\chi^2 (0,975)$ |
|-------------------|------------------|------------------|
| Quito AS          | 231757,77        | 5353,97          |
| Quito 0 kGy       | 177,97           | 4,11             |
| Quito 10 kGy EB   | 576,34           | 13,31            |
| Quito 20 kGy EB   | 124,10           | 2,86             |
| Quito 20 kGy Gama | 38,18            | 0,88             |
| Quito 70 kGy EB   | 60,92            | 1,40             |

Esses resultados confirmam a grande dispersão dos resultados da quitosana SA, indicando que para haver maior significância dos resultados deve-se aumentar o número de medidas.

As amostras de quitosana de siri não irradiada e irradiada por feixe de elétrons na dose de 10 kGy apresentam médias com valores próximos, no entanto é observada maior dispersão nas medidas da amostra irradiada.

Nas outras amostras a dispersão das medidas apresenta-se adequada às suas respectivas médias e desvios padrão.

#### 5.3.4. Grau de cristalinidade

A cristalinidade da quitosana depende do grau de desacetilação, do processo de obtenção e da fonte do biopolímero (MONTEIRO, 2000).

O grau de cristalinidade foi determinado através da técnica de difração de raios-x. A partir dos difratogramas obtidos foram identificadas a fração cristalina ( $I_C$ ) e a fração amorfa ( $I_A$ ) e assim foi calculado o grau de cristalinidade ( $I_{CR}$ ) pela Equação:

$$I_{CR} = I_C - I_A/I_C \times 100 \quad (11)$$

Na quitosana ocorrem interações do tipo ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila, amino e carbonila, fazendo com que a quitosana apresente uma estrutura semicristalina. A Figura 20 apresenta o difratograma para a amostra de quitosana SA e a proveniente da casca do siri e é possível observar que a quitosana é realmente um polímero semicristalino.

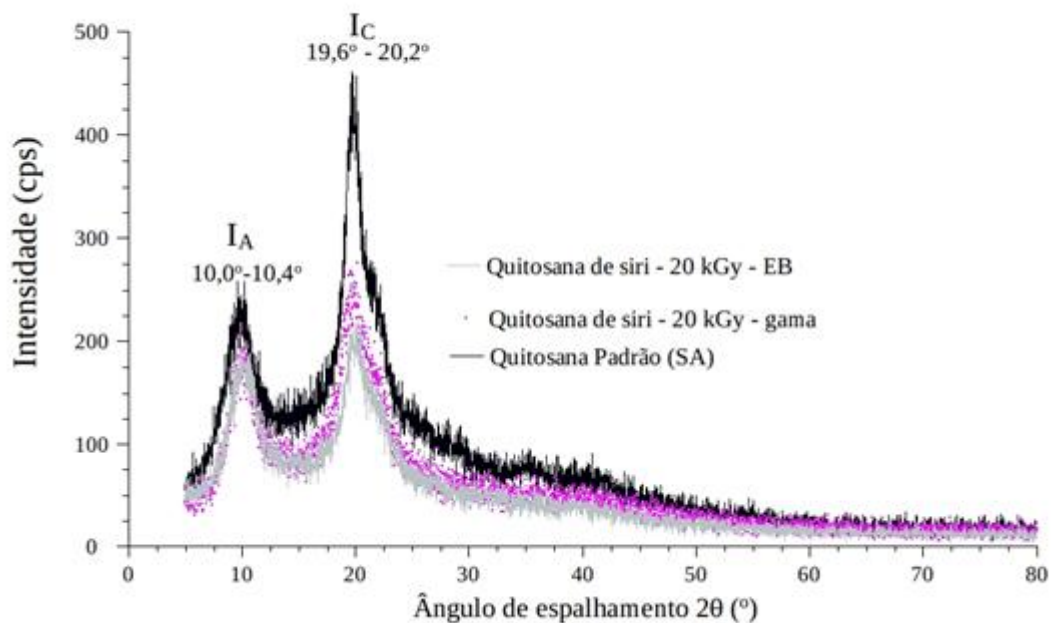


Figura 20. Difratogramas da quitosana SA e obtida da casca do siri.

Os índices de cristalinidade estão descritos na Tabela 17, onde se observa que a quitosana SA tem maior grau de cristalinidade que as quitosanas obtidas da casca do siri; a amostra irradiada por feixe de elétrons apresentou-se como a mais amorfa, sugerindo que sob o processo de irradiação há a desagregação da fase cristalina desse material.

Essa desagregação pode estar ligada à ruptura de ligações de hidrogênio entre os grupos mais eletronegativos do material (-OH, NH<sub>2</sub> e -C=O). A desagregação do arranjo cristalino é sensível à taxa de dose do processo de irradiação: em alta taxa de dose (feixe de elétrons), a desagregação é maior.

Tabela 17: Índice de cristalinidade da quitosana SA e do siri.

| <b>Amostras</b>       | <b>Índice de cristalinidade (%)</b> |
|-----------------------|-------------------------------------|
| Quitosana AS          | 45 %                                |
| Quitosana 20 kGy gama | 25 %                                |
| Quitosana 20 kGy EB   | 14 %                                |

Segundo a literatura, a quitosana possui uma célula unitária com estrutura em ziguezague estabilizada pelas ligações de hidrogênio; esses fatores permitem-lhe a formação de um arranjo cristalino do tipo ortorrômbico (OGAWA, YUI, OKUYAMA, 2004). A presença dos picos nos ângulos 20,1° são típicos de célula unitária ortorrômbica (CREBER et al., 2003).

### 5.3.5. Termogravimetria

A termogravimetria mostra o comportamento de degradação térmica de um material segundo a sua porcentagem de perda de massa em função da temperatura.

Como primeira etapa de degradação, as amostras apresentaram um evento endotérmico que é traduzido como um processo de desidratação e ocorre entre 65°C e 157°C (Tabela 18) e que representa uma perda de massa de 10 % a 20 % do material.

A decomposição por volta de 300°C (na Tabela 18, entre 298°C e 318°C), foi chamada de evento principal e ocorre com perda de 37 % a 44 % do material original. Em cerca de 550°C (na Tabela 27, 540,5°C a 614°C) ocorre um segundo evento, que tem perdas entre 26 % e 48 % do material original.

O primeiro processo de decomposição está relacionado a degradação principal da amostra, onde ocorre a quebra do anel glicosídico, ocasionando o processo de despolimerização (ZOHURIAAN, SHOKROLAHI, 2004). O evento



chamado de secundário (Tabela 18) está relacionado a queima do material carbonizado na primeira degradação.

A quitosana não irradiada apresentou ainda um terceiro evento em 633°C, correspondendo a 11,3 % de perda de massa. Esse evento pode estar relacionado a presença de uma outra estrutura que pode sugerir a ocorrência de uma desacetilação incompleta da amostra.

As curvas com suas respectivas curvas de Termogravimetria Derivativa (DTG) estão representados na Figura 21, 22 e 23. Observou-se que as quitosanas irradiadas a 10 kGy EB e 20 kGy (EB e gama) apresentaram comportamento semelhante à quitosana SA.

Tabela 18: Resultados de TG/DTG das amostras de quitosana.

| Amostras          | Temperatura (°C)       |                  |                     |                     | Perda de massa na degradação (%) |                     |                     |
|-------------------|------------------------|------------------|---------------------|---------------------|----------------------------------|---------------------|---------------------|
|                   | Evento 1 (endotérmico) | Evento Principal | Evento secundário 1 | Evento secundário 2 | Evento Principal                 | Evento secundário 1 | Evento secundário 2 |
| Quito SA          | 65,5                   | 309,2            | 538,2               | -                   | 37,7                             | 26,3                | -                   |
| Quito 0 kGy       |                        | 299,5<br>(6,4)   | 540,5<br>(0,7)      | 633,5<br>(2,1)      | 44,0<br>(8,5)                    | 41,0<br>(11,3)      | 11,3<br>(3,8)       |
| Quito 10 kGy EB   | 157,0<br>(11,3)        | 305,8<br>(2,1)   | 614,1<br>(3,9)      | -                   | 41,1<br>(3,1)                    | 48,4<br>(4,3)       | -                   |
| Quito 20 kGy EB   | 83,7<br>(18,4)         | 305,9<br>(1,9)   | 592,6<br>(25,9)     | -                   | 38,1<br>(1,9)                    | 43,0<br>(1,3)       | -                   |
| Quito 20 kGy Gama | 83,4<br>(23,8)         | 317,7<br>(0,2)   | 599,7<br>(8,7)      | -                   | 40,2<br>(1,6)                    | 42,7<br>(1,7)       | -                   |
| Quito 70 kGy EB   | 156,2<br>(4,2)         | 298,6<br>(2,2)   | 582,4<br>(14,5)     | -                   | 39,6<br>(0,8)                    | 27,5<br>(19,3)      | -                   |

- Evento ausente

§ Desvio padrão entre parênteses

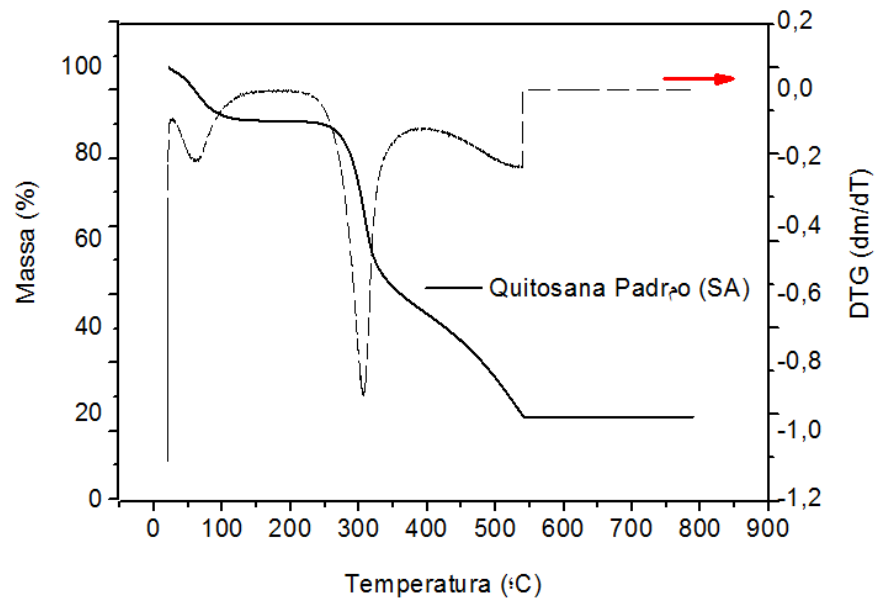


Figura 21. Termograma e DTG da quitosana SA

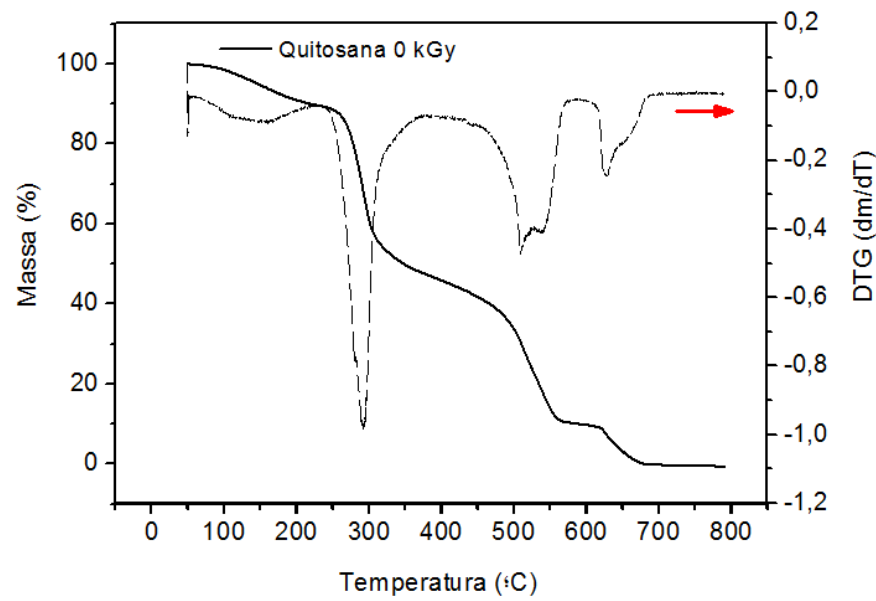


Figura 22. Termograma e DTG da quitosana do siri sem irradiação

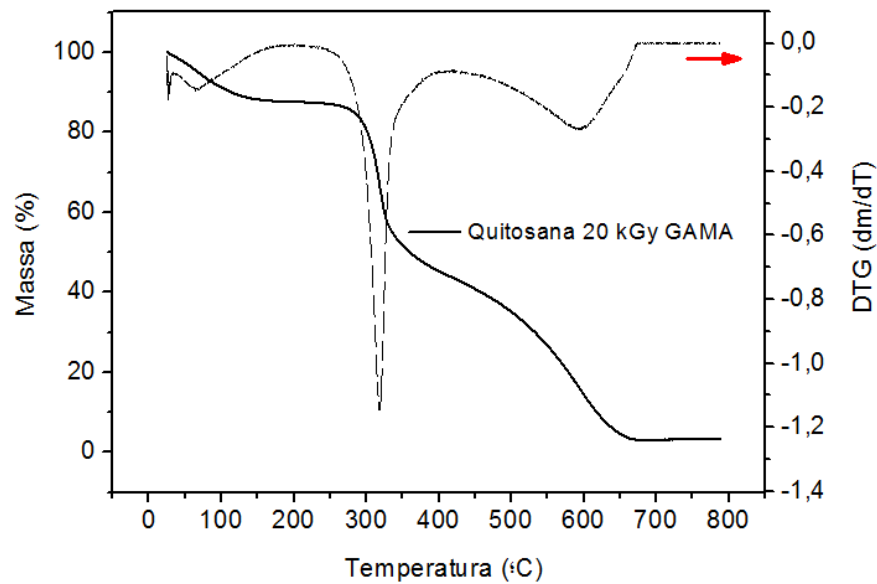


Figura 23. Termograma e DTG da quitosana do siri irradiada a 20 kGy gama

#### 5.4. Imobilização da quitosana em filmes poliméricos

Com a quitosana de siri preparada conforme descrição anterior a partir da utilização da irradiação procedeu-se à sua imobilização em filmes poliméricos tratados por radiação, onde foi possível oxidar o polímero para que a ligação química entre este e a macromolécula biológica tivesse sucesso. A metodologia de sua imobilização em filmes poliméricos seguiu um protocolo específico que está sob sigilo de patente. Os resultados dos ensaios de caracterização do material final obtido serão mostrados a seguir.

##### 5.4.1. Espectrometria (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho é um método simples e rápido analisar qualitativamente um material e suas modificações químicas que possa sofrer após um processo.

O espectro de FT-IR das amostras do PP virgem e do tratado por irradiação está apresentado na Figura 24. O PPv apresenta bandas de absorção típicas do polipropileno (SILVERSTEIN et al., 1979): vibrações de deformação axial da ligação C-H na região de  $2850\text{ cm}^{-1}$  e  $2980\text{ cm}^{-1}$ ; vibração da deformação

angular simétrica da ligação -C-H do grupo metil ( $\text{CH}_3$ ) em  $1367\text{ cm}^{-1}$  e da deformação angular assimétrica dessa mesma ligação em  $1457\text{ cm}^{-1}$  e por último, deformação angular simétrica no plano do grupo metileno ( $-\text{CH}_2$ ) em  $720\text{ cm}^{-1}$ . Ainda, observa-se uma banda relativa à vibração de deformação axial das ligações C-C em  $1171\text{ cm}^{-1}$  característica do esqueleto hidrocarbonado da cadeia parafínica.

Após o tratamento por irradiação, a amostra de PP mostra uma banda mais profunda na região de  $3365\text{ cm}^{-1}$ , que é característica da presença de hidroxila, e também na região de  $1708\text{ cm}^{-1}$ , que indica a presença do grupo peróxido (SILVERSTEIN et al., 1979). Sendo assim, o tratamento do filme de PP teve sucesso no sentido de formação de uma estrutura química necessária à ligação da biomolécula.

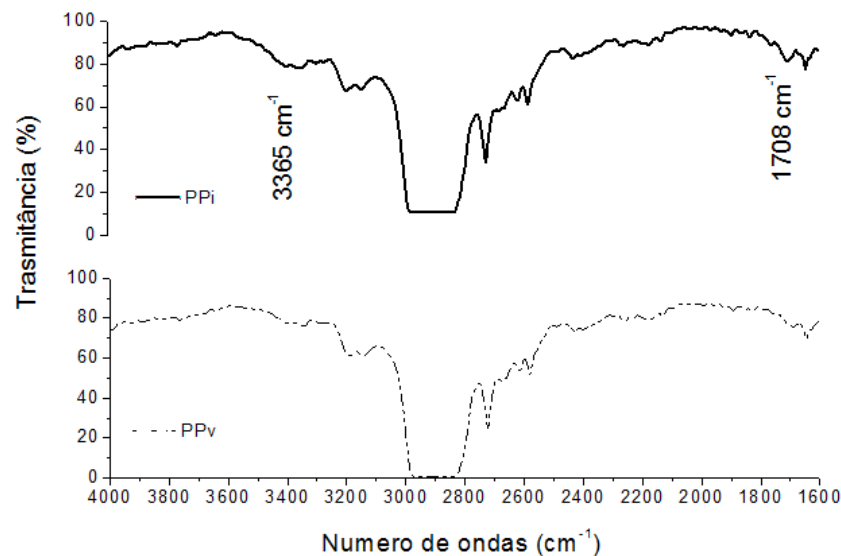


Figura 24. Espectro FTIR do PP virgem e do PP irradiado

No espectro de PP/Quito (Figura 25) observa-se aumento da amplitude na região de  $3450\text{ cm}^{-1}$  que é uma região característica da deformação axial O-H em ligação de hidrogênio intermolecular, e/ou devido à deformação axial N-H em ligação de hidrogênio intermolecular como o dublete que engloba a banda citada e aquela na região de  $3351\text{ cm}^{-1}$  (SILVERSTEIN et al., 1979). Essa superposição de frequências ocorre nos casos em que há a presença desses grupos na

composição do material analisado. Esses resultados indicam a presença de um material hidroxilado e que contém um grupo amina.

Observa-se também a diminuição da amplitude da banda em  $1715\text{ cm}^{-1}$  que é justamente a banda de material oxidado do PP irradiado, sugerindo que houve consumo de peróxido formado no filme polimérico para a formação da ligação química da quitosana ao PP.

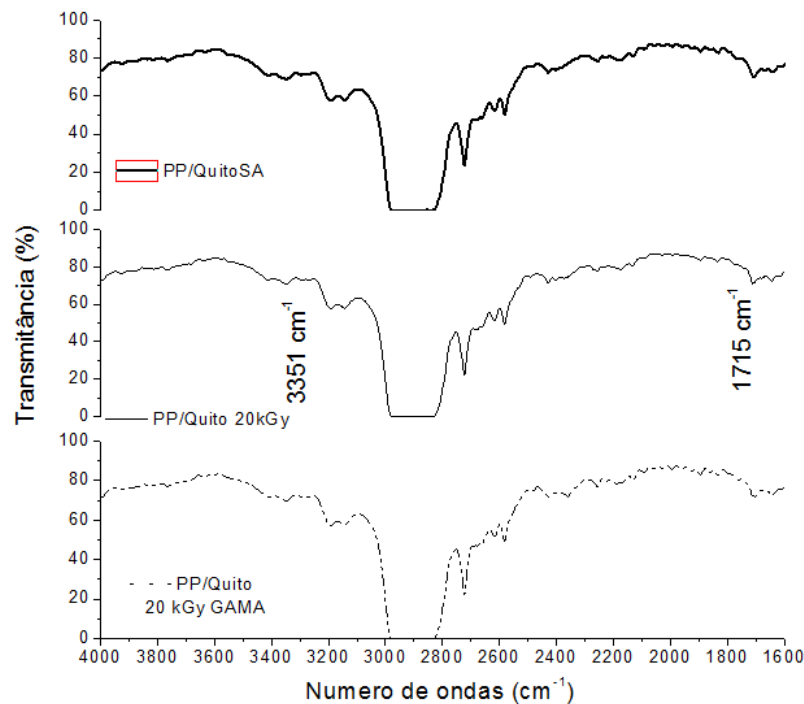


Figura 25. Espectro FTIR PP/Quito SA; PP/Quito 0 kGy e PP/Quito 20 kGy Gama

A Figura 26 mostra os espectros no infravermelho das amostras de PE. Verificam-se as seguintes vibrações características do polietileno (SILVERSTEIN et al., 1979): região de  $2970\text{ cm}^{-1}$  a  $2850\text{ cm}^{-1}$  devido à vibração das deformações axial assimétrica e simétrica do grupo metileno ( $-\text{CH}_2-$ ), região  $1477\text{ cm}^{-1}$  a  $1430\text{ cm}^{-1}$  devido à deformação angular simétrica no plano do ( $-\text{CH}_2-$ ) e na região de  $730\text{ cm}^{-1}$  a  $710\text{ cm}^{-1}$  devido à vibração de deformação angular assimétrica no plano do ( $-\text{CH}_2-$ ).

Quando submetido ao processo de irradiação observa-se a formação de peróxido indicado pela presença da banda característica em  $1714\text{ cm}^{-1}$ , indicando o sucesso do tratamento por radiação.

Da mesma forma que os espectros de quitosana imobilizada no substrato de PP, os espectros de PE com quitosana (Figura 27), apresentam aumento da amplitude na região de  $3450\text{ cm}^{-1}$  que é uma região característica da deformação axial O-H e/ou N-H em ligação de hidrogênio intermolecular; há um dublete que engloba a banda citada e aquela na região de  $3351\text{ cm}^{-1}$ , melhor observada nas amostras de quitosana de siri irradiadas. Esses resultados indicam a presença de um material hidroxilado e que contém um grupo amina.

A diminuição da amplitude da banda em  $1715\text{ cm}^{-1}$  também é verificada, sugerindo que houve consumo de peróxido formado no filme polimérico para a formação da ligação química da quitosana ao PE.

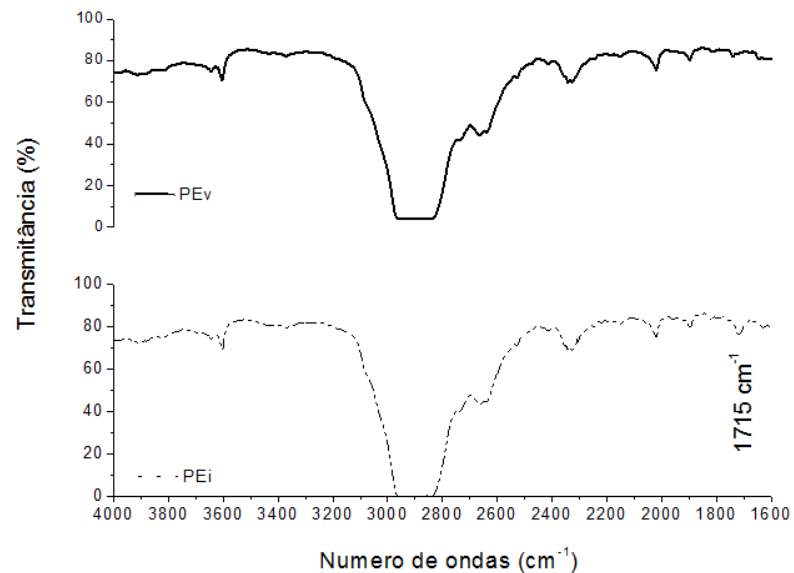


Figura 26. Espectro FTIR do PE virgem e PE irradiado.

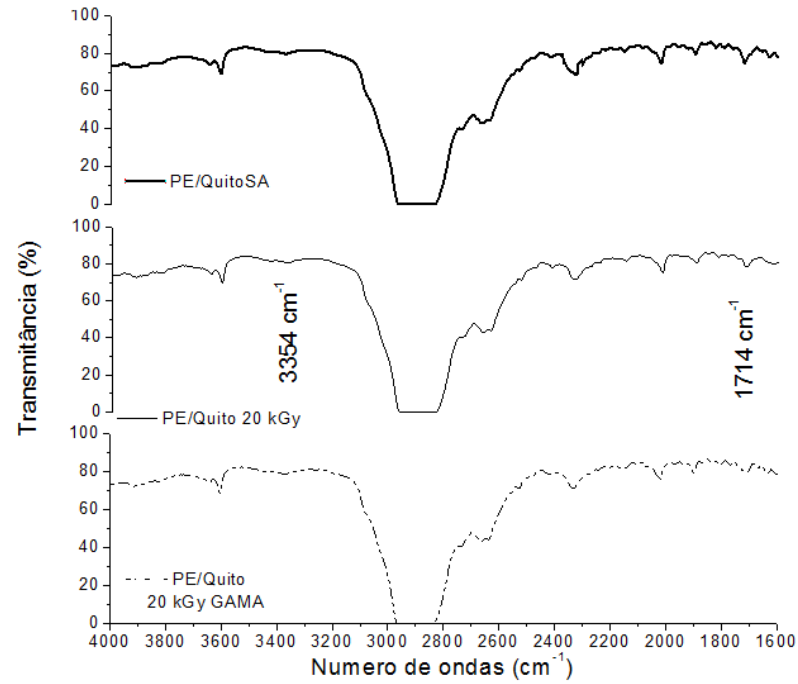


Figura 27. Espectro FTIR do PEv, PEi e PE/Quito 20 kGy Gama

#### 5.4.2. Termogravimetria

As curvas do PP virgem e irradiado com suas respectivas curvas de fluxo de calor ( $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) estão representadas na Figura 28 e 29.

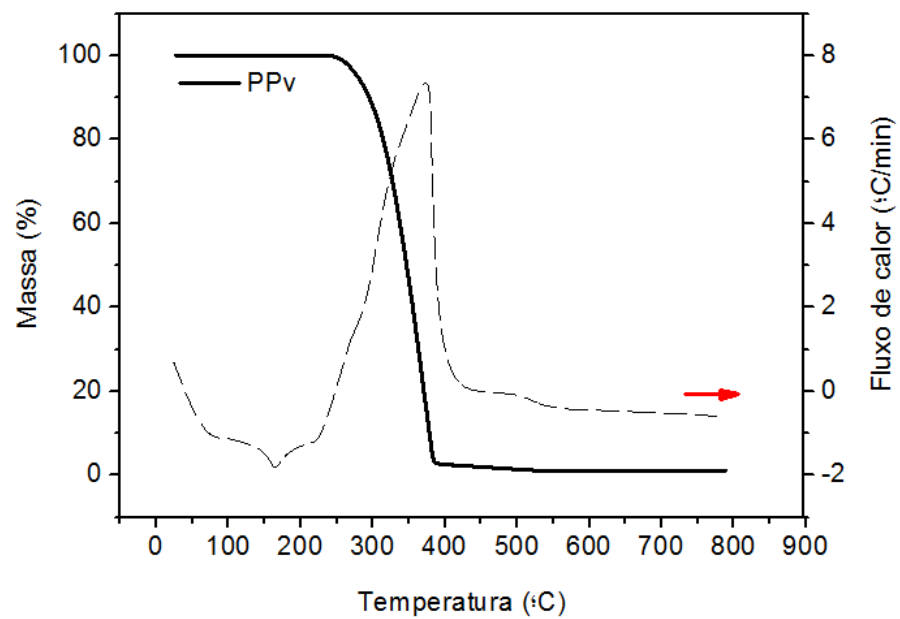


Figura 28. Termograma (TGA e DSC) do PP virgem

Observa-se que o polipropileno apresenta temperatura de degradação em cerca de 375°C, iniciando em 238°C e terminando em 390°C, que é uma temperatura característica de degradação do PP como descrito na literatura (ROSÁRIO et al., 2010). Esse único evento de degradação ocorre com perda de massa de cerca de 96,5 % da amostra.

Após o tratamento por irradiação, o PP teve sua degradação em cerca de 365°C em evento único cuja perda de massa foi de cerca de 95,7 %; essa alteração da temperatura de degradação térmica indica que o material passou por alterações estruturais químicas, apesar de esse evento continuar a ser o principal. Nessa amostra observa-se também o aparecimento de um ombro no perfil de DSC na temperatura de 260°C, que pode estar relacionado à formação de hidroperóxidos em decorrência do tratamento por radiação. Esse registro não aparece no termograma de termogravimetria do PP virgem – não se observa ponto de inflexão na curva - talvez devido a questões quantitativas (a alteração pode ter ocorrido com baixa perda de massa).

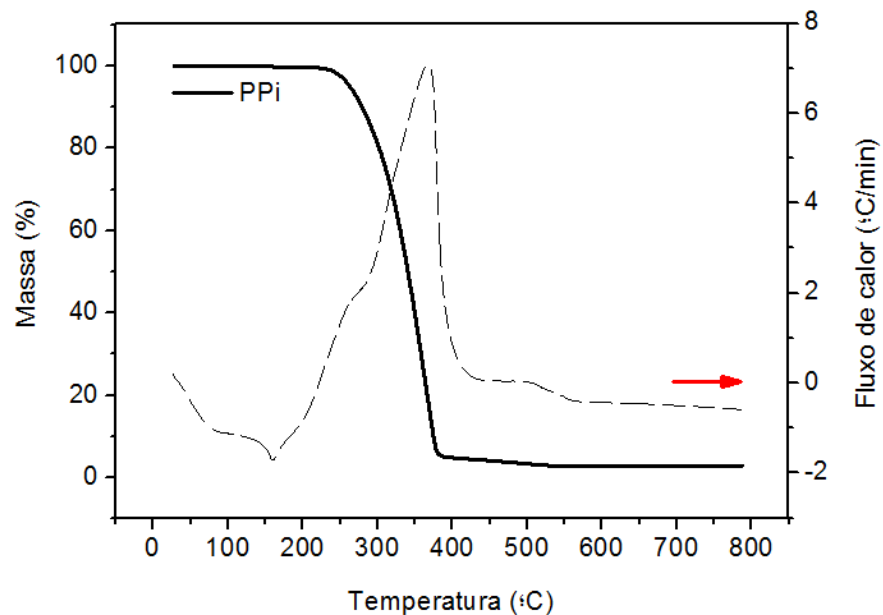


Figura 29. Termograma (TGA e DSC) do PP irradiado



As Figuras 30 e 31 mostram as curvas e as curvas do fluxo de calor dos filmes (PP) enxertados com a quitosana SA e a obtida do siri irradiada a 20 kGy gama.

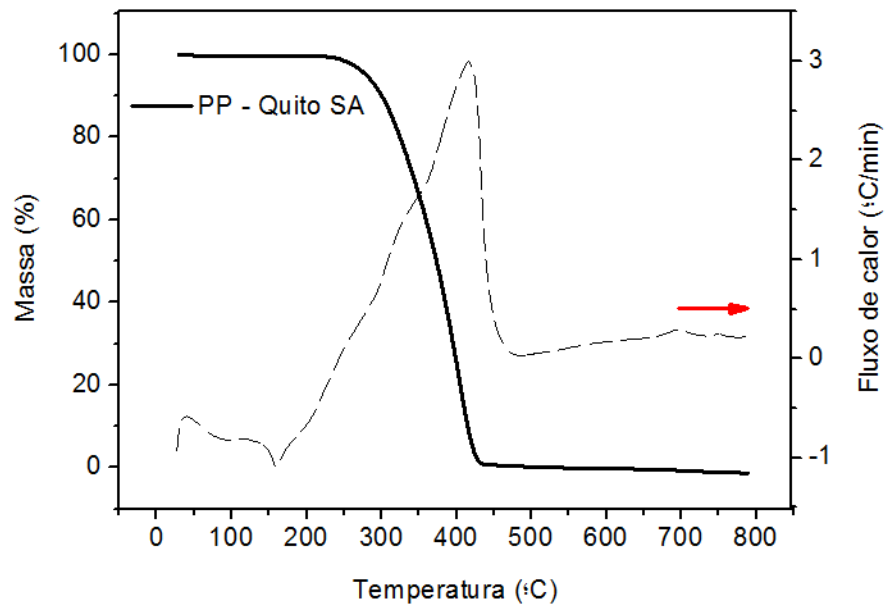


Figura 30. Termogramas (TGA e DSC) da amostra de quitosana SA imobilizada no substrato de PP

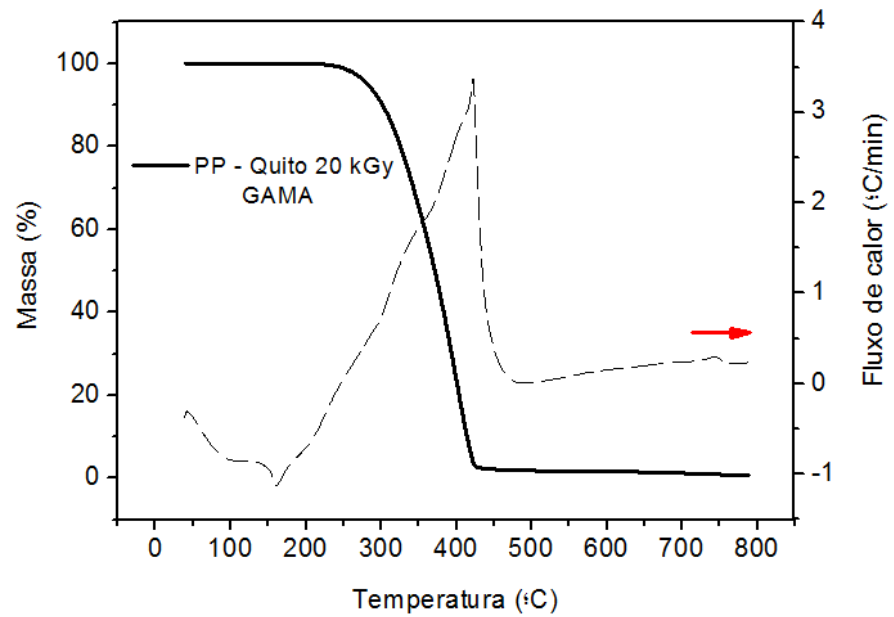


Figura 31. Termogramas (TGA e DSC) da amostra de quitosana de siri irradiada (20 kGy gama) imobilizada no substrato de PP

A degradação em único evento das amostras de polipropileno com quitosana ocorreu nas temperaturas: 402°C, 399,3°C e 398°C para PP/Quito SA, PP/QuitoGama e PP/Quito EB respectivamente, correspondendo a uma perda de massa de 99,2 %, 97,3 % e 85,7 %. Em relação ao filme oxidado, esse evento ocorreu em temperatura mais alta devido à incorporação da biomolécula, e com perda de massa em valores próximos com exceção ao PP/Quito EB, o que pode estar relacionado à quantidade de quitosana possivelmente um pouco maior do que em relação à quitosana obtida com o uso da radiação gama e da quitosana SA. Observa-se também o aparecimento de um ombro no perfil de DSC na faixa de 333,2 – 341,3°C em todas as amostras, sugerindo a ocorrência de um evento não desvinculado do evento principal, como a degradação de uma ligação química como a da quitosana incorporada ao filme, já que os valores de temperatura estão em uma faixa intermediária entre a temperatura de degradação da quitosana livre (Tabela 19) e a temperatura de degradação do filme sem a incorporação dessa biomolécula. Esse estudo inexistente na literatura e mais investigações devem ser feitas.

A Figura 32 e 33 traz os termogramas para o polietileno virgem e irradiado.

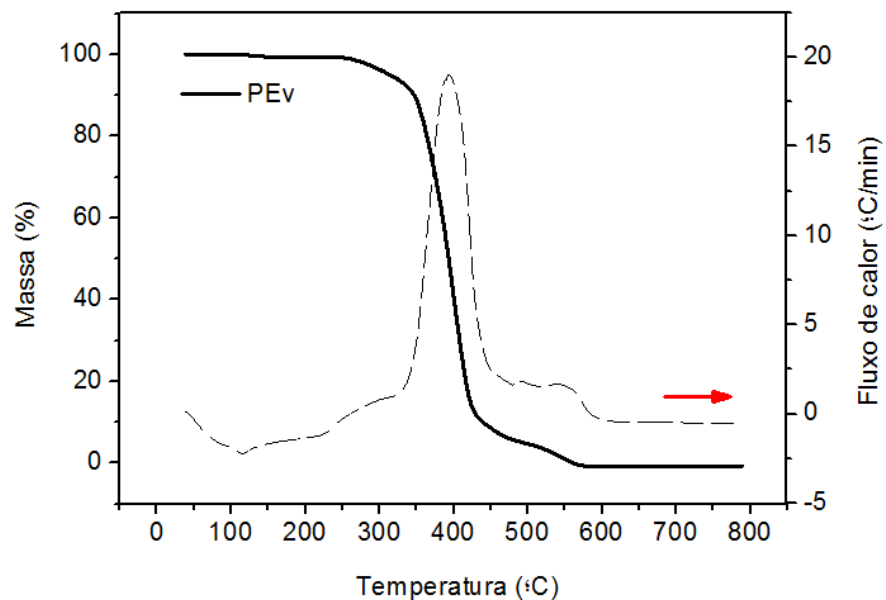


Figura 32. Termogramas (TGA e DSC) do PE virgem

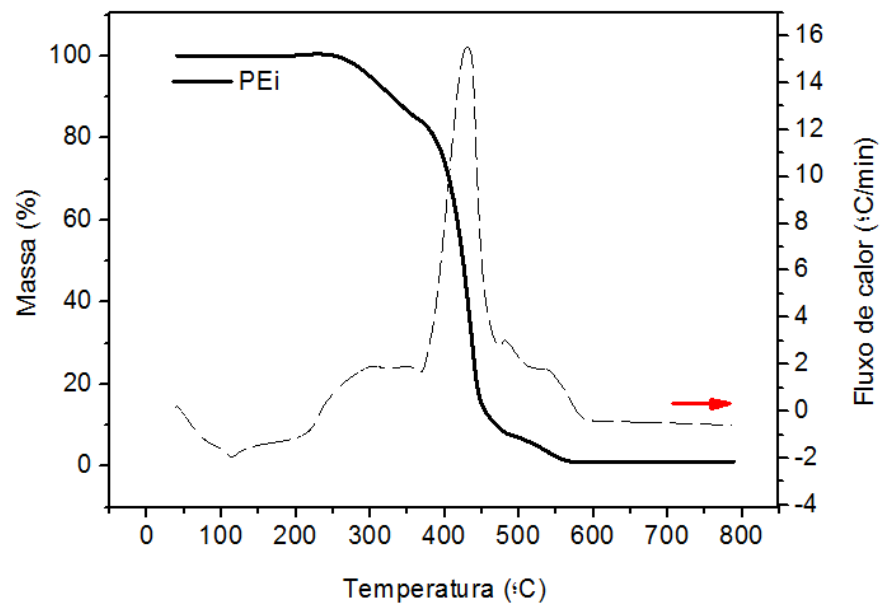


Figura 33. Termograma (TGA e DSC) do PE irradiado

No caso do PE virgem, a degradação térmica ocorre em cerca de 404,6°C, que é a temperatura de degradação típica deste tipo de polímero como descrito na literatura (BONELLI et al., 2005). Observa-se ainda um evento de degradação em cerca de 288°C que ocorre com 8,6 % de perda de massa e outro em cerca 546°C que ocorre com cerca de 9 % de perda de massa. O evento na temperatura menor pode estar relacionado a decomposição da ligação de eventuais aditivos presentes e o evento na temperatura maior está relacionado à decomposição final do material e seus produtos de oxidação já que a termodegradação ocorreu na presença de oxigênio.

No PE irradiado o evento principal ocorre em uma temperatura maior do que no PE virgem (cerca de 439°C) e com menor perda de massa (cerca de 78 %), indicando a ocorrência de alterações do material após o tratamento por irradiação. O evento secundário que ocorre antes do evento principal é observado em uma temperatura maior (cerca de 324°C) e com maior perda de massa (cerca de 14 %) do que o seu correspondente no PE virgem indicando a ocorrência de um evento de natureza qualitativa distinta daquele observado no material referência e que pode estar relacionado ao rompimento das ligações dos grupos contendo oxigênio eventualmente formados durante a irradiação. O último evento ocorre em uma temperatura um pouco menor (cerca de 537°C) e com menor

perda de massa (cerca de 7 %); essa observação sustenta a tese de que uma parte mais susceptível do material foi degradada antes desse evento final.

Os filmes de PE contendo quitosana (Figuras 34 e 35) apresentaram temperaturas de degradação do evento principal em: 411°C, 441°C e 407°C para PP/Quito SA, PP/QuitoGama e PP/Quito EB respectivamente, correspondendo a uma perda de massa de 50 %, 79 % e 63 %.

Igualmente aos filmes de PE, observa-se também o aparecimento de um evento secundário na faixa de 321 – 344°C em todas as amostras, sugerindo a ocorrência da degradação da ligação da quitosana incorporada ao filme, já que os valores de temperatura estão em uma faixa intermediária entre a temperatura de degradação da quitosana livre e a temperatura de degradação do filme sem a incorporação dessa biomolécula. Essa evidência é maior nos filmes com quitosana SA e a de siri cuja obtenção utilizou feixe de elétrons já que a perda de massa nesse evento está em torno de 17 %; os filmes com quitosana cuja obtenção utilizou radiação gama apresentou perda de massa um pouco menor nesse evento, mas com valor semelhante ao do PE irradiado, sugerindo que a incorporação de quitosana deve ter sido muito baixa. O último evento apresentou temperatura de degradação menor nas amostras de PE com quitosana SA e de siri por feixe de elétrons e perda de massa maior; o filme de PE com quitosana de siri por radiação gama apresentou temperatura de degradação e perda de massa no último evento com valores parecidos ao do filme de PE irradiado, o que sugere ainda mais fortemente que esse tipo de quitosana foi incorporada em baixa concentração no filme.

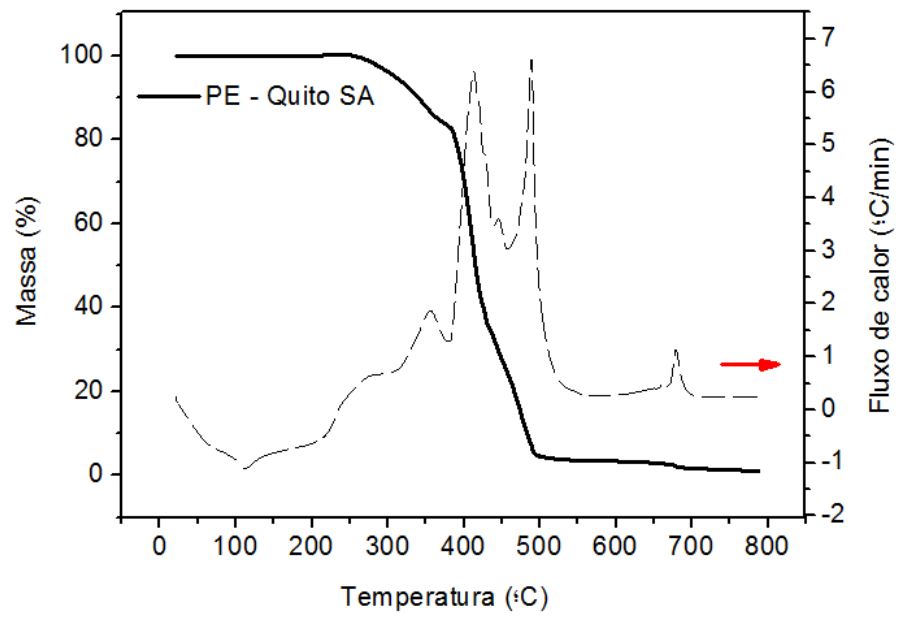


Figura 34. Termogramas (TGA e DSC) da amostra de quitosana SA imobilizada no substrato de PE

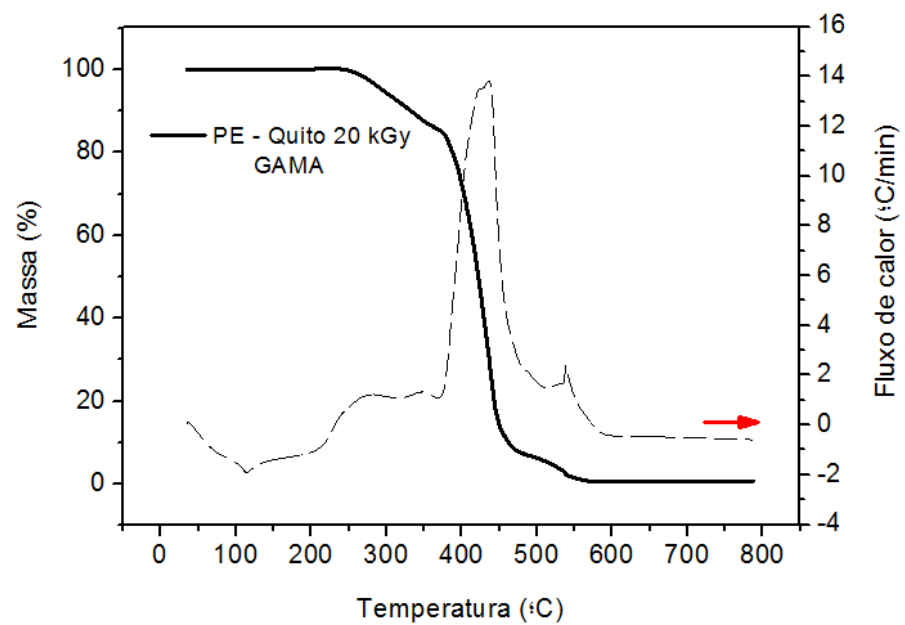


Figura 35. Termogramas (TGA e DSC) da amostra de quitosana de siri irradiada (gama - 20 kGy) imobilizada no substrato de PE

Tabela 19. Resultados de TG/DTG das amostras dos filmes puros e imobilizados com quitosana

| Amostras    | Temperatura (°C)       |                  |                     |                     | Perda de massa na degradação (%) |                     |                     |
|-------------|------------------------|------------------|---------------------|---------------------|----------------------------------|---------------------|---------------------|
|             | Evento 1 (endotérmico) | Evento Principal | Evento secundário 1 | Evento secundário 2 | Evento Principal                 | Evento secundário 1 | Evento secundário 2 |
| PP          |                        |                  |                     |                     |                                  |                     |                     |
| Virgem      | 157                    | 371              | -                   | -                   | 96,5                             | -                   | -                   |
| Irradiado   | 114                    | 359,5 (5,7)      | -                   | -                   | 95,7 (1,1)                       | -                   | -                   |
| 20 kGy EB   | 170                    | 398 (9,3)        | 339,1 (10,4)        | -                   | 85,2 (16,0)                      | -                   | -                   |
| 20 kGy gama | 180                    | 399,3 (0,0)      | 341,3 (2,5)         | -                   | 97,1 (0,4)                       | -                   | -                   |
| Padrão (SA) | 186                    | 402 (2,8)        | 333,2 (9,7)         | -                   | 99,2 (2,1)                       | -                   | -                   |
| PE          |                        |                  |                     |                     |                                  |                     |                     |
| Virgem      | 288,3                  | 404,6            | 546,3               | -                   | 8,7                              | 80,3                | 8,9                 |
| Irradiado   | 323,6 (3,3)            | 438,9 (0,4)      | 537,3 (4,0)         | -                   | 14,0 (0,5)                       | 77,8 (2,3)          | 6,4 (1,2)           |
| 20 kGy EB   | 336,4 (7,4)            | 407,0 (6,2)      | 424,7 (3,0)         | 510,3               | 17,0 (2,30)                      | 67,3 (10,0)         | 14,3 (11,7)         |
| 20 kGy gama | 321,0 (0,4)            | 441,5 (4,1)      | 527,9 (4,4)         | -                   | 13,9 (7,6)                       | 78,8 (1,8)          | 4,9 (1,8)           |
| Padrão (SA) | 344,3 (6,7)            | 410,9 (0,6)      | 468,2 (7,8)         | -                   | 16,9 (2,4)                       | 50,3 (5,3)          | 28,6 (6,6)          |

A caracterização dos filmes mostrou que há fortes indícios que houve incorporação da quitosana (padrão e de siri) nos substratos poliméricos, mas parece haver dependência do tipo de quitosana e do tipo de filme para a avaliação a em termos quantitativos. Uma investigação mais detalhada deve ser realizada para a avaliação da quantidade de quitosana quimicamente ligada aos filmes.

## **5.5. Estudo para determinar a atividade bacteriostática das quitosanas**

Como avaliação final, foi realizado um estudo sobre a capacidade dos filmes incorporados com quitosana atuarem como inibidores da atividade bacteriana. Esse estudo será descrito a seguir.

### **5.5.1. Viabilidade das bactérias *E. coli* e *S. aureus***

As bactérias cresceram em placas preparadas com apenas LB+ágar e tiveram crescimento totalmente inibido em placas preparadas com LB+ágar+Ampicilina e LB+ágar+Tetraciclina. Dessa forma foi confirmada a viabilidade das cepas nos meios sem antibióticos, assim como sua sensibilidade à Ampicilina e à Tetraciclina.

### **5.5.2. Concentração Mínima Inibitória Crescimento Bacteriano (MIC)**

Foi verificada a redução da turbidez do meio LB com o aumento da concentração de quitosana. Sendo maior a diminuição da turbidez no uso da quitosana SA que chegou a 50% na concentração máxima de 2,5µg/mL. Enquanto que a diminuição da turbidez na mesma concentração de quitosana IPEN chegou a 33%.

Considerando essa redução da turbidez, todos os resultados de densidade óptica medidos para o ensaio de MIC foram normalizados antes da construção da curva que relacionou crescimento bacteriano em função do tempo de cultura e concentração de quitosana no meio LB.

A Figura 36 mostra a capacidade de inibição do crescimento bacteriano pelas quitosanas em solução. Para a quitosana SA, a concentração estudada (0,125 µg/mL) já foi capaz de inibir quase totalmente o crescimento de *E. coli* (>97%) e *S. aureus* (>97%), mantendo essa inibição até a máxima concentração estudada (2,5µg/mL).

Para a quitosana IPEN, a menor concentração (0,125 µg/mL) provocou uma pequena redução do crescimento bacteriano para *E. coli* (10%) e *S. aureus* (10%) que foi aumentando em função da concentração e chegando a níveis de

inibição comparáveis aos da Quitosana Sygma-Aldrich na concentração de 1,5µg/mL.

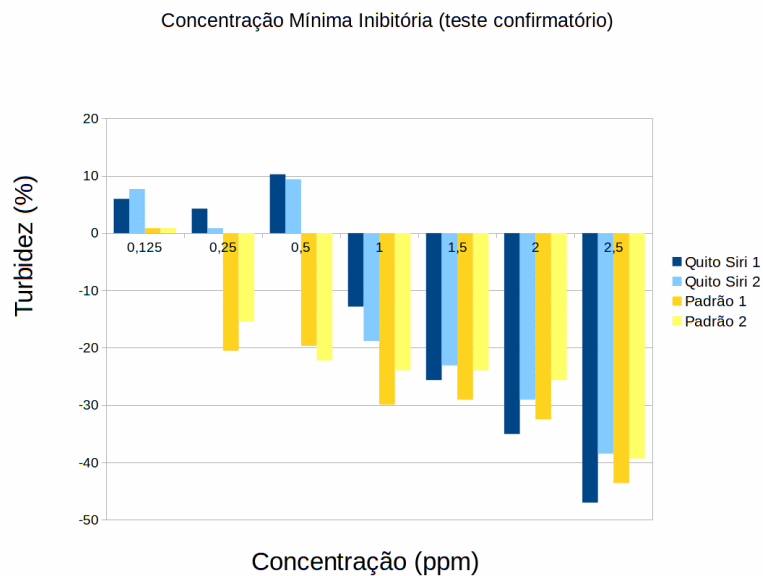


Figura 36. Diminuição da turbidez em função da concentração de quitosana

#### 5.5.4. Liberação da quitosana para o meio LB

Considerando a medida no tempo de crescimento de 22h, como no ensaio anterior, se verificou que os filmes com quitosana não liberaram o antibiótico para o meio LB no qual foram incubadas em concentração suficiente para inibir o crescimento bacteriano. Pela Figura 37, observa-se que os filmes virgens apresentam níveis mais altos que o meio com bactérias (LB+8UFC). Já os filmes PP/Quito Gama, PE/Quito Gama e PE/Quito EB em algumas horas apresentaram níveis menores que o meio. Isso pode ser uma indicação da presença da quitosana que já foi comprovada anteriormente a imobilização da mesma.



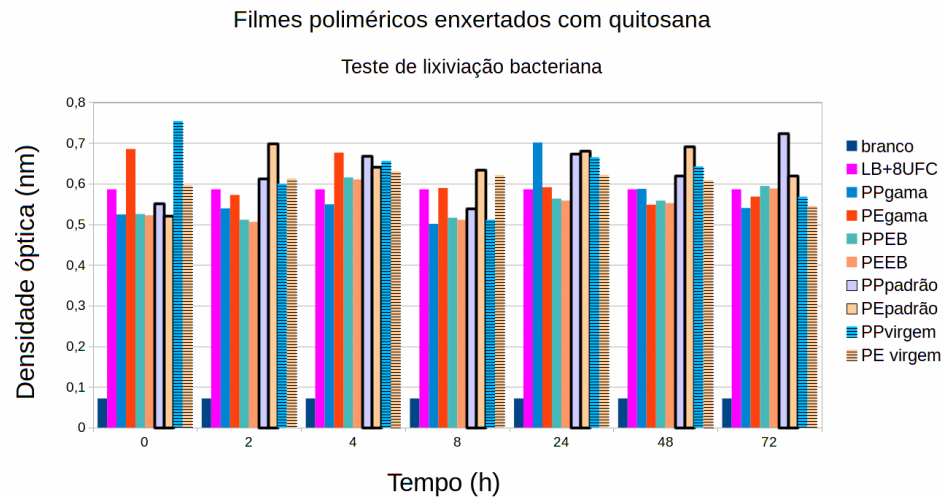


Figura 37. Teste de lixiviação bacteriana (72 horas)

#### 5.5.5. Solubilidade da quitosana no meio LB+ágar e confirmação da capacidade de inibição do crescimento bacteriano pelas soluções preparadas com quitosanas Sigma-Aldrich e IPEN.

Foi observado que a mistura da quitosana em solução no meio LB+ágar provocou a opacificação do meio, sendo essa opacificação mais acentuada para as placas com a adição da quitosana SA.

Houve inibição total do crescimento bacteriano para placas preparadas com soluções na concentração de 1,0 µg/mL para as duas quitosanas e para as duas bactérias estudadas.

Não houve crescimento de colônias de *E. coli* sob os filmes com e sem quitosana (Figura 38).

O resultado pode ser devido também à característica da *E. coli* que como microrganismo aeróbico teria seu crescimento inibido pela carência de oxigênio entre o filme e o meio LB + ágar. Isso confirma que a quitosana não é liberada dos filmes ou se liberada não se difunde pelo ágar. Concordando com o observado no preparo das placas de cultura contendo meio LB + Agar + quitosanas (item D).

Nas placas inoculadas com *S. aureus* (Figura 39), devida a sua característica anaeróbica se notou o crescimento sob os filmes com e sem quitosana. Visualmente comparando, o crescimento de *S. aureus* sob as películas com quitosana foi inferior ao crescimento sob os filmes sem quitosana.

Na Figura 40, não houve formação de halo ao redor dos poços indicando que não houve difusão das duas formas de quitosana através do ágar. Isso é um ponto positivo porque mostra a insolubilidade da quitosana no pH do Agar (~7,2) e em meio aquoso, sendo coerente com a literatura. Outro ponto positivo é que observando os poços atentamente se nota que não cresceram bactérias (*E. coli* nem *S. aureus*) nas paredes dos poços. Uma vez que as bactérias foram inoculadas depois de feitos os poços, no espalhamento do inóculo com a alça de Drigalski uma quantidade deve ter entrado nos poços.

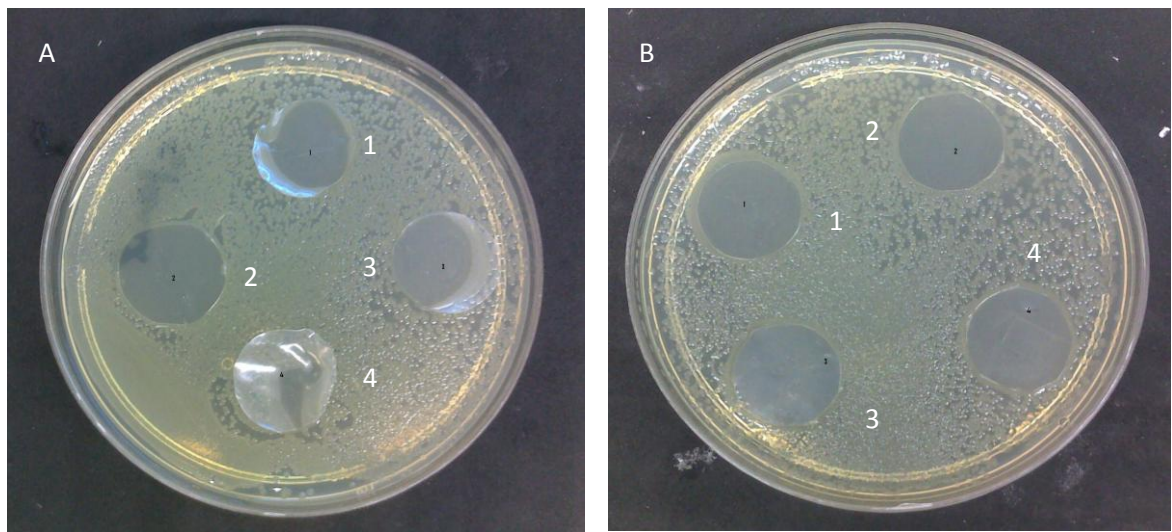


Figura 38. Filmes com quitosana (A) e sem quitosana (B) posicionados na superfície de placa LB+Ágar inoculada com  $8 \cdot 10^5$  UFC de *E. coli* (W3110). (1) PP EB, (2) PE EB, (3) PPy e (4)PEy. (Obs: os filmes não aderem perfeitamente, porém em (1) e (3) mesmo com a presença de uma fina camada de ar, não houve formação de colônias. Já em (4) se vê colônias na metade esquerda, onde o filme não aderiu no Agar).

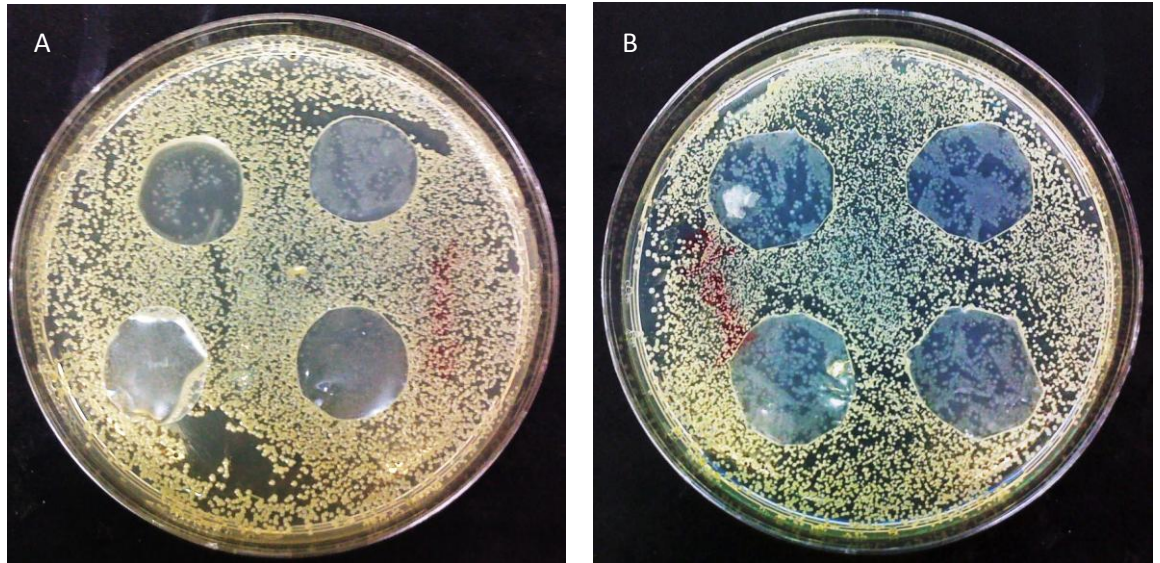


Figura 39. Filmes com quitosana depositados sobre placa contendo meio LB+Ágar com inoculação de aproximadamente  $8 \times 10^3$  UFC de *Staphylococcus aureus*. (1) PP EB, (2) PP gama, (3) PE EB e (4) PE gama.

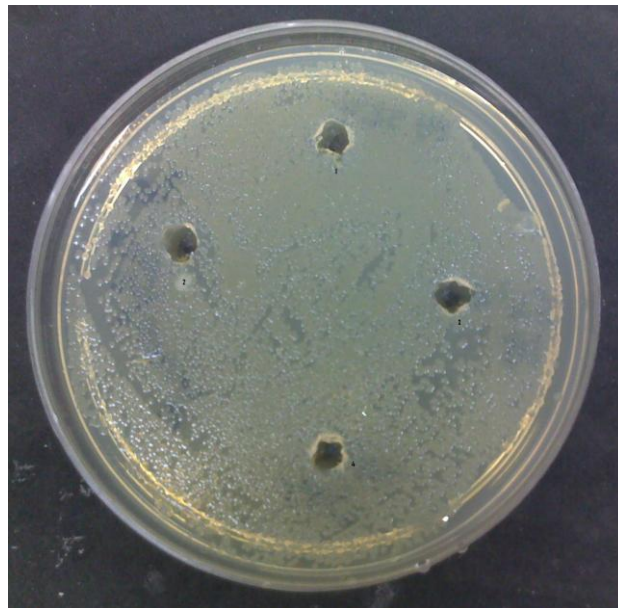


Figura 40. Estudo da difusão da quitosana em meio LB+ágar. - Comparação entre soluções preparadas com padrão Aldrich e com quitosana de carangueijo produzida no IPEN. 50ul/poço. (1) 1,25ug/mL (IPEN), (2) 1,25ug/mL (Aldrich), (3) 0,75ug/mL (IPEN) e (4) 0,75ug ug/mL (Aldrich).

## 6. Conclusões

As conclusões dessa dissertação estão apresentadas de acordo com as seguintes etapas:

### a. Separação da quitina da matéria-prima animal

- A granulometria não é relevante para a obtenção de uma quitosana de boa qualidade;
- A quitina encontrada na casca do siri está na faixa dos 10 – 15%, que é um teor semelhante ao encontrado em cascas de camarões (crustáceos) e lulas/polvos (moluscos);
- O cálcio é o metal que está em maior quantidade na constituição da casca de siri, daí a importância de a primeira etapa de pré-tratamento do material in natura ser a remoção de material inorgânico;
- O processo de irradiação da casca de siri in natura permite maior liberação do material inorgânico e de proteínas.

### b. Conversão da quitina em quitosana

- A conversão teve maior rendimento de quitosana quando a quitina é proveniente da casca de sir irradiada.
- A dose de 10 kGy é a que apresenta maior rendimento da conversão em quitosana
- O aumento da dose promove maior rendimento de purificação do produto em relação ao rendimento desse processo do produto não irradiado.
- A quitosana de siri é semelhante quimicamente à quitosana padrão;
- O grau de desacetilação da quitosana de siri é semelhante a da quitosana padrão, com exceção a da quitosana de siri irradiada em 20 kGy por feixe de elétrons que teve um valor menor;
- O peso molecular da quitosana de siri é menor que a da quitosana padrão e o aumento da dose de radiação promove a quebra das moléculas de modo a obter uma quitosana de peso molecular mais baixo com o aumento da dose;
- O grau de cristalinidade da quitosana produzida a partir da casca de siri

irradiada na dose de 20 kGy é menor que a da quitosana padrão – a quitosana obtida com o uso de feixe de elétrons apresentou o menor grau de cristalinidade.

- c. Imobilização do biopolímero em suporte polimérico e seu estudo de atividade bacteriana
- Houve a ligação do biopolímero nos suportes de PP e PE.
  - A quantidade de biopolímero que foi ligada ao suporte polimérico teve alguma ação inibitória em relação às bactérias testadas.
  - Não houve migração do biopolímero do suporte para o meio de cultura bacteriano.

## 7. TRABALHOS FUTUROS

Esta dissertação permitiu abrir os seguintes temas de estudo:

- 1) Avaliação qualitativa/quantitativa da ligação entre a biomolécula ao substrato polimérico;
- 2) Otimizar o processo para o incremento da concentração da biomolécula ao substrato polimérico;
- 3) Obter a quitosana a partir de outras fontes biológicas naturais e estudar qualitativa e quantitativamente a relação química/biológica da presença da quitosana nestas fontes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDOU, E. S.; NAGY, K. S.; ELSABEE, M.Z. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 1359 – 1367, 2008.
- ABREU, F. O. M. S.; CAVALCANTE, L. G.; DOUDEMMENT, P. V.; CASTRO, A. M.; NASCIMENTO, A. P. Propriedades e características da quitosana obtida a partir do exoesqueleto de caranguejo-uçá utilizando radiação de micro-ondas. *Polímeros*, v. 23, n. 5, p. 630 – 635, 2013.
- AFONSO, R. M. R. Estudos sobre aproveitamento biotecnológico de quitina produzida por organismos marinhos. 2008. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Algarve, Faro, Portugal.
- AL-SAGHEER, F. A.; AL-SUGHAYER, M. A.; MUSLIM, S.; ELSABEE, M. Z. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. *Carbohydrate Polymers*, v. 77, n. 2, p. 410 – 419, 2009.
- AMARAL, I. F.; LAMGHARI, M.; SOUZA, S. K.; SAMPAIO, P.; BARBOSA, M. A. Ratbone marrow stromal cell osteogenic differentiation and fibronectin adsorption on chitosan membranes: The effect of the degree of acetylation. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, v. 75A, n. 2, p. 387 – 397, 2005.
- AZEVEDO, V. V. C.; COSTA, A. C. F. M.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; FOOK, M. V. L. Quitina e quitosana: Aplicações como biomateriais. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v. 2, n. 3, p. 27 – 34, 2007.
- AZEVEDO, A. S.; FOOK, M. V. L.; NETO, P. I. N.; SOUZA, O. B.; AZEVEDO, S. S. Hidroxiapatita e quitosana isoladas e associadas à medula óssea no reparo do tecido ósseo em coelhos – Estudo histológico e morfométrico. *Ciência Rural*, v. 43, n. 7, p. 1265 – 1270, 2013.
- BATTISTI, M. V.; CAMPANA-FILHO, S. P. Obtenção e caracterização de  $\alpha$ -quitina e quitosanas de cascas de *Macrobrachium rosenbergii*. *Química Nova*, v. 31, n. 8, p. 2014 – 2019, 2008.
- BAUTISTA-BAÑOS, S.; HERNANDEZ-LOPEZ, M.; BOSQUEZ-MOLINA, E. Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts. *Mexican Journal of Phytopatology*, v. 22, n. 2, p. 178 – 186, 2004.
- BAXTER, A.; DILLON, M.; TAYLOR, K. D. A.; ROBERTS, G. A. F. Improved method for i.r. determination of the degree of N-acetylation of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 14, n. 3, p. 166 – 169, 1992.
- BEZERRA, A.M. Síntese e avaliações física, química e biológicas de derivados de quitosana de alta e baixa massa molecular. 2011. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo.



BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O.; PEPPAS, N. A.; GURNY, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 57, p. 19 – 34, 2004(a).

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

BERTH, G.; DAUTZENBERG, H.; PETER, M. G. Physico-chemical characterization of chitosan varying in degree of acetylation. *Carbohydrate Polymers*, v. 36, p. 205 – 216, 1998.

BONELLI, C. M. C.; ELZUBAIR, A.; SUAREZ, J. C. M.; MANO, E. B. Comportamento térmico, mecânico e morfológico de compósitos de polietileno de alta densidade reciclado com fibra de piaçava. *Polímeros*, v. 15, n. 4, p. 256 – 260, 2005.

BRASIL. MINISTÉRIO DA PESCA E AGRICULTURA – BRASÍLIA: MPA, 2011

BROUSSIGNAC, P. UM haut polymere naturel peu connu dans l'industrie, le quitosane. *Chimie et Industrie - Genie Chimique*, v. 99, p. 1241 – 1247, 1968.

CAMPANA-FILHO, S. P.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R. L. Extração, estruturas e propriedades de  $\alpha$  e  $\beta$  – quitina. *Química Nova*, v. 30, n. 3, p. 644 – 650, 2007.

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

CANEVAROLO Jr., S. V. Ciência dos Polímeros: Um texto básico para tecnólogos e engenheiros. 3ª edição. São Paulo: Editora Artliber, 2010.

CENTRO DE PESQUISAS AMBIENTAIS DO NORDESTE. Contextualização sobre Espécies Invasoras, p. 33 – RECIFE: CEPAN, 2009

CHANG, D. S.; CHO, H. R.; GOO, H. Y.; CHOE, W. K. A. Development of food preservation with the waste of crab processing. *Bulletin of the Korean Society of Fisheries Technology*. v. 22, p. 70 – 78, 1989.

CHEN, P. Y.; LIN, A. Y. M.; MEYERS, M. A. Structure and mechanical properties of crab exoskeletons. *Acta Biomaterialista* 4, p. 587 – 596, 2008.

CHIELLINI, E.; DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R. M. Chitosan – A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, v. 36, n. 8, p. 981 – 1014, 2011.



CHIOU, M. S.; HO, P. Y.; LI, H. Y. Adsorption of anionic dyes in acid solutions using chemically cross-linked chitosan beads. *Dyes Pigments*, v. 60, n.1, p. 69 – 84, 2004.

CHO, Y. I.; NO, H. K.; MEYERS, S. P. Physicochemical characteristics and functional properties of various commercial chitin and chitosan products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, p. 3839 – 3843, 1998.

CHOI, K. S.; KIM, C. H.; CHOI, J. W.; CHUN, H. J. Synthesis of chitosan derivatives with quaternary ammonium salt and their antibacterial activity. *Polymer Bulletin*, v. 38, n. 4, p. 387 – 393, 1997.

CLARK, G. L.; SMITH, A. F. X-ray diffraction studies of chitin, chitosan and derivatives. *The Journal of Physical Chemistry A*, v. 40, p. 863 – 879, 1936.

CREBER, K. A. M.; WAN, Y.; PEPPEY, B.; BUI, V. T. Ionic conductivity and related properties of crosslinked chitosan membranes. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 89, n. 2, p. 306 – 317, 2003.

DESBRIERES, J.; TOLAIMATE, A.; RHAZI, M.; ALAGUI, A. Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties. *Polymer*, v. 44, n.26, p. 7939 – 7952, 2003.

DARMADJI, P.; IZUMIMOTO, M. Effect of chitosan in meat preservation. *Meat Science*, v. 38, n. 2, p. 243 – 254, 1994.

DIAS, K. B.; SILVA, D. P.; FERREIRA, L. A.; FIDELIS, R. R.; COSTA, J. L.; SILVA, A. L. L.; SCHEIDT, G. N. Chitin and Chitosan: Characteristics, uses and production current perspectives. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, v. 4, n.3, p. 184 – 191, 2013.

DIMZON, I. K. D.; KNEPPER, T. P. Degree of deacetylation of chitosan by infrared spectroscopy and partial least squares. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 72, p. 939 – 945, 2015.

DODANE, V.; VILIVALAM, V. Pharmaceutical applications of chitosan. *Pharmaceutical Science & Technology*, v. 1, n.6, p. 246 – 253, 1998.

DOMSZY, J. G.; ROBERTS, G. A. F. Evaluation of infrared spectroscopy techniques for analyzing chitosan. *Macromolecular Chemistry and Physics*, v. 186, n. 8, p. 1671 – 1677, 1985.

DU, Y.; WANG, X.; FAN, L.; LIU, H.; HU, Y. Chitosan-metal complexes as antimicrobial agent: synthesis, characterization and structure activity study. *Polymer Bulletin*, v. 55, n. 1, p. 105 – 113, 2005.

DUMITRIU, S.; CHORNET, E. Immobilization of xylanase in chitosan-xanthan hydrogels. *Biotechnology Progress*, v. 13, n. 5, p. 539 – 545, 1997.

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

GODOI, F. C. Membrana densa de quitosana contendo nanopartículas de cobre: caracterização e possíveis aplicações. 2013. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

GOULAS, A. E.; RIGANAKOS, K. A.; BADEKA, A.; KONTOMINAS, M. G. Effect of ionizing radiation on the physicochemical and mechanical properties of commercial monolayer flexible plastics packaging materials. *Food Additives & Contaminants*, v. 19, p. 1190 - 1199, 2003.

GOY, R. C.; BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros*, v. 19, n. 3, 2009.

GUAN, Y. L.; LIU, X. F.; YANG, D. Z.; LI, Z.; YAO, K. D. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 79, n. 7, p. 1324 – 1335, 2001.

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

HALASZ, A.; MANNO, D.; PERREAULT, N. N.; SABBADIN, F.; BURCE, N. C.; HAWARI, J. Biodegradation of RDX nitroso products MNX and TNX by cytochrome P450 XplA. *Environmental Science & Technology*, v. 46, p. 7245 – 7251, 2012.

HIRANO, S.; TSUCHIDA, H.; NAGAO, N. N-acetylation in chitosan and the rate of its enzymic hydrolysis. *Biomaterials*, v. 10, n.8, p. 574 – 576, 1989.

IBAMA – INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (2008).

ILLUM, L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharmaceutical Research*, v. 15, n. 9, p. 1326 – 1331, 1998.

JAWORSKA, M.; SAKURAI, K.; GAUDON, P.; GUIBAL, E. Influence of chitosan characteristics on polymer properties. I: Crystallographic properties. *Polymer International*, v. 52, n. 2, p. 198 – 205, 2003.

JUNQUEIRA, A. O. R.; TAVARES, M. D. S.; SHAEFFER-NOVELLI, Y.; RADASHEVSKY, V. I.; CIRELLI, J. O.; JULIO, L. M.; ROMAGNOLI, F. C.; SANTOS, K. C.; FERREIRA-SILVA, M. A. G. Informe sobre as Espécies Exóticas Invasoras Marinhas no Brasil, Ed. Lopes, Brasília, Brasil, 2009.

KESHAVARZ, T.; ROY, I.; SUKAN, A. Dual production of biopolymers from bacteria. *Carbohydrate polymers*, v. 126, p. 47 – 51, 2015.

KHAN, T. A.; PEH, K. H.; CH'NG, H. S. Reporting degree of deacetylation values of chitosan: The influence of analytical methods. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 5, p. 205 – 212, 2003.

KHOR, E.; TAN, S. C.; TAN, K.; WANG, S. M. The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of determination. *Talanta*, v. 45, n. 4, p. 713 – 719, 1998.

KIENZLE-STERZER, C. A.; RODRIGUEZ-SANCHEZ, D.; RHA, C. K. Flow behavior of a cationic biopolymer: Chitosan. *Polymer Bulletin*, v. 13, n. 1, p. 1 – 6, 1985.

KNAUL, J. Z.; KASAAI, M. R.; BUI, V. T.; CREBER, K. A. M. Characterization of deacetylated chitosan and chitosan molecular weight review. *Canadian Journal of Chemistry*, v. 76, p. 1699 – 1706, 1998.

KNORR, D.; HOOVER, D. G.; SUDARSHAN, N. R. Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnology*, v. 6, n.3, p. 257 – 272, 1992.

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

KUBOTA, N.; KIKUCHI, Y. Preparation and properties of macromolecular complexes consisting of chitosan derivatives and potassium mehaphosphate. *Macromolecular Chemistry and Physics*, v. 193, n.2, p. 559 – 566, 1992.

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

KURITA, K. Chitin and Chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine Biotechnology*, v. 8, n.1, p. 75 – 88, 2006.

LEE, Y. M.; KIM, S. S.; KIM, S.H. Synthesis and properties of poly(ethylene glycol) macromere/ $\beta$ -chitosan hydrogels. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 8, p. 537 – 541, 1997.

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

LIBERATO, M.V. Caracterização estrutural de endoglucaminases da família GH5 e beta-glicosidades da família GH1: Interação enzima-substrato. 2013. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo.

LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. Caracterização de polímeros. E-papers. Rio de Janeiro, 2001.

LUZARDO-ALVAREZ, A.; ANTELO-QUEIJO, A.; SOTO, V. H.; BLANCO-MENDEZ, J. Preparation and characterization of  $\beta$ -cyclodextrin linked chitosan

microparticles. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 123, n. 6, p. 3595 – 3604, 2012.

MANO, E. B.; MENDES, L. C. Introdução a polímeros. 2ª edição. São Paulo: Edgard Blucher, 1999.

MARTINEZ-RUVALCABA, A.; CHORNET, E.; RODRIGUE, D. Viscoelastic properties of dispersed chitosan/xanthan hydrogel. *Carbohydrate Polymers*, v. 67, n.4, p. 586 – 595, 2007.

MATHUR, N. K.; NARANG, C. K. Products of chemistry chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. *Journal of Chemical & Engineering Data*, v. 67, n. 11, p. 938 - 942, 1990.

MATTOSO, L. H. C.; MOURA, M. R.; AOVADA, F. A.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; MCHUGH, T. H.; KROCHTA, J. M. Improved barrier and mechanical properties of novel hydroxypropyl methylcellulose edible films with chitosan/tripolyphosphate nanoparticles. *Journal of Food Engineering*, v. 92, n. 4, p. 448 – 453, 2009.

MONTEIRO JR, O.A. Preparação, modificação química e calorimetria do biopolímero quitosana. 2000. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.

MUCHA, M. Rheological characteristics of semi-dilute chitosan solutions. *Macromolecular Chemistry and Physics*, v. 198, n. 2, p. 471 – 484, 1997.

MUZZARELLI, R. A. A. Colorimetric determination of chitosan. *Analytical Biochemistry*, v. 260, n. 2, p. 255 – 257, 1998.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extractions and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, v. 1054, n. 1 – 2, p. 95 – 111, 2004.

NIEKRASZEWICZ, A. Chitosan medical dressings. *Fibres & Textiles in Eastern Europe*, v. 13, p. 16 – 18, 2005.

NO, H. K.; PARK, N. Y.; LEE, S. H.; MEYERS, S. P. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology*, v. 74, p. 65 – 72, 2002.

NOGUEIRA, B.R. Avaliação dos efeitos da radiação ionizante por feixe de elétrons na incorporação de fibra de piaçava (*Attalea Funifera* Mart.) no copolímero de etileno e álcool vinílico (EVOH). 2006. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

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

OGAWA, K.; TOSHIFUMI, Y.; MASARU, M. Dependence on the preparation procedure of the polymorphism and crystallinity of chitosan membranes. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 56. n. 6, p. 858 - 862, 1992.

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

OKUYAMA, K.; NOGUCHI, K.; HANAFUSA, Y.; OSAWA, K.; OGAWA, K. Structural study of anhydrous tendon chitosan obtained via chitosan/acetic acid complex. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 26, p. 285 - 293, 1999.

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

RAFIEE-TEHRANI, M.; AVADI, M. R.; SADEGHI, A. M. M.; TAHZIBI, A.; BAYATI, K. H.; POULADZADEH, M.; ZOHURIAAN-MEHR, M. J. Diethylmethyl chitosan as an antimicrobial agent: synthesis, characterization and antibacterial effects. *European Polymer Journal*, v. 40, n. 7, p. 1355 – 1361, 2004.

RATNAM, C. T.; RAJU, G. YUNUS, W. M. Z. W. Oil palm empty fruit (OPEFB) fiber reinforced PVC/ENR blend-electron beam irradiation. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B*, v. 265, p. 510 - 514, 2007

RASHID, T. Ur.; RAHMAN, M. M.; KABIR, S.; SHAMSUDDIN, S. M.; KHAN, M. A. A new approach for the preparation of chitosan from  $\gamma$ -irradiation of prawn shell - effects of radiation on the characteristics of chitosan, *Polymer International*, v. 61, p. 1302 – 1308, 2012.

RAYMOND, L.; NORIN, F. G. I.; MARCHESSAULT, R. H. Degree of deacetylation of chitosan using conductimetric titration and solid-state NMR. *Carbohydrate Research*, v. 1, n. 246, p. 331 – 336, 1993.

RINAUDO, M.; DESBRIÈRES, J. Water soluble derivatives obtained by controlled chemical modifications of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, v. 24, p. 209 – 214, 1994.

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

ROBERTS, G. A. F. Structure of chitin and chitosan. Chitin Chemistry. Londres: Macmillan, 350p, 1992.

RODRIGUES, A. P. Preparação e caracterização de membranas de quitosana e alginato para aplicação na terapia de lesões. 2008. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

ROJAS, J.; HERNADEZ, C.; TRUJILLO, D. Effect of the alkaline treatment conditions on the tableting performance of chitin obtained from shrimp heads, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 8(7), p. 211 – 219, 2014.

SASHIWA, H.; AIBA, S. Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials. *Progress in Polymer Science*, v. 29, p. 887 – 908, 2004.

SCHATZ, C.; VITON, C.; DELAIR, T.; PICHOT, C.; DOMARD, A. Typical physicochemical behaviors of chitosan in aqueous solution. *Biomacromolecules*, v. 4, p. 641 – 648, 2003.

SCHNEIDER, S. W.; GORZELANNY, C.; PÖPPELMANN, B.; PAPPELBAUM, K.; MOERSCHBACHER, B. M. Human macrophage activation triggered by chitotriosidase mediated chitin and chitosan degradation. *Biomaterials*, v. 31, n.33, p. 8556 – 8563, 2010.

SHAHIDI, F.; JEON, Y. J.; KIM, S. K. Preparation of chitin and chitosan oligomers and their applications in physiological functional foods. *Food Reviews International*, v. 16, n. 2, p. 159 – 176, 2000.

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

SIMPSON, B. K.; GAGNÉ, N.; ASHIE, I. N. A; NOROOZI, E. Utilization of chitosan for preservation of raw shrimp (*Pandalus borealis*). *Food Biotechnology*, v. 11, n. 1, p. 25 – 44, 1997.

SINGLA, A. K.; CHAWLA, M. Chitosan: Some pharmaceutical and biological aspects – an update. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 53, p. 1047 – 1067, 2001.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, v. 70, n. 1 – 2, p. 1 – 20, 2001.

SORLIER, P.; VITON, C.; DOMARD, A. Relation between solution properties and degree of acetylation of chitosan: role of aging. *Biomacromolecules*, v. 3, p. 1336 – 1342, 2002.

TAHTAT, D.; UZUN, C.; MAHLOUS, M.; GÜVEN, O. Beneficial effect of gamma irradiation on the N-deacetylation of chitin to form chitosan. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B*, v. 265, p. 425 – 428, 2007.

THATTE, M. R. Synthesis and antibacterial assessment of water-soluble hydrophobic chitosan derivatives bearing quaternary ammonium functionality. Louisiana State University. LA, 2001.

TIYABOONCHAI, W. Chitosan nanoparticles: A promising system for drug delivery. *Naresuan University Journal*, v. 11, n. 3, p. 51 – 66, 2003.

TSAI, G. J.; SU, W. H.; CHEN, H. C.; PAN, C. L. Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. *Fisheries Science*, v. 68, n. 1, p. 170 – 177, 2002.

UENO, H.; MORI, T.; FUJINAGA, T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 52, n. 2, p. 105 – 115, 2001.

YADAV, H. K. S.; NAGAVARMA, B. V. N.; AYAZ, A.; VASHUDA, L. S.; SHIVAKUMAR, H. G. Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles – A Review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, v. 5, p. 16 – 23, 2012.

YU, H. Q.; GE, X. W.; CHEN, Y. Z.; WANG, J. P. Gamma radiation-induced grafting of a cationic monomer onto chitosan as a flocculant. *Chemosphere*, v. 66, n. 9, p. 1752 – 1757, 2007.

WANG, G. H. Inhibition and inactivation of five species of food borne pathogens by chitosan. *Journal of Food Protection*, v. 55, n. 11, p. 916 – 919, 1992.

WANG, X.; MA, J.; FENG, Q.; CUI, F. Skeletal repair in rabbits with calcium phosphate cements incorporated phosphorylated chitin. *Biomaterials*, v. 23, p. 4591 -4600, 2002.

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

ZIVANOVIC, S.; LI, J.; DAVIDSON, P. M.; KIT, K. Physical, mechanical and antibacterial properties of chitosan/PEO blend films. *Biomacromolecules*, v. 8, p. 1505 – 1510, 2007.

ZOHURIAAN, M. J.; SHOKROLAHI, F. Thermal studies on natural and modified gums. *Polymer Testing*, v. 23, p. 575 – 579, 2004.