

TMUP
72
2005

Departamento de Química
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

SÍNTESE E ESTUDO DE DERIVADOS DO
QUITOSANO COM PONTECIAL INTERESSE
BIOLÓGICO E AMBIENTAL

*Dissertação submetida à Faculdade de
Ciências da Universidade do Porto para a
obtenção do grau de Mestre em Química*

Luiz Fernando Mesquita da Silva Pinto - 2005

QD262
PINI S
2005



FC

Biblioteca
Faculdade de Ciências
Universidade do Porto



0000066060

Departamento de Química
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

SÍNTESE E ESTUDO DE DERIVADOS DO
QUITOSANO COM POTENCIAL INTERESSE
BIOLÓGICO E AMBIENTAL



*Dissertação submetida à Faculdade de
Ciências da Universidade do Porto para a
obtenção do grau de Mestre em Química*

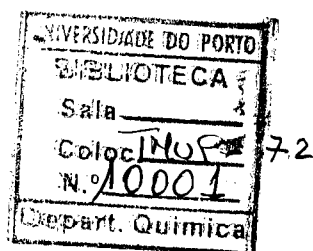
Luiz Fernando Mesquita da Silva Pinto - 2005

Departamento de Química
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

SÍNTESE E ESTUDO DE DERIVADOS DO
QUITOSANO COM POTENCIAL INTERESSE
BIOLÓGICO E AMBIENTAL

”

*Dissertação submetida à Faculdade de
Ciências da Universidade do Porto para a
obtenção do grau de Mestre em Química*



Luiz Fernando Mesquita da Silva Pinto - 2005

Para ti Mãe,
que foste exemplo de persistência, coragem e dedicação.
Serás sempre o estímulo para alcançar os meus sonhos.

Agradecimentos

Ao meu Pai e Irmãos, de quem muitas vezes me tive de privar e de não lhes dar a atenção merecida, agradeço a compreensão e o apoio nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador, Doutor Carlos Gomes, agradeço o apoio, amizade e confiança que demonstrou ao longo destes anos de trabalho em conjunto.

Agradeço também à minha orientadora, Doutora Paula Gomes, pelo dinamismo contagiante, pela sua disponibilidade, apoio e amizade, bem como a forma como me acolheu no seu grupo de investigação.

Ao Yury, um especial agradecimento pela ajuda na orientação deste trabalho, pela disponibilidade constante e amizade que se tem mantido apesar da distância. Obrigado, também por me ter ajudado a reencontrar a vontade de aprender sempre mais. Спасибо.

À Flávia pela compreensão, motivação e encorajamento constante, indispensáveis para a realização deste trabalho.

Quero agradecer também aos meus amigos Ricardo Silva e José Fonseca, pela disponibilidade e incentivo que me transmitiram nos momentos mais difíceis.

Agradeço à Carla Torrão, pela disponibilidade e apoio na revisão do texto.

Aos membros GISOCB-CIQ e LAQUIPAI, agradeço a simpatia com que sempre me trataram e a forma como me receberam no grupo.

Aos restantes colegas de mestrado, agradeço o companheirismo e a boa disposição.

Resumo

O presente trabalho teve como objectivo a síntese e a caracterização de novos derivados do quitosano com potencial interesse em aplicações biomédicas e ambientais. Concretamente, foram sintetizados e caracterizados sete derivados do quitosano; cinco derivados N-(2-carboxietil)quitosano, com diferentes graus de carboxietilação, e dois derivados peptídicos do quitosano, N-[2-(N^γ-(carboximetilcarbamoil)etil]quitosano e N-{2-[N^γ-(1-carboximetil-2-fenil)etilcarbamoil]etil}quitosano. Nos derivados carboxietilados, foram introduzidos grupos carboxietilo no átomo de azoto do quitosano, através da reacção com o ácido 3-bromopropanóico. Nos derivados peptídicos foram introduzidos, também no átomo de azoto do quitosano, substituintes derivados dos aminoácidos glicina ou fenilalanina, através da reacção com N-(3-bromopropanoil)glicina e N-(3-bromopropanoil)fenilalanina, previamente sintetizados neste trabalho.

Todas as sínteses dos derivados do quitosano envolveram a introdução de substituintes funcionalizados com grupos carboxílicos. Esta foi a estratégia escolhida para conferir a estes materiais maior solubilidade em meio aquoso. O aumento de solubilidade dos derivados do quitosano é um factor preponderante para ampliar as possibilidades da sua utilização em diversas aplicações, particularmente nas aplicações propostas neste trabalho.

A caracterização dos derivados sintetizados foi feita por espectroscopia de ressonância nuclear (¹³C e ¹H), calorimetria diferencial de varrimento, análise elementar e potenciometria com eléctrodo selectivo ao protão. Os estudos potenciométricos envolveram estudos ácido-base e de complexação dos derivados sintetizados com iões cobre (II).

Abstract

New chitosan derivatives with interest in biomedical and environmental applications were synthesized and characterized. Five N-(2-carboxyethyl)chitosan derivatives, with different degrees of carboxyethylation, and two peptide derivatives of chitosan, N-[2-(N'-carboxymethylcarbamoyl)ethyl]chitosan and N-{2-[N'-(1-carboxymethyl-2-phenyl)ethylcarbamoyl]ethyl}chitosan, have been prepared.

N-(2-carboxyethyl)chitosans were obtained by reaction of chitosan with 3-bromopropionic acid. Peptide-chitosan derivatives were obtained by reaction of chitosan with N-(3-bromopropanoyl)glycine and N-(3-bromopropanoyl)phenylalanine, previously synthesized in this work.

The introduction of carboxyl functionalized substituents in the polymeric structure of chitosan, was the chosen strategy to confer to these materials a larger solubility in aqueous medium. The solubility increase of chitosan derivatives is a preponderant factor to widen the applicability of these materials, mainly in the proposed applications.

Characterization of the chitosan derivatives was performed by nuclear magnetic resonance (^{13}C and ^1H), differential scanning calorimetry, elemental analysis and potentiometric titration. The potentiometric studies involved acid-base and complexation titrations of those derivatives with copper (II) ions.

Índice Geral

Agradecimentos	VII
Resumo	VIII
Abstract	IX
Índice Geral	X
Índice de Figuras	XIV
Índice de Tabelas	XVII
Lista de Símbolos e Abreviaturas	XVIII

CAPÍTULO 1

1- Introdução	- 3 -
1.1- A Quitina	- 3 -
1.2- Fontes e Processos de Obtenção	- 4 -
1.3- Estrutura da Quitina	- 5 -
1.4- Desacetilação da Quitina - O Quitosano	- 7 -
1.5- A Química da Quitina e do Quitosano	- 10 -
1.5.1- Hidrólise da cadeia polimérica	- 10 -
1.5.2- Acilação	- 11 -
1.5.3- Tosilação	- 12 -
1.5.4- N-ftaloilação	- 13 -
1.5.5- Sulfatação	- 14 -
1.5.6- Alquilação	- 14 -
1.5.7- Formação de sais quaternários	- 16 -
1.5.8- Fosforilação	- 17 -

1.5.9- Silanização	- 17 -
1.5.10- Formação de amidas e bases de Schiff.....	- 18 -
1.5.11- Carboxialquilação	- 19 -
1.5.12- Derivados peptídicos do quitosano	- 21 -
1.6- Aplicações da Quitina e do Quitosano.....	- 23 -
1.6.1- Aplicações biomédicas.....	- 23 -
1.6.2- Agricultura	- 24 -
1.6.3- Cosméticos	- 25 -
1.6.4- Fotografia	- 25 -
1.6.5- Tratamento de Águas	- 25 -
1.6.6- Aplicações cromatográficas	- 26 -
1.7- Propriedades Complexantes do Quitosano.....	- 27 -
1.7.1-Complexação com quitosano	- 27 -
1.7.2-Complexação com derivados carboxialquilados.....	- 29 -

CAPÍTULO 2

2- Experimental	- 33 -
2.1- Reagentes e Soluções.....	- 33 -
2.1.1- Síntese dos derivados N-(2-carboxietil)quitosano	- 33 -
2.1.2- Síntese dos derivados dos aminoácidos glicina e fenilalanina.....	- 34 -
2.1.3- Síntese dos derivados peptídicos do quitosano.....	- 35 -
2.1.4- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear.....	- 35 -
2.1.5- Titulações potenciométricas.....	- 36 -
2.2- Equipamentos.....	- 37 -
2.2.1- Sínteses.....	- 37 -

2.2.2- Espectroscopia de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN	- 37 -
2.2.3- Análise elementar.....	- 38 -
2.2.4- Titulações potenciométricas.....	- 38 -
2.2.5- Calorimetria diferencial de varrimento.....	- 38 -
2.3- Procedimento Experimental.....	- 39 -
2.3.1- Síntese dos derivados CEQ.....	- 39 -
2.3.2- Síntese dos derivados dos aminoácidos glicina e fenilalanina.....	- 40 -
2.3.2.1- Síntese do N-(3-bromopropanoil)glicinato de terc-butilo.....	- 40 -
2.3.2.2- Síntese do N-(3-bromopropanoil)fenilalaninato de terc-butilo.....	- 42 -
2.3.2.3- Remoção dos grupos terc-butilo por acidólise com TFA anidro.....	- 43 -
2.3.3- Síntese dos derivados peptídicos do quitosano.....	- 44 -
2.3.3.1- Síntese do Quit β Ala α Gly	- 44 -
2.3.3.2- Síntese do Quit β Ala α Phe	- 45 -
2.3.4- Titulações potenciométricas.....	- 46 -
2.3.4.1- Preparação da solução de hidróxido de potássio isenta de carbonatos.....	- 46 -
2.3.4.2- Titulações potenciométricas.....	- 46 -
2.3.5- Calorimetria diferencial de varrimento.....	- 47 -

CAPÍTULO 3

3- Síntese e Caracterização de Derivados do Quitosano	- 49 -
3.1- Derivados N-(2-carboxietil)quitosano	- 52 -
3.1.1- Caracterização dos derivados.....	- 53 -
3.1.1.1- Espectroscopia de ^1H -RMN.....	- 53 -
3.1.1.2- Análise elementar.....	- 59 -
3.1.1.3- Propriedades ácido-base.....	- 59 -
3.1.1.4- Estudos com calorimetria diferencial de varrimento	- 64 -

3.2- Derivados Peptídicos do Quitosano	- 68 -
3.2.1- Síntese e caracterização do N-(3-bromopropanoil)glicinato de terc-butilo	- 68 -
3.2.2- Síntese e caracterização do N-(3-bromopropanoil)fenilalaninato de terc-butilo	- 71 -
3.2.3- Remoção dos grupos terc-butilo por acidólise com TFA anidro - Síntese do N-(3-bromopropanoil)glicina e N-(3-bromopropanoil)fenilalanina.....	- 74 -
3.2.4- Síntese e caracterização do derivado QuitβAlaαGly	- 80 -
3.2.4.1-Espectroscopia de ¹H-RMN	- 81 -
3.2.4.2-Análise elementar.....	- 83 -
3.2.5- Síntese e caracterização do derivado QuitβAlaαPhe.....	- 84 -
3.2.5.1-Espectroscopia de ¹H-RMN	- 85 -
3.2.5.2-Análise elementar.....	- 87 -
3.2.6- Propriedades ácido-base.....	- 87 -
CAPÍTULO 4	
4- Estudos de Complexação com Cobre (II)	- 93 -
CAPÍTULO 5	
5- Conclusões.....	- 103 -
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	- 107 -

Índice de Figuras

CAPÍTULO 1

Figura 1.1: Estrutura da quitina.....	- 6 -
Figura 1.2: Estrutura da celulose.....	- 6 -
Figura 1.3: Orientações das cadeias poliméricas nas diferentes formas de quitina.....	- 7 -
Figura 1.4: Estrutura do quitosano.....	- 7 -
Figura 1.5: O-acilação da quitina com anidrido butírico.....	- 11 -
Figura 1.6: Acilação intensiva do quitosano com cloreto de acilo.....	- 12 -
Figura 1.7: Tosilação do quitosano com cloreto de tosilo.....	- 13 -
Figura 1.8: Ftaloilação do quitosano.....	- 14 -
Figura 1.9: Reacção do quitosano com epóxidos.....	- 15 -
Figura 1.10: Introdução de grupos amónio quaternários na estrutura do quitosano.....	- 16 -
Figura 1.11: Silanização da quitina.....	- 17 -
Figura 1.12: Reacção do quitosano com aldeídos e com anidridos carboxílicos.....	- 18 -
Figura 1.13: Formação de ligações cruzadas entre cadeias de quitosano.....	- 19 -
Figura 1.14: Esquema da síntese do N-carboximetilquitosano e do N,N'-dicarboximetilquitosano.....	- 20 -
Figura 1.15: Esquema da síntese do N-carboxibutilquitosano.....	- 20 -
Figura 1.16: Estruturas propostas para os complexos formados entre o ião cobre (II) e o quitosano.....	- 28 -

CAPÍTULO 3

Figura 3.1: Reacção de N-carboxialquilação do quitosano pelo ácido 3-bromopropanóico.....	- 52 -
Figura 3.2: Esquema geral de uma unidade monomérica dos derivados N-(2-carboxietil)quitosano, com o respectivo sistema de numeração dos átomos de carbono.....	- 53 -

Figura 3.3: Espectro de ^1H -RMN (300 MHz) do quitosano em DCI 1% em D_2O .	- 54 -
Figura 3.4: Espectro de ^1H -RMN (300 MHz) do CEQ1 em $\text{D}_2\text{O}:\text{DCI} = 1:1$	- 54 -
Figura 3.5: Espectro de ^1H -RMN (300 MHz) do CEQ2 em $\text{D}_2\text{O}:\text{DCI} = 1:1$.	- 55 -
Figura 3.6: Espectro de ^1H -RMN (300 MHz) do CEQ3 em $\text{D}_2\text{O}:\text{DCI} = 1:1$	- 55 -
Figura 3.7: Espectro de ^1H -RMN (300 MHz) do CEQ4 em $\text{D}_2\text{O}:\text{DCI} = 1:1$	- 56 -
Figura 3.8: Espectro de ^1H -RMN (300 MHz) do CEQ5 em $\text{D}_2\text{O}:\text{DCI} = 1:1$	- 56 -
Figura 3.9: Curvas de titulação (pH vs grau de neutralização) do quitosano e derivados CEQ.	- 60 -
Figura 3.10: Relação entre GS dos derivados CEQ e $\log K_1^{\text{H}}$ (25 °C, I = 0,1M KNO_3).	- 63 -
Figura 3.11: Termogramas obtidos por CDV para o quitosano e derivados CEQ.	- 64 -
Figura 3.12: Mecanismo de formação do N-(3-bromopropanoil)glicinato de terc-butilo.	- 69 -
Figura 3.13: Espectro de ^1H -RMN (300 MHz) do N-(3-bromopropanoil)glicinato de terc-butilo em CDCl_3 .	- 70 -
Figura 3.14: Espectro de ^{13}C -RMN (75 MHz) do N-(3-bromopropanoil)glicinato de terc-butilo em CDCl_3 .	- 71 -
Figura 3.15: Mecanismo da reacção de síntese do N-(3-bromopropanoil)fenilalaninato de terc-butilo.	- 72 -
Figura 3.16: Espectro de ^1H -RMN (300 MHz) do N-(3-bromopropanoil)fenilalaninato de terc-butilo em CDCl_3 .	- 73 -
Figura 3.17: Espectro de ^{13}C -RMN (75 MHz) do N-(3-bromopropanoil)fenilalaninato de terc-butilo em CDCl_3 .	- 74 -
Figura 3.18: Remoção do grupo terc-butilo dos ésteres N-(3-bromopropanoil)glicinato de terc-butilo e N-(3-bromopropanoil)fenilalaninato de terc-butilo, por acidólise com TFA.	- 75 -
Figura 3.19: Espectro de ^1H -RMN (300 MHz) do N-(3-bromopropanoil)glicina em DMSO-d_6 .	- 76 -
Figura 3.20: Espectro de ^{13}C -RMN (75 MHz) do N-(3-bromopropanoil)glicina em DMSO-d_6 .	- 77 -
Figura 3.21: Espectro de ^1H -RMN (300MHz) do N-(3-bromopropanoil)fenilalanina em DMSO-d_6 .	- 78 -
Figura 3.22: Espectro de ^{13}C -RMN (75 MHz) do N-(3-bromopropanoil)fenilalanina em DMSO-d_6 .	- 79 -

Figura 3.23: Esquema da síntese dos derivados Quit β Ala α Gly	- 80 -
Figura 3.24: Espectro de ¹ H-RMN (300 MHz) do Quit β Ala α Gly em D ₂ O:DCl = 1:1	- 82 -
Figura 3.25: Espectro de ¹ H-RMN (300 MHz) do Quit β Ala α Gly em D ₂ O com 1 gota de DCl.	- 82 -
Figura 3.26: Esquema da síntese do derivado Quit β Ala α Phe	- 85 -
Figura 3.27: Espectro de ¹ H-RMN (300 MHz) do Quit β Ala α Phe em D ₂ O:DCl = 1:1	- 86 -
Figura 3.28: Curvas de titulação pH vs α (grau de neutralização) de soluções de quitosano e derivados Quit β Ala α Gly e Quit β Ala α Phe.	- 88 -

CAPÍTULO 4

Figura 4.1: Curvas de titulação pH vs grau de neutralização de soluções de CEQ1 na presença de catião cobre (II) em diferentes razões molares [Cu(II)]/[CEQ1]	- 93 -
Figura 4.2: Curvas de titulação pH vs grau de neutralização de soluções de CEQ3 na presença de catião cobre (II) em diferentes razões molares [Cu(II)]/[CEQ3]	- 94 -
Figura 4.3: Curvas de titulação pH vs grau de neutralização de soluções de CEQ4 na presença de catião cobre (II) em diferentes razões molares [Cu(II)]/[CEQ4].	- 94 -
Figura 4.4: Curvas de titulação pH vs grau de neutralização de soluções de Quit β Ala α Gly na presença de catião cobre (II) em diferentes razões molares [Cu(II)]/[Quit β Ala α Gly].....	- 95 -
Figura 4.5: Curvas de titulação pH vs grau de neutralização de soluções de Quit β Ala α Phe na presença de catião cobre (II) em diferentes razões molares [Cu(II)]/[Quit β Ala α Phe].....	- 95 -
Figura 4.6: Diagramas de distribuição de espécies para os sistemas Cu(II)-CEQ1, Cu(II)-CEQ3 e Cu(II)-CEQ4, em função do pH.	- 98 -
Figura 4.7: Diagramas de distribuição de espécies para os sistemas Cu(II)-Quit β Ala α Gly e Cu(II)-Quit β Ala α Phe em função do pH.....	- 99 -

Índice de Tabelas

Tabela 2.1: Condições de reacção utilizadas nas sínteses dos derivados CEQ.....	- 40 -
Tabela 3.1: Parâmetros determinadós para a caracterização dos derivados CEQ sintetizados.....	- 62 -
Tabela 3.2: Resultados dos estudos térmicos realizados com quitosano e derivados CEQ.....	- 65 -
Tabela 3.3: Parâmetros determinados para a caracterização dos derivados peptídicos do quitosano-	89 -
Tabela 4.1: Composição, notação e constantes de formação obtidas para os vários complexos Cu(II)-derivados do quitosano.....	- 97 -

Lista de Símbolos e Abreviaturas

AE	Análise elementar
CCF	Cromatografia em camada fina
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CDV	Calorimetria diferencial de varrimento
CEQn	Derivados N-(2-carboxietil)quitosano
D ₂ O	Água deuterada
DCC	Dicicloexilcarbodiimida
DCI	Ácido clorídrico deuterado
DCU	Dicicloexilureia
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DIU	Diisopropilureia
DMAc	Dimetilacetamida
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido hexadeuterado
DSS	2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sódio
EEDQ	1-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-diidroquinolina
GA	Grau de acetilação
GD	Grau de desacetilação
GlcNH ₂	Unidades de D-glucosamina
GlcNHAc	Unidades de N-acetil-D-glucosamina
GS	Grau de substituição
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
J	Constante de acoplamento
NMP	N-metilpirrolidona
PESH	Potenciometria com eléctrodo selectivo ao protão
QuitaβAlαGly	N-[2-(N'-carboximetilcarbamoil)etil]quitosano
QuitaβAlαPhe	N-{2-[N'-(1-carboxi-2-fenil)etilcarbamoil]etil} quitosano
Rf	Factor de retardação

TFA	Ácido trifluoracético
TMS	Tetrametilsilano
δ	Desvio químico
η	Rendimento da reacção
$^1\text{H-RMN}$	Ressonância magnética nuclear protónica
$^{13}\text{C-RMN}$	Ressonância magnética nuclear de carbono-13

CAPÍTULO

1

INTRODUÇÃO

1- Introdução

O quitosano, polissacárido obtido por desacetilação da quitina, tem sido alvo de variados estudos devido às suas excelentes propriedades como a bioactividade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedades de adsorção e complexação. Estas excelentes características, aliadas à sua capacidade de ser “moldado” para adquirir diferentes formas (ex: filmes e esferas), fazem do quitosano um material passível de ser utilizado nas mais diversas áreas como o ambiente, a agricultura e a medicina. Nesta óptica, iniciou-se neste trabalho a síntese e caracterização de novos derivados do quitosano com potencial interesse em aplicações biomédicas ou ambientais.

Neste capítulo, faz-se uma breve introdução sobre o quitosano, onde se abordam aspectos relacionados com a sua obtenção, algumas das suas propriedades, aplicações e reacções mais conhecidas para obtenção de derivados.

1.1- A Quitina

A quitina foi isolada pela primeira vez por Henri Braconnot em 1811 quando estudava as substâncias derivadas do *Agaricus volvaceus* e outros fungos, atribuindo-lhe a denominação inicial de fungina. Em 1823, Odier, na realização de um trabalho com insectos, afirmou ter encontrado um tipo de substância semelhante a um componente estrutural das plantas (que se sabe agora, tratar-se de celulose). A essa nova substância identificada nos insectos, Odier decidiu dar o nome de “quitina”, palavra proveniente do grego e que significa túnica ou cobertura. Mais tarde, em 1834, Payen isolou pela primeira vez a celulose, dando origem a uma grande controvérsia que se arrastou por mais de cem anos, sobre as diferenças entre a quitina e a celulose, em parte porque se pensava que a presença de azoto, verificada em alguns dos trabalhos com a quitina, se devia a resíduos de proteínas que não podiam ser completamente removidos das amostras¹⁻³.

Enquanto as dúvidas acerca da presença de azoto na quitina iam sendo esclarecidas, outros autores, como Winterstein (1894), contribuíam para reavivar a controvérsia, referindo-se à quitina como sendo um tipo de “celulose fúngica” contendo azoto e sendo característica dos fungos⁴.

Apenas no século XX, com a contribuição de novos métodos instrumentais, foi possível eliminar muitas das dúvidas acerca da estrutura da quitina e estabelecer as suas diferenças em relação à celulose³.

1.2- Fontes e Processos de Obtenção

A quitina é a segunda maior fonte de biomassa e o componente orgânico mais abundante na estrutura esquelética de muitas classes de invertebrados, como os artrópodes, anelídeos, moluscos e celenterados, estando também presente nas paredes celulares de alguns fungos e em algumas espécies de algas⁵.

A taxa de regeneração da quitina na biosfera é de cerca de $2,3 \times 10^9$ toneladas/ano, somente para os crustáceos, o que corresponde quase ao dobro da mesma taxa relativa à celulose ($1,3 \times 10^9$ toneladas/ano). Estima-se que, só nas costas dos países iberoamericanos, sejam produzidas anualmente cerca de 170 mil toneladas de resíduos ricos em quitina, provenientes da indústria da pesca, aquicultura e indústria alimentar de processamento de crustáceos e moluscos. Esta produção corresponde a uma fatia de 12% do total dos resíduos ricos em quitina produzidos em todo o mundo⁶.

Os restos das carapaças dos crustáceos, além de quitina, contêm proporções variadas de proteínas, sais de cálcio (fundamentalmente carbonatos e fosfatos de cálcio) e pigmentos. Assim, o isolamento da quitina envolve normalmente três operações básicas: 1) desproteinização, 2) desmineralização e 3) despigmentação.

Para eliminação das proteínas, a matéria-prima é normalmente tratada com uma solução alcalina e levada a temperaturas que podem variar entre 65 a 100 °C. Em alguns trabalhos

foram adoptadas soluções aquosas de Na_2CO_3 , NaHCO_3 , KOH , K_2CO_3 , $\text{Ca}(\text{OH})_2$, Na_2SO_3 , NaHSO_4 , $\text{Ca}(\text{HSO}_3)_2$, Na_3PO_4 e Na_2S no isolamento das proteínas, embora na maioria dos trabalhos seja escolhido o NaOH , variando ligeiramente o intervalo de temperatura, e de uma forma mais ampla, o intervalo de concentração da base, o tempo de duração da operação e o número de operações⁶.

O conteúdo mineral dos resíduos dos crustáceos oscila entre 30 e 55%, e é constituído principalmente por carbonato de cálcio e, em menor proporção ($\approx 10\%$), por fosfato de cálcio. A remoção desta matéria inorgânica é realizada através de tratamento com vários ácidos a diferentes concentrações, como o HNO_3 , H_2SO_3 , CH_3COOH e HCOOH e, na maioria dos casos, o HCl ⁷.

Os exoesqueletos dos crustáceos contêm pigmentos que não se encontram complexados com materiais inorgânicos ou proteínas, não sendo eliminados pelos tratamentos atrás mencionados. Estes pigmentos podem ser eliminados por extracção com etanol ou acetona, depois do tratamento de desmineralização, ou por tratamento com KMnO_4 , NaClO , SO_2 , NaHSO_3 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ou H_2O_2 ^{6,7}.

Depois de realizadas as três etapas para o isolamento da quitina, o material seco é caracterizado de forma a definir as suas propriedades através de parâmetros como, por exemplo, o grau de acetilação (GA) ou de desacetilação ($\text{GD} = 1 - \text{GA}$).

1.3- Estrutura da Quitina

A estrutura da quitina é constituída por unidades de 2-acetamido-2-desoxi-D-glucose, também designada N-acetil-D-glucosamina (GlcNHAc), unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ (figura 1.1). A sua estrutura é bastante semelhante à da celulose (figura 1.2), na qual o grupo hidroxilo do carbono 2 do anel de glucopirranose se encontra substituído por um grupo acetamida.

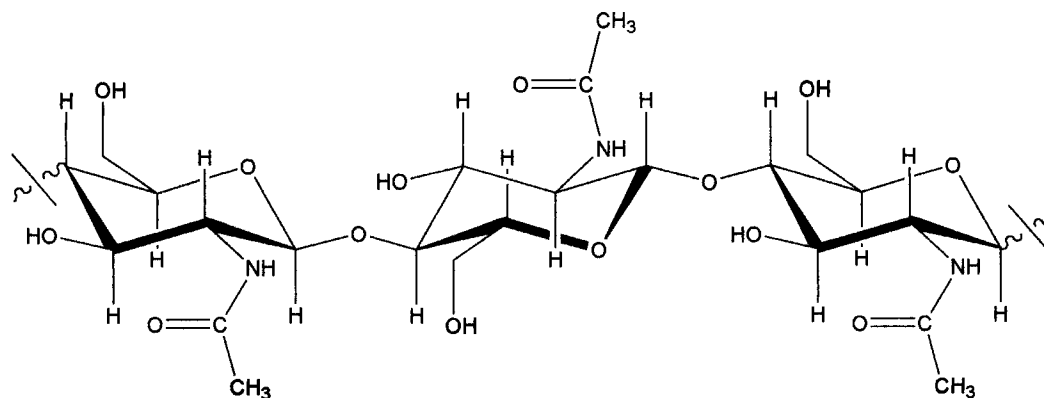


Figura 1.1: Estrutura da quitina.

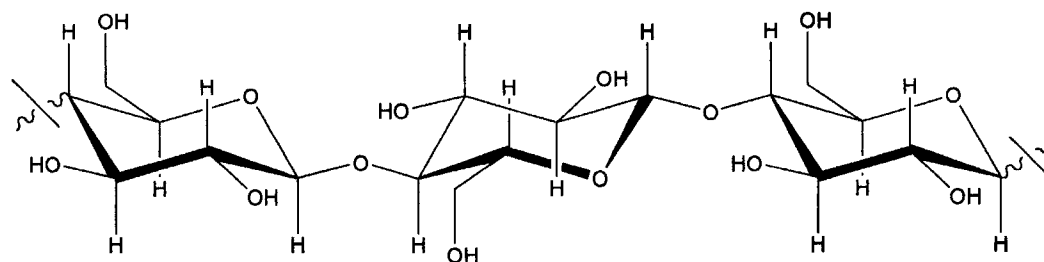


Figura 1.2: Estrutura da celulose.

Por ser um produto natural, a quitina não possui uma composição uniforme. As diferentes cadeias polissacarídicas que compõe o polímero apresentam diferenças importantes ao nível do tamanho, percentagem de grupos acetamida e posição destes grupos ao longo das cadeias poliméricas. A única exceção conhecida é a quitina obtida a partir de algas diatomáceas (*Thalassiosira fluviatilis* e *Cyclotella cryptica*), na qual todas as unidades monoméricas se encontram acetiladas⁸.

Dependendo da sua origem, a quitina pode existir sob três formas diferentes, definidas de acordo com a disposição das cadeias que constituem o polímero. Na α -quitina, as cadeias poliméricas apresentam-se em disposição antiparalela, na β -quitina apresentam-se em disposição paralela e na γ -quitina verifica-se um misto das duas disposições, segundo o esquema da figura 1.3.

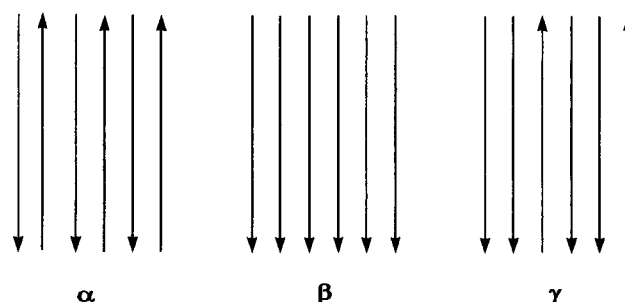


Figura 1.3: Orientações das cadeias poliméricas nas diferentes formas de quitina.

A forma mais estável e mais abundante é a α -quitina, encontrada onde é necessária maior rigidez, como no exoesqueleto dos artrópodes. As outras formas (β -quitina e γ -quitina) são encontradas, por exemplo, nas lulas e são caracterizadas por apresentar simultaneamente flexibilidade e resistência. Mediante tratamento químico adequado é possível converter as formas β ou γ na forma α , no entanto, estas conversões são irreversíveis⁹.

1.4- Desacetilação da Quitina - O Quitosano

A quitina, embora sendo uma fonte de matéria-prima com muitas potencialidades, tem uma aplicação ainda muito reduzida, principalmente devido ao seu difícil tratamento e baixa solubilidade, resultantes da existência de fortes ligações de hidrogénio entre as cadeias poliméricas¹⁰. Uma forma de controlar este problema consiste na desacetilação da quitina, em meio alcalino forte e a temperaturas superiores a 60 °C. Deste tratamento, resulta o derivado mais importante da quitina, o poli[β -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranoses], mais conhecido por quitosano (figura 1.4).

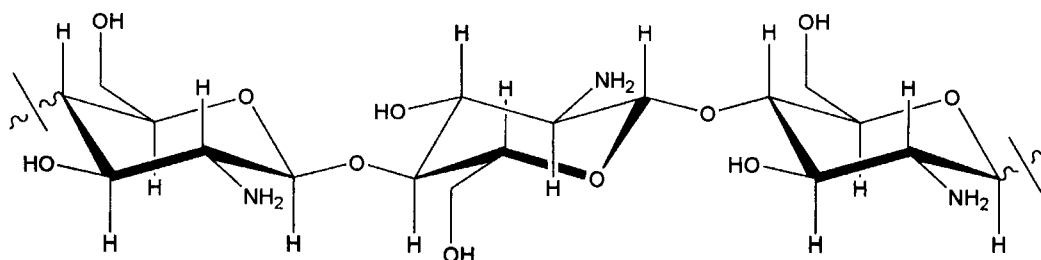


Figura 1.4: Estrutura do quitosano.

O quitosano foi obtido pela primeira vez em 1859 por Rouget, quando tratava quitina com uma solução quente de hidróxido de potássio. O produto obtido deste tratamento, ao contrário da quitina inicial, era solúvel em ácidos orgânicos. Este novo produto foi denominado “quitina modificada” por Rouget e, mais tarde, em 1894, Hoppe-Seyler designou-o pela primeira vez com o nome “quitosano”³.

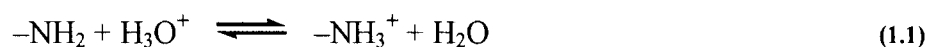
Em princípio, o quitosano pode ser obtido por tratamento ácido ou alcalino da quitina. No entanto, o tratamento ácido não é muito utilizado devido à susceptibilidade das ligações glicosídicas à hidrólise ácida¹¹. Para promover a desacetilação da quitina em meio alcalino é necessário recorrer a condições de reacção muito severas, utilizando soluções alcalinas muito concentradas (NaOH 40 a 50%), temperatura elevadas (normalmente superiores a 60 °C) e longos tempos de reacção. Ainda assim, a desacetilação da quitina raramente é completa, embora tal não constitua um problema na maioria dos casos, uma vez que um grau de desacetilação de aproximadamente 60% já permite a solubilização do polímero em soluções ácidas diluídas¹². Aliás, tem sido este critério de solubilidade o parâmetro adoptado por muitos autores para distinguir quitina de quitosano.

Mesmo utilizando tratamentos alcalinos para promover a desacetilação da quitina, é preciso ter em conta que as condições normalmente utilizadas nestes tratamentos podem, também, conduzir à quebra das ligações glicosídicas, afectando o tamanho das cadeias poliméricas¹¹. Alguns autores optam por realizar o tratamento alcalino em várias etapas, nas quais se utilizam curtos tempos de reacção, em substituição de um único processo mais prolongado¹³. Também se pode optar por realizar a desacetilação na ausência de oxigénio, ou na presença de um antioxidante, para diminuir a extensão da quebra de ligações glicosídicas, conducente a perda de peso molecular do polímero¹⁴. Uma outra alternativa é a utilização de condições mais suaves de reacção, como a utilização de concentrações de 20 a 30% de NaOH e menores temperaturas, mas tal implica um produto com um grau de desacetilação mais baixo. Isto deve-se, provavelmente, ao facto de que a reacção realizada nestas condições, dá-se unicamente nas regiões externas do polímero, que são mais acessíveis aos reagentes¹⁵.

Um outro aspecto interessante relativo à desacetilação da quitina reside no facto deste processo ser mais rápido para a β -quitina do que para a α -quitina. Tal comportamento deve-se à menor cristalinidade da β -quitina em relação a α -quitina, pelo que as forças

intermoleculares são mais fracas na primeira¹⁶. Dado que as forma α e β da quitina são características do tipo de ser vivo que serve como fonte do polímero, tal será um aspecto a ter em conta nas condições de preparação do quitosano.

Embora insolúvel em água, é possível solubilizar quitosano em soluções aquosas de ácidos orgânicos, tais como ácido acético, fórmico e cítrico, e em ácidos inorgânicos diluídos como o ácido clorídrico, nítrico e perclórico, devido a protonação dos grupos amino¹⁷. Com efeito, em meio ácido tem lugar o seguinte equilíbrio:



O valor de pK_a , que se encontra na literatura para este equilíbrio, situa-se entre 6,3 e 7, dependendo do grau de acetilação¹⁸.

Pode-se dizer, então, que a solubilidade do quitosano estará intimamente relacionada com a quantidade de grupos amino protonados ($-\text{NH}_3^+$) na cadeia polimérica. Quanto maior a quantidade destes grupos, maior o número de interacções electrostáticas repulsivas entre as cadeias e também maior a solvatação em água^{19, 20}. Deste modo, o conhecimento preciso do teor de grupos $-\text{NH}_2$ é um factor de muita importância e que poderá condicionar a utilização do quitosano nas suas diferentes aplicações. Esta informação é dada em termos de grau de desacetilação (GD) ou grau de acetilação (GA). Existem, para a determinação do GD (ou GA), muitos métodos analíticos, como por exemplo o método da ninhidrina^{21, 22}, a titulação potenciométrica²³, e os métodos de espectroscopia de infravermelho, ultravioleta e ressonância magnética nuclear²⁴.

Um outro aspecto muito importante, no que diz respeito à solubilidade do quitosano, é o seu peso molecular, que, como vimos, vai depender do método utilizado na desacetilação e da fonte utilizada na sua produção. Torna-se, por isso, importante determinar o peso molecular do quitosano após a sua preparação. Para isso, os métodos normalmente utilizados são a cromatografia^{20, 25}, dispersão da luz ("light scattering") e viscosimetria²⁶. De um modo geral, o peso molecular do quitosano comercial pode oscilar entre 100.000 e 1.200.000 Daltons, dependendo do processo utilizado²⁷.

1.5- A Química da Quitina e do Quitosano

Nos últimos anos, têm sido realizados muitos estudos baseados em novas modificações químicas da estrutura da quitina e do quitosano, com o objectivo de aumentar ainda mais as potencialidades destes materiais. No caso da quitina, estas modificações são de difícil introdução devido à reduzida solubilidade do polímero. De forma a contornar este problema, alguns trabalhos recentes descrevem modificações da quitina em meio heterogéneo, que no entanto apresentam baixos rendimentos e dão por vezes origem à degradação parcial do polímero¹¹. É, por isso, importante que se consiga levar a cabo modificações do polímero em meio homogéneo, recorrendo a condições de reacção suaves. Deste modo, ou se procede a uma pré-modificação específica da quitina por introdução de grupos que desfavoreçam a formação de ligações de hidrogénio entre as cadeias poliméricas, ou então, desacetila-se a quitina, dando origem ao quitosano. Este, por ser o derivado solúvel mais importante da quitina, passou a ser o ponto de partida para a maior parte das sínteses que visam a obtenção de novos materiais baseados na quitina.

Seguidamente, descrevem-se algumas das reacções mais conhecidas e utilizadas para a derivatização da quitina e do quitosano, com o objectivo de mostrar um pouco da dinâmica que tem sido dada à modificação destes polímeros, contribuindo muito para ampliar a suas aplicações.

1.5.1- Hidrólise da cadeia polimérica

As ligações glicosídicas da quitina e do quitosano são relativamente estáveis em meio alcalino, mas muito sensíveis em meio ácido. Nestas condições, pode ocorrer hidrólise do polímero dando origem a oligómeros, além do próprio monómero²⁸. A hidrólise da quitina pode também ser levada a cabo por acção enzimática^{29,30}.

1.5.2- Acilação

A acilação da quitina tem sido utilizada como um método para lhe conferir solubilidade, tendo sido já descritos vários derivados acilados da quitina³¹⁻³³. Mais recentemente, Szolsland³⁴ preparou a di-O-butilquitina por O-acilação da quitina com anidrido butírico a temperatura ambiente, na presença de ácido perclórico (figura 1.5). O produto final apresentou-se solúvel em solventes orgânicos comuns como metanol, acetona e dimetilformamida (DMF).

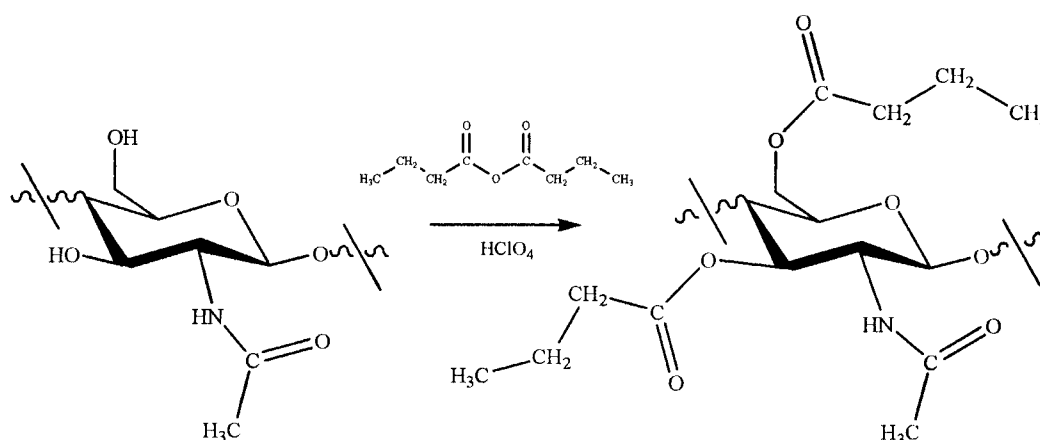


Figura 1.5: O-acilação da quitina com anidrido butírico.

No caso do quitosano, a acetilação é normalmente realizada com um anidrido carboxílico ou um haleto de acilo, ocorrendo preferencialmente nos grupos amino, dado a acilação dos grupos hidroxilo ser um processo mais lento. Se a acilação for realizada de forma controlada, pode conduzir a um quitosano parcialmente acetilado, dando origem a um produto que alguns autores classificam de “quitina alcalina”^{35, 36}. Este produto é igual ao obtido por uma desacetilação parcial da quitina, sendo também parcialmente solúvel em água, mas com a vantagem de ser mais fácil a sua preparação. Por sua vez, se a acetilação for intensiva, provoca a substituição nos grupos amino e hidroxilo, produzindo um derivado poliacetilado do quitosano, solúvel em solventes orgânicos comuns como o clorofórmio³⁵ (figura 1.6).

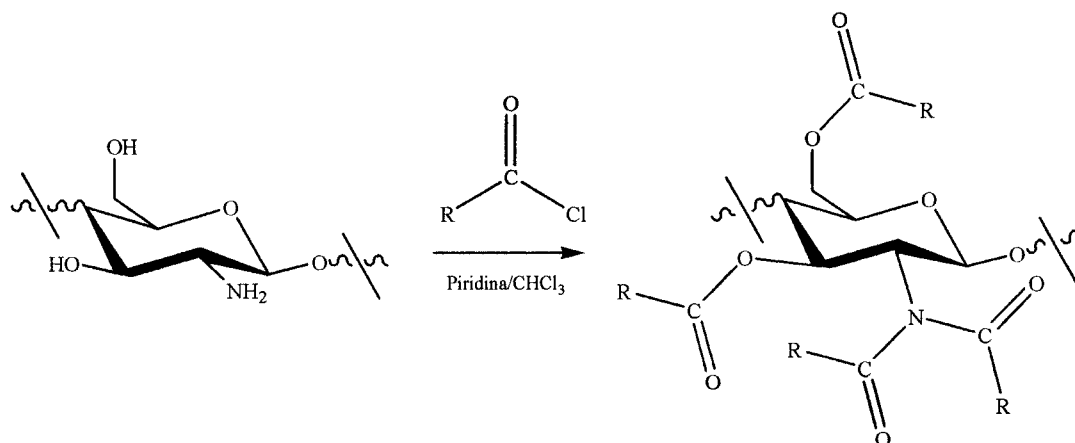


Figura 1.6: Acilação intensiva do quitosano com cloreto de acilo.

1.5.3- Tosilação

Kurita *et al.*³⁷ desenvolveram o método da tosilação, que é hoje uma das modificações mais conhecidas da quitina e do quitosano. A tosilação foi realizada fazendo reagir o polissacárido, em meio heterogéneo, com cloreto de *p*-toluenossulfonilo, a 0 °C em clorofórmio (figura 1.7). Devido ao facto do grupo *p*-toluenossulfonilo ser um excelente grupo de saída, os derivados tosilados tornam-se muito úteis como intermediários para posteriores modificações do quitosano e da quitina³⁸.

O grau de tosilação influencia a solubilidade do polímero resultante, que será solúvel em água se esse grau for menor que 30%. Se o grau de tosilação for superior, o produto torna-se hidrofóbico e solúvel em solventes orgânicos como dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida (DMAc) e N-metilpirrolidona (NMP)³⁹.

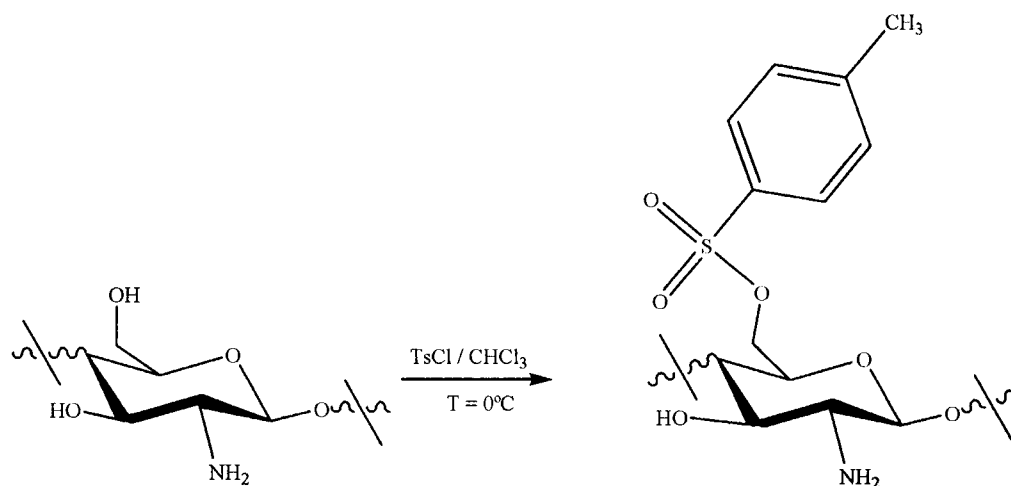


Figura 1.7: Tosilação do quitosano com cloreto de tosil.

1.5.4- N-ftaloilação

Uma outra modificação corrente do quitosano baseia-se na reacção com ácido ftálico, que resulta na introdução do grupo ftaloílo no átomo de azoto dos grupos amino. Desta forma, além de actuar como um grupo protector dos grupos amino, o grupo ftaloílo favorece a solubilidade do polímero em solventes orgânicos, por ser volumoso e impedir a formação de ligações de hidrogénio intermoleculares (figura 1.8). A posterior remoção do grupo ftaloílo, se desejada, é facilmente realizada com hidrazina, e o polímero readquire os grupos amino livres originais.

Normalmente, a ftaloilação é realizada por preparação de um gel de quitosano, o qual é depois, introduzido em piridina ou DMAc. A reacção do gel com o anidrido ftálico resulta no derivado N-ftaloilquitosano, solúvel em DMSO, o qual constitui um intermediário importante para posteriores modificações químicas⁴⁰.

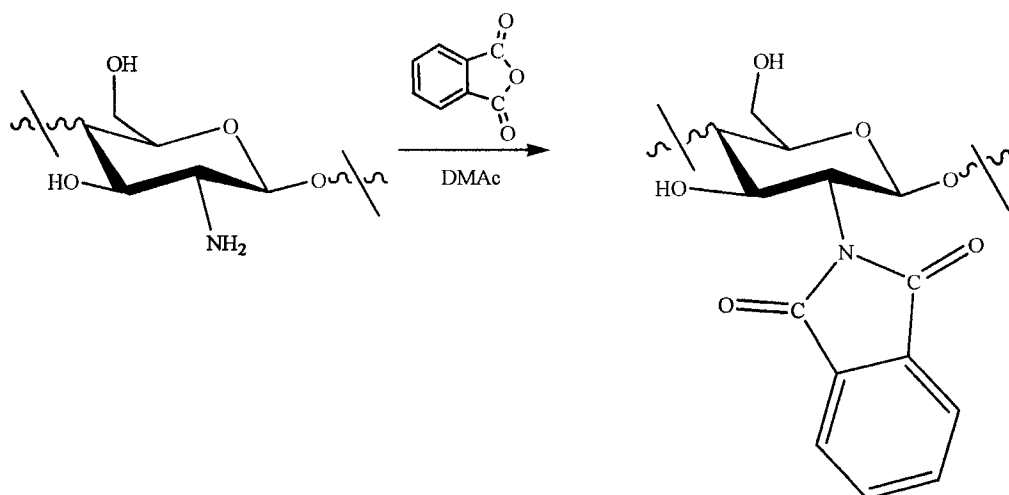


Figura 1.8: Ftaloilação do quitosano.

1.5.5- Sulfatação

Naggi *et al.*⁴¹ estudaram a sulfatação selectiva do grupo hidroxilo primário (do carbono 6) do quitosano. Para isso, utilizaram uma mistura de ácido sulfúrico/ácido clorossulfónico na proporção de 2:1, à temperatura ambiente. Com este procedimento, conseguiram obter graus de sulfatação do quitosano superiores a 95%, tendo o produto resultante a vantagem de ser solúvel em água.

A sulfatação selectiva no átomo de azoto (N-sulfatação) pode ser realizada a partir da uma suspensão de quitosano numa solução aquosa de carbonato de sódio, por reacção com o aducto de trimetilamina e trióxido de enxofre (Me_3NSO_3). A reacção é realizada entre 50 e 70 °C, podendo conduzir a graus de sulfatação entre 0,4 e 0,86⁴².

1.5.6- Alquilação

Lang *et al.*⁴³ sintetizaram os derivados N-hidroxietil-, N-hidroxipropil-, N-hidroxibutil-, N-di-hidroxipropil-, O-hidroxietil- e O-hidroxipropilquitosano. Estes derivados foram preparados por reacção do quitosano com os epóxidos apropriados. Dependendo das

condições de reacção, a substituição pode ocorrer nos grupos amino ou nos grupos hidroxilo dando origem aos derivados N-hidroxiálquilados ou O-hidroxiálquilados do quitosano, ou mesmo a uma mistura de ambos os tipos. Se a reacção for realizada em meio neutro ou ácido, a N-alquilação é favorecida, ao passo que, se forem utilizadas condições alcalinas, é favorecida a O-alquilação (figura 1.9).

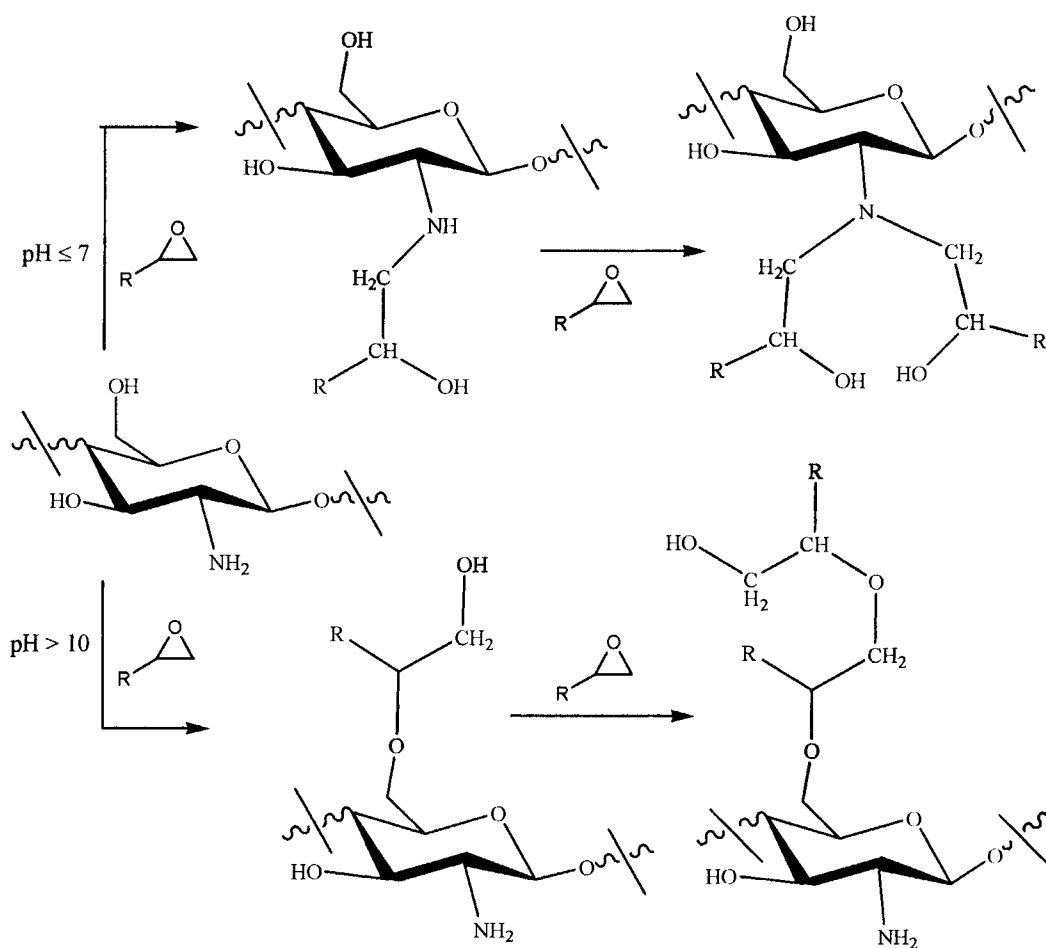


Figura 1.9: Reacção do quitosano com epóxidos; R = -H, $-(\text{CH}_2)_x\text{CH}_3$ (com $x = 0$ ou 1).

1.5.7- Formação de sais quaternários

A introdução de grupos amónio quaternários na estrutura do quitosano pode ser realizada de duas formas: ou adicionando um substituinte que já contenha um grupo amónio quaternário (reacção 1, figura 1.10), ou transformando os grupos amino primários do quitosano em grupos amónio quaternários (reacção 2, figura 1.10). A primeira via recorre à utilização de um epóxido de amónio quaternário, como o cloreto de (2,3-epoxipropil)trimetilamónio. Na segunda via, pode recorrer-se à reacção com haletos de alquilo, ou sulfatos de dialquilo como o sulfato de dimetilo ou de dietilo⁴⁴.

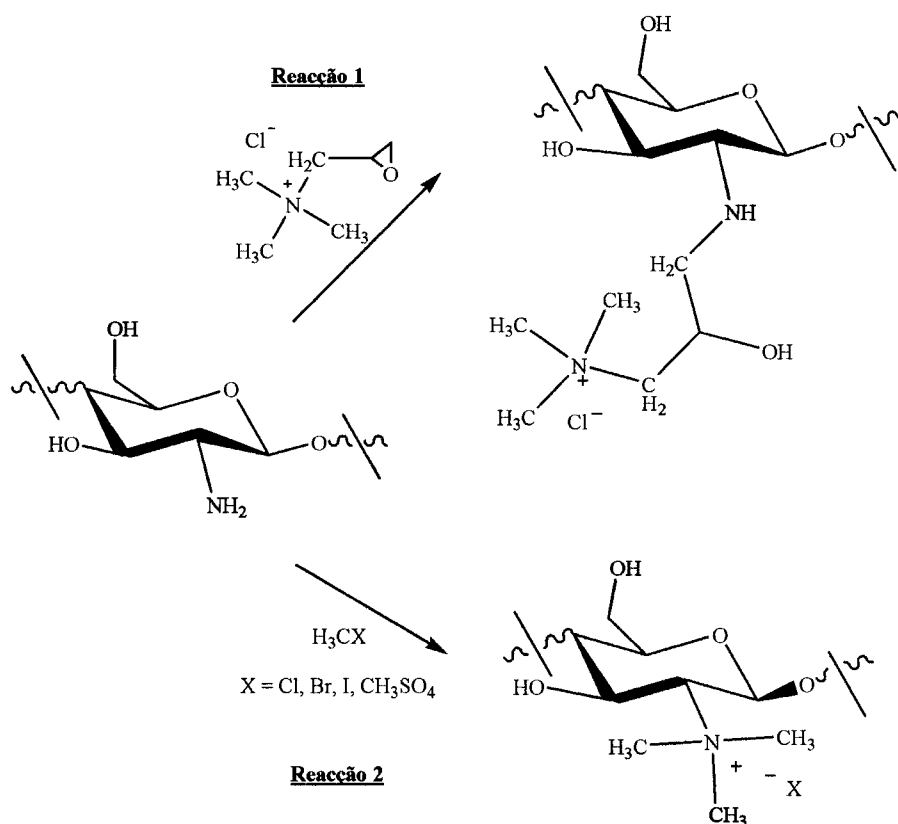


Figura 1.10: Introdução de grupos amónio quaternários na estrutura do quitosano. Reacção 1: Reacção do quitosano com cloreto de (2,3-epoxypropyl)trimetilamónio. Reacção 2: Metilação do quitosano.

1.5.8- Fosforilação

A fosforilação do quitosano pode ser realizada a partir da reacção com pentóxido de fósforo em ácido metanossulfónico, resultando um derivado hidrossolúvel.

O grau de substituição depende da quantidade de pentóxido de fósforo utilizada, podendo aproximar-se de 1 (equivalente a 100%) quando se utilizam 4 equivalentes de P_2O_5 por monómero⁴⁵.

1.5.9- Silanização

Outra forma de solubilizar a quitina consiste na reacção desta com uma mistura de hexametildissilano e clorotrimetilsilano em piridina (figura 1.11). Se for pretendida apenas uma silanização parcial, basta substituir a piridina por DMF.

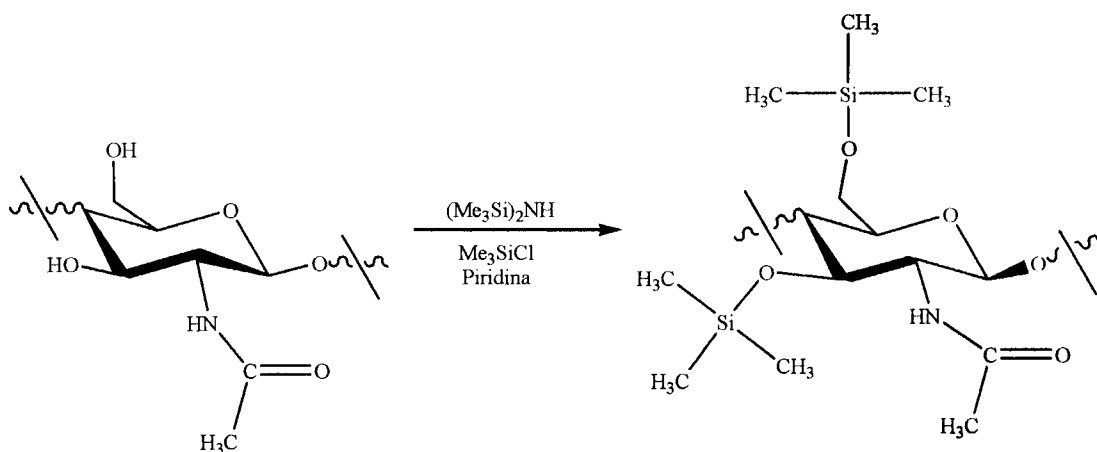


Figura 1.11: Silanização da quitina.

A quitina silanizada com trimetilsilano é solúvel em solventes como a acetona e a piridina. A remoção dos grupos trimetilsililo, se desejada, é facilmente realizada com ácido acético a temperatura ambiente^{46, 47}.



1.5.10- Formação de amidas e bases de Schiff

O grupo amino primário do quitosano é mais reactivo perante electrófilos do que os grupos hidroxilo, sendo susceptível de reagir com aldeídos e cetonas para formar iminas, ou com anidridos carboxílicos dando origem a amidas. Geralmente, a reacção é realizada solubilizando previamente o quitosano numa solução de ácido acético/metanol, para de seguida se adicionar o anidrido carboxílico, dando origem ao derivado N-acilquitosano, ou o aldeído/cetona, formando-se os derivados de N-arilideno- ou N-alquilidenoquitosano (figura 1.12)⁴⁸.

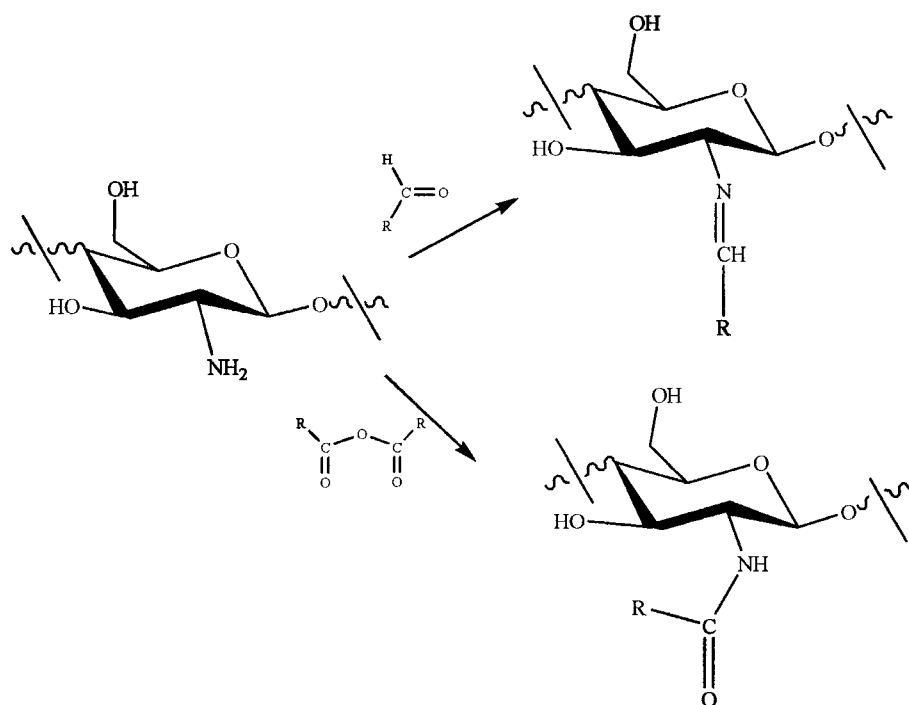


Figura 1.12: Reacção do quitosano com aldeídos e com anidridos carboxílicos, formando-se bases de Schiff e amidas, respectivamente; R = grupo arilo ou alquilo.

A reacção do quitosano com dialdeídos, como o glutaraldeído, produz ligação cruzada (“crosslinking”) entre as cadeias poliméricas, sendo um método muito utilizado para a imobilização de enzimas (figura 1.13)^{49,50}.

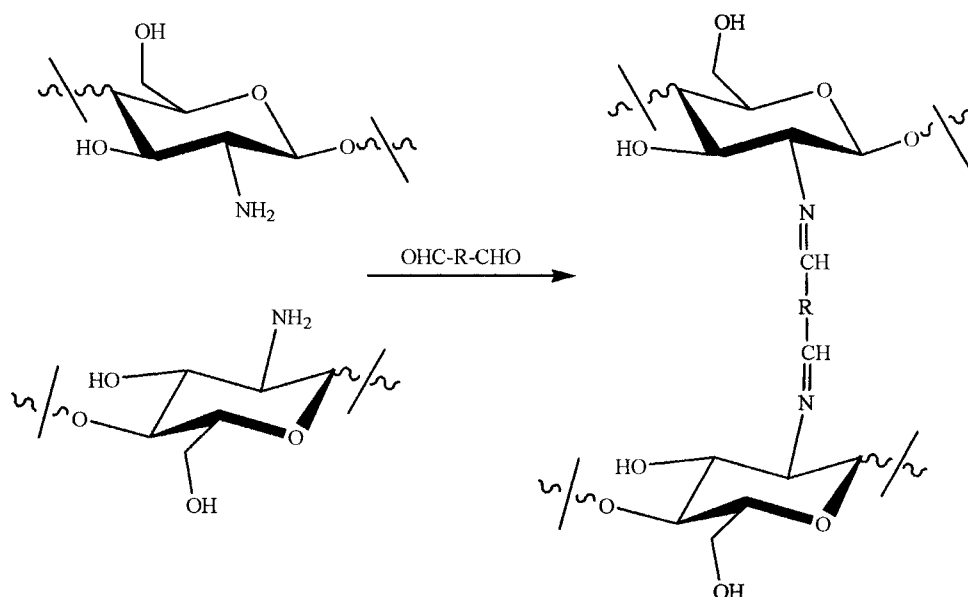


Figura 1.13: Formação de ligações cruzadas entre cadeias de quitosano, por reacção com dialdeídos.

1.5.11- Carboxialquilação

Os derivados carboxialquilados do quitosano são dos exemplos mais interessantes de quitosano modificado. A carboxialquilação confere grande versatilidade ao quitosano, possibilitando a sua solubilização tanto em meio ácido como em meio alcalino.

Os derivados N-carboximetilados do quitosano podem ser obtidos por alquilação redutiva. Por exemplo, a reacção entre o quitosano e o ácido glioxílico dá origem a uma base de Schiff que, por redução com cianoborohidreto de sódio, conduz a um derivado solúvel em água, o N-carboximetilquitosano. Quando se dispõe de um grande excesso de ácido glioxílico, por exemplo, numa relação entre grupos amino e ácido glioxílico na ordem de 1:9, pode-se obter o N,N'-dicarboximetilquitosano, a partir da redução com borohidreto de sódio⁵¹ (figura 1.14).

Um outro derivado do quitosano, o N-carboxibutilquitosano, pode ser obtido através da reacção entre o quitosano e o ácido levulínico, dando origem a uma base de Schiff. A posterior redução desta imina com borohidreto ou cianoborohidreto de sódio dá origem ao N-carboxibutilquitosano⁵² (figura 1.15).

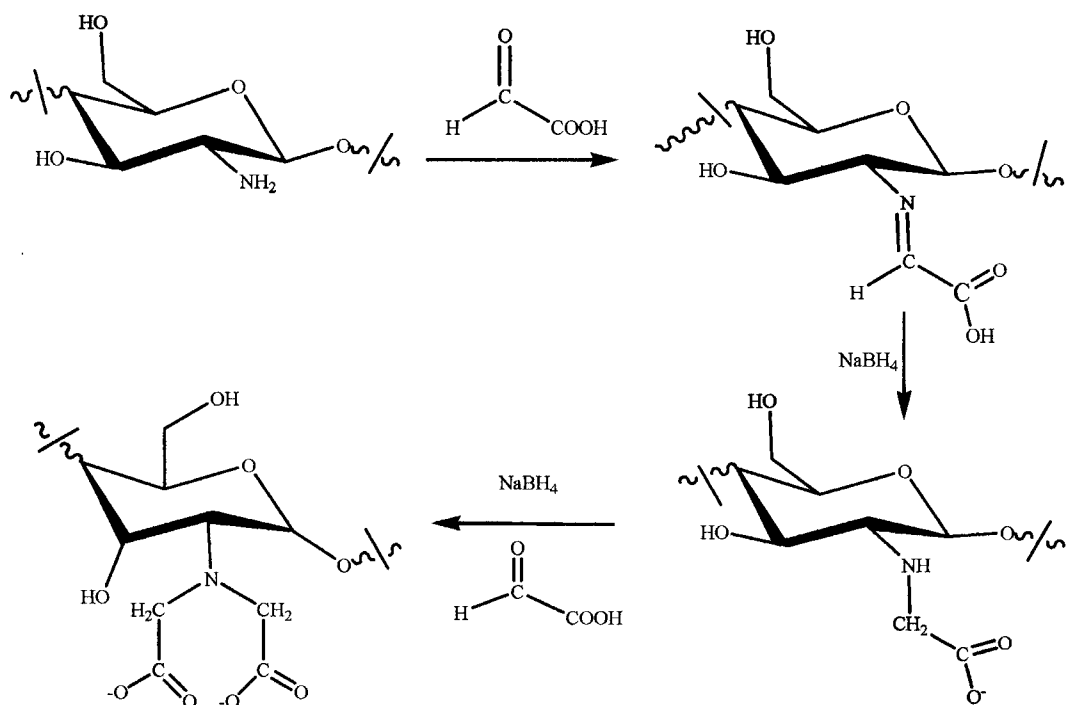


Figura 1.14: Esquema da síntese do N-carboximetilquitosano e do N,N'-dicarboximetilquitosano.

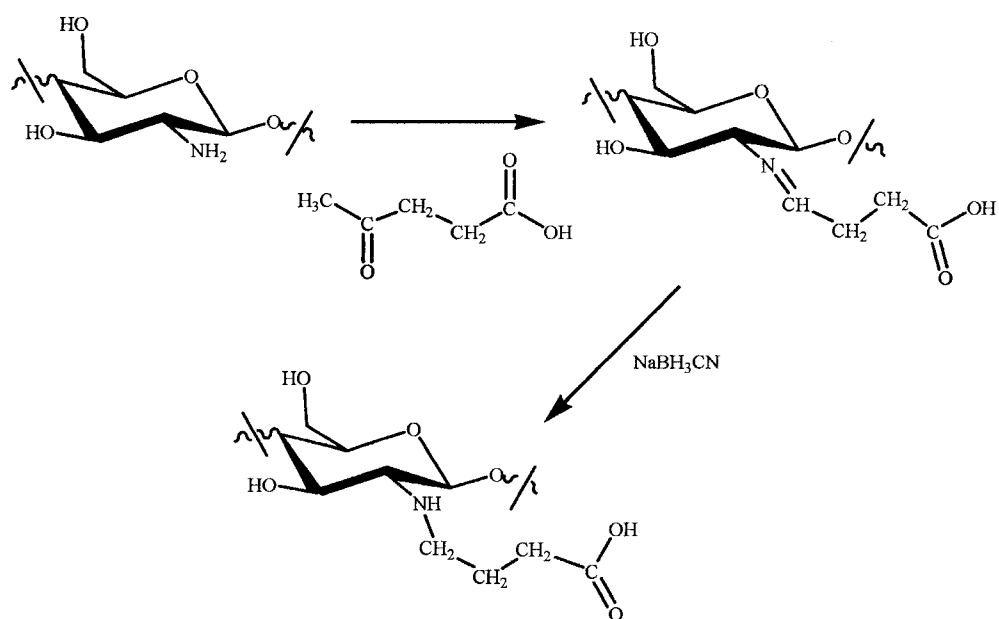


Figura 1.15: Esquema da síntese do N-carboxibutilquitosano.

Os derivados carboximetil e carboxibutilquitosano são os derivados carboxialquilados mais conhecidos do quitosano. O carboxietilquitosano encontra-se ainda pouco estudado, como se pode verificar pelo menor número de trabalhos publicados, tanto no que diz respeito ao método de síntese, quanto no âmbito das possíveis aplicações.

Lee *et al.*⁵³ iniciaram o desenvolvimento de derivados carboxietilados do quitosano com a síntese do O-carboxietilquitosano por hidrólise alcalina do O-(2-cianoetil)quitosano, quando preparavam membranas para estudos de pervaporação. Mais tarde foram sintetizados alguns derivados N-carboxietilquitosano via adição conjugada (1,4) tipo Michael com acrilato de etilo¹⁰ ou acrilato de metilo⁵⁴. Desta adição nucleófila, resultaram intermediários que, por hidrólise com hidróxido de sódio, conduzem a derivados N-carboxietilquitosano.

Num outro trabalho, Orienti *et al.*⁵⁵ sintetizaram o N-carboxietilquitosano por alquilação com ácido 3-bromopropanóico em meio água/piridina, para utilização como material de suporte para um gel de aplicação tópica contendo vitamina B₆.

Recentemente, Skorik *et al.*⁵⁶ realizaram a síntese do N-(2-carboxietil)quitosano, por reacção do quitosano com ácido 3-X-propanóico (com X = Cl, Br ou I), sob condições alcalinas moderadas (pH 8-9). Os autores verificaram que nas condições reaccionais utilizadas, a introdução dos grupos carboxietilo é regioselectiva, ocorrendo exclusivamente nos grupos amino. Uma das vantagens deste método consiste na reduzida toxicidade dos reagentes utilizados.

A continuação deste estudo e a caracterização dos derivados N-carboxietilquitosano daí resultantes, nomeadamente ao nível da complexação com ião cobre (II), constitui um dos principais objectivos da presente dissertação.

1.5.12- Derivados peptídicos do quitosano

A maior parte dos estudos centrados no quitosano e envolvendo péptidos, baseiam-se na capacidade do quitosano para adsorver substâncias de natureza peptídica ou proteica, através de interacções não covalentes (forças de van der Waals e pontes de hidrogénio). Estas interacções, por serem fracas, são vantajosas quando o objectivo é apenas que o quitosano sirva como transporte de um determinado péptido ou proteína. Além disso, a capacidade do quitosano para formar hidrogéis, constituindo cápsulas ou membranas, torna-o num material ideal para utilização em veiculação de fármacos. Com efeito, esta característica tem sido alvo

de muitos estudos, devido ao facto dos hidrogéis de quitosano serem sensíveis ao pH, permitindo a sua utilização no transporte de proteínas até ao intestino, onde aquelas são libertadas⁵⁷.

Pode-se conceber a união covalente entre um péptido (ou proteína) e o quitosano, obtendo-se derivados com novas potencialidades. Guggi *et al.*⁵⁸ desenvolveram um derivado péptídico do quitosano com a dupla função de excipiente farmacêutico e protector de fármacos contra a acção proteolítica de enzimas como a tripsina ou a quimiotripsina. Assim, estes autores ligaram ao quitosano, covalentemente, um péptido que inibe a acção daquelas enzimas, obtendo um material que preserva as propriedades mucoadesivas do quitosano, vantajosas para a libertação do fármaco no intestino, associadas à possibilidade de prevenção da sua degradação.

Mitani *et al.*⁵⁹ introduziram vários aminoácidos e péptidos na estrutura do quitosano com objectivo de aumentar as suas propriedades complexantes, para o tratamento de águas residuais. Neste trabalho foram preparadas esferas de quitosano com glutaraldeído e ácido glioxílico, de modo a funcionalizar o quitosano com grupos carboxílicos. As esferas resultantes foram postas a reagir com ésteres de aminoácidos ou péptidos em meio DMF utilizando 1-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (EEDQ) como reagente de acoplamento. A hidrólise dos ésteres dos aminoácidos introduzidos foi realizada com solução alcalina concentrada, resultando nos aminoácidos livres (grupo carboxílico terminal não esterificado).

Alguns autores referem-se ao derivado N-carboximetilquitosano como um derivado da glucose funcionalizada com o aminoácido glicina. De facto, quando a introdução do grupo carboximetilo se faz através do átomo de azoto, pode-se encarar o grupo amino do quitosano como parte integrante do substituinte, obtendo-se assim, um derivado da celulose em que o grupo hidroxilo do carbono 2 se encontra substituído por um aminoácido glicina⁶⁰.

1.6- Aplicações da Quitina e do Quitosano

Devido à sua abundância como matéria-prima e características únicas, a quitina, o quitosano e seus derivados têm sido utilizados no desenvolvimento de muitos produtos e para as mais diversas áreas de aplicação como medicina, ambiente, nutrição, cosméticos, agricultura, fotografia, etc. Devido à sua maior versatilidade, o quitosano tem sido preferido em detrimento da quitina, na maior parte dessas aplicações.

1.6.1- Aplicações biomédicas

Foram verificadas propriedades coagulantes interessantes do quitosano. Pensa-se que este comportamento é devido à capacidade deste polissacárido em adsorver proteínas, o que acaba por desencadear uma resposta trombogénica no organismo. No que se refere a aplicações biomédicas, o quitosano é mais utilizado do que a quitina. De facto, além de ser mais fácil proceder à modificação química da sua estrutura, o quitosano conjuga as propriedades de biodegradabilidade, biocompatibilidade e bioactividade, com propriedades de adsorção, além da possibilidade de ser moldado para a preparação de membranas para aplicação externa, ou de cápsulas para a aplicação oral⁶¹.

No que diz respeito a administração por via oral, o quitosano apresenta a vantagem de não ser absorvido pelo organismo. Por outro lado, apresentando propriedades mucoadesivas, pode ser utilizado para promover o transporte de proteínas, fármacos e outras moléculas através da mucosa, tanto a nível do estômago, do intestino, ou mesmo por via nasal^{62, 63}.

São também reconhecidas as capacidades do quitosano no auxílio da reconstrução de tecidos. Os estudos já realizados permitiram constatar que o quitosano fomenta o crescimento celular, porque as células aderem fortemente ao polímero e proliferam mais rapidamente. Este comportamento tem sido aproveitado para os estudos em engenharia de tecidos, sendo o quitosano utilizado em trabalhos de regeneração da pele, do tecido ósseo e cartilágneo e na preparação de pele artificial⁶⁴⁻⁶⁷.

Foi verificado que o quitosano e o derivado N,N,N-trimetilquitosano, devido ao carácter catiónico, são capazes de aumentar a permeabilidade de moléculas hidrofílicas através da mucosa intestinal. Esta propriedade conduziu a um grande número de estudos visando a investigação do uso do quitosano e seus derivados para aumentar a permeabilidade intestinal para drogas hidrofílicas com fraca biodisponibilidade por via oral, como são os péptidos⁶⁸.

Actualmente, o quitosano é parte constituinte de suturas cirúrgicas, agentes hemostáticos, implantes biodegradáveis e próteses vasculares. É já utilizado como excipiente em soluções orais de medicamentos, sendo actualmente um dos muitos materiais propostos para preparação de microesferas e microcápsulas para transporte de fármacos no organismo⁶⁹. Devido às óptimas propriedades mucoadesivas do quitosano, está a ser investigada a possibilidade da sua aplicação para a administração de fármacos por via intranasal ou transdérmica⁷⁰.

A aplicação mais conhecida do quitosano, e de certa forma a responsável pela divulgação comercial deste interessante polissacárido, tem sido a sua utilização em produtos dietéticos como inibidor da digestão de gorduras ("fat trapper"). O quitosano é dissolvido sob as condições ácidas do estômago, onde vai emulsionar as gorduras. Ao chegar ao intestino o complexo quitosano-gordura gelifica e é expulso do organismo, pelo que se impede que as gorduras sejam absorvidas pelas paredes intestinais⁷¹.

1.6.2- Agricultura

Foram realizados estudos utilizando vários tipos de bactérias, onde se verificou a capacidade antibacteriana do quitosano. Pensa-se que os grupos amónio ($-NH_3^+$) do quitosano, interactivam com os grupos aniónicos presentes na membrana bacteriana, conduzindo à sua instabilização e à morte da bactéria⁶⁴. Por este motivo, o quitosano é actualmente utilizado como revestimento protector e biofungicida para pulverização em frutas, vegetais e sementes. Nos Estados Unidos, já se encontram registados vários pesticidas à base de quitosano⁷².

1.6.3- Cosméticos

O início da aplicação do quitosano na indústria dos cosméticos deveu-se à sua capacidade para formar filmes, tornando-o adequado como constituinte em fixadores para cabelo. Entretanto, com o desenvolvimento de novos derivados do quitosano, tornou-se possível a sua utilização em variadas aplicações, favorecendo o crescimento da sua utilização.

Actualmente, vários derivados do quitosano são utilizados em cosméticos para tratamento capilar e da pele, como constituinte de champôs, fixadores de cabelo, cremes hidratantes e tónicos para a pele entre outros produtos⁷³.

1.6.4- Fotografia

O quitosano tem sido utilizado no desenvolvimento de produtos para fotografia e impressão, principalmente devido à sua resistência ao desgaste, características ópticas e capacidade para formar filmes que actuam como uma película protectora no papel fotográfico⁷⁴.

1.6.5- Tratamento de Águas

Por ser não tóxico e se apresentar na forma cationica a pH inferior a 6, o quitosano é utilizado como agente floculante no tratamento de águas residuais e como agente complexante no tratamento de águas ricas em metais pesados.

O quitosano apresenta uma grande capacidade para fixar moléculas como pesticidas, proteínas e corantes. O grupo amino confere ao quitosano uma maior afinidade para formar complexos com metais de transição do que outros polissacáridos naturais, como a celulose⁷⁴. Com o objectivo de conferir uma maior selectividade na fixação de metais pesados, tem sido sintetizada uma grande variedade de derivados do quitosano.

1.6.6- Aplicações cromatográficas

A presença de grupos amino e hidroxilo livres no quitosano, torna-o um suporte cromatográfico bastante funcional, permitindo o desenvolvimento de vários tipos de derivados, e conseqüentemente, a sua utilização em diferentes aplicações de cromatografia líquida. A maior parte dos trabalhos já desenvolvidos, refere-se à separação de substâncias quirais, mas existem já vários estudos acerca da adsorção de metais pesados por parte de derivados do quitosano⁷⁵ com algumas referências à separação de metais em HPLC e estudos referentes à separação de proteínas e aminoácidos.

Para as aplicações em separações de substâncias quirais, tem sido desenvolvido um grande número de derivados do quitosano que podem ou não encontrar-se imobilizados em sílica, embora esta imobilização seja a opção escolhida na maior parte dos trabalhos científicos⁷⁶⁻⁷⁹. Independentemente do método escolhido, estes estudos concentram-se no desenvolvimento de derivados do quitosano que conduzam a maior selectividade na separação, mas que não sejam solúveis nos solventes utilizados no processo de eluição cromatográfica.

Quando o objectivo é a separação de metais, os polissacáridos naturais competem com as resinas sintéticas, já muito difundidas no mercado, devido à crescente atenção que tem sido dada ao desenvolvimento de produtos que causem menor impacto ambiental. Deste modo, além do grande número de trabalhos sobre a síntese de derivados do quitosano, muitos outros estudos concentram-se na selectividade destes para a adsorção de metais de transição, que é um passo necessário para a sua aplicação como fase estacionária em cromatografia^{59, 80-84}.

Foram realizados, também, alguns trabalhos envolvendo a utilização de alguns derivados do quitosano como fase estacionária cromatográfica, para separação de proteínas e fenóis^{85, 86}.

1.7- Propriedades Complexantes do Quitosano

O perigo associado à contaminação das águas naturais com metais pesados, tem conduzido ao desenvolvimento de várias técnicas para o tratamento de águas residuais ricas neste tipo de poluentes. Os processos mais vulgarmente utilizados incluem a precipitação com carbonatos ou hidróxidos, a adsorção com carvão activado, ou a utilização de resinas de permuta iónica como a Chelex 100 ou Amberlite⁸⁷. Todavia, sob o ponto de vista da protecção ambiental, tem sido dada mais atenção ao desenvolvimento de resinas quelantes que sejam produzidas à base de materiais que provoquem o menor impacto ambiental possível, e por este motivo, os polímeros naturais, tais como ácido alginico, a celulose, a quitina e o quitosano, têm sido muito estudados⁸². No caso do quitosano, a presença de grupos amino confere a este biopolímero uma excelente capacidade de complexação com iões de metais de transição.

1.7.1-Complexação com quitosano

A capacidade do quitosano para formar complexos com iões metálicos tem merecido o interesse de muitos investigadores, no entanto, a comparação entre os resultados dos diferentes estudos é dificultada pelas diferentes condições experimentais utilizadas em cada caso. Verificou-se que o processo de complexação do quitosano e a estabilidade do complexo metal-quitosano, são influenciados pelas condições do meio, pelo estado físico do polímero (pó, gel ou filme), e de forma ainda mais acentuada pelo grau de acetilação (GA)^{84, 88-91}. Foram já realizados estudos que verificaram que o aumento do GA do polímero inviabilizava a formação de complexos com os iões cobre (II), cobalto (II) e níquel (II). Quando se utilizava quitina, não se observava a formação destes complexos⁹². No que diz respeito às condições do meio, Bassi *et al.*⁹³ estudaram a remoção de vários iões metálicos com quitosano em pó, e verificaram que o ataque ao metal é dependente do pH, encontrando valores máximos entre pH 6,0 e 7,0.

Rhazi *et al.*⁹⁴ estudaram o comportamento do quitosano perante diferentes metais. Neste estudo, verificaram a selectividade deste polímero na fixação de iões metálicos divalentes, tendo constatado que a sua capacidade aumenta na ordem $\text{Co(II)} < \text{Ni(II)} < \text{Cd(II)} < \text{Zn(II)} <$

Hg(II) < Cu(II) e no caso de íons metálicos trivalentes a ordem obtida foi Cr(III) < Eu(III) < Nd(III).

O mecanismo de coordenação do quitosano com íons metálicos é ainda tema de discussão e, por conseguinte, objecto de muitos estudos. Foram já propostos alguns modelos para explicá-lo. Num primeiro modelo, conhecido como modelo em ponte (“bridge model”) propõe-se a formação de um complexo, em que o íon metálico se encontra ligado a vários átomos de azoto, da mesma cadeia polimérica ou de cadeias diferentes. Um segundo modelo, conhecido como modelo pendente (“pendant model”) considera que o íon metálico se encontra ligado aos grupos amino, formando apenas um tipo de complexos com estrutura $[\text{Cu}(\text{GlcNH}_2)(\text{OH})_2]^{2+}$ (figura 1.16).

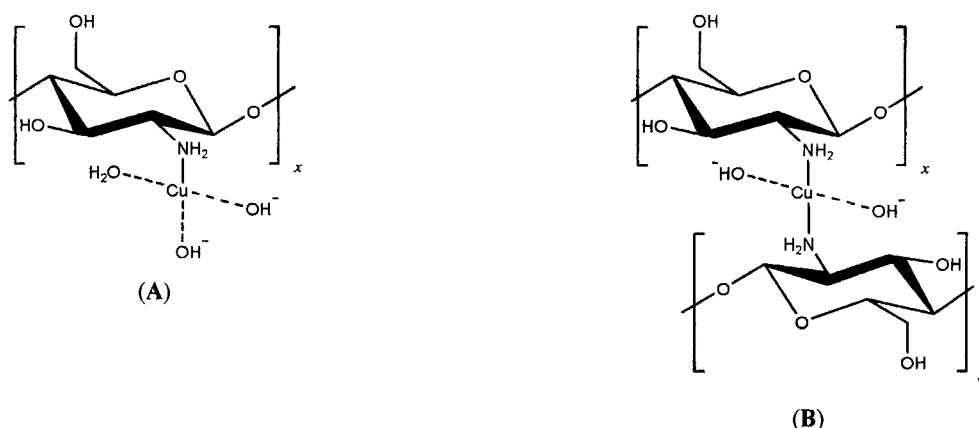


Figura 1.16: Estruturas propostas para os complexos formados entre o íon cobre (II) e o quitosano. Na figura (A) é a estrutura proposta para o modelo pendente (“pendant model”) e (B) para o complexo em ponte (“bridge model”).

Com efeito, o grupo amino das unidades monoméricas do quitosano revela grande capacidade e selectividade na complexação de íons de metais de transição. Não obstante, essas características podem ser ainda melhoradas através da ligação de grupos funcionais específicos ao biopolímero. Foram já realizadas várias modificações químicas do quitosano associadas a estudos de complexação com catiões metálicos^{88, 95-105}, o que evidencia o crescente interesse dos investigadores no desenvolvimento de novos derivados do quitosano. Aproveitando a versatilidade do polímero, os investigadores têm vindo a desenvolver materiais ainda com maior afinidade e/ou selectividade para metais de transição.

1.7.2-Complexação com derivados carboxialquilados

Os derivados N-carboximetilquitosano e N,O-carboximetilquitosano foram já estudados na complexação com metais de transição. Estes materiais, apresentam a vantagem de serem solúveis numa gama mais alargada de pH e possuem um grupo carboxílico capaz de participar nos complexos formados.

Muzzarelli *et al.*⁵¹ verificaram a capacidade do N-carboximetilquitosano para complexar iões de metais de transição. O complexo formado é insolúvel e, por isso, este derivado pode ser utilizado no tratamento de águas residuais ricas em metais pesados. Verificou-se que o derivado completamente substituído é particularmente apropriado na precipitação de metais de transição, ao contrário do derivado menos substituído, que deu origem a precipitados com uma cinética de deposição mais lenta.

Tang *et al.*¹⁰⁶ estudaram a complexação do N,O-carboximetil quitosano com zinco(II), na qual verificaram que a complexação ocorre preferencialmente nos grupos carbonilo em detrimento da coordenação pelos grupos -OH e -NH₂. O complexo formado é insolúvel, o que também possibilita a sua utilização no tratamento de águas residuais ricas neste tipo de metal.

Como já referido, Skorik *et al.*⁵⁶ sintetizaram um novo derivado carboxialquilado do quitosano, o N-(2-carboxietil)quitosano, sendo este derivado alvo de estudos de complexação com cobre (II) no presente trabalho. Os resultados obtidos são apresentados nesta dissertação, com o objectivo de contribuir para o conhecimento das potencialidades dos derivados carboxialquilados e das diferenças existentes entre cada um deles, relativamente à interacção com metais.

CAPÍTULO

2

EXPERIMENTAL

2- Experimental

Neste capítulo faz-se uma descrição dos materiais e equipamentos utilizados, bem como dos procedimentos adoptados para a realização das sínteses e caracterização dos derivados do quitosano e dos compostos intermediários derivados dos aminoácidos glicina e fenilalanina.

2.1- Reagentes e Soluções

Os reagentes utilizados foram de qualidade *pro analysi* ou equivalente. Sempre que necessário, foram utilizados solventes secos com filtros moleculares (4 Å) da Merck sendo estes previamente activados por aquecimento numa mufla a 300 °C durante vinte e quatro horas.

2.1.1- Síntese dos derivados N-(2-carboxietil)quitosano

Na síntese dos derivados N-(2-carboxietil)quitosano, genericamente representados por CEQn (com n = 1 a 5), partiu-se de quitosano de baixo peso molecular (150.000 Dalton) da Aldrich, (ref. 44,886-9, lote 07223CU) com 5,4 mmol de N/g de quitosano (valor obtido por análise elemental), ácido 3-bromopropanóico a 97% da mesma marca (ref. 10,128-1 e lote 07710PU-070), e hidrogenocarbonato de sódio da May & Baker Ltd (lote H1318).

As diálises foram realizadas em membranas selectivas tubulares da Medical International, com 23,8 mm de espessura e grau de admissão de peso molecular (molecular weight cut-off) de 12-14 kDalton, e capacidade para 4,4 mL·cm⁻¹.

A precipitação do produto da mistura reaccional foi realizada por adição de etanol da Merck (ref. 818760) e na sua solubilização para diálise utilizou-se ácido clorídrico 37% da mesma marca (ref. 100317).

2.1.2- Síntese dos derivados dos aminoácidos glicina e fenilalanina

Na síntese do N-(3-bromopropanoil)glicinato de terc-butilo e do N-(3-bromopropanoil)fenilalaninato de terc-butilo, partiu-se do ácido 3-bromopropanóico a 97% da Merck (ref. 10,128-1, lote 07710PU-070) e do cloreto de glicinato de terc-butilo da Bachem (ref. E-1980, lote 0551557) ou do cloreto de fenilalaninato de terc-butilo da Bachem (ref. E-2255, lote 0546004). O solvente escolhido para estas sínteses foi diclorometano da Carlo Erba (ref. 02902E48, lote 07030501), destilado no laboratório sobre CaCl_2 (anidro) por destilação fraccionada. Para a neutralização dos aminoácidos de partida utilizaram-se soluções aquosas de carbonato de sódio a 30% da Fluka (ref. 2078388).

Para o acompanhamento das reacções, recorreu-se à técnica de cromatografia em camada fina (CCF), que possibilitou também a confirmação da pureza dos compostos preparados. Para tal, utilizaram-se placas de alumínio com 0,25 mm de espessura e recobertas com gel de sílica 60 F_{254} da Merck (ref. 105562) sensíveis à luz ultravioleta de comprimento de onda de 254 nm. Os cromatogramas de CCF foram revelados por irradiação com luz ultravioleta a 254 nm e por pulverização com uma solução de dicarboxidina, após exposição das placas a atmosfera de cloro em câmara apropriada para o efeito¹⁰⁷. As manchas reveladas por este método apresentavam uma coloração avermelhada, cuja intensidade dependia da concentração dos compostos que as originaram.

Para a purificação dos compostos sintetizados, utilizou-se a técnica de cromatografia de adsorção em coluna. Como fase estacionária utilizou-se sílica 60 A C-C (Chromagel) com granulometria 35-70 μm , $\text{pH} = 7$ e superfície mássica 550 $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ da SDS (ref. 2000044, lote 18650). O sistema de eluentes escolhido, quer para a CCF, quer para a cromatografia em coluna, foi sempre diclorometano/acetona 20:1 (proporção volumétrica).

Na síntese do N-(3-bromopropanoil)glicina e do N-(3-bromopropanoil)fenilalanina, a remoção dos grupos terc-butílicos dos ésteres precursores foi realizada por reacção com ácido trifluoracético da Merck (ref nº 808260) e a precipitação do produto realizada com éter etílico também da Merck (ref nº 100921).

2.1.3- Síntese dos derivados peptídicos do quitosano

Na síntese dos derivados peptídicos do quitosano, N-[2-(N'-carboximetil carbamoil)etil]quitosano, representado por $\text{Quit}\beta\text{Ala}\alpha\text{Gly}$, e N-{2-[N'-(1-carboxi-2-fenil)etilcarbamoil]etil}quitosano, representado por $\text{Quit}\beta\text{Ala}\alpha\text{Phe}$, utilizou-se quitosano de baixo peso molecular (150.000 Dalton) da Aldrich, (ref. 44,886-9, lote 07223CU) com 4,2 mmol em resíduos GlcNH_2/g de quitosano (valor obtido por titulação potenciométrica), hidrogenocarbonato de sódio da May & Baker Ltd, (lote H1318), e N-(3-bromopropanoil)glicina e N-(3-bromopropanoil)fenilalanina, sintetizados neste trabalho.

Os restantes reagentes e as membranas de diálise utilizadas foram semelhantes aos empregues nos estudos com os derivados CEQ.

2.1.4- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Para o traçado dos espectros de ressonância magnética nuclear protónica, foram preparadas amostras de $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ dos derivados CEQ1 a CEQ4, $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ do quitosano e derivado CEQ5, e $15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ dos derivados peptídicos do quitosano, dissolvidas em ácido clorídrico deuterado (DCl) diluído (1:1 em volume) em água deuterada (D_2O), ou em D_2O com uma gota de DCl, ambos da Aldrich (ref. 151882 e 543047, respectivamente). Como padrão interno do desvio químico foi utilizado o 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sódio (DSS) da Aldrich (ref. 17,883-7).

Para o traçado dos espectros de ressonância magnética protónica ($^1\text{H-RMN}$) e de carbono-13 ($^{13}\text{C-RMN}$) dos derivados dos aminoácidos glicina e fenilalanina, foram preparadas amostras de $15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, dissolvidas em clorofórmio deuterado (CDCl_3) no caso dos ésteres terciários, e em dimetilsulfóxido hexadeuterado (DMSO-d_6) no caso dos derivados $\text{N-(3-bromopropanoil)glicina}$ e $\text{N-(3-bromopropanoil)fenilalanina}$. O tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como padrão interno do desvio químico.

2.1.5- Titulações potenciométricas

Para as titulações potenciométricas do quitosano e derivados, foi preparada uma solução de hidróxido de potássio da Merck (ref. 109964), segundo o método descrito por Albert e Sergeant¹⁰⁸. Para a precipitação de carbonatos foi utilizado hidróxido de bário da Merck (ref. 101735). A coluna para a remoção do excesso de bário é empacotada com resina Amberlite IR 120H também da Merck (ref. 115131). Depois de preparada, a solução de hidróxido de potássio, livre de carbonatos, foi padronizada potenciométricamente contra ácido nítrico padrão $0,1000 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ da Merck (ref. 109964).

A célula potenciométrica de pH foi calibrada com soluções tampão, nomeadamente tampões de pH 4,008 e pH 6,865, com força iónica ajustada a $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ com nitrato de potássio da Merck (ref. 120.105063). Os padrões foram preparados com hidrogenofalato de potássio (ref. 33325), dihidrogenofosfato de potássio (ref. 30407) e hidrogenofosfato de sódio dodecaidratado (ref. 30427), todos da Riedel-de Haën.

Nos estudos de complexação de cobre(II), foi utilizada uma solução padrão de nitrato de cobre(II) $0,1000 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ da Orion (ref. 942906).

2.2- Equipamentos

Todas as pesagens foram efectuadas numa balança digital monoprato da Mettler Toledo AG 245. As medições de volumes foram realizadas com pipetas da marca Eppendorf e utilizou-se material volumétrico comum no laboratório.

As amostras de produto utilizadas para caracterização por ^1H -RMN, ^{13}C -RMN e análise elementar (AE), foram previamente colocadas a secar num pistão de vácuo da marca Gallenkamp.

2.2.1- Sínteses

Os derivados do quitosano foram purificados por diálise e posteriormente secos num liofilizador da marca B. Braun, modelo Christ Alpha 1-1.

Na síntese dos derivados dos aminoácidos, os solventes foram evaporados sob pressão reduzida, utilizando um evaporador rotativo Buchi B-159. Os cromatogramas de CCF foram revelados por irradiação com luz ultravioleta a 254 nm com uma lâmpada UVCN-6 da Vilben Lourmat.

2.2.2- Espectroscopia de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN

Os espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN foram realizados em Espanha, na *Rede de Infraestruturas de Apoio á Investigación e ao Desenvolvimento Tecnolóxico* (RIAIDT) da Universidade de Santiago de Compostela e traçados num espectrómetro Bruker AMX 300.

2.2.3- Análise elementar

A análise elementar (AE) para os derivados CEQ foi encomendada ao Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB) da Universidade Nova de Lisboa e realizada num analisador VarioEl.

A análise elementar dos derivados peptídicos do quitosano foi realizada em Espanha na *Rede de Infraestruturas de Apoio á Investigación e ao Desenvolvimento Tecnológico* (RIAIDT) da Universidade de Santiago de Compostela, num analisador Carlo Erba, modelo EA 1108.

2.2.4- Titulações potenciométricas

Nas titulações potenciométricas, com medição de pH, utilizou-se um sistema automático de titulação controlado por computador, constituído por uma bureta automática da marca Crison, modelo microBu 2030, equipada com uma seringa com capacidade para 10 mL e um decimilivoltímetro Crison, modelo micropH 2002. O sistema comportava ainda um vaso de parede dupla no interior da qual circulava água a $25,0 \pm 0,1$ °C, proveniente de um banho termostaticado, um agitador magnético Metrohm E 649 colocado sob o vaso de parede dupla, um eléctrodo de referência (de junção dupla Ag/AgCl) da Orion, modelo 90-02, e um eléctrodo de membrana de vidro da marca Russel, modelo SWL/S7.

2.2.5- Caloria diferencial de varrimento

As análises por calorimetria diferencial de varrimento (CDV) foram realizadas no Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP-IPP), num calorímetro diferencial de varrimento da marca Netzsch modelo CDV 204, equipado com um controlador TASC 414/3A. O

equipamento era controlado por computador através do software Netzsch CDV 204 Measurement, versão 3.4.

2.3- Procedimento Experimental

2.3.1- Síntese dos derivados CEQ

Foram sintetizados cinco derivados seguindo, no essencial, o procedimento desenvolvido por Skorik *et al.*⁵⁶. Para cada derivado preparado procurou-se, todavia, alterar as proporções dos reagentes quitosano e ácido 3-bromopropanóico e o número de vezes em que se realizou a adição do segundo, contribuindo para complementar o trabalho já desenvolvido e comprovar a reprodutibilidade do método de síntese.

Fez-se reagir quitosano (5,00 g, 27,0 mmol de N) e ácido 3-bromopropanóico nas proporções molares 1:1 para CEQ1, 1:2 para CEQ2, 1:4 para CEQ3, 1:9 para CEQ4 e 1:15 para CEQ5, em água (350 mL) a 60 °C, em meio alcalino moderado (pH = 8-9) ajustado com hidrogenocarbonato de sódio. As adições de ácido 3-bromopropanóico e hidrogenocarbonato de sódio foram feitas de três em três dias durante nove dias nas sínteses CEQ4 e CEQ5, durante seis dias nas sínteses do CEQ3 e de uma só vez, com um tempo de reacção de três dias, nas sínteses CEQ1 e CEQ2, como mostra a tabela 2.1.

Em todas as sínteses, teve-se o cuidado de se adicionar apenas um equivalente de base durante as primeiras cinco horas de reacção, para prevenir a precipitação prematura do quitosano. Só depois deste período foi adicionada a quantidade de hidrogenocarbonato necessária para elevar o pH para o intervalo pretendido (pH 8-9).

O produto obtido foi precipitado em etanol, filtrado e dissolvido em água (0,03 g de polímero/mL). Esta solução foi acidulada com HCl concentrado até pH 1-2, dialisada contra água desionizada durante sete dias e o produto liofilizado.

Tabela 2.1: Condições de reacção utilizadas nas sínteses dos derivados CEQ.

Síntese	Equivalentes de Reagente adicionado ^{a)}	Tempo/dias ^{b)}
CEQ1	1x1	3d
CEQ2	2x1	3d
CEQ3	2x2	3x2d
CEQ4	3x3	3x3d
CEQ5	5x3	3x3d

a) Razão molar ácido 3-bromopropanóico/resíduo de D-glucosamina x 1, 2 ou 3 vezes.

b) Número de adições de ácido x tempo intercalar de reacção da síntese.

2.3.2- Síntese dos derivados dos aminoácidos glicina e fenilalanina

2.3.2.1- Síntese do N-(3-bromopropanoil)glicinato de terc-butilo

Nesta síntese, procedeu-se à condensação do ácido 3-bromopropanóico com o glicinato de terc-butilo. Antes de iniciada a referida reacção, procedeu-se à neutralização do éster cloridratado, dissolvendo-o (8,6347 g; 51,507 mmol) numa solução de carbonato de sódio a 30% (125 mL). Após solubilização completa, a solução foi submetida a sete extracções com diclorometano (7 x 125 mL), sendo as fases orgânicas combinadas e secas por adição de sulfato de magnésio anidro. A solução foi filtrada por gravidade e o solvente evaporado a pressão reduzida no evaporador rotativo. O glicinato de terc-butilo foi obtido sob a forma de um óleo amarelo claro (4,8414 g; 36,907 mmol), sendo o rendimento da neutralização de 72%.

Dissolveu-se o produto anterior em diclorometano (200 mL) e a solução resultante foi arrefecida em banho de gelo e agitada magneticamente enquanto se adicionou ácido 3-bromopropanóico (5,6478 g; 36,907 mmol). Seguidamente, e de forma lenta, adicionou-se a diisopropilcarbodiimida (DIC) com um excesso de cerca 10% relativamente à quantidade estequiométrica (6,29 mL; 40,6 mmol). Após terminada a adição da carbodiimida, deixou-se a

mistura a reagir à temperatura ambiente, monitorizando o progresso da reacção por CCF. Passadas vinte e quatro horas após o início da reacção, adicionou-se mais um equivalente de DIC (5,72 mL, 36,9 mmol), também com adição lenta e com a mistura reaccional previamente arrefecida em banho de gelo. Deixou-se a mistura sob agitação magnética e à temperatura ambiente durante mais três dias. Os cromatogramas de CCF evidenciaram a presença de quatro manchas com os seguintes valores de R_f : 0,01 (glicinato de terc-butilo), 0,10 (diisopropilureia), 0,45 (produto principal) e 0,81 (DIC).

A mistura reaccional foi filtrada a pressão reduzida para remoção do precipitado branco formado, correspondente a diisopropilureia (DIU). O filtrado foi levado à secura no evaporador rotativo, obtendo-se um óleo amarelo escuro, que depois de solubilizado num volume mínimo de acetona, foi armazenado a 0 °C durante doze horas. Ao fim deste período, e tendo sido verificada a formação de mais precipitado (DIU), procedeu-se a uma nova filtração. O filtrado, depois de evaporado, resultou novamente num óleo amarelo escuro que, por CCF, revelou a presença das mesmas manchas observadas durante o processo de síntese, sendo a mancha de $R_f = 0,10$, referente a DIU, de muito fraca intensidade.

Submeteu-se esta mistura a uma separação cromatográfica em coluna acompanhada por CCF, usando como eluente diclorometano/acetona (20:1 V/V). Por evaporação das fracções que continham o produto principal cromatograficamente homogéneo, obteve-se o N-(3-bromopropanoil)glicinato de terc-butilo (6,9505 g; 26,117 mmol; η 71%), que se apresentou sob a forma de um óleo incolor. (δ_H /ppm; $CDCl_3$; 300 MHz): 1,46 (s, 9H, $-COO(CH_3)_3$), 2,81 (t, 2H, $J=6,67$ Hz, $BrCH_2CH_2CO-$), 3,62 (t, 2H, $J=6,67$ Hz, $BrCH_2CH_2CO-$), 3,95 (d, 2H, $J=4,97$ Hz, $-CONHCH_2CO-$), 6,19 (m, 1H, $-CONHCH_2-$); (δ_C /ppm; $CDCl_3$; 75 MHz): 27,35 ($BrCH_2-$), 28,46 ($-COOC(CH_3)_3$), 39,80 ($BrCH_2CH_2CO-$), 42,55 ($-NHCH_2CO-$), 82,96 ($-COOC(CH_3)_3$), 169,32 e 170,01 ($-CONHCH_2CO-$).

2.3.2.2- Síntese do N-(3-bromopropanoil)fenilalaninato de terc-butilo

Neste caso, procedeu-se à condensação do ácido 3-bromopropanóico com o fenilalaninato de terc-butilo.

O cloreto de fenilalaninato de terc-butilo foi submetido a neutralização prévia, dissolvendo-se (8,6831 g, 33,687 mmol) numa solução aquosa de carbonato de sódio 30% (125 mL). Após solubilização completa, a solução foi submetida a cinco extracções com diclorometano (5 x 125 mL), sendo as fases orgânicas combinadas e secas por adição de sulfato de magnésio anidro. A solução foi submetida a filtração por gravidade e o filtrado evaporado sob pressão reduzida. O fenilalaninato de terc-butilo foi obtido sob a forma de um óleo amarelo escuro (6,5367 g; 29,538 mmol). O rendimento da neutralização foi de 87%.

O óleo obtido foi dissolvido em diclorometano (200 mL) e a solução resultante arrefecida em banho de gelo. Sob agitação magnética, adicionou-se o ácido 3-bromopropanóico (4,5187 g, 29,538 mmol) e, muito lentamente, a dicitloexilcarbodiimida (DCC) com um excesso de 10% relativamente à quantidade estequiométrica (4,1996 g). Após terminada a adição da DCC, deixou-se a mistura a reagir à temperatura ambiente, monitorizando a evolução da reacção por CCF. Passadas vinte e quatro horas após o início da reacção, adicionou-se mais um equivalente de DCC (3,8178 g), também com adição lenta e com a mistura reaccional previamente arrefecida em banho de gelo. Deixou-se a mistura sob agitação magnética e à temperatura ambiente durante mais três dias.

A mistura reaccional foi submetida a filtração sob pressão reduzida para remoção do precipitado branco formado, correspondente a dicitloexilureia (DCU). O filtrado foi levado à secura no evaporador rotativo, obtendo-se um óleo amarelo escuro, que foi de seguida solubilizado num volume mínimo de acetona e armazenado a 0 °C durante doze horas. Ao fim deste período, e tendo sido verificada a formação de mais precipitado (DCU), voltou-se a filtrar a mistura. O filtrado, depois de evaporado, resultou novamente num óleo amarelo escuro que, por CCF, revelou a presença de seis manchas com os seguintes valores de R_f : 0,025 (fenilalaninato de terc-butilo), 0,15 (DCC), 0,39 (produto secundário), 0,51 (produto principal), 0,64 (produto secundário), 0,72 (DCU). As manchas referentes a DCU e aos dois produtos secundários eram pouco intensas.

Submeteu-se esta mistura a uma separação cromatográfica em coluna acompanhada por CCF, usando como eluente diclorometano/acetona (20:1 V/V). Por evaporação das fracções que continham o produto principal homogéneo, obteve-se o N-(3-bromopropanoil)fenilalaninato de terc-butilo (8,1895 g; 22,989 mmol; η 78%), que se apresentou como um óleo incolor. ($\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$; CDCl_3 ; 300 MHz): 1,45 (s, 9H, $-\text{COO}(\text{C}\underline{\text{H}}_3)_3$), 2,80 (m, 2H, $\text{BrCH}_2\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{CO}-$), 3,14 (d, 2H, $J=5,95$ Hz; $-\text{CH}(\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{Ph})$), 3,63 (m, 2H, $\text{BrC}\underline{\text{H}}_2\text{CH}_2\text{CO}-$), 4,82 (dd, 1H, $J=5,98$ Hz e 7,54 Hz; $-\text{NHCH}-$), 6,19 (d, 1H, $J=7,30$ Hz; $-\text{CONHCH}-$), 7,26 (m, 5H, $-\text{C}_6\text{H}_5$); ($\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$; CDCl_3 ; 75 MHz): 26,9 ($\text{BrC}\underline{\text{H}}_2-$), 27,9 ($-\text{COOC}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 38,0 ($-\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph})$), 39,5 ($\text{BrCH}_2\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{CO}-$), 53,6 ($-\text{NHCH}-$), 82,5 ($-\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$), 126,9; 128,3; 129,5; 135,9 ($-\underline{\text{C}}_6\text{H}_5$), 169,9 e 170,5 ($-\underline{\text{C}}\text{ONH}-$ e $-\underline{\text{C}}\text{OO}-$).

2.3.2.3- Remoção dos grupos terc-butilo por acidólise com ácido trifluoracético anidro.

Nesta síntese procedeu-se à remoção do grupo terc-butilo dos ésteres N-(3-bromopropanoil)glicinato de terc-butilo e N-(3-bromopropanoil)fenilalaninato de terc-butilo.

Fez-se reagir o N-(3-bromopropanoil)glicinato de terc-butilo (6,9402 g, 26,078 mmol) ou N-(3-bromopropanoil)fenilalaninato de terc-butilo (7,9968 g, 22,447 mmol), com um excesso de ácido trifluoracético (TFA) anidro (8,0 mL) durante vinte e quatro horas, à temperatura ambiente e sob agitação magnética. Após este período, adicionou-se éter etílico à solução, tendo-se verificado a formação de um precipitado branco nos dois casos. As misturas foram filtradas a pressão reduzida, e os sólidos resultantes foram secos em exsiccador de vácuo e posteriormente identificados como sendo os compostos esperados: N-(3-bromopropanoil)glicina (4,6935 g, 22,347 mmol; p.f. 135-137 °C; η 86%) e N-(3-bromopropanoil)fenilalanina (5,2595 g, 17,523 mmol; p.f. 127-130 °C; η 78%).

N-(3-bromopropanoil)glicina: ($\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$; DMSO- d_6 ; 300 MHz): 2,76 (t, 2H, $J=6,48$ Hz, $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$), 3,63 (t, 2H, $J=6,49$ Hz, $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$), 3,77 (d, 2H, $J=5,79$ Hz, $-\text{NHCH}_2\text{COOH}$), 8,33 (m, 1H, $-\text{NHCH}_2\text{COOH}$); ($\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$; DMSO- d_6 ; 75 MHz): 29,0 (BrCH_2-), 38,1 ($\text{BrCH}_2\text{CH}_2-$), 40,5 ($-\text{NHCH}_2-$), 169,4 e 171,0 ($-\text{CONHCH}_2\text{COOH}$).

N-(3-bromopropanoil)fenilalanina: ($\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$; DMSO- d_6 ; 300 MHz): 2,70 (td, 2H, $J=5,8$ Hz, 6,6 Hz e 13 Hz; $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$), 2,87 (dd, 1H, $J=4,9\text{Hz}$ e 13,5 Hz, $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{Ph})$) e 3,05 (dd, 1H, $J=4,8\text{Hz}$ e 13,7 Hz, $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{Ph})$), 3,53 (td, 2H, $J=5,4\text{Hz}$, 6,4 Hz e 12,9 Hz; $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$), 4,45 (td, 1H, $J=5,0$ Hz, 5,1 Hz e 7,9 Hz; $-\text{NHCH}-$), 7,23 (m, 5H, $-\text{C}_6\text{H}_5$), 8,35 (d, 1H, $J=7,9$ Hz; $-\text{NHCH}-$); ($\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$; DMSO- d_6 ; 75 MHz): 28,9 (BrCH_2-); 36,8 ($-\text{CH}(\text{CH}_2\text{Ph})$); 38,0 ($\text{BrCH}_2\text{CH}_2-$); 53,4 ($-\text{CH}(\text{CH}_2\text{Ph})$); 126,3; 128,1; 129,0 e 137,4 ($-\text{C}_6\text{H}_5$); 169,0 e 172,7 ($-\text{CONH}-$ e $-\text{COOH}$).

2.3.3- Síntese dos derivados peptídicos do quitosano

2.3.3.1- Síntese do Quit β Ala α Gly

Dissolveu-se quitosano (0,1435 g, 0,6027 mmol GlcNH_2) e N-(3-bromopropanoil)glicina (0,2345 g, 1,202 mmol) em água (10 mL). Após solubilização completa dos reagentes, adicionou-se um equivalente de hidrogenocarbonato de sódio e verificou-se o pH da mistura (pH 5-6). A mistura resultante ficou sob agitação magnética em banho termostatizado a 60 °C durante uma hora para solubilização da base. Após este período, realizou-se uma nova adição de meio equivalente de NaHCO_3 , verificou-se o pH da mistura reaccional (pH 6-7) e deixou-se esta em agitação no banho a 60 °C durante mais vinte e três horas. Passado esse período, o pH da mistura reaccional baixou novamente (pH 5-6), sendo corrigido com adição de meio equivalente de base (pH 6-7). Estas adições foram realizadas diariamente durante seis dias, ao fim dos quais já não se observava alteração significativa do pH da solução. Adicionou-se, então, mais um equivalente de base, observando-se a subida de

pH (8-9). A mistura ficou em reacção por mais vinte e quatro horas, antes de ser dada por concluída a reacção (perfazendo um total de oito dias de reacção).

O produto foi precipitado em etanol, filtrado e dissolvido na quantidade mínima de água. A solução resultante foi acidulada com HCl concentrado até pH 1-2, dialisada contra água desionizada durante sete dias. A solução dialisada foi liofilizada, obtendo-se o Quit β Ala α Gly.

2.3.3.2- Síntese do Quit β Ala α Phe

Dissolveu-se N-(3-bromopropanoil)fenilalanina (0,4062 g, 1,353 mmol) e quitosano (0,1607 g, 0,6749 mmol GlcNH₂) numa mistura água/metanol 1:1 em volume (10 mL). Após solubilização completa dos reagentes, adicionou-se um equivalente de NaHCO₃ e verificou-se o pH da mistura (pH 5-6). A mistura resultante ficou sob agitação magnética em banho termostatizado a 60 °C durante uma hora para solubilização da base. Após este período, realizou-se uma nova adição de meio equivalente de NaHCO₃, e deixou-se a mistura em agitação no banho a 60 °C durante mais vinte e três horas. Passado esse período, o pH da mistura reaccional baixou novamente (pH 4-5), sendo corrigido com adição de meio equivalente de NaHCO₃ (pH 5-6). Estas adições foram realizadas de dois em dois dias até ao décimo dia de reacção. Não havendo ocorrido alteração do pH passados quatro dias (décimo quarto dia de reacção), foi concluída a reacção.

O produto foi precipitado em etanol, filtrado e dissolvido na quantidade mínima de água. A solução resultante foi acidulada com HCl concentrado até pH 1-2, dialisada contra água desionizada durante sete dias. A solução dialisada foi liofilizada obtendo-se o Quit β Ala α Phe.

2.3.4- Titulações potenciométricas

2.3.4.1- Preparação da solução de hidróxido de potássio isenta de carbonatos

A preparação da solução de hidróxido de potássio para as titulações potenciométricas foi realizada segundo o procedimento seguido por Albert e Serjeant¹⁰⁸. Preparou-se uma solução mista de hidróxido de potássio $9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e hidróxido de bário $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para promover a precipitação do carbonato sob a forma de carbonato de bário. Esta solução foi agitada numa garrafa plástica, selada com uma tampa, através da qual foi adaptada uma entrada para azoto de modo a manter uma atmosfera livre de CO_2 e um tubo de escoamento adaptado com uma torneira. Depois da agitação, a garrafa é invertida e deixada em repouso até precipitação completa do carbonato de bário. Posteriormente, a garrafa é ligada a uma coluna de PVC contendo resina Amberlite IR 120H, previamente tratada com ácido clorídrico e cloreto de potássio. Através da abertura da torneira, a solução é passada pela resina, para a remoção do excesso de bário da solução, sempre numa atmosfera inerte. Depois de rejeitados os primeiros 100 mL, o hidróxido de potássio é recolhido numa garrafa plástica saturada com N_2 , vedada com tampa e ligada à saída da coluna através de um tubo. Depois de completamente cheia com a base, é ligada através da mesma tampa à bureta de modo a preservar a atmosfera livre de CO_2 .

2.3.4.2- Titulações potenciométricas

Foram preparadas soluções de aproximadamente $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ dos derivados CEQ, $0,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ do derivado $\text{Quit}\beta\text{Ala}\alpha\text{Gly}$ e $0,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ do derivado $\text{Quit}\beta\text{Ala}\alpha\text{Phe}$, dissolvendo uma certa massa de cada um dos polímeros num excesso conhecido de ácido nítrico $0,1000 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, igual para todas as titulações e necessário para promover uma completa protonação dos derivados. Após solubilização, adicionou-se uma quantidade necessária de nitrato de potássio e completou-se o volume até 25 mL com água desionizada de modo a ajustar a força iónica da solução para

0,1 mol·L⁻¹ em KNO₃. Essas soluções foram tituladas com uma solução de KOH 0,1 mol·L⁻¹ previamente preparada e padronizada, sob atmosfera de azoto a 25,0 ± 0,1 °C.

Antes da realização das titulações, o sistema potenciométrico foi calibrado com soluções tampão de pH=4,008 e pH=6,865, segundo o método descrito por Vasconcelos e Machado¹⁰⁹.

Para os estudos de complexação com cobre (II), foram realizadas titulações ácido-base de soluções ácidas dos derivados CEQ1, CEQ3, CEQ4, QuitβAlaαGly e QuitβAlaαPhe com cobre (II), utilizando diferentes razões molares Cu(II)/derivado, compreendidas entre 0 e 2.

Após a obtenção dos resultados experimentais, estes foram sujeitos a tratamento computacional de modo a ser possível obter os valores das constantes de protonação e complexação com cobre (II). Estes cálculos foram realizados através do programa HYPERQUAD^{110, 111} que utiliza métodos de regressão não linear para efectuar a minimização da soma do quadrado dos resíduos $\sum \omega_i (E_{\text{calc}} - E_{\text{exp}})^2$, em que E_{calc} e E_{exp} são, respectivamente, a força electromotriz calculada e a experimental, e ω_i é o peso associado a cada um dos pontos experimentais. Este programa determinou também a variância associada a cada um dos pontos experimentais através da equação $\sigma^2 = \sigma_E^2 + (dE/dV)^2 \times \sigma_V^2$ em que σ^2 é a variância da medição, σ_E^2 e σ_V^2 são as variâncias estimadas das leituras de potencial e de volume, e a variável (dE/dV) representa o declive da curva de titulação, que permite atribuir um peso diferente a cada ponto experimental.

Os valores das constantes de equilíbrio obtidos com este programa foram sempre acompanhados de dois parâmetros estatísticos, χ^2 (qui quadrado) baseado nos resíduos calculados e σ (desvio padrão do ensaio), os quais dependiam do número de pontos experimentais utilizados e do número de parâmetros a otimizar.

2.3.5- Calorimetria diferencial de varrimento

Massas rigorosas dos derivados CEQ foram colocadas em cápsulas de alumínio apropriadas (da Netzsch) e seladas. As condições experimentais consistiram no aquecimento da amostra

em atmosfera de azoto ($20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) desde a temperatura ambiente até $500 \text{ }^\circ\text{C}$ com um gradiente de $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

A calibração do sistema (temperatura e sensibilidade) foi efectuada de acordo com um procedimento sugerido pela Netzsch, que consiste na utilização de um conjunto de seis padrões (mercúrio, índio, estanho, bismuto, zinco e cloreto de cézio).

Os resultados analíticos foram tratados no programa TA Analysis versão 3.4, também da Netzsch.

CAPÍTULO

3

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO
DE DERIVADOS DO QUITOSANO**

N-(2-CARBOXIETIL)QUITOSANO

N-[2-(N²-CARBOXIMETILCARBAMOIL)ETIL]QUITOSANO

N-{2-[N²-(1-CARBOXI-2-FENIL)ETILCARBAMOIL]ETIL} QUITOSANO

3.1

DERIVADOS

N-(2-CARBOXIETIL)QUITOSANO

3.1- Derivados N-(2-carboxietil)quitosano

No presente estudo, procedeu-se à síntese dos derivados N-(2-carboxietil)quitosano, utilizando diferentes proporções ácido 3-bromopropanóico/quitosano e diferentes tempos de reacção. Este procedimento teve como objectivo complementar um trabalho de síntese recentemente realizado⁵⁶, e visava a obtenção de derivados com diferentes graus de substituição.

Nos estudos anteriormente realizados, foi verificado que o aumento da proporção ácido 3-bromopropanóico/quitosano favorece a obtenção de derivados mais substituídos. Verificou-se também que, independentemente da proporção utilizada, a velocidade da carboxialquilação diminui consideravelmente a partir do segundo dia de reacção. Este comportamento é resultante da competição entre a reacção de substituição nucleófila que produz os derivados CEQ, e a reacção de eliminação sofrida pelo ácido 3-bromopropanóico dando origem a ácido acrílico. Tendo em conta estas observações, neste trabalho foram sintetizados derivados N-(2-carboxietil)quitosano com diferentes graus de substituição, recorrendo a adições de equivalentes de ácido 3-bromopropanóico de três em três dias, com um tempo de reacção máximo de nove dias.

As condições utilizadas na síntese dos derivados CEQ podem ser resumidas no esquema apresentado na figura 3.1.

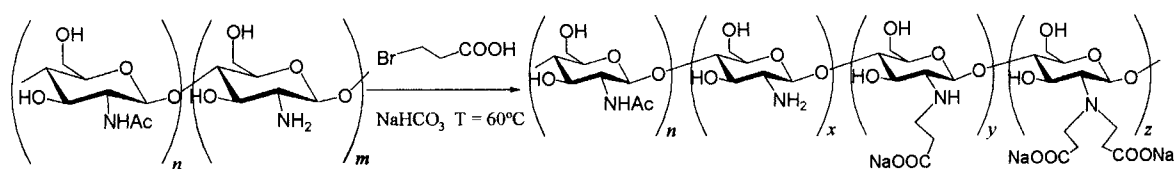


Figura 3.1: Reacção de N-carboxialquilação do quitosano pelo ácido 3-bromopropanóico.

3.1.1- Caracterização dos derivados

A estrutura química dos polímeros sintetizados foi determinada por espectroscopia de ressonância magnética protónica ($^1\text{H-RMN}$). Os derivados CEQ foram ainda quantitativamente caracterizados em termos de grau de substituição (GS) e grau de acetilação (GA). O GS dá-nos o valor da extensão da introdução de grupos carboxietilo nas unidades monoméricas de D-glucosamina, sendo calculado através da utilização das técnicas de $^1\text{H-RMN}$, AE e potenciometria com eléctrodo selectivo ao protão (PESH). O GA foi calculado a partir dos espectros de $^1\text{H-RMN}$ e representa a fracção de grupos acetilo nas unidades monoméricas dos derivados, provenientes da incompleta desacetilação do quitosano. Foi ainda realizado um estudo térmico preliminar dos derivados CEQ utilizando a técnica de calorimetria diferencial de varrimento (CDV).

3.1.1.1- Espectroscopia de $^1\text{H-RMN}$

Os espectros de $^1\text{H-RMN}$ do quitosano utilizado nas sínteses e dos derivados CEQ sintetizados são interpretados segundo a estrutura química das unidades monoméricas dos derivados, esquematizadas na figura 3.2, e são apresentados nas figuras 3.3 a 3.8.

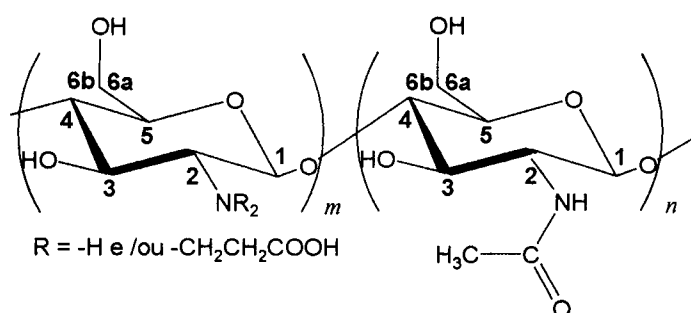


Figura 3.2: Esquema geral de uma unidade monomérica dos derivados N-(2-carboxietil)quitosano, com o respectivo sistema de numeração dos átomos de hidrogénio. Na figura, R poderá tratar-se de um átomo de H e/ou um grupo carboxietilo ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), dependendo do GS do derivado.

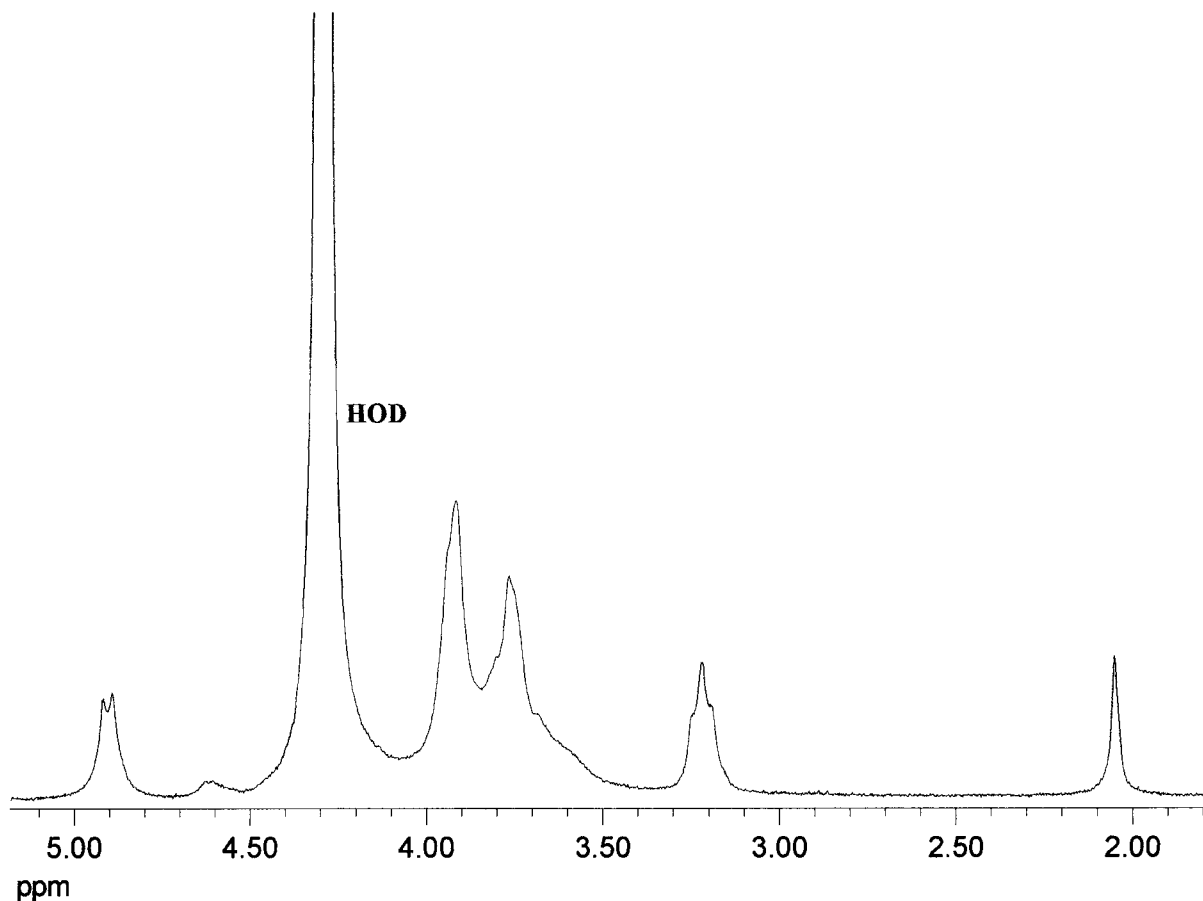


Figura 3.3: Espectro de ^1H -RMN (300 MHz) do quitosano em DCl 1% em D_2O . (δ/ppm): 2,05 (s, 0,34H, $-\text{CH}_3$ de GlcNHAc); 3,22 (m, 1,01H, H-2 de GlcNH $_2$); 3,47 – 4,06 (m, \approx 5,61H, H-2 de GlcNHAc e H-3, 4, 5, 6a e 6b de GlcNH $_2$ e GlcNHAc); 4,62 (m; \approx 0,12H; H-1 de GlcNHAc), 4,90 (d, 1,00H, H-1 do GlcNH $_2$)

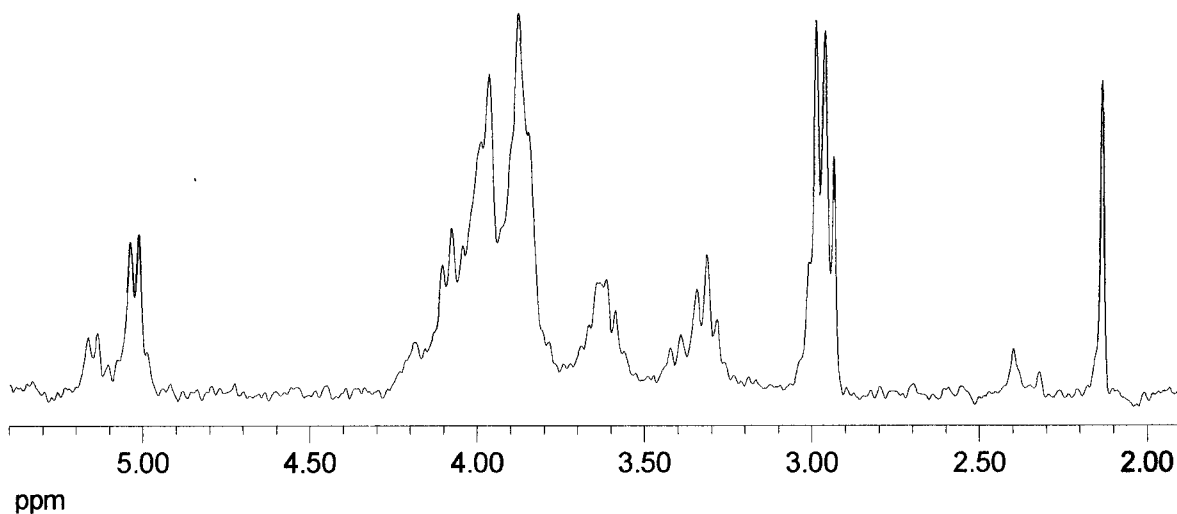


Figura 3.4: Espectro de ^1H -RMN (300 MHz) do CEQ1 em $\text{D}_2\text{O}:\text{DCl}=1:1$ (δ/ppm): 2,11 (s, 0,32H, $-\text{CH}_3$ de GlcNHAc); 2,97 (m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ de GlcNHR, sobreposição com sinais dos prótons da referência DSS utilizada); 3,20 – 3,45 (m, 0,97H, H-2 de GlcNH $_2$ e H-2 de GlcNHR); 3,46 – 4,30 (m, 6,05H, H-3, 4, 5, 6a, 6b, $-\text{NCH}_2-$ de GlcNHR, H-2 de GlcNHAc), 5,00 (d, 0,73H, H-1 do GlcNH $_2$), 5,13 (d, 0,27H, H-1 de GlcNHR).

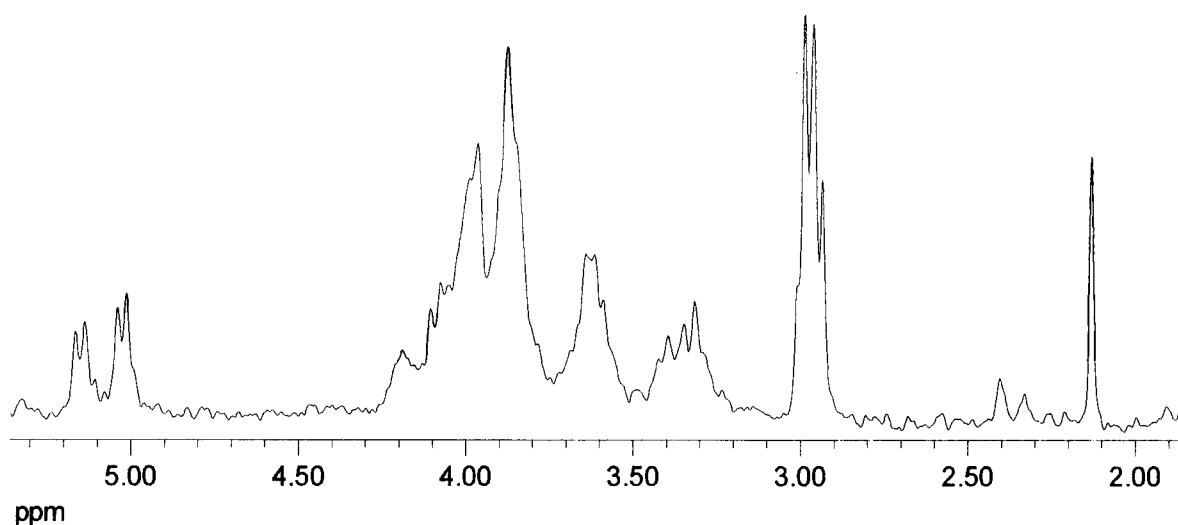


Figura 3.5: Espectro de ^1H -RMN (300 MHz) do CEQ2 em $\text{D}_2\text{O}:\text{DCI}=1:1$ (δ/ppm): 2,13 (s, 0,32H, $-\text{CH}_3$ de GlcNHAc); 2,97 (m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ de GlcNHR sobreposição com sinais dos prótons da referência DSS); 3,20 – 3,48 (m, 0,96H, H-2 de GlcNH₂ e H-2 de GlcNHR); 3,48 – 4,30 (m, 6,14H, H-3, 4, 5, 6a, 6b, $-\text{NCH}_2-$ de GlcNHR, H-2 de GlcNHAc), 5,03 (d, 0,57H, H-1 do GlcNH₂), 5,15 (d, 0,43H, H-1 de GlcNHR).

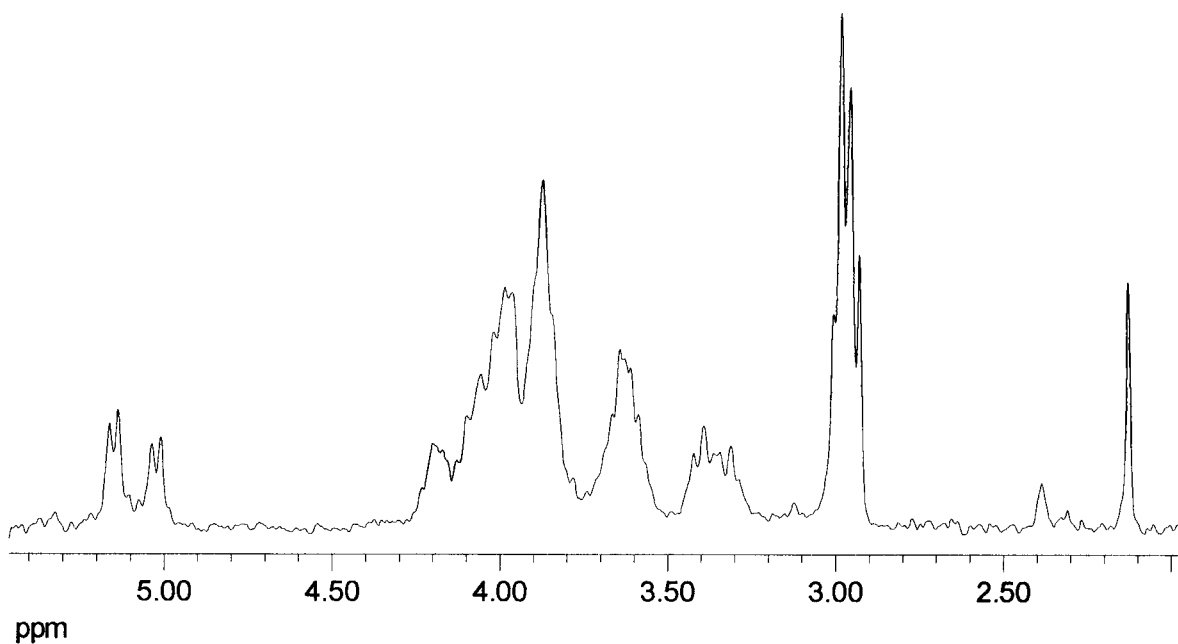


Figura 3.6: Espectro de ^1H -RMN (300 MHz) do CEQ3 em $\text{D}_2\text{O}:\text{DCI}=1:1$ (δ/ppm): 2,13 (s, 0,32H, $-\text{CH}_3$ de GlcNHAc); 2,96 (m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ de GlcNHR sobreposição com sinais dos prótons da referência DSS); 3,26 – 3,48 (m, 1,02H, H-2 de GlcNH₂ e H-2 de GlcNHR); 3,51 – 4,24 (m, 6,87H, H-3, 4, 5, 6a, 6b, $-\text{NCH}_2-$ de GlcNHR, H-2 de GlcNHAc), 5,02 (d, 0,44H, H-1 do GlcNH₂), 5,15 (d, 0,56H, H-1 de GlcNHR).

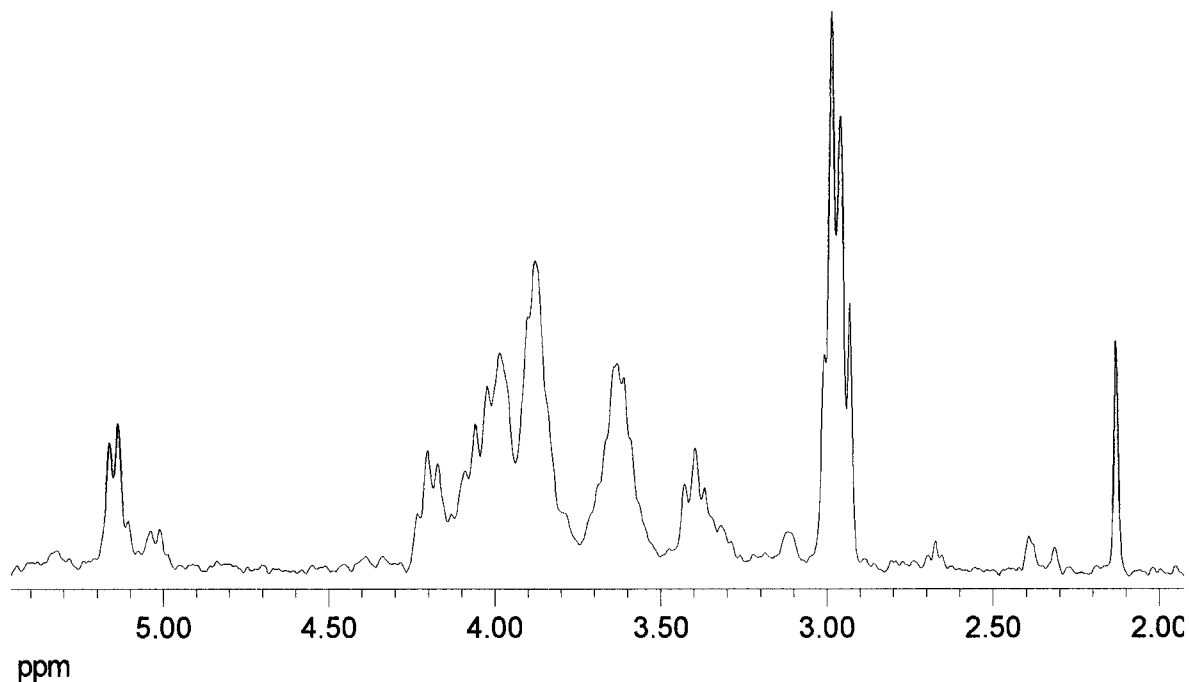


Figura 3.7: Espectro de ^1H -RMN (300 MHz) do CEQ4 em $\text{D}_2\text{O}:\text{DCI}=1:1$ (δ/ppm): 2,13 (s, 0,32H, $-\text{CH}_3$ de GlcNHAc); 2,97 (m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ de GlcNHR, sobreposição com sinais dos prótons da referência DSS); 3,11 (d, 0,16H; $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ de GlcNR₂); 3,24 – 3,46 (m, 1,01H, H-2 de GlcNH₂, GlcNHR e GlcNR₂); 3,49 – 4,25 (m, 7,10H, H-3, 4, 5, 6a, 6b, $-\text{NCH}_2-$ de GlcNHR e GlcNR₂, H-2 de GlcNHAc), 5,02 (d, 0,21H, H-1 de GlcNH₂), 5,15 (d, 0,73H, H-1 de GlcNHR); 5,33 (m, 0,06H, H-1 de GlcNR₂).

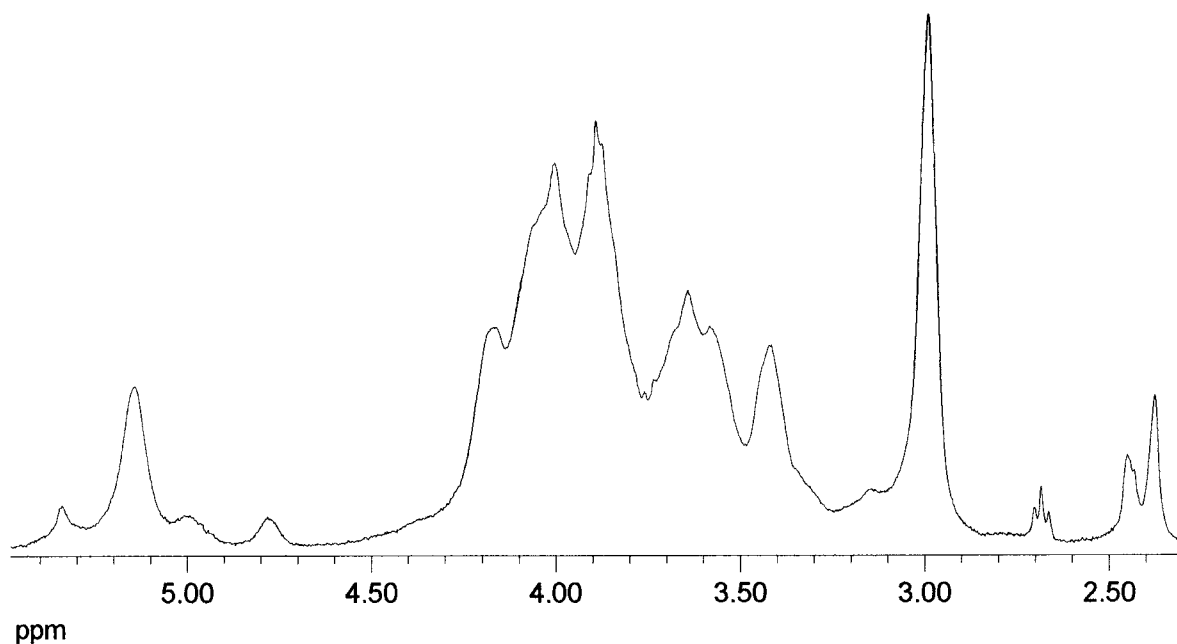


Figura 3.8: Espectro de ^1H -RMN (300 MHz) do CEQ5 em $\text{D}_2\text{O}:\text{DCI}=1:1$ (δ/ppm): 2,37-2,45 (m, 0,32H, $-\text{CH}_3$ de GlcNHAc); 2,99 (m, $\approx 1,27\text{H}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ de GlcNHR); 3,14 (m, $\approx 0,35\text{H}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ de GlcNR₂); 3,24 – 4,50 (m, 7,96H, H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b, $-\text{NCH}_2-$ de GlcNHR e GlcNR₂), 4,78 (m, 0,11H, H-1 do GlcNHAc), 5,00 (m, $\approx 0,18\text{H}$, H-1 de GlcNH₂); 5,14 (m, $\approx 0,64\text{H}$, H-1 de GlcNHR); 5,34 (m, $\approx 0,18\text{H}$, H-1 de GlcNR₂).

A partir da análise dos espectros de ^1H -RMN dos derivados CEQ1 a CEQ3, observa-se a existência de dois dupletos correspondentes ao próton ligado ao carbono 1, H-1, com $\delta = 5,00$ ppm e $\delta = 5,13$ ppm no caso do CEQ1, os quais resultam da presença de duas unidades monoméricas distintas no polímero, nomeadamente GlcNH_2 e GlcNHR ($\text{R} = -\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$). No caso do derivado CEQ5, observa-se a presença de um terceiro sinal com $\delta = 5,34$ ppm, que corresponde à ressonância do próton H-1 de uma unidade monomérica dissubstituída GlcNR_2 . Este sinal, embora pouco intenso, é já detectável a $\delta = 5,33$ ppm para o derivado CEQ4. A presença de unidades GlcNR_2 neste derivado pode ainda ser confirmada pelo sinal a $\delta = 3,11$ ppm, que é devido a prótons $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ numa unidade monomérica dissubstituída.

O sinal correspondente aos prótons $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ pode ser observado a $\delta \approx 3,00$ ppm para todos os derivados. Todavia, nos espectros dos derivados CEQ1 a CEQ4, este sinal encontra-se sobreposto com um dos sinais característicos do 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sódio (DSS), padrão interno utilizado nas análises. Aliás, nos mesmos espectros, foram também observados os restantes sinais característicos dos grupos $-\text{CH}_2-$ do DSS a $\delta \approx 0,6-0,7$ ppm, $\delta \approx 1,5-1,7$ ppm e $\delta \approx 2,7-3,0$ ppm¹¹². O aparecimento destes sinais deveu-se à utilização de quantidade excessiva de padrão interno, relativamente à amostra. Para o derivado CEQ5, foi otimizada a quantidade de DSS e aumentada a concentração do polímero, o que acabou por produzir espectros menos definidos devido ao aumento da viscosidade da solução.

Apesar dos problemas apontados relativamente à resolução dos espectros de ^1H -RMN, foi possível determinar a estrutura dos derivados sintetizados. De um modo geral, os espectros obtidos encontram-se semelhantes aos anteriormente descritos na literatura⁵⁶, o que confirmou a reprodutibilidade do método de síntese, no que diz respeito à regioselectividade da carboxialquilação do quitosano nas condições experimentais utilizadas.

Os integrais dos sinais dos espectros de ^1H -RMN foram calculados considerando como padrão os integrais dos sinais de ressonância dos prótons H-1 [$\text{I}(\text{H}-1)$] de unidades GlcNH_2 e GlcNHR . O valor do GA foi determinado a partir do integral relativo do sinal de ressonância dos prótons do grupo metilo [$\text{I}(-\text{CH}_3)$] das unidades GlcNHAc ¹¹³. Para este cálculo foi utilizada a equação (3.1):

$$GA = \frac{\frac{I(-CH_3)_{GlcNHAc}}{3}}{\frac{I(-CH_3)_{GlcNHAc}}{3} + I(H-1)_{GlcNH_2 \text{ e } GlcNHR}} \quad (3.1)$$

Após o cálculo do GA, e utilizando os valores dos integrais dos prótons H-1 das unidades GlcNH₂, GlcNHR e GlcNR₂, foi possível calcular o valor dos coeficientes *n*, *x*, *y* e *z* de acordo com o esquema da figura 3.1. Estes coeficientes correspondem às fracções das unidades GlcNHAc, GlcNH₂, GlcNHR e GlcNR₂, respectivamente. Assim sendo, o GA pode ser obtido a partir da equação:

$$GA = \frac{n}{n + x + y + z} \quad (3.2)$$

Para o cálculo do GS foi utilizada a equação:

$$GS = \frac{y + 2z}{x + y + z} \quad (3.3)$$

Os valores obtidos para o GS e GA para todos os derivados CEQ encontram-se compilados na tabela 3.1.

Como se pode observar, não houve alteração do GA dos polímeros durante a reacção (GA = 0,10). Com efeito, não seria de esperar que o meio alcalino moderado utilizado nas reacções de síntese promovesse a desacetilação do polímero.

Observou-se também que o GS aumentou com a crescente proporção ácido 3-bromopropanóico/quitosano. De facto, a adição do ácido foi também um factor preponderante na eficácia da reacção de substituição, logo, no GS resultante.

3.1.1.2- Análise elementar

A análise elementar foi utilizada neste trabalho como um método adicional de determinação do GS dos derivados CEQ. O cálculo foi realizado a partir dos resultados experimentais das percentagens de carbono e azoto das amostras, utilizando a seguinte equação:

$$GS = \frac{\Delta_{C/N}}{3 \times M_{C/N} \times (1 - GA)} \quad (3.4)$$

em que $\Delta_{C/N}$ representa a diferença entre as razões das percentagens de carbono e azoto obtidas para cada derivados CEQ e para o quitosano,

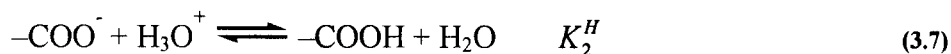
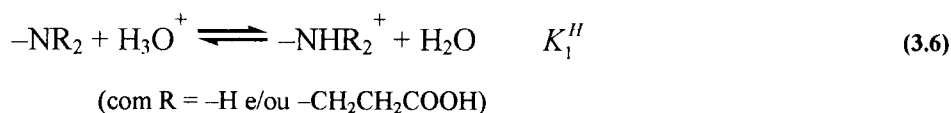
$$\Delta_{C/N} = \left(\frac{\%C}{\%N} \right)_{CEQ} - \left(\frac{\%C}{\%N} \right)_{QUITOSANO} \quad (3.5)$$

e $M_{C/N}$ representa a razão entre as massas molares do carbono e do azoto. Nesta expressão (3.4) foi utilizado o valor de 0,10 para o GA, obtido a partir dos resultados da análise por $^1\text{H-RMN}$.

Na tabela 3.1 são apresentados os resultados obtidos por AE para o quitosano e derivados CEQ sintetizados. Verifica-se uma boa concordância entre estes valores e os obtidos a partir dos sinais dos espectros de $^1\text{H-RMN}$.

3.1.1.3- Propriedades ácido-base

As propriedades ácido-base dos derivados CEQ sintetizados são controladas pelos grupos amino e carboxílico, que conferem a estes polímeros propriedades anfipróticas. Em solução aquosa devem ser considerados os dois equilíbrios seguintes:



Devido ao seu carácter zwitteriónico, estes derivados são solúveis em meio muito ácido ou muito alcalino, precipitando a um determinado pH correspondente ao seu ponto isoelectrico, o qual vai depender do GS. Este comportamento torna-se mais evidente para os derivados com GS próximo de 1.

Para estudar o comportamento ácido-base dos derivados sintetizados, efectuaram-se titulações potenciométricas com eléctrodo selectivo ao catião H^+ . As curvas de titulação (pH vs grau de neutralização) para estes derivados e para o quitosano são apresentadas na figura 3.9. O grau de neutralização é definido como:

$$\alpha = \frac{n(OH^-_{ad}) - n(H^+_{exc})}{n(H^+_{der\ GS=1})} \quad (3.8)$$

em que $n(OH^-_{ad})$ é o nº de moles de base (titulante) adicionado, $n(H^+_{exc})$ é o nº de moles de ácido (HNO_3) previamente adicionado na preparação da amostra e $n(H^+_{der\ GS=1})$ é o número de moles de grupos ácidos presentes no polímero, considerando-o monossubstituído. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 3.1.

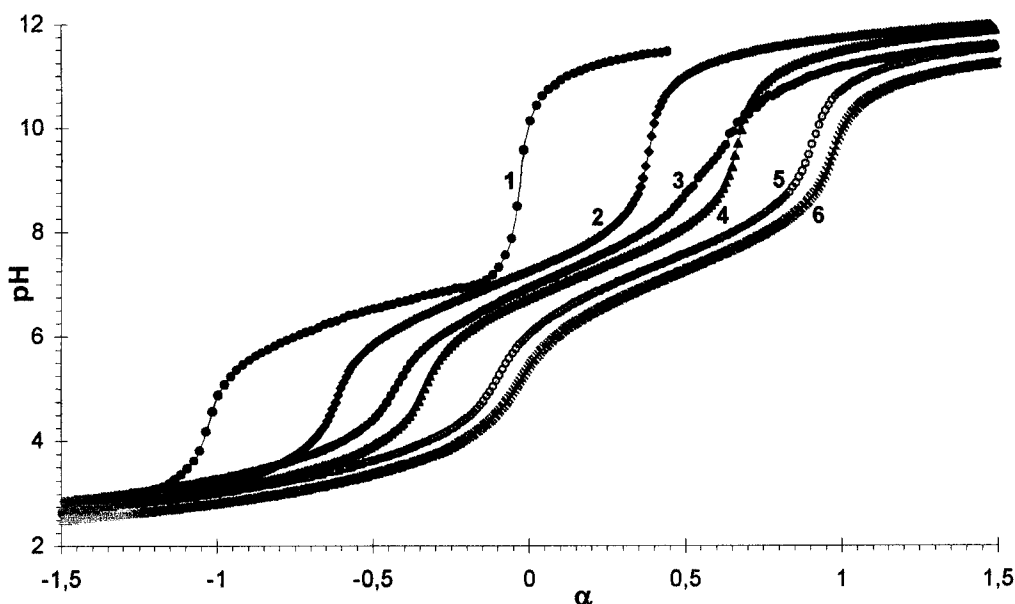


Figura 3.9: Curvas de titulação (pH vs grau de neutralização) do quitosano e derivados CEQ, com uma quantidade equimolar de HNO_3 $0,1000 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e força iónica ajustada a $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em KNO_3 . (1)- Quitosano; (2)- CEQ1; (3)- CEQ2; (4)- CEQ3, (5)- CEQ4 e (6)- CEQ5.

Os resultados obtidos a partir das titulações potenciométricas foram também utilizados no cálculo do GS dos derivados CEQ. Neste caso, o GS é calculado a partir da razão entre a quantidade de base gasta para neutralizar todos os prótons dos derivados CEQ e a quantidade de base gasta para neutralizar apenas os prótons dos grupos amônio. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 3.1.

No caso dos derivados CEQ1 e CEQ2, o cálculo do GS produziu resultados muito superiores aos obtidos pelos outros métodos de análise, devido à presença de ácido clorídrico residual nos polímeros que não foi removido durante a diálise.

As constantes de protonação do quitosano e dos derivados CEQ foram calculadas utilizando o programa HYPERQUAD. Na tabela 3.1 são apresentados os resultados obtidos a partir das curvas de titulação. No caso do quitosano, o valor obtido para $\log K^H$ foi de $6,40 \pm 0,01$ que se encontra em boa concordância com os valores encontrados na literatura¹¹⁴.

Tabela 3.1: Parâmetros determinados para a caracterização dos derivados CEQ sintetizados.

Polímero	Proporção dos reagentes ^{a)}	Tempo/dias	¹ H-RMN				PESH			AE			PESH		
			GA		x ^{b)}	y ^{b)}	z ^{b)}	GS ^{c)}	GS ^{c)}	GS ^{c)}	C / %	H / %	N / %	log K ₁ ^{H d)}	log K ₂ ^{H d)}
			n ^{b)}												
Quitosano			0,10	0,90	0	0	-			41,53	7,46	7,65	6,40 ± 0,01		
CEQ1	1	3	0,10	0,66	0,24	0	0,27	^{h)}		39,46	7,25	6,54	6,80 ± 0,01	2,85 ± 0,02	
CEQ2	1 equiv x 2 ^{e)}	3 dias x 2	0,10	0,51	0,39	0	0,43	^{h)}		39,25	7,61	6,13	6,98 ± 0,01	3,17 ± 0,01	
CEQ3	2 equiv x 2 ^{e)}	3 dias x 2	0,10	0,40	0,50	0	0,56	0,58	0,58	41,74	7,48	6,17	6,88 ± 0,02	3,26 ± 0,01	
CEQ4	3 equiv x 3 ^{e)}	3 dias x 3	0,10	0,19	0,66	0,05	0,84	0,91	0,88	43,01	5,76	7,12	7,14 ± 0,01	3,44 ± 0,02	
CEQ5	5 equiv x 3 ^{e)}	3 dias x 3	0,10	0,16	0,58	0,16	1,00	1,00	0,98	39,81	6,86	5,17	7,54 ± 0,01	4,02 ± 0,01	

- a) razão ácido 3-bromopropanóico/quitosano
b) ver reação de N-carboxialquilação figura 3.1.
c) o grau de substituição (GS) foi calculado por unidade de resíduos D-glucosamina do quitosano
d) T 25 °C, I = 0,1 M KNO₃
e) número de vezes em que foram feitas as adições
f) amostra continha HCl que não foi totalmente removida por diálise

Analisando os valores de $\log K_1^H$ e $\log K_2^H$ obtidos para os derivados CEQ, é possível observar que existe uma correlação entre os valores de $\log K_1^H$ e o GS do polímero (tabela 3.1, figura 3.10).

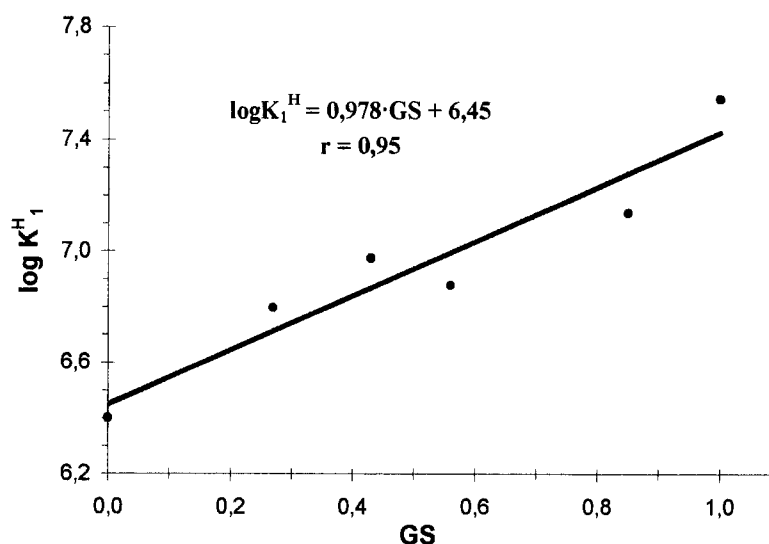


Figura 3.10: Relação entre GS dos derivados CEQ e $\log K_1^H$ (25 °C, I = 0,1M KNO₃).

Embora a presença de grupos carboxílicos possa contribuir, por efeito indutivo negativo, para uma ligeira diminuição do carácter básico dos grupos amino, outros factores, que neste caso demonstram ser de maior importância, provocam justamente o efeito contrário. Estes factores poderão ser efeitos estéricos, estabelecimento de pontes de hidrogénio⁵⁶, e efeito indutivo positivo produzido pelos grupos $-\text{CH}_2-$ do substituinte que, ao estarem mais próximos do átomo de azoto, aumentam a densidade electrónica junto deste, estabilizando o catião amónio formado.

Pode-se fazer uma comparação adicional entre o derivado CEQ5 e um derivado semelhante sintetizado por Muzzarelli *et al.*⁵¹, o N-(carboximetil)quitosano, com valor de GS semelhante e que apresentou as seguintes constantes de protonação: $\log K_1^H = 6,6$ e $\log K_2^H = 2,3$. Verificamos que, relativamente a este derivado, o CEQ5 apresenta um menor carácter ácido para os grupos carboxílicos e maior carácter básico para os grupos amino. Este comportamento estará relacionado com a influência importante provocada pela introdução de um grupo $-\text{CH}_2-$ adicional no substituinte, o qual vai provocar uma redução na influência mútua entre os grupos funcionais amino e carboxílico.

3.1.1.4- Estudos com calorimetria diferencial de varrimento

Nestes estudos, pretendeu-se verificar a influência dos grupos carboxetilo e, conseqüentemente, do GS na estabilidade dos polímeros. Para isso, foram analisadas amostras de quitosano e dos derivados CEQ1 a CEQ4 por calorimetria diferencial de varrimento. Os termogramas obtidos são apresentados na figura 3.11. Os valores obtidos para os eventos térmicos e entalpias associadas encontram-se compilados na tabela 3.2.

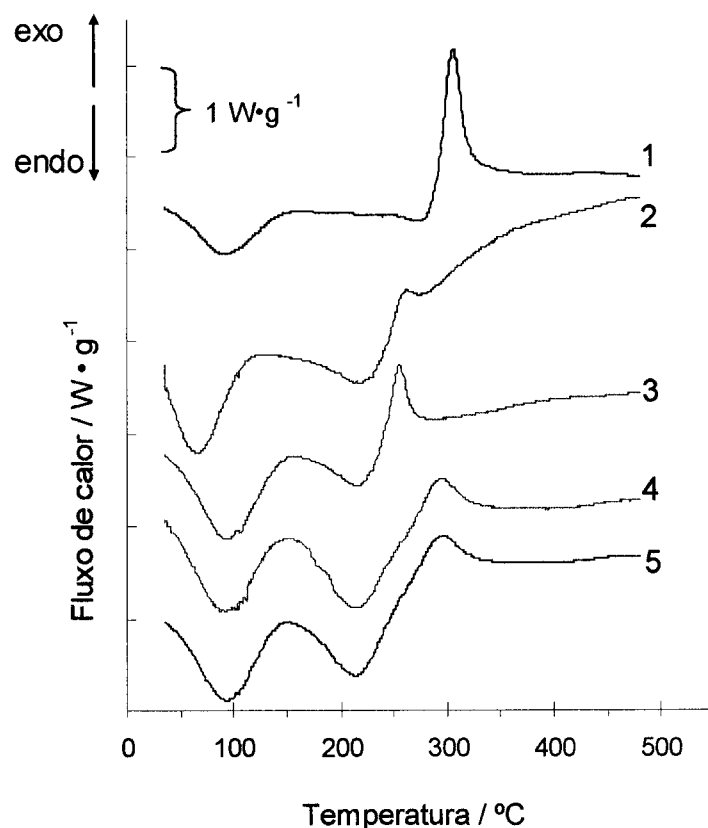


Figura 3.11: Termogramas obtidos por CDV para o (1)-quitosano e derivados (2)-CEQ1, (3)-CEQ2, (4)-CEQ3 e (5)-CEQ4.

Tabela 3.2 Resultados dos estudos térmicos realizados com quitosano e derivados CEQ.

Polímero	1º evento térmico		2º evento térmico		3º evento térmico	
	T _{pico} /°C	ΔH/J g ⁻¹	T _{pico} /°C	ΔH/J g ⁻¹	T _{pico} /°C	ΔH/J g ⁻¹
Quitosano	108	288,21	-	-	306	-134,62
CEQ1	87	324,55	217	50,1	266	-38,30
CEQ2	85	280,11	215	77,6	256	-36,23
CEQ3	86	289,78	214	146,8	295	-45,31
CEQ4	96	218,56	213	170,2	295	-72,30

O primeiro evento térmico observado traduz-se num pico endotérmico, que ocorre para todos os polímeros e que é atribuído a perda de águas de cristalização¹¹⁵⁻¹¹⁷. Os polissacáridos apresentam uma forte afinidade para a água e, no estado sólido, podem apresentar estruturas distorcidas nas quais as moléculas de água podem ser incorporadas resultando na hidratação do polissacárido¹¹⁸.

Kittur *et al.*¹¹⁸ estudaram o comportamento térmico de um derivado semelhante, o N,O-carboximetilquitosano, e encontraram uma relação entre a entalpia desta transição e o grau de carboximetilação do quitosano. Neste trabalho, verificaram que quanto maior o grau de carboximetilação, maior era a quantidade de água no polímero. No caso dos derivados CEQ sintetizados, não foi verificada esta correlação, o que quer dizer que além da presença de grupos hidrofílicos no polímero, o modo de preparação, o condicionamento e o aspecto físico do material são determinantes para a quantidade de água de hidratação no polímero.

Continuando a análise dos termogramas de CDV, verifica-se um segundo evento endotérmico centrado entre 213 e 217 °C, que apenas ocorre nos derivados CEQ e não no quitosano. Os resultados obtidos indicam a existência de uma correlação entre a entalpia deste evento e o GS. Kittur *et al.*¹¹⁸ no seu estudo com o O-carboximetilquitina, O-carboximetilquitosano e o N,O-carboximetilquitosano, não observaram a existência deste segundo evento térmico, obtendo termogramas essencialmente idênticos ao do quitosano, particularmente no caso dos dois últimos derivados. O aparecimento do segundo pico endotérmico a 215 °C não foi registado em compostos similares com quitosano e, tanto quanto foi possível investigar, não

aparecem descritos na literatura estudos com CDV onde se verifique a sua presença. Todavia, num trabalho recente, Sato *et al.*¹¹⁹ estudaram o comportamento da N-carboxietilquitina através de um pirolisador acoplado à cromatografia gasosa com espectrometria de massa como método de detecção. Neste estudo, os autores verificaram a formação de ácido acrílico proveniente da pirólise da N-carboxietilquitina, e concluíram que a quantidade deste ácido era dependente do grau de substituição de grupos carboxietilo na quitina. Com estas técnicas, foi também possível calcular o GS do referido polímero, obtendo-se boa correlação com os resultados obtidos por ¹H-RMN. Assim sendo, há uma grande probabilidade desta transição ($T \approx 215$ °C, para os derivados CEQ) estar relacionada com a formação de ácido acrílico, por decomposição do substituinte carboxietilo, o que explica a sua correlação com o GS. A confirmação desta afirmação está, naturalmente, dependente de novos estudos, introduzindo novos derivados obtendo uma gama mais alargada de GS.

O último evento térmico observado é um pico exotérmico situado entre 256 e 306 °C, e que resulta da termodegradação da cadeia polimérica do quitosano. A temperatura deste evento dependeu da morfologia do material. Os derivados CEQ1 e CEQ2 apresentavam aspecto de flocos muito mais finos que os restantes derivados, e termodegradaram-se a temperaturas inferiores.

3.2

DERIVADOS PEPTÍDICOS DO QUITOSANO

N-[2-(N²-CARBOXIMETILCARBAMOIL)ETIL]QUITOSANO

N-{2-[N²-(1-CARBOXI-2-FENIL)ETILCARBAMOIL]ETIL}QUITOSANO

3.2- Derivados Peptídicos do Quitosano

A síntese dos derivados N-[2-(N'-carboximetilcarbamoil)etil]quitosano, representado por $\text{Quit}\beta\text{Ala}\alpha\text{Gly}$, e N-{2-[N'-(1-carboxi-2-fenil)etilcarbamoil]etil}quitosano, representado por $\text{Quit}\beta\text{Ala}\alpha\text{Phe}$, envolveu a preparação prévia do N-(3-bromopropanoil)glicina e N-(3-bromopropanoil)fenilalanina. Estes compostos foram preparados a partir da condensação do ácido 3-bromopropanóico com os ésteres terc-butílicos da glicina e da fenilalanina, seguida de acidólise com ácido trifluoracético para remoção dos grupos terc-butilo.

3.2.1- Síntese e caracterização do N-(3-bromopropanoil)glicinato de terc-butilo

A condensação do ácido 3-bromopropanóico com o glicinato de terc-butilo, para a formação do N-(3-bromopropanoil)glicinato de terc-butilo, foi realizada através da formação de uma ligação peptídica. Para isso, recorreu-se ao auxílio da diisopropilcarbodiimida (DIC), que é um reagente de acoplamento usado para activar o grupo carboxílico, proporcionando uma fácil condensação com o grupo amino em condições suaves^{120, 121}. O mecanismo desta reacção é apresentado na figura 3.12.

A reacção foi sempre acompanhada por CCF, através da qual foi observada a formação de um produto imediatamente após a adição da carbodiimida, e que veio a identificar-se como sendo o produto esperado. Ao fim do primeiro dia de reacção, já não era significativa a variação das manchas referentes ao produto e ao aminoácido de partida, sendo a mancha referente à DIC já muito ténue. Por este motivo, realizou-se uma segunda adição de DIC (um equivalente), continuando a acompanhar o desenvolvimento da reacção por CCF. Ao fim do quarto dia de reacção, e por não se ter verificado uma alteração significativa dos cromatogramas, passou-se ao tratamento da mistura reaccional para isolamento do produto.

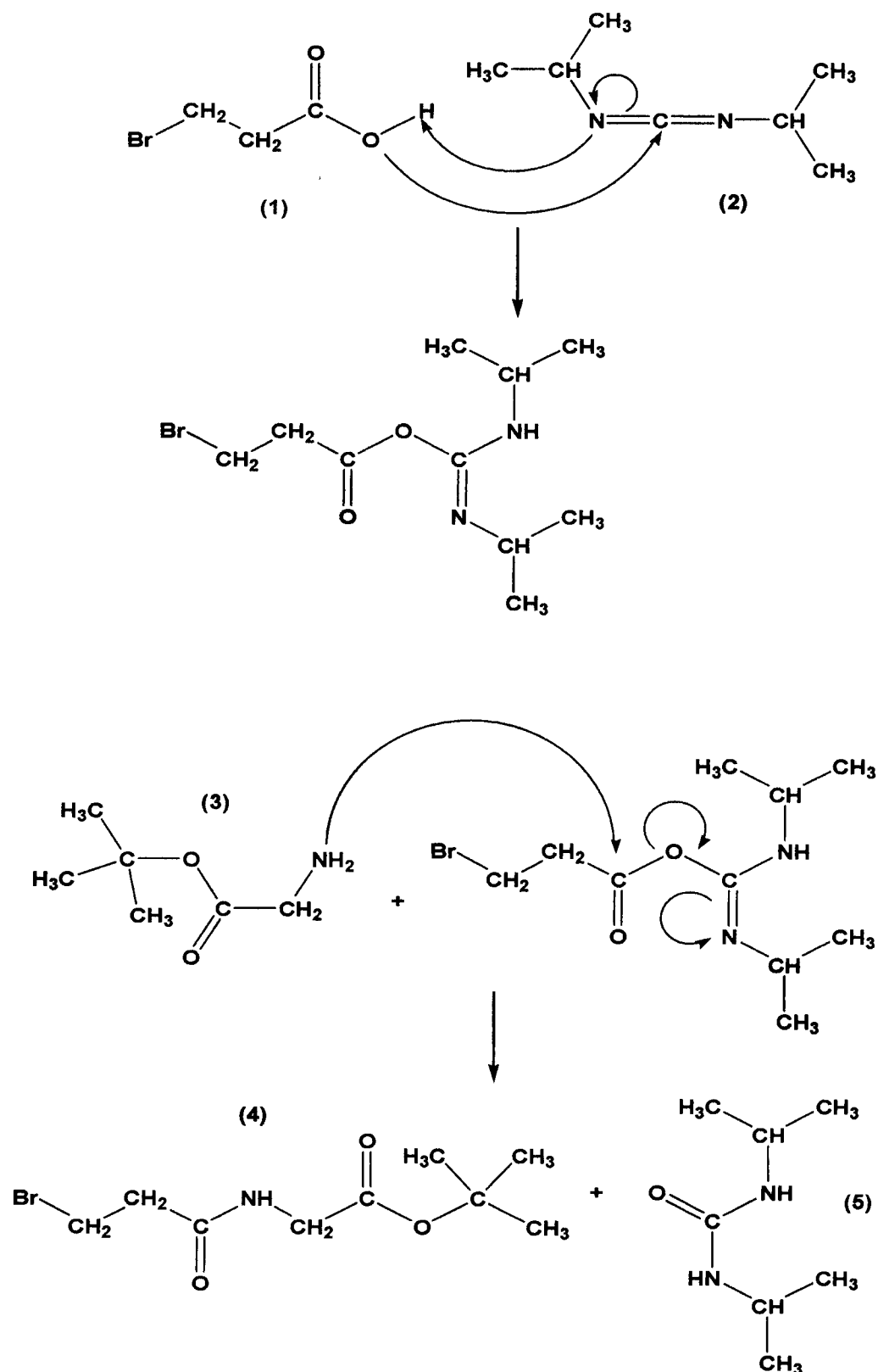


Figura 3.12: Mecanismo de formação do N-(3-bromopropil)glicinato de terc-butilo, por condensação via DIC. Na figura (1)- ácido 3-bromopropanóico, (2)- diisopropilcarbodiimida, (3)-glicinato de terc-butilo, (4)-N-(3-bromopropil)glicinato de terc-butilo e (5)- diisopropilureia.

A mistura reaccional foi submetida a filtração sob pressão reduzida para a remoção do precipitado branco correspondente a diisopropilureia (DIU), e posteriormente submetida a cromatografia em coluna. O produto foi obtido sob a forma de um óleo incolor. Esta síntese teve um rendimento de 71%.

Os espectros de ^1H -RMN e de ^{13}C -RMN do N-(3-bromopropanoil)glicinato de terc-butilo são apresentados nas figuras 3.13 e 3.14. Estes apresentam-se compatíveis com a estrutura esperada, confirmando a identidade do produto.

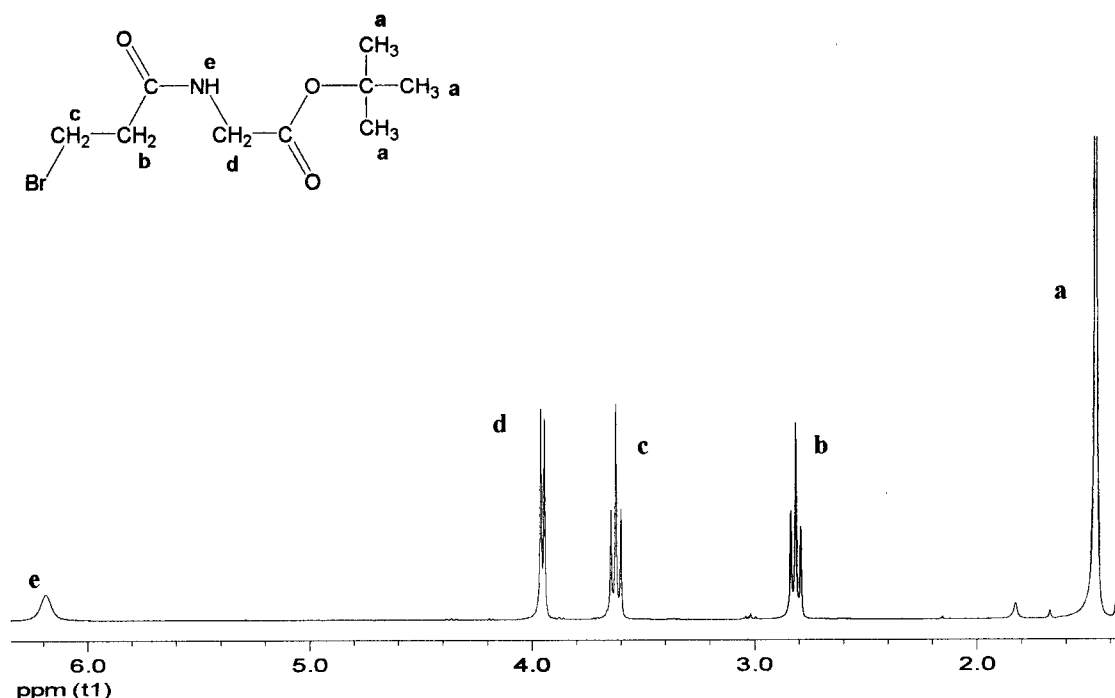


Figura 3.13: Espectro de ^1H -RMN (300 MHz) do N-(3-bromopropanoil)glicinato de terc-butilo em CDCl_3 .

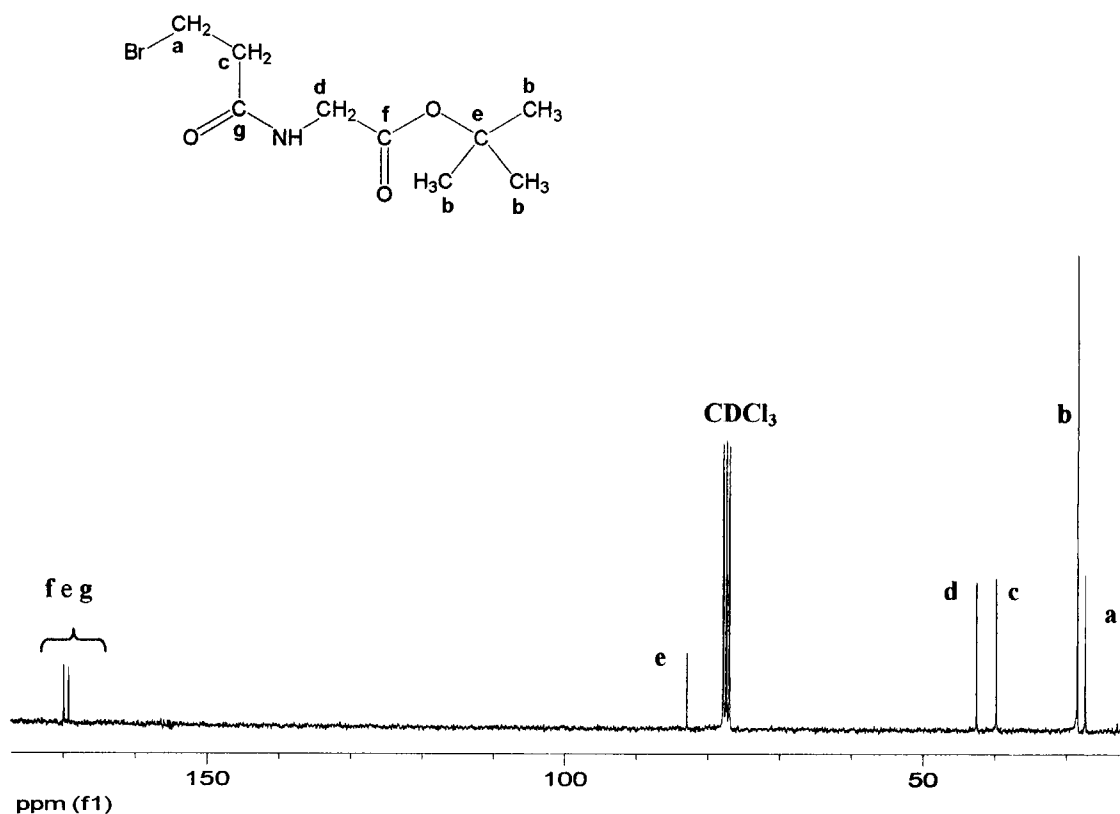


Figura 3.14: Espectro de ^{13}C -RMN (75 MHz) do N-(3-bromopropanoil)glicinato de terc-butilo em CDCl_3 .

3.2.2- Síntese e caracterização do N-(3-bromopropanoil)fenilalaninato de terc-butilo

No que diz respeito às condições experimentais, a estratégia adoptada para a síntese do N-(3-bromopropanoil)fenilalaninato de terc-butilo assemelha-se à descrita na secção anterior. Neste caso, a única diferença importante é a utilização da dicicloexilcarbodiimida (DCC) como reagente de acoplamento. A escolha da DCC foi realizada depois de alguns ensaios iniciais onde se verificou, por CCF, um factor de retardação (Rf) mais favorável para a posterior separação cromatográfica em coluna. Na figura 3.15, encontra-se esquematizado o mecanismo da síntese do N-(3-bromopropanoil)fenilalaninato de terc-butilo.

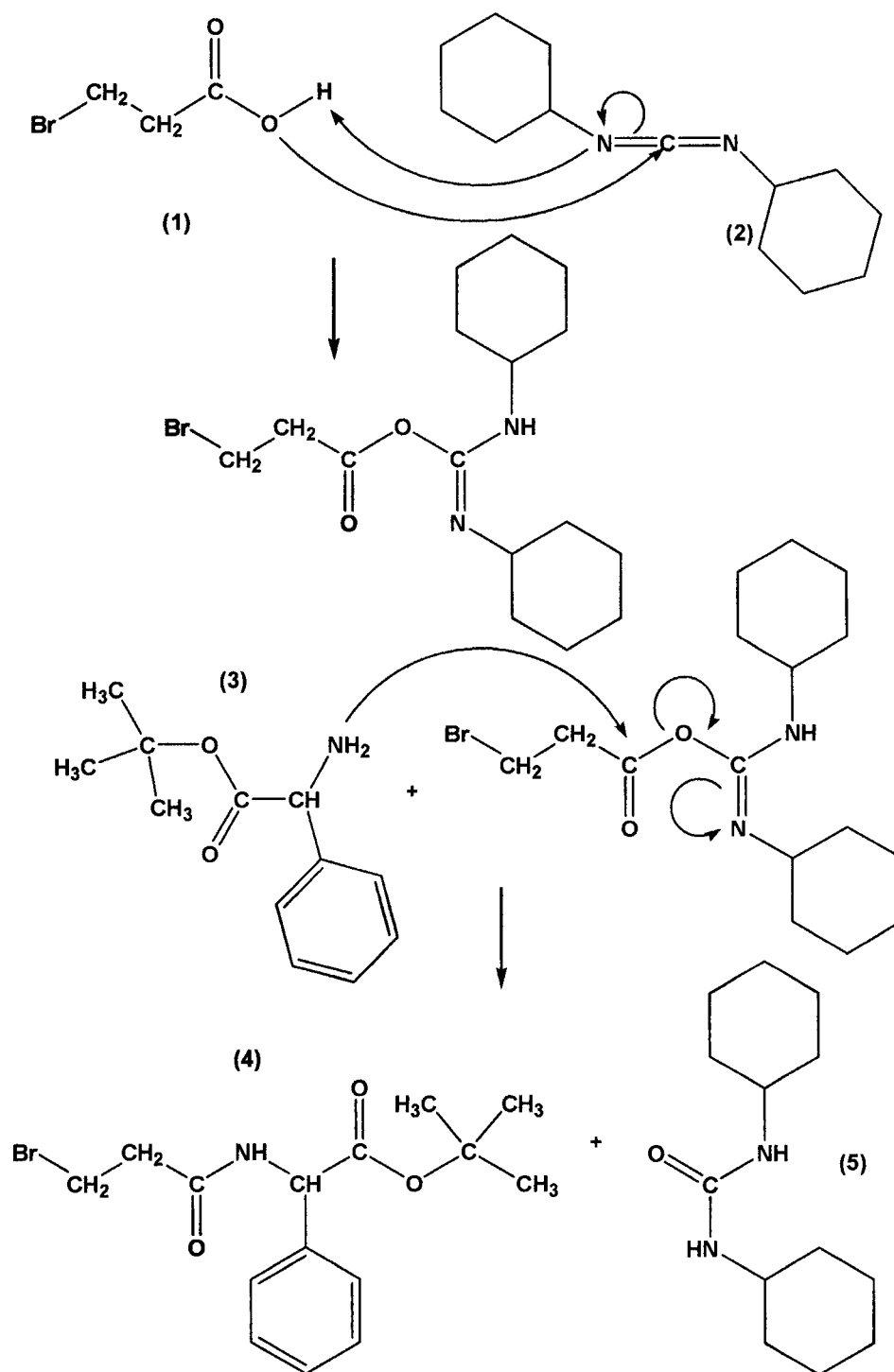


Figura 3.15: Mecanismo da reacção de síntese do N-(3-bromopropanoil)fenilalaninato de terc-butilo. Na figura (1)- ácido 3-bromopropanóico, (2)- dicioexilcarbodiimida, (3)- fenilalaninato de terc-butilo, (4)-N-(3-bromopropanoil)fenilalaninato de terc-butilo e (5)- dicioexilureia.

Observou-se, também neste caso, o aparecimento da mancha referente ao produto que se veio a identificar como o pretendido, imediatamente após ter sido realizada a adição da DCC. Pelos mesmos motivos atrás apontados, foi realizada a adição de um novo equivalente da carbodiimida após vinte quatro horas de reacção, sendo esta acompanhada durante mais

quatro dias por CCF. Ao fim deste período, e não sendo observada uma alteração significativa dos cromatogramas de CCF, passou-se ao isolamento do produto.

A mistura reaccional foi filtrada sob pressão reduzida para a remoção do precipitado branco correspondente à dicicloexilureia (DCU), e posteriormente submetida a cromatografia em coluna. O produto foi obtido sob a forma de um óleo incolor. A síntese foi realizada com um rendimento de 78%. Os espectros de ^1H -RMN e de ^{13}C -RMN do N-(3-bromopropanoil)fenilalaninato de terc-butilo são apresentados nas figuras 3.16 e 3.17 e apresentam-se compatíveis com a estrutura esperada para o produto.

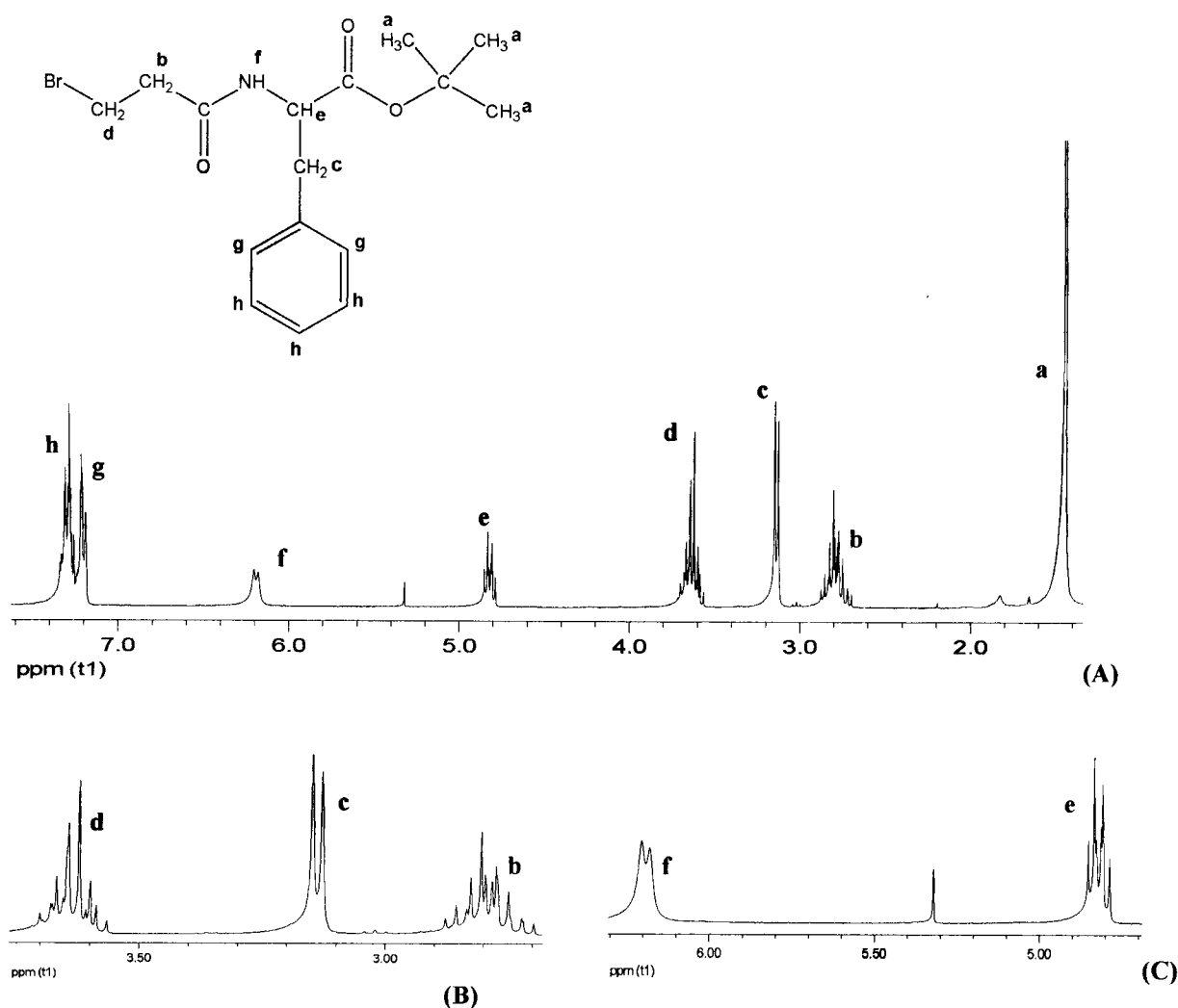


Figura 3.16: Espectro de ^1H -RMN (300 MHz) do N-(3-bromopropanoil)fenilalaninato de terc-butilo e CDCl_3 . Em (A) é apresentado o espectro obtido para o composto. São apresentadas, também, ampliações de zonas dos espectros compreendidas entre (B)-2,70 e 3,75 ppm e (C)- 4,70 e 6,30 ppm, onde se pode visualizar o desdobramento de alguns sinais.

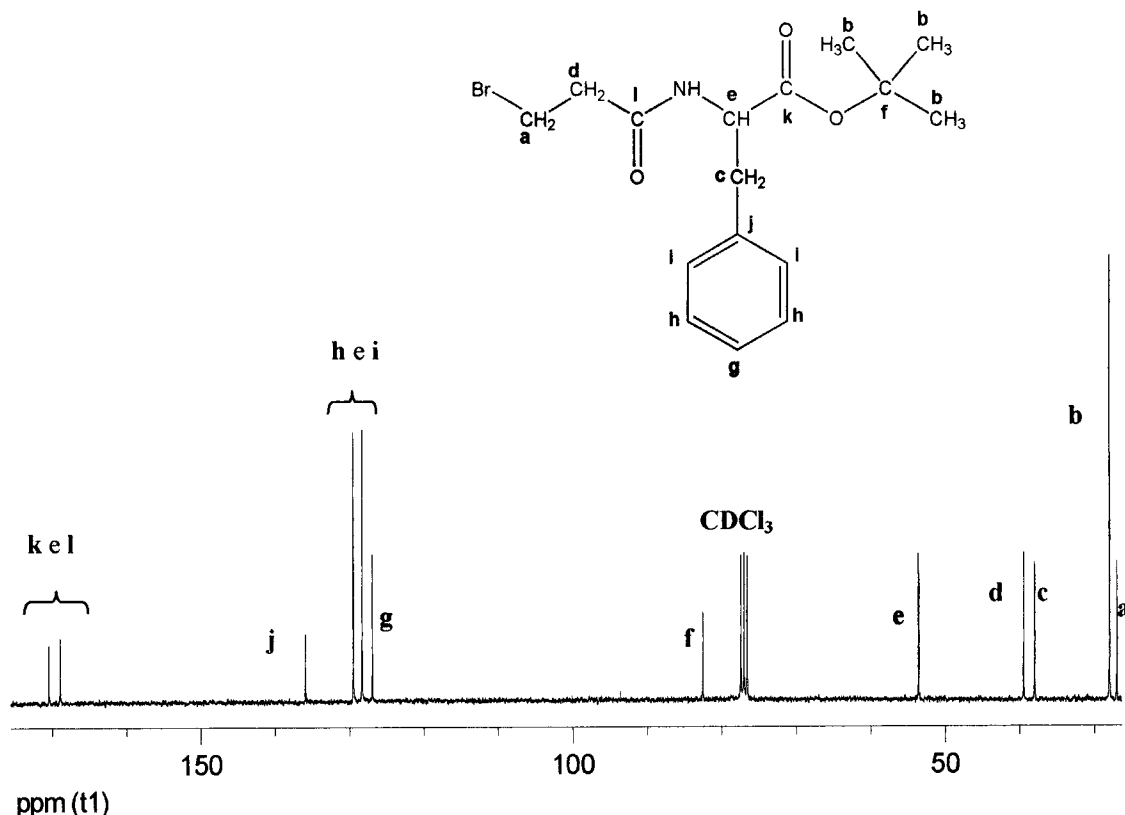


Figura 3.17: Espectro de ^{13}C -RMN (75 MHz) do N-(3-bromopropanoil)fenilalaninato de terc-butilo em CDCl_3 .

Conforme mencionado na parte experimental deste trabalho, os cromatogramas de CCF revelaram ainda a existência de dois produtos secundários que, após separação cromatográfica, se isolaram em quantidade insuficiente para proceder à sua análise estrutural. Uma vez que o produto principal foi entretanto identificado como sendo o composto esperado, os dois produtos secundários foram ignorados no seguimento do trabalho.

3.2.3- Remoção dos grupos terc-butilo por acidólise com ácido trifluoracético anidro - Síntese do N-(3-bromopropanoil)glicina e N-(3-bromopropanoil)fenilalanina

Uma vez concluída a fase de condensação do ácido 3-bromopropanóico com os dois aminoácidos cujos grupos carboxílicos estavam protegidos com ésteres terc-butílicos, procedeu-se à remoção dos grupos protectores. Para tal, depois de isolados e caracterizados,

os ésteres sintetizados foram tratados com ácido trifluoracético puro para a clivagem dos ésteres terc-butílicos aos correspondentes ácidos carboxílicos. O esquema da reação de acidólise encontra-se representado na figura 3.18.

A acidólise foi acompanhada por CCF, sendo completa ao fim de vinte e quatro horas. Os produtos foram obtidos sob a forma de sólido branco após precipitação com éter etílico. Os rendimentos das acidólises foram de 86% para a preparação do N-(3-bromopropanoil)glicina e de 78% para o N-(3-bromopropanoil)fenilalanina. Os espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN destes produtos são apresentados nas figuras 3.19 à 3.22.

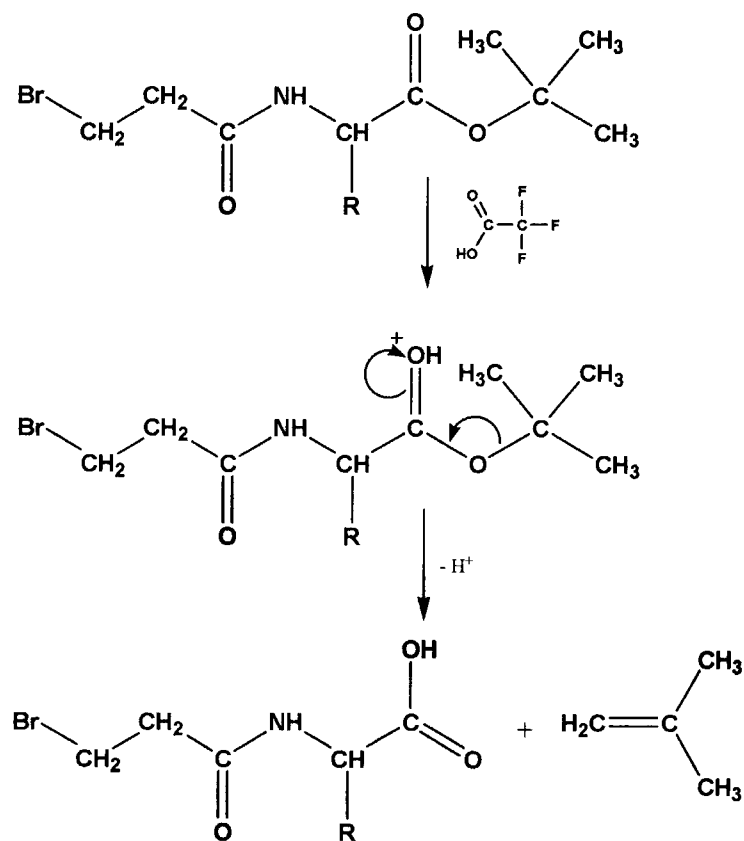


Figura 3.18: Remoção do grupo terc-butílico dos ésteres N-(3-bromopropanoil)glicinato de terc-butílico e N-(3-bromopropanoil)fenilalaninato de terc-butílico, por acidólise com ácido trifluoracético anidro. Na figura, R = $-\text{H}$ no caso da síntese do N-(3-bromopropanoil)glicina ou R = $-\text{CH}_2\text{Ph}$ para a síntese do N-(3-bromopropanoil)fenilalanina.

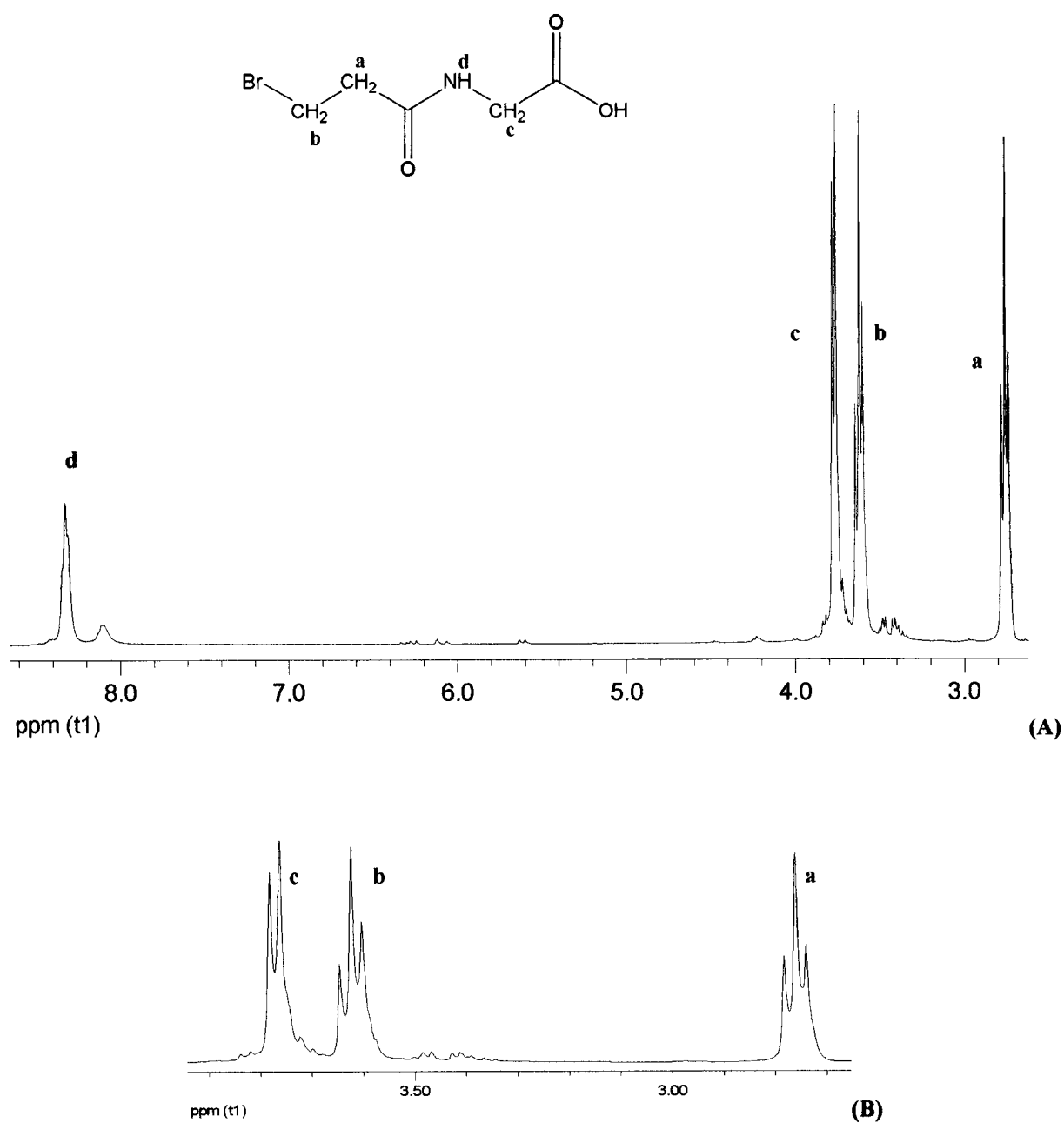
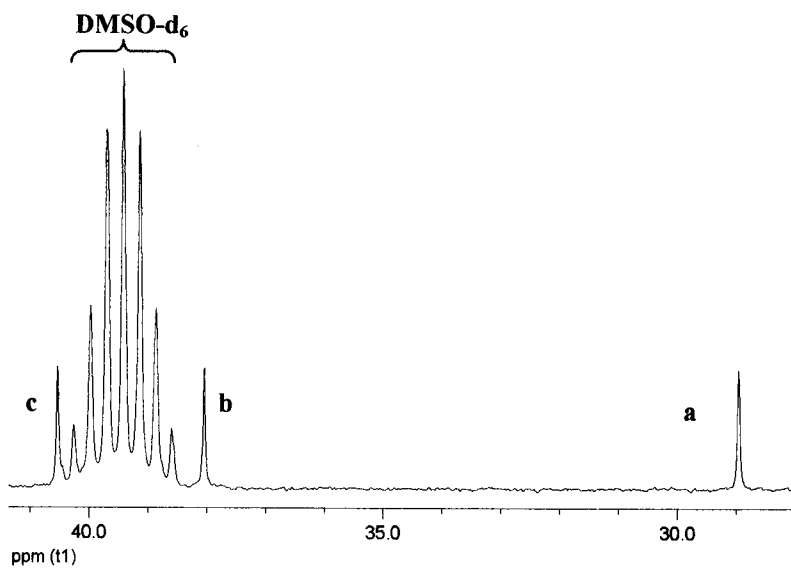
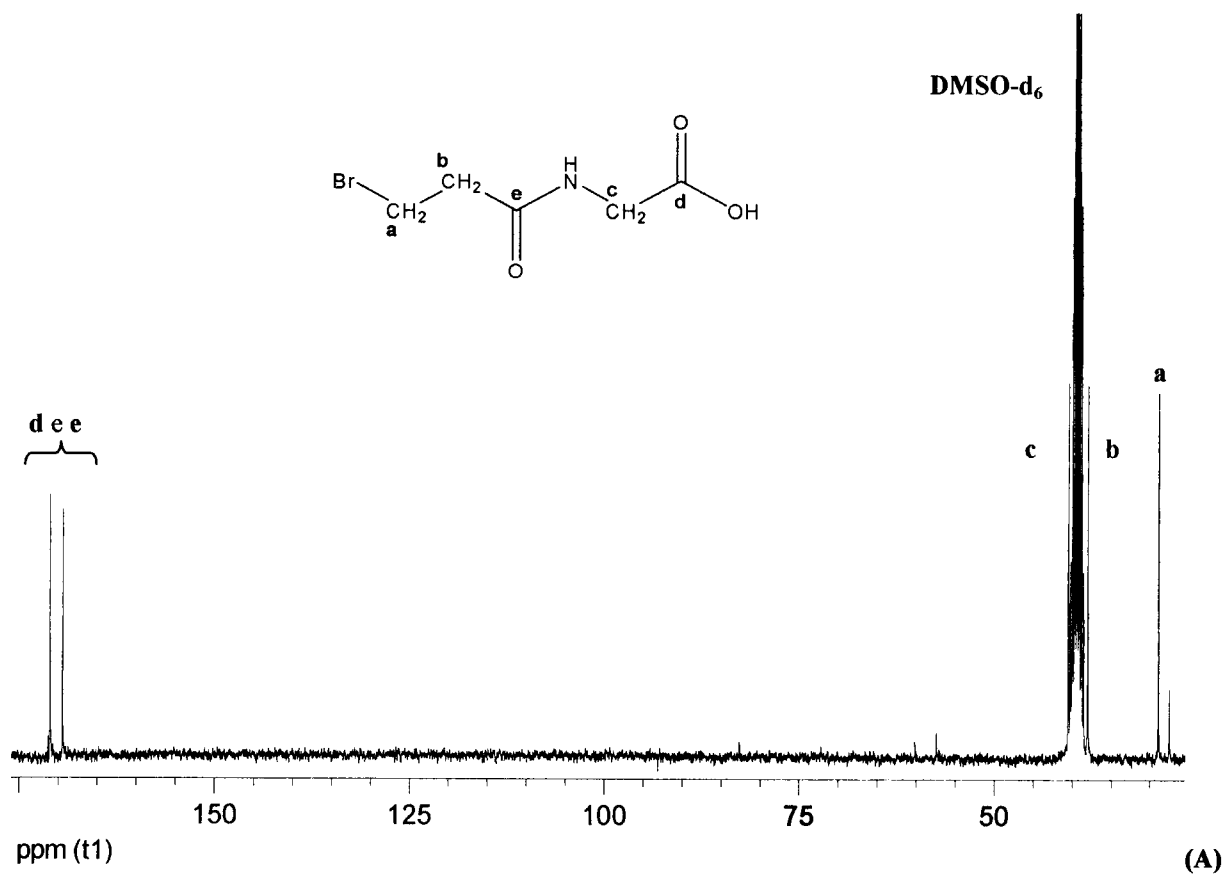


Figura 3.19: Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz) do N-(3-bromopropanoil)glicina em DMSO-d_6 . Em (A) é apresentado o espectro integral obtido para o composto e em (B) apresenta-se uma ampliação dos sinais do espectro compreendidos entre 2,80 e 3,90 ppm, onde se visualizam os desdobramentos dos sinais a, b e c.



(B)

Figura 3.20: Espectro de ¹³C-RMN (75 MHz) do N-(3-bromopropanoil)glicina em DMSO-d₆. Em (A) é apresentado o espectro integral obtido para o composto e em (B) apresenta-se uma ampliação dos sinais do espectro compreendidos entre 28,0 e 41,0 ppm.

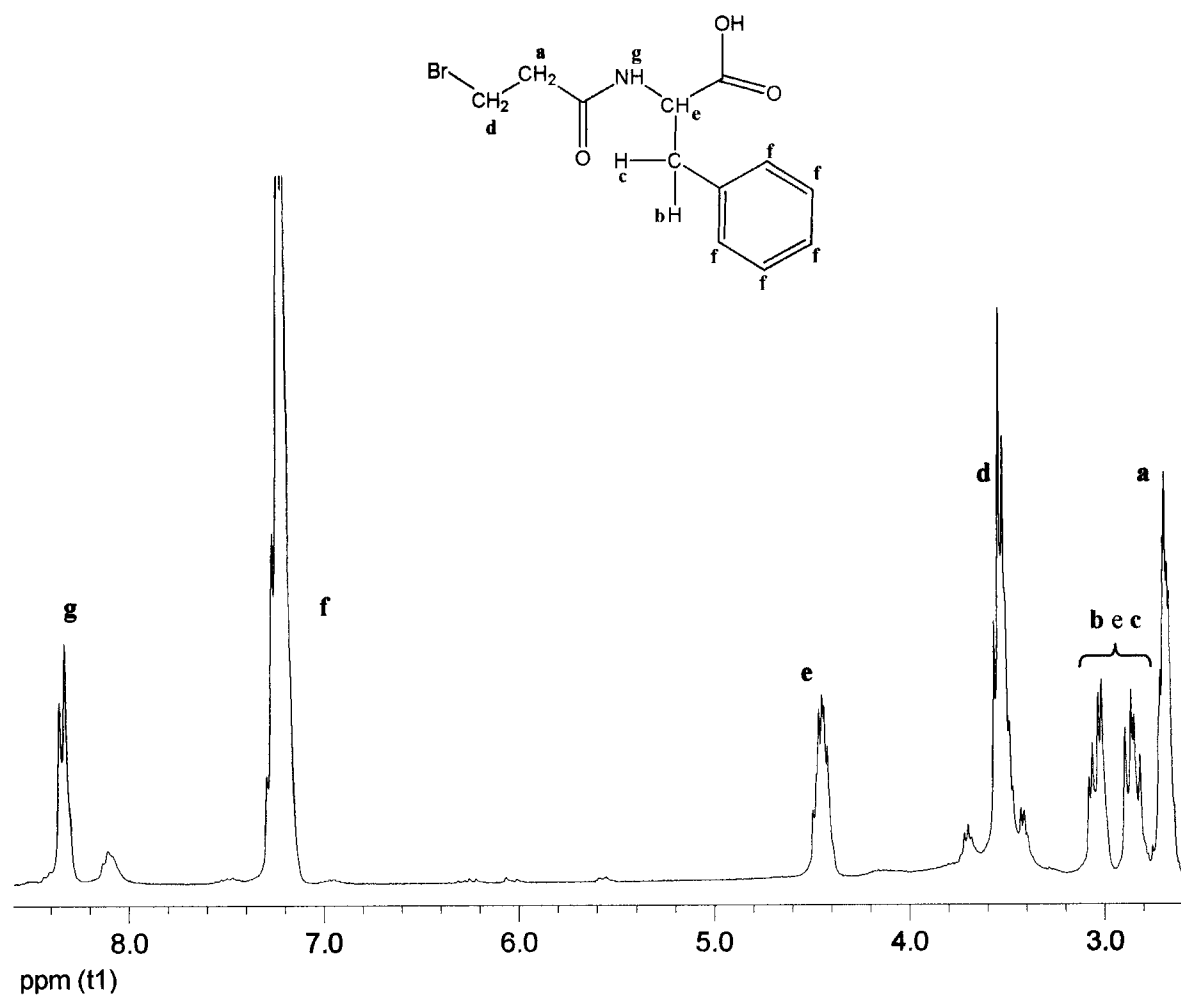


Figura 3.21: Espectro de ¹H-RMN (300 MHz) do N-(3-bromopropanoil)fenilalanina em DMSO-d₆.

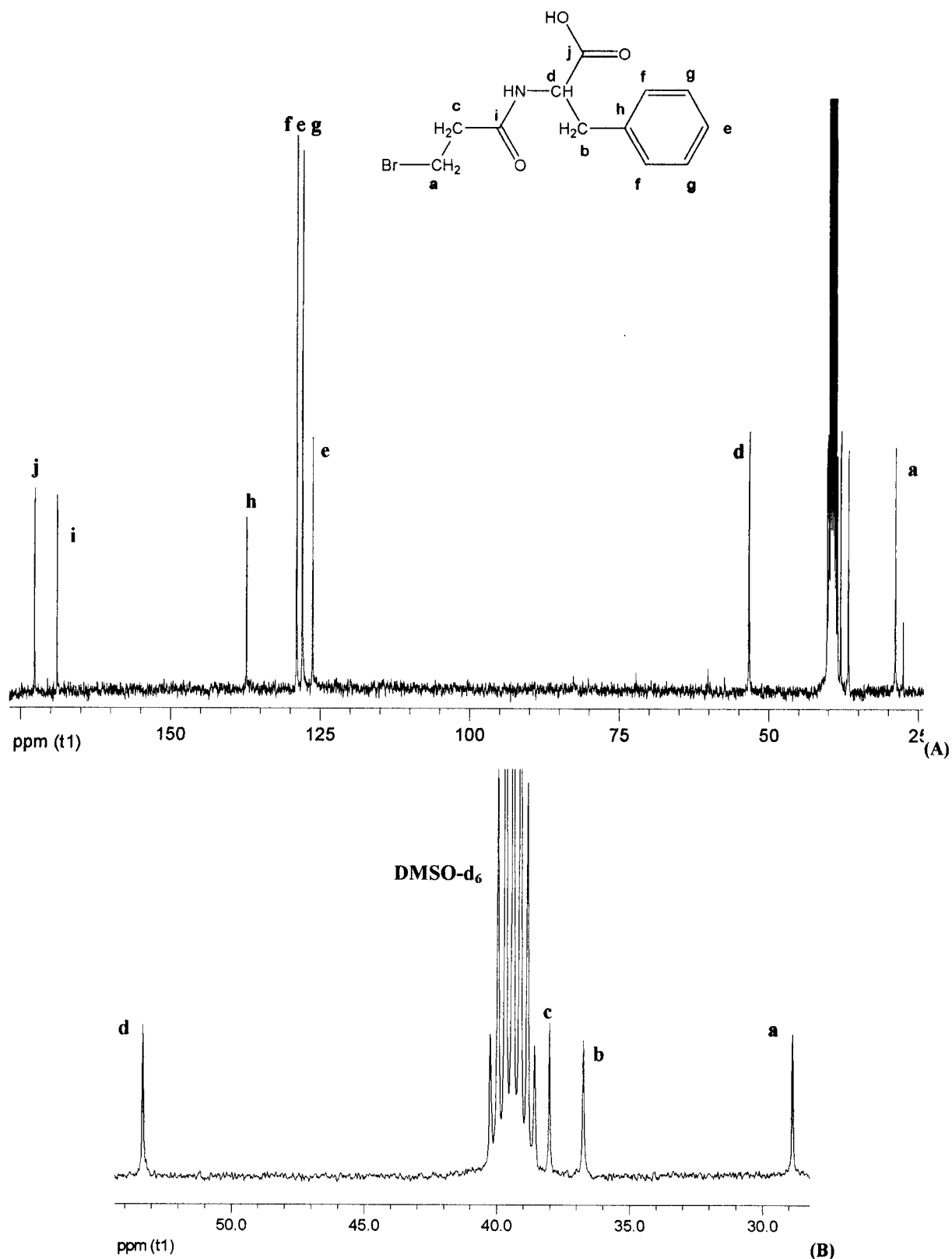


Figura 3.22: Espectro de ^{13}C -RMN (75 MHz) do N-(3-bromopropanoil)fenilalanina em DMSO-d₆. Em (A) é apresentado o espectro integral obtido para o composto e em (B) apresenta-se uma ampliação dos sinais do espectro compreendidos entre 29,0 e 54,0 ppm.

3.2.4- Síntese e caracterização do derivado Quit β Ala α Gly

Após a preparação N-(3-bromopropanoil)glicina passou-se à síntese do derivados N-[2-(N'-carboximetilcarbamoil)etil]quitosano (Quit β Ala α Gly). O esquema da síntese é apresentado na figura 3.23.

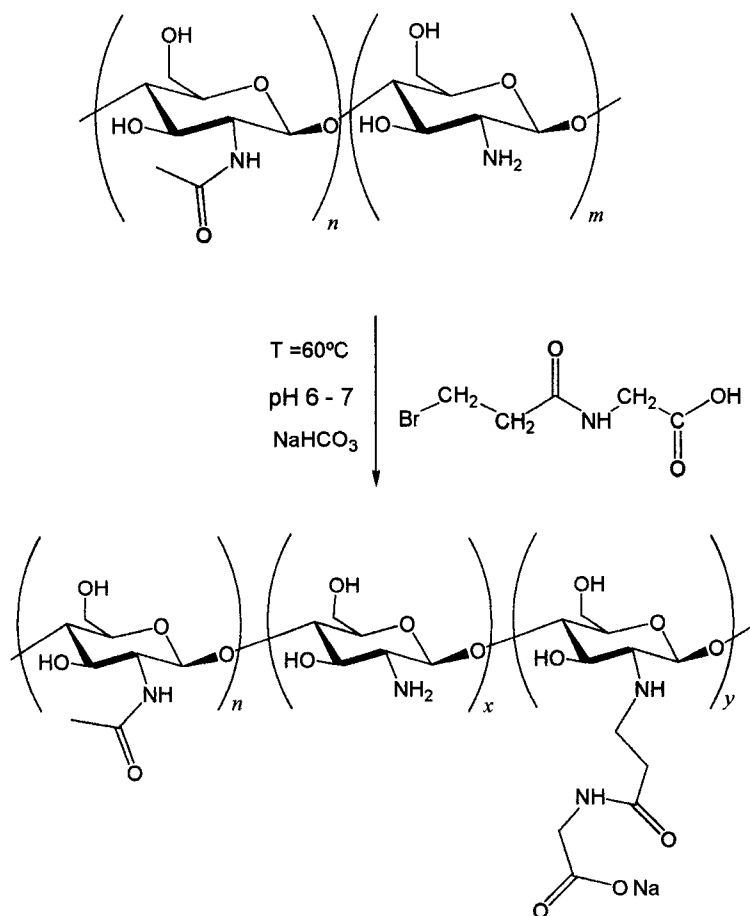


Figura 3.23: Esquema da síntese dos derivados Quit β Ala α Gly.

Uma diferença importante, relativamente à síntese dos derivados CEQ, residiu na cinética da reacção de substituição. Para os derivados CEQ, a reacção avançou de forma significativa dentro das primeiras cinco horas de reacção, pois não ocorreu precipitação do polímero com a adição de um excesso de NaHCO₃. No caso do derivado Quit β Ala α Gly, a elevação do pH da mistura reaccional para valores superiores a 7 dava origem a precipitação do quitosano, mesmo quando efectuada quarenta e oito horas após o início da reacção. De facto, pretendia-

se reproduzir, nesta síntese, as mesmas condições de reacção utilizadas na preparação dos derivados CEQ. Devido à impossibilidade de o fazer, optou-se por utilizar um intervalo de pH que garantisse a solubilização dos reagentes envolvidos na síntese e, simultaneamente, favorecesse a desprotonação dos grupos amino, logo, a reacção de substituição. Foi, por isso, escolhido o intervalo de pH entre 6 e 7, que deveria ser mantido por adição periódica de base ou tamponamento da solução.

Numa primeira fase, a reacção foi estudada para ser realizada em meio tampão dihidrogenofosfato/hidrogenofosfato, todavia o aumento da força iónica causado pela adição do tampão provocava a precipitação prematura do quitosano. Decidiu-se, então, proceder à monitorização do pH do meio e a manutenção deste no intervalo desejado, através da adição periódica do NaHCO_3 necessário.

3.2.4.1-Espectroscopia de ^1H -RMN

Para a atribuição dos sinais nos espectros de ^1H -RMN, os hidrogénios das várias estruturas monoméricas foram numerados de forma idêntica à anteriormente aplicada nos derivados CEQ (figura 3.2). Os dados espectroscópicos relevantes para o derivado $\text{Quit}\beta\text{Ala}\alpha\text{Gly}$ encontram-se resumidos na tabela 3.3.

A partir da análise dos espectros de ^1H -RMN deste derivado (figura 3.24), verifica-se a existência de sinais referentes a protões de unidades monoméricas substituídas, confirmando a introdução do derivado da glicina na estrutura polimérica do quitosano. Observa-se a 4,92 ppm o sinal de ressonância de protões H-1 de unidades monoméricas substituídas (GlcNHR) e a 2,76 ppm o sinal correspondente aos protões de grupos $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}-$ do substituinte. Verifica-se também o aparecimento de dois dupletos a 5,14 e 5,34 ppm, de protões H-1 de unidades GlcNH₂ e GlcNHR, respectivamente, resultantes da hidrólise ácida do polímero provocada pela solubilização das amostras em $\text{DCl}:\text{D}_2\text{O}$ 1:1¹²². Estes sinais deixaram de ser visíveis quando a amostra foi preparada numa solução de D_2O com apenas uma gota de DCl (figura 3.25).

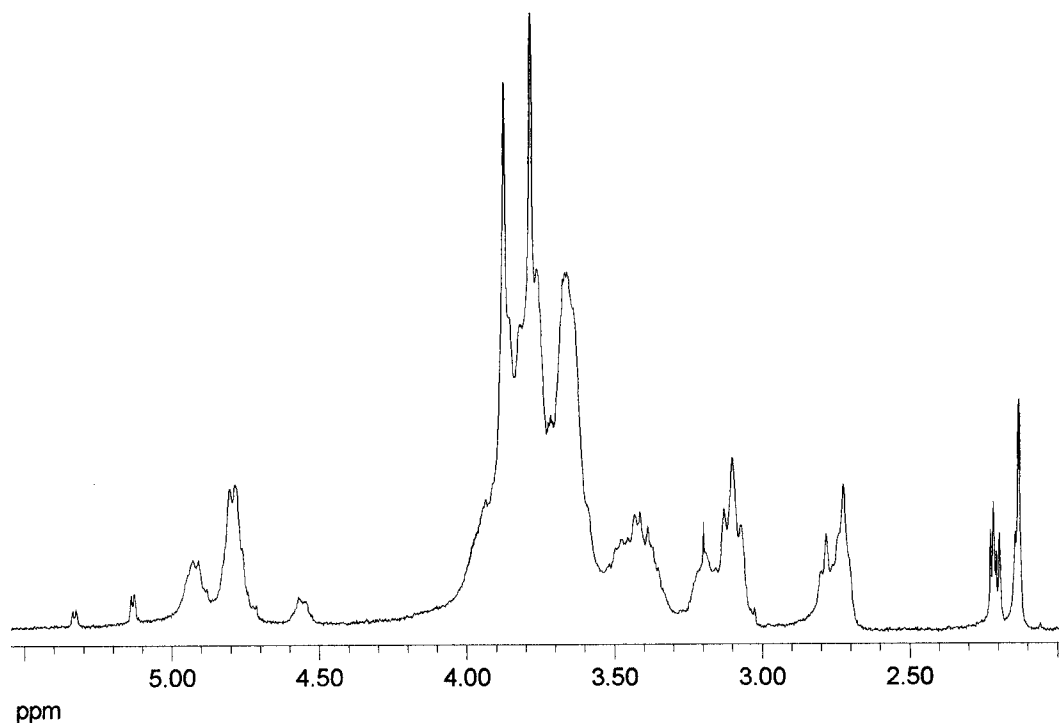


Figura 3.24: Espectro de ^1H -RMN (300 MHz) do Quit β Ala α Gly em $\text{D}_2\text{O}:\text{DCI}=1:1$ (δ/ppm): 2,13-2,23 (m, 0,33H, $-\text{CH}_3$ de GlcNHAc), 2,76 (m, 0,52H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}-$ de GlcNHR), 3,13 (m, $\approx 0,95\text{H}$, H-2 de GlcNHR e GlcNH $_2$), 3,35-4,10 (m, $\approx 6,01\text{H}$, H-2 de GlcNHAc, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{COOH}$ de GlcNHR and H-3,4,5,6a e 6b de GlcNH $_2$, GlcNHR e GlcNHAc), 4,56 (d, 0,11H, H-1 de GlcNHAc), 4,80 (d, $\sim 0,60\text{H}$, H-1 de GlcNH $_2$), 4,92 (d, $\sim 0,24\text{H}$, H-1 de GlcNHR), 5,14 (d, $\sim 0,14\text{H}$, H-1 de GlcNH $_2$ unidade hidrolisada), 5,34 (d, $\sim 0,02\text{H}$, H-1 de GlcNHR unidade hidrolisada).

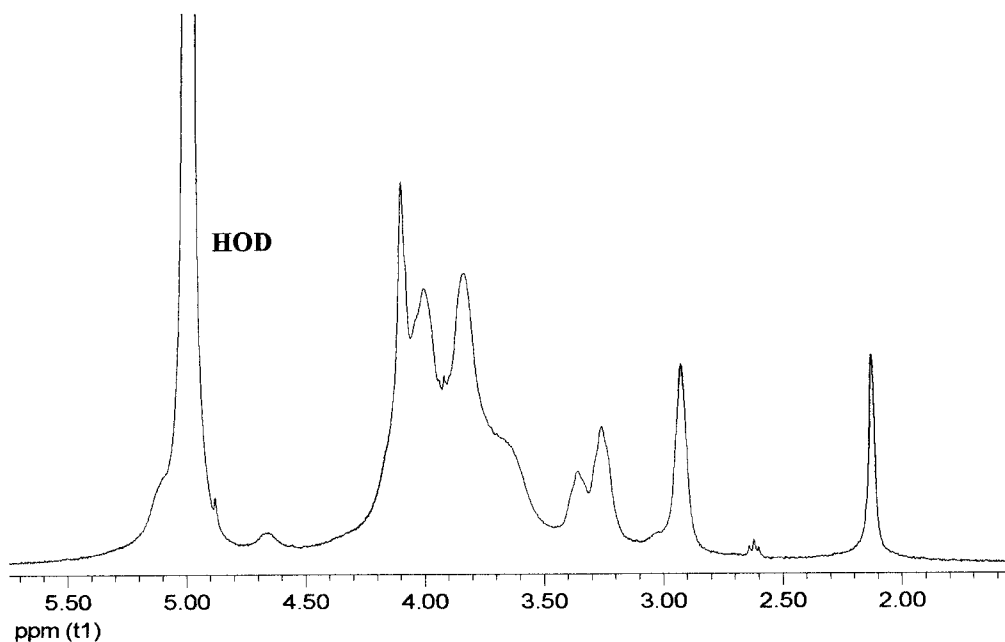


Figura 3.25: Espectro de ^1H -RMN (300 MHz) do Quit β Ala α Gly em D_2O com 1 gota de DCI (δ/ppm): 2,13 (s, 0,33H, $-\text{CH}_3$ de GlcNHAc), 2,93 (m, $\approx 0,51\text{H}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}-$ de GlcNHR), 3,14-3,48 (m, $\approx 0,90\text{H}$, H-2 de GlcNHR e GlcNH $_2$), 3,48-4,39 (m, $\approx 6,07\text{H}$, H-2 de GlcNHAc, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{COOH}$ de GlcNHR and H-3,4,5,6a e 6b de GlcNH $_2$, GlcNHR e GlcNHAc), 4,67 (d, $\approx 0,12\text{H}$, H-1 de GlcNHAc), 4,99 (sobreposição HOD e H-1 de GlcNH $_2$ e GlcNHR). Para o cálculo dos integrais, foi utilizado como referência o sinal de ressonância dos prótons $-\text{CH}_3$ de GlcNHAc (0,33H obtido no espectro da figura 3.24).

Embora, as condições de preparação da amostra correspondente ao espectro da figura 3.25 não conduzam a hidrólise, a sobreposição do sinal do solvente com os sinais de ressonância dos prótons H-1 dificultou o cálculo do GA e GS.

Os integrais relativos dos sinais de ressonância dos prótons nos espectros de $^1\text{H-RMN}$ (figura 3.24) foram obtidos considerando como referência os sinais de prótons H-1 de unidades GlcNH_2 e GlcNHR . Estes integrais permitiram calcular os coeficientes n , x e y que representam as frações das várias unidades monoméricas presentes no polímero como apresentado na figura 3.23. A partir destes valores foi calculado o GA (equações 3.1 ou 3.2) e o GS (equação 3.3). Neste caso, dado que não foi observada a presença de unidades dissustituídas, o coeficiente z presente nestas equações será igual a zero. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 3.3.

Devido ao intervalo de pH utilizado na reacção de substituição (pH 6-7) não seria de esperar uma alteração do grau de acetilação do polímero durante a síntese do derivado, o que foi confirmado a partir do valor do GA obtido (0,10).

Não são evidentes, nos espectros de $^1\text{H-RMN}$, sinais indicativos da ocorrência de substituição pelo átomo de oxigénio dos grupos hidroxilo das unidades de D-glucosamina. Uma integração aproximada do sinal de ressonância do próton H-1 de GlcNHR permite calcular uma razão $\delta(-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH-}) : \delta(\text{H-1 de GlcNHR})$ próxima de 2, corroborando a regioselectividade da reacção de substituição. Este comportamento correspondeu ao esperado, atendendo aos resultados anteriormente obtidos para os derivados CEQ.

3.2.4.2-Análise elementar

Na tabela 3.3 são apresentados os resultados obtidos por AE para o quitosano e seu derivado $\text{Quit}\beta\text{Ala}\alpha\text{Gly}$. A partir destes dados foi possível calcular o GS, sendo encontrada uma boa correlação com o resultado obtido por $^1\text{H-RMN}$.

Foi utilizada a seguinte equação para o cálculo do GA:

$$GS = \frac{\Delta_{C/N}}{(\%_{C/N} - 5 \times M_{C/N}) \times (1 - GA)} \quad (3.9)$$

em que $\Delta_{C/N}$ representa a diferença entre as razões das percentagens de carbono e azoto obtidas para o quitosano e para o derivado Quit β Ala α Gly, $M_{C/N}$ é a razão das massas molares C/N e GA o grau de acetilação, para o qual foi utilizado o valor obtido por $^1\text{H-RMN}$ (0,10).

3.2.5- Síntese e caracterização do derivado Quit β Ala α Phe

A síntese do derivado N-{2-[N'-(1-carboxi-2-fenil)etilcarbamoil]etil}quitosano (Quit β Ala α Phe) foi realizada através da reacção do quitosano com o N-(3-bromopropanoil)fenilalanina, conforme o esquema da figura 3.26.

Devido à baixa solubilidade do derivado da fenilalanina em água, foi utilizada uma mistura metanol:água 1:1 como solvente para a reacção de síntese. O pH da mistura reaccional foi mantido entre 5 e 6 por adição periódica de NaHCO₃. A utilização deste intervalo de pH, inferior ao descrito para o derivado da glicina, foi necessária devido à precipitação prematura do quitosano, na mistura de solvente utilizada, a valores de pH superiores a 6.

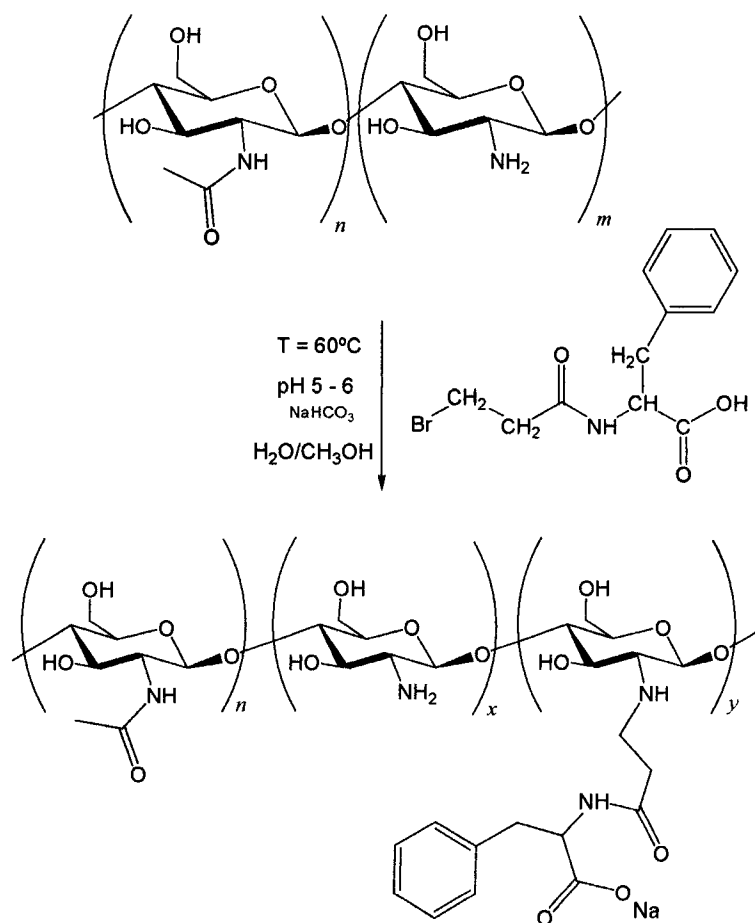


Figura 3.26: Esquema da síntese do derivado QuitβAlaαPhe.

3.2.5.1-Espectroscopia de ^1H -RMN

Os dados espectroscópicos relevantes obtidos para o derivado QuitβAlaαPhe encontram-se resumidos na tabela 3.3.

O espectro de ^1H -RMN deste derivado (figura 3.27) revela a presença de hidrogénios H-1 pertencentes a unidades monoméricas substituídas, evidenciando a introdução do derivado da fenilalanina na estrutura polimérica do quitosano. É possível observar, entre 4,99 e 5,19 ppm, a sobreposição de sinais de prótons H-1 do polímero referentes a unidades GlcNH₂ e GlcNHR. A 5,40 e 5,59 ppm observam-se os dupletos do mesmo tipo de prótons em unidades GlcNH₂ e GlcNHR, resultantes da hidrólise ácida do polímero¹²², derivado das condições ácidas utilizadas na preparação da amostra para a análise. Observam-se ainda os sinais de

ressonância de prótons dos grupos fenilo a 7,39 ppm, e de prótons $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}-$, $-\text{CHCH}_2\text{-Ph}$, $-\text{CHCH}_2\text{Ph}$ de unidades GlcNHR a 2,85, 3,06 e 4,51 ppm, respectivamente, confirmando a substituição na estrutura polimérica.

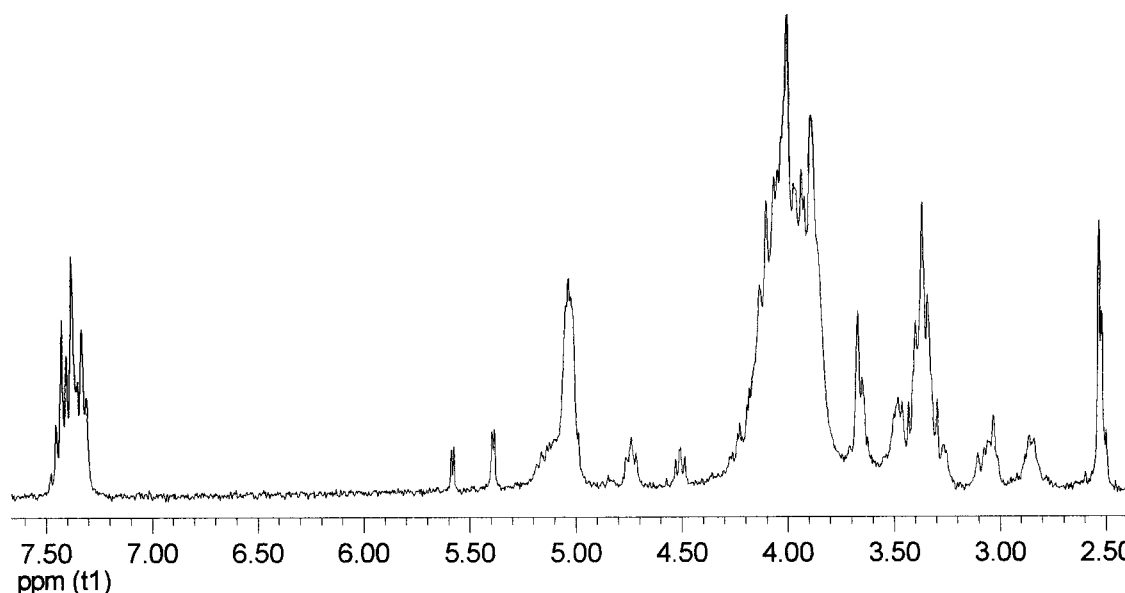


Figura 3.27: Espectro de ^1H -RMN (300 MHz) do Quit β Al α Phe em $\text{D}_2\text{O}:\text{DCl}=1:1$ (δ/ppm): 2,52 (m, 0,30H, $-\text{CH}_3$ de GlcNHAc), 2,85 (m, 0,25H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}-$ de GlcNHR), 3,06 (m, 0,25H, $-\text{CH}_2\text{Ph}$ de GlcNHR), 3,37-4,30 (m, $\approx 6,02\text{H}$, H-2 de GlcNHR e GlcNH $_2$ $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}-$ de GlcNHR e H-3,4,5,6, de GlcNH $_2$, GlcNHR e GlcNHAc), 4,51 (t, 0,12H, $-\text{CHCH}_2\text{Ph}$), 4,74 (t, 0,10H, H-2 de GlcNHAc), 4,99-5,19 (m, 0,83H-1 de GlcNHAc, GlcNH $_2$ e GlcNHR), 5,40 (d, 0,12H, H-1 de GlcNH $_2$ unidade hidrolisada), 5,59 (d, 0,05H de GlcNHR unidade hidrolisada), 7,39 (m, 0,62H, H grupo fenilo de GlcNHR).

Os integrais dos sinais dos espectros de ^1H -RMN foram obtidos considerando como padrão todos os sinais dos prótons H-1 (GlcNH $_2$, GlcNHR e GlcNHAc).

O GA foi calculado com base no integral de ressonância dos sinais dos prótons do grupo metilo de unidades de GlcNHAc (2,52 ppm), ou a partir do sinal de ressonância dos prótons H-2 de unidades GlcNHAc, que neste espectro aparece a 4,74 ppm, não se encontrando sobrepostos aos dos prótons do anel de D-glucosamina. Para este cálculo foi utilizada a equação 3.2. Também neste caso o GA foi de 0,10, valor já esperado dado o baixo pH a que foi realizada a reação.

O GS foi calculado utilizando a equação 3.2, sendo y obtido a partir do integral do sinal de ressonância dos prótons $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}-$, $-\text{CHCH}_2\text{Ph}$, $-\text{CHCH}_2\text{Ph}$, ou de prótons do grupo fenilo de unidades GlcNHR.

3.2.5.2-Análise elementar

Na tabela 3.3 são apresentados os resultados obtidos por AE para o quitosano e seu derivado Quit β Ala α Phe. O GS foi calculado a partir destes dados, utilizando a equação:

$$GS = \frac{\Delta_{C/N}}{(\%_{C/N} - 12 \times M_{C/N}) \times (1 - GA)} \quad (3.10)$$

Nesta expressão, $\Delta_{C/N}$ é a diferença da razão C/N no quitosano e no derivado Quit β Ala α Phe, $M_{C/N}$ é a razão das massas molares C/N e GA o grau de acetilação do derivado, para o qual foi utilizado o valor obtido por $^1\text{H-RMN}$ (0,10).

Neste caso, foi também encontrada uma boa correlação relativamente ao resultado obtido por $^1\text{H-RMN}$.

3.2.6- Propriedades ácido-base

O comportamento ácido-base dos derivados Quit β Ala α Gly e Quit β Ala α Phe foi estudado a partir de titulações potenciométricas com eléctrodo selectivo ao catião H^+ . As curvas obtidas pH vs α são apresentadas na figura 3.28. No gráfico, α corresponde ao grau de neutralização, definido do mesmo modo como o apresentado na secção 3.1.1.3.

As curvas de titulação obtidas para estes dois derivados permitiram calcular as constantes de protonação. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 3.3.

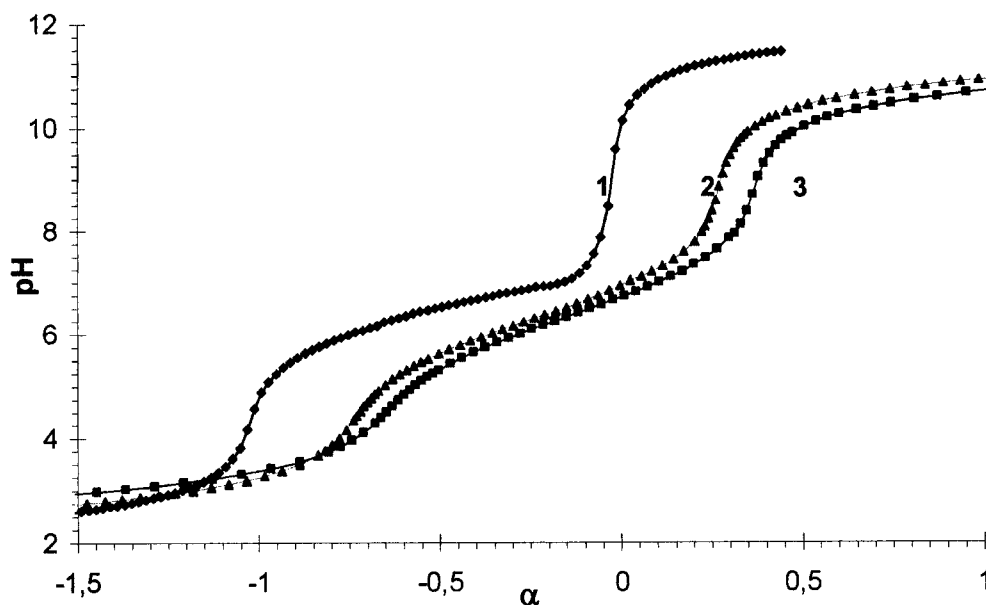


Figura 3.28: Curvas de titulação pH vs α (grau de neutralização) de soluções de quitosano e derivados Quit β Al α Gly e Quit β Al α Phe. Na figura (1)-Quitosano, (2)- Quit β Al α Phe e (3)- Quit β Al α Gly.

Devido à diferença entre o GS dos dois polímeros, não foi possível estabelecer uma relação directa entre os valores encontrados e o tipo de substituinte introduzido na cadeia polimérica. Todavia, introduzindo nesta discussão o derivado CEQ1 (GS 0,27, $\log K_1^H$ $6,80 \pm 0,01$; $\log K_2^H$ $2,85 \pm 0,02$), com um GS semelhante ao obtido para o Quit β Al α Gly, verificamos que ocorreu uma ligeira diminuição do carácter básico dos grupos amino para o derivado Quit β Al α Gly. Isso poderá ser devido ao facto dos grupos substituintes no derivado peptídico serem maiores, o que dá origem a efeitos estéricos que dificultam o acesso ao protão pelos grupos amino. Esta observação explica também o menor carácter básico dos grupos amino nos derivados Quit β Al α Phe.

Para os derivados peptídicos não foi calculado o GS a partir dos resultados das titulações potenciométricas, devido ao facto das amostras conterem HCl que não foi totalmente removido durante a diálise.

Tabela 3.3: Parâmetros determinados para a caracterização dos derivados peptídicos do quitosano.

Polímero	Tempo/dias	¹ H-RMN				AE			PESH		
		GA n ^{a)}	x ^{a)}	y ^{a)}	GS ^{b)}	GS ^{b)}	C /%	H /%	N /%	log K ₁ ^{H c)}	log K ₂ ^{H e)}
Quitosano ^{d)}	--	0,10	0,90	-	-	-	39,42	6,91	7,22	6,40 ± 0,01	-
QuitβAlαGly	8	0,10	0,67	0,23	0,26	0,26	38,64	6,29	7,38	6,38 ± 0,02	2,05 ± 0,06
QuitβAlαPhe	14	0,10	0,78	0,12	0,13	0,18	42,06	6,91	6,85	6,33 ± 0,02	1,37 ± 0,1

a) ver reações das figuras 3.23 e 3.26.

b) o grau de substituição (GS) foi calculado por unidade de resíduos D-glucosamina do quitosano.

c) T 25 °C, 0,1M KNO₃

d) trata-se do mesmo lote utilizado nas sínteses dos derivados CEQ, no entanto, como a análise elementar foi encomendada a uma outra instituição, tornou-se necessário submetê-la a uma nova análise, nas mesmas condições dos derivados peptídicos.

CAPÍTULO

4

**ESTUDOS DE
COMPLEXAÇÃO COM COBRE (II)**

4- Estudos de Complexação com Cobre (II)

Os estudos da complexação do catião cobre (II) com os derivados do quitosano sintetizados, pode ser realizado indirectamente a partir dos efeitos dos iões metálicos no equilíbrio ácido-base. O catião cobre (II) é considerado um candidato ideal para este fim, devido ao facto dos grupos $-NH_2$ presentes nas unidades monoméricas dos derivados terem forte afinidade para coordenar com este ião metálico. Foram, por isso, realizadas titulações ácido-base de soluções ácidas dos derivados CEQ1, CEQ3, CEQ4, Quit β Ala α Gly e Quit β Ala α Phe com cobre (II), utilizando diferentes razões molares Cu(II)/derivado. As curvas de titulação obtidas são apresentadas nas figuras 4.1 a 4.5.

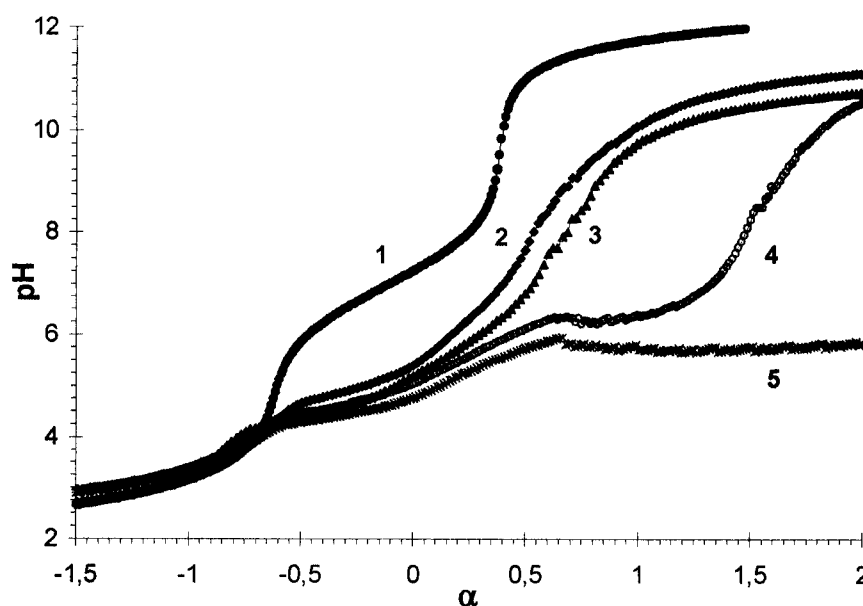


Figura 4.1: Curvas de titulação pH vs α (grau de neutralização) de soluções de CEQ1 na presença de catião cobre (II) em diferentes razões molares $[Cu(II)]/[CEQ1]$: (1)- $[Cu(II)]/[CEQ1] = 0$; (2)- $[Cu(II)]/[CEQ1] = 0,25$; (3)- $[Cu(II)]/[CEQ1] = 0,5$; (4)- $[Cu(II)]/[CEQ1] = 1$ e (5)- $[Cu(II)]/[CEQ1] = 2$.

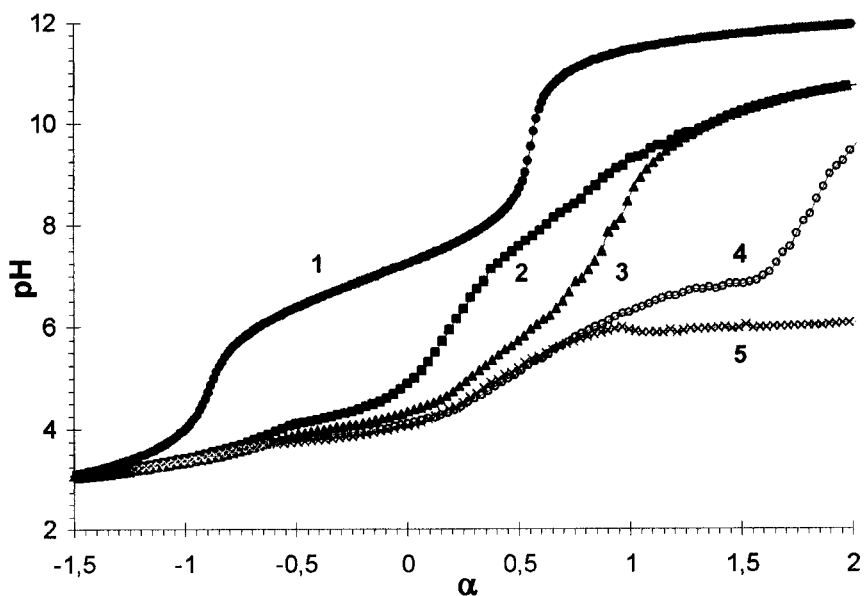


Figura 4.2: Curvas de titulação pH vs α (grau de neutralização) de soluções de CEQ3 na presença de cátion cobre (II) em diferentes razões molares $[Cu(II)]/[CEQ3]$: (1)- $[Cu(II)]/[CEQ3] = 0$; (2)- $[Cu(II)]/[CEQ3] = 0,25$; (3)- $[Cu(II)]/[CEQ3] = 0,5$; (4)- $[Cu(II)]/[CEQ3] = 1$ e (5)- $[Cu(II)]/[CEQ3] = 2$.

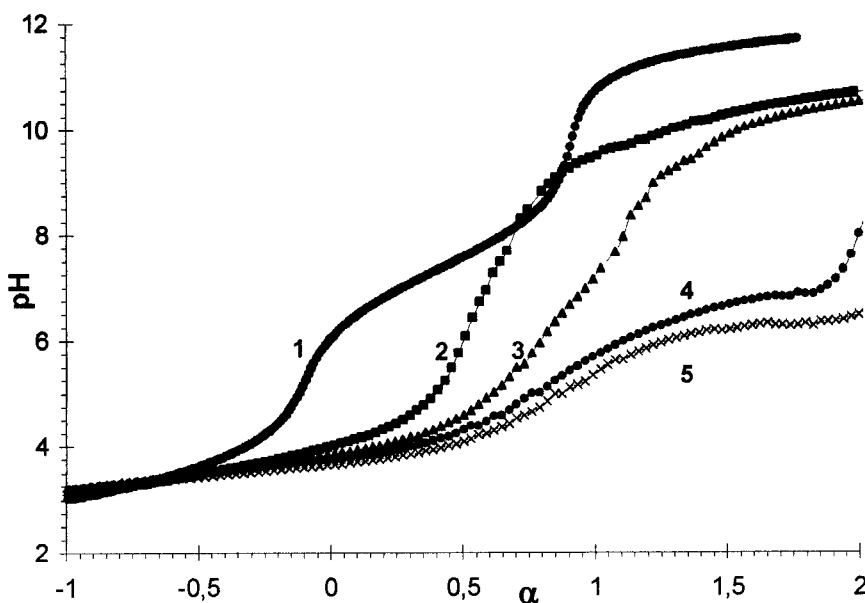


Figura 4.3: Curvas de titulação pH vs α (grau de neutralização) de soluções de CEQ4 na presença de cátion cobre (II) em diferentes razões molares $[Cu(II)]/[CEQ4]$: (1)- $[Cu(II)]/[CEQ4] = 0$; (2)- $[Cu(II)]/[CEQ4] = 0,25$; (3)- $[Cu(II)]/[CEQ4] = 0,5$; (4)- $[Cu(II)]/[CEQ4] = 1$ e (5)- $[Cu(II)]/[CEQ4] = 2$.

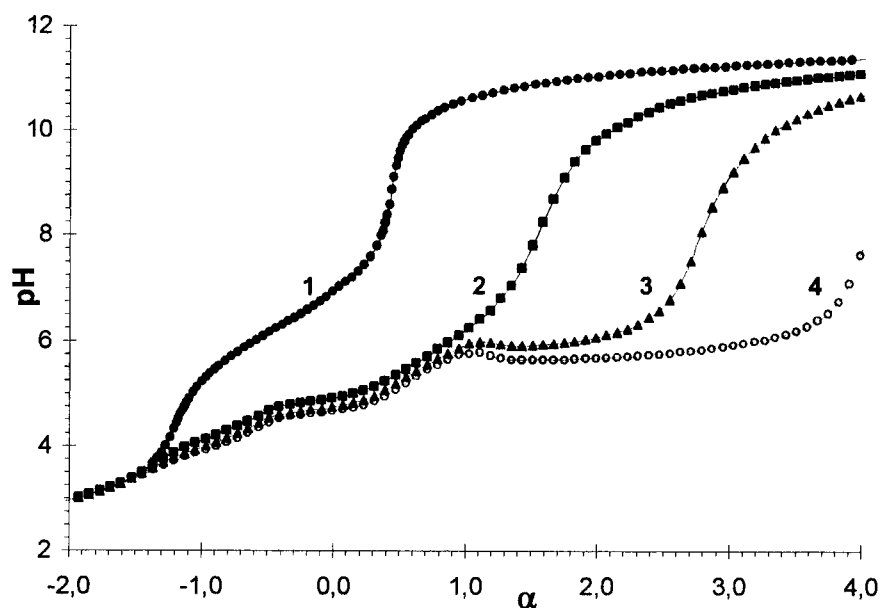


Figura 4.4: Curvas de titulação pH vs α (grau de neutralização) de soluções de Quit β Al α Gly na presença de cátion cobre (II) em diferentes razões molares [Cu(II)]/[Quit β Al α Gly]: (1)-[Cu(II)]/[Quit β Al α Gly] = 0; (2)-[Cu(II)]/[Quit β Al α Gly] = 0,5; (3)-[Cu(II)]/[Quit β Al α Gly]= 1 e (4)-[Cu(II)]/[Quit β Al α Gly] = 1,5.

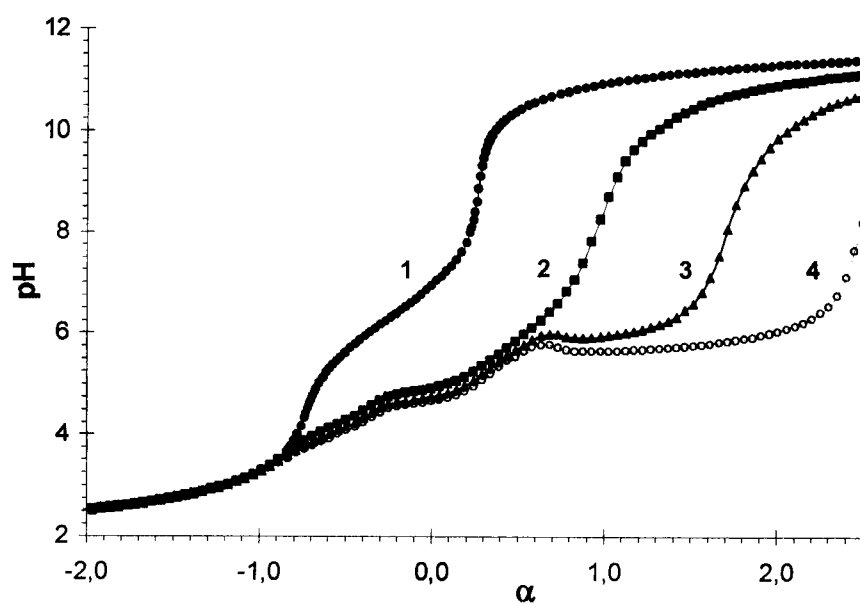


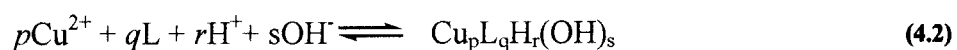
Figura 4.5: Curvas de titulação pH vs α (grau de neutralização) de soluções de Quit β Al α Phe na presença de cátion cobre (II) em diferentes razões molares [Cu(II)]/[Quit β Al α Phe] (1)-[Cu(II)]/[Quit β Al α Phe] = 0; (2)-[Cu(II)]/[Quit β Al α Phe] = 0,5; (3)- [Cu(II)]/[Quit β Al α Phe]= 1 e (4)-[Cu(II)]/[Quit β Al α Phe] = 1,5.

A valores de pH inferiores a 4, as curvas de titulação dos derivados do quitosano na presença de ião cobre (II) apresentam um comportamento semelhante às realizadas na ausência do metal. Este comportamento deve-se ao facto dos grupos amino e carboxílico se encontrarem sob a forma protonada, não sendo significativa a competição do ião metálico pelos sítios de coordenação. A valores de pH superiores, observam-se alterações importantes nestas curvas de titulação, sugerindo a formação de complexos envolvendo os iões cobre (II) e os grupos de coordenação presentes nas unidades monoméricas dos derivados. Quando as titulações atingiam valores de pH próximos de 7, iniciava-se a precipitação dos polímeros. Este comportamento foi mais nítido quanto maior a razão Cu(II)/derivado utilizada, principalmente no caso dos derivados CEQ devido à maior concentração de polímero empregue nas titulações. Esta precipitação teve uma interferência significativa sobre a resposta do eléctrodo, reflectida no tempo de estabilização e reprodutibilidade dos valores de pH, evidente nas curvas de titulação apresentadas.

Os dados experimentais, limitados à primeira região tampão (pH < 7), foram utilizados para a determinação das espécies que caracterizavam o sistema em estudo e respectivas constantes de estabilidade, de acordo com a notação geral β_{pqrs} , traduzida pela equação:

$$\beta_{pqrs} = \frac{[Cu_p L_q H_r (OH)_s]}{[Cu^{2+}]^p \times [L]^q \times [H^+]^r \times [(OH^-)]^s} \quad (4.1)$$

correspondendo à equação química geral:



em que L representa a forma desprotonada das unidades monoméricas dos derivados. Para estes estudos, recorreu-se ao programa HYPERQUAD, para o qual foram fixadas as constantes de formação dos hidroxocomplexos de cobre (II)^{123, 124}: $\log \beta_{1001} = 6,0$; $\log \beta_{1002} = 12,8$; $\log \beta_{1003} = 15,7$; $\log \beta_{1004} = 16,6$ e $\log \beta_{2002} = 17,5$. Foram também fixados os valores de $pK_w = 13,86$, correspondente à autoprotólise da água e das constantes de protonação dos derivados do quitosano, determinadas experimentalmente neste trabalho (tabelas 3.1 e 3.3).

A determinação das constantes de estabilidade dos complexos formados foi iniciada, considerando a possibilidade de formação, na zona de pH escolhida, de várias espécies envolvendo a participação do catião cobre (II), de unidades monoméricas dos derivados e de aniões hidróxido em diferentes proporções estequiométricas. Este modelo inicial foi aplicado para todas as titulações, sendo refinado até à obtenção de resultados que apresentassem parâmetros estatísticos satisfatórios e fossem reprodutíveis para as curvas de titulação com diferentes proporções Cu(II)/derivado.

Na tabela 4.1 são apresentadas as espécies resultantes do melhor ajuste às curvas de titulação e as respectivas constantes de estabilidade. Os diagramas de distribuição destas espécies no sistema em estudo são apresentados nas figuras 4.6 e 4.7.

Tabela 4.1: Composição, notação e constantes de formação obtidas para os vários complexos Cu(II)-quitosano e Cu(II)-derivados do quitosano.

Ligando	GS	Espécie (pqrs)	Fórmula	$\log\beta_{pqrs}$
CEQ1	0,27	1 2 0 0	CuL ₂	9,30 ± 0,03
CEQ3	0,56	1 2 0 0	CuL ₂	11,09 ± 0,06
CEQ4	0,84	1 2 0 0	CuL ₂	12,20 ± 0,05
QuitβAlaαPhe	0,13	1 1 0 1	CuLOH	15,19 ± 0,10
QuitβAlaαGly	0,26	1 1 0 1	CuLOH	16,15 ± 0,06
Quitosano⁹²	-	1 1 0 2 1 2 0 2	CuL(OH) ₂ CuL ₂ (OH) ₂	5,47 8,09

Nos três sistemas Cu(II)-CEQ estudados, apenas o modelo que tomava em consideração a formação exclusiva da espécie CuL₂ produziu um ajuste satisfatório relativamente aos resultados experimentais. No caso dos derivados peptídicos QuitβAlaαPhe e QuitβAlaαGly, também um único modelo resultou num ajuste satisfatório, correspondendo à espécie CuLOH. Estes modelos, CuL₂ e CuLOH, foram diferentes dos propostos por Rhazi *et al.*⁹² em estudos com o quitosano, nos quais apontava para a formação das espécies CuL(OH)₂ e CuL₂(OH)₂ (figura 1.16). Este facto evidencia a influência dos grupos substituintes na formação dos complexos envolvendo o ião cobre (II) e os derivados do quitosano estudados. Considerando

os dois modelos de complexação do quitosano mais conhecidos, pode-se propor o modelo em ponte (“bridge model”) correspondente à espécie CuL_2 , como o modelo de coordenação predominante para os derivados CEQ, e o modelo pendente (“pendant model”) como modelo predominante no caso dos derivados peptídicos do quitosano.

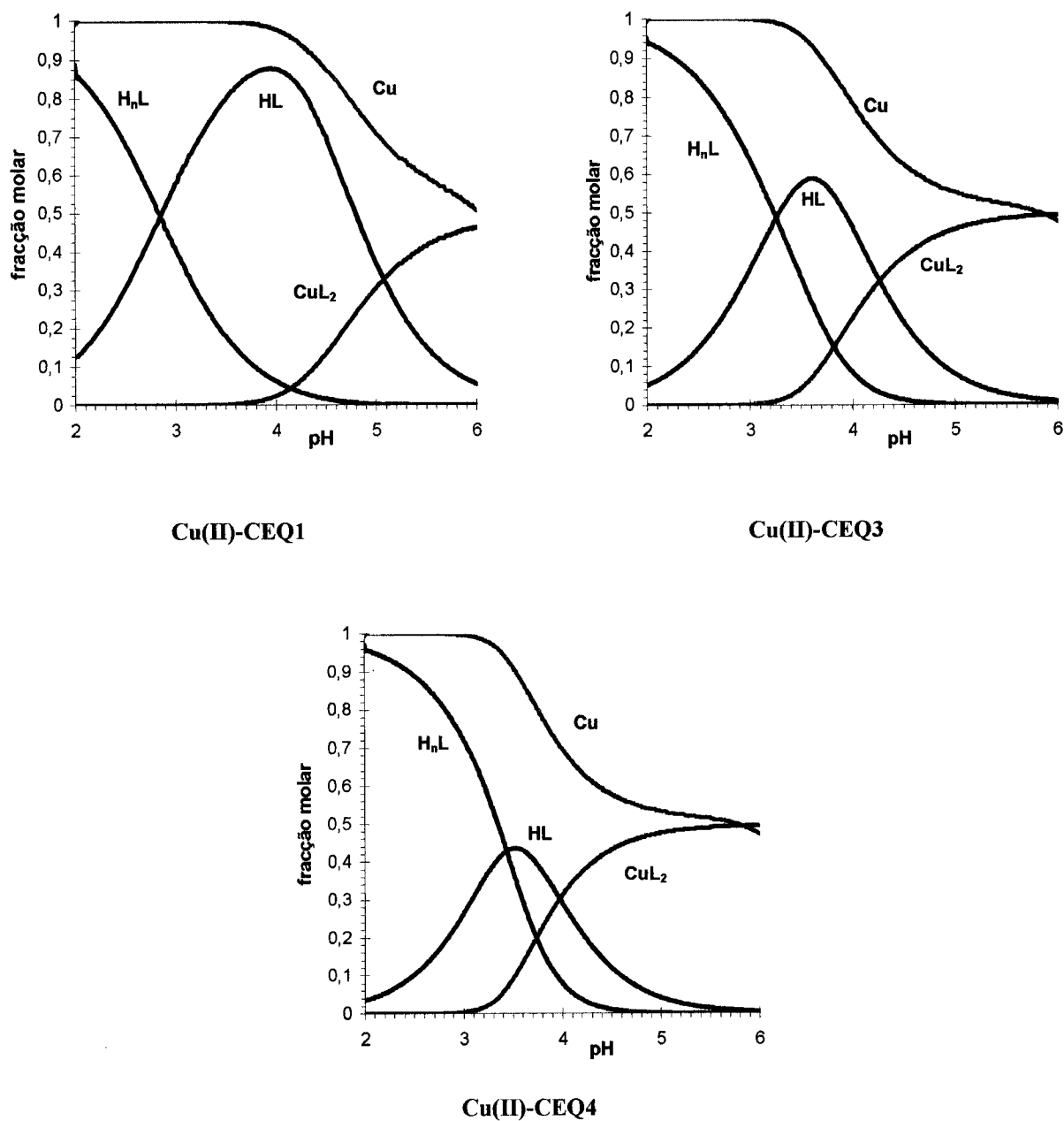


Figura 4.6: Diagramas de distribuição de espécies para os sistemas Cu(II)-CEQ1, Cu(II)-CEQ3 e Cu(II)-CEQ4, em função do pH. As condições utilizadas foram $[\text{Cu(II)}]=[\text{GlcNR}_2]= 8 \times 10^{-3} \text{ M}$, $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$, $I = 0,1 \text{ M KNO}_3$.

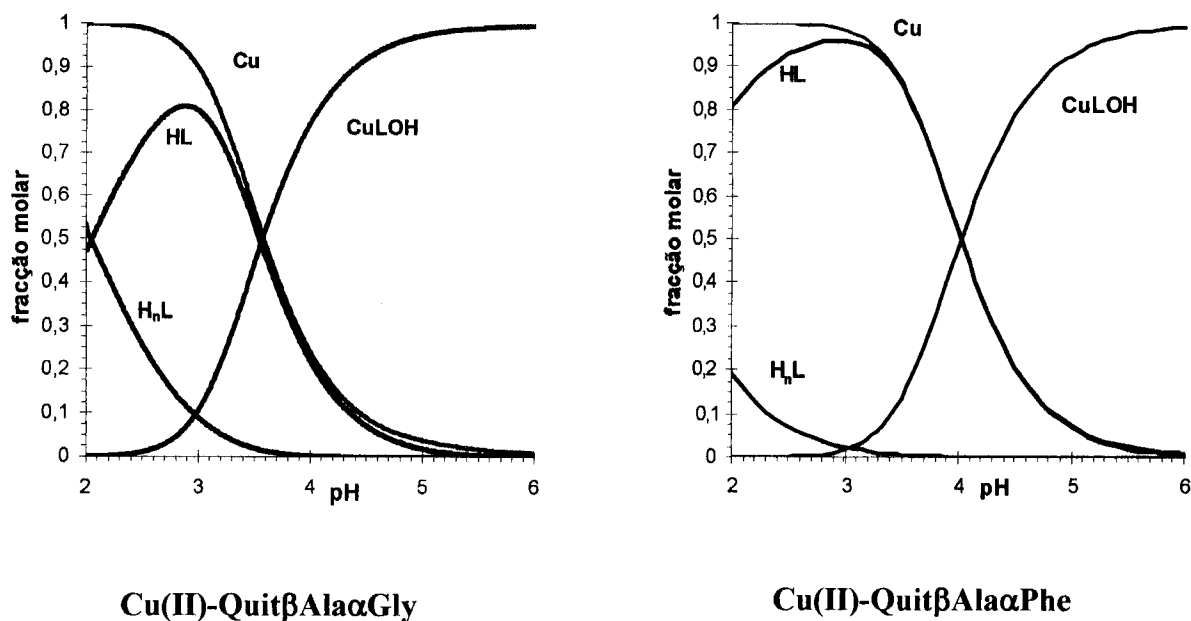


Figura 4.7: Diagramas de distribuição de espécies para os sistemas Cu(II)-QuitβAlαGly e Cu(II)-QuitβAlαPhe em função do pH. As condições utilizadas foram $[Cu(II)]=[GlcNR_2]=3 \times 10^{-3}$ M, $T = 25,0$ °C, $I = 0,1$ M KNO_3 .

As constantes de estabilidade obtidas para os sistemas Cu(II)-CEQ são superiores às obtidas para o sistema Cu(II)-quitosano, indicando uma maior estabilidade dos complexos formados com os derivados CEQ. Este facto estará relacionado com o aumento da basicidade dos grupos amino e com a presença dos grupos quelantes carboxietilo no polímero, que deverão participar nos complexos formados com o metal. A comparação entre as constantes de estabilidade obtidas para os três sistemas Cu(II)-CEQ permite verificar que a estabilidade dos complexos formados aumenta com o GS ($CEQ1 < CEQ3 < CEQ4$), o que poderá estar relacionado com a maior possibilidade de formação de quelatos devido ao aumento de grupos complexantes nas unidades monoméricas dos derivados. Esta observação é corroborada pelos diagramas de distribuição das espécies na figura 4.6, onde se pode verificar a tendência da formação dos complexos a menores valores de pH, com o aumento do GS dos derivados CEQ.

Relativamente, aos sistemas Cu(II)-QuitβAlαPhe e Cu(II)-QuitβAlαGly, os valores superiores obtidos para as constantes de estabilidade dão indicação da formação de espécies mais estáveis que as anteriormente descritas, envolvendo o ião cobre (II) e os grupos coordenantes destes derivados. Esta afirmação é corroborada pelos diagramas de distribuição

das espécies obtidos para os sistemas Cu(II)-Quit β Ala α Phe e Cu(II)-Quit β Ala α Gly, onde se observa a formação dos complexos a valores de pH ainda inferiores aos observados para os derivados CEQ. Além disso, se tivermos em conta apenas o carácter básico dos grupos amino dos derivados peptídicos do quitosano, não seria de esperar a obtenção de constantes de estabilidade superiores às observadas para os derivados CEQ. O resultado obtido reforça a hipótese de participação dos grupos substituintes dos derivados peptídicos na formação dos complexos com iões cobre (II).

Embora não se possa excluir completamente, nos modelos utilizados para o cálculo computacional com o HYPERQUAD, não foi considerada a interacção entre o iões cobre (II) e os grupos OH do carbono C3 devido à desfavorável posição trans destes relativamente aos grupos amino^{125, 126} e, no caso dos derivados estudados, também devido aos efeitos estéricos provocados pelos grupos substituintes. Também não foi considerada a interacção do ião metálico com o grupo amida das unidades N-acetiladas dos derivados, devido ao baixo grau de acetilação dos polímeros (GA = 0,10) e à fraca habilidade complexante destes grupos para os iões cobre (II) em solução aquosa¹²⁷.

Apesar dos cálculos com o HYPERQUAD não indicarem a existência de outros complexos envolvendo o ião cobre (II) e os derivados CEQ, poderá ser considerada a possibilidade de se formarem espécies com constantes de estabilidade muito baixas (formando-se em quantidades muito pequenas), de tal modo que a análise potenciométrica, por si só, não foi suficientemente sensível para as detectar.

CAPÍTULO

5

CONCLUSÕES

5- Conclusões

Foram sintetizados e caracterizados dois tipos de derivados do quitosano: os derivados N-(2-carboxietil)quitosano e os derivados peptídicos do quitosano. A síntese dos derivados N-(2-carboxietil)quitosano, resultou em produtos com diferentes GS que variaram entre 0,27 e 1,00, obtidos por alquilação do quitosano com o ácido 3-bromopropanóico em condições alcalinas moderadas. Quanto aos derivados peptídicos, sintetizaram-se dois derivados, o Qui β Ala α Gly (GS 0,26) e Qui β Ala α Phe (GS 0,13), através da reacção do quitosano com o N-(3-bromopropanoil)glicina em meio neutro, ou com o N-(3-bromopropanoil)fenilalanina em meio ácido fraco, respectivamente. Estes derivados foram caracterizados recorrendo às técnicas de ^1H -RMN, AE e PESH, as quais permitiram quantificar a substituição na estrutura polimérica em termos de GS e verificar a introdução regioselectiva dos substituintes nos grupos amino. Estas técnicas permitiram também verificar que, sob as condições de reacção utilizadas, não há alteração do grau de acetilação do polímero.

Para a síntese dos derivados peptídicos, foi necessário efectuar previamente a síntese do N-(3-bromopropanoil)glicinato de terc-butilo (η 71%) e do N-(3-bromopropanoil)fenilalaninato de terc-butilo (η 78%), que por acidólise deram origem aos produtos N-(3-bromopropanoil)glicina (η 86%) e N-(3-bromopropanoil)fenilalanina (η 78%), respectivamente, posteriormente utilizados na derivatização do quitosano. Estes quatro produtos foram caracterizados por ^1H -RMN e ^{13}C -RMN.

Os estudos de CDV dos derivados CEQ revelaram a presença de um evento térmico, que não se observa para o quitosano, e que parece estar relacionado com o GS dos derivados CEQ. Estes resultados permitem propor que este evento térmico seja resultante da decomposição endotérmica do substituinte carboxietilo, resultando na formação de ácido acrílico. A confirmação desta afirmação está dependente de novos estudos, onde sejam introduzidos novos derivados, para cobrir uma gama mais alargada de GS.

Das titulações potenciométricas ácido-base, verificou-se a influência dos grupos substituintes no carácter básico dos grupos amino presentes nos derivados. No caso dos derivados CEQ o aumento do GS conduzia a uma aumento do carácter básico destes grupos, sendo encontrada

uma boa correlação entre $\log K_1^H$ e o GS ($\log K_1^H = 0,978 \cdot \text{GS} + 6,45$). Para os derivados peptídicos, observou-se uma ligeira diminuição do carácter básico dos grupos amino, principalmente para o derivado $\text{Quit}\beta\text{Ala}\alpha\text{Phe}$. Este comportamento pode ser resultado do aumento de impedimentos estéricos provocados pelo maior tamanho do substituinte.

A partir dos estudos de complexação com cobre (II), foram propostos os modelos de coordenação em ponte $[\text{Cu}(\text{GlcNR}_2)_2]$ para os derivados CEQ estudados e o modelo pendente $[\text{CuGlcNR}_2\text{OH}]$ para os derivados peptídicos. As constantes de estabilidade determinadas para estas espécies mostram uma maior estabilidade dos complexos formados com os derivados CEQ e peptídicos, relativamente aos formados com o quitosano, sugerindo a participação dos substituintes nos complexos formados entre os derivados e os iões cobre (II). Os complexos formados eram insolúveis, o que aliado às propriedades quelantes vantajosas, possibilita a utilização destes materiais para a remoção de metais de transição de águas residuais.

Relativamente aos derivados peptídicos do quitosano, o método de síntese adoptado pode ser considerado como uma alternativa para a introdução de péptidos com propriedades farmacológicas na estrutura do quitosano. O método proposto demonstrou ser eficaz para a ancoragem regiosselectiva de aminoácidos proteinogénicos. Tal abre novas perspectivas para futuros métodos de ligação covalente ao quitosano de péptidos, proteínas e outros fármacos ou pró-fármacos contendo aminoácidos ou oligopéptidos. Estes produtos podem ser utilizados em aplicações biomédicas, como por exemplo na veiculação de fármacos e melhoramento das suas características de solubilidade e biodisponibilidade. Foram já publicados alguns trabalhos onde se ligaram aminoácidos e dipéptidos a fármacos, obtendo-se novos compostos promissores do ponto de vista terapêutico^{128, 129}. Estando já desbravado o primeiro passo de ligação de um aminoácido ao quitosano, o passo seguinte será, naturalmente, a ligação directa desses derivados peptídicos ao polímero.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

- 1- Velásquez, C.L.; *Revista Iberoamericana de Polímeros*; **2003**; 4; 91
- 2- Cellulose and Renewable Materials Division of American Chemical Society; <http://membership.acs.org/C/CELL/apayen.htm>; **Março 2005**
- 3- Web Chitin and Chitosan Association; <http://www.chitin.org/chemistry/history.htm>; **Março 2005**
- 4- Soil and Health Library; <http://www.soilandhealth.org/01aglibrary/010104howard/010104howardch2.html>; **Março 2005**
- 5- Dinesh, K.S.; Alok, R.R.; *Journal of Macromolecular Science-Polymer Reviews Part C*; **2000**; 40; 69
- 6- Goycoolea, F.M.; Agulló, E.; Mato, R.; *Fuentes y procesos de obtención en: Quitina y Quitosano*; Pastor A. (Ed.); Pontificia Universidad Católica del Perú –CYTED-CIAD; **2004**; p.105
- 7- No, H.K.; Meyers, S.P.; *Preparation of chitin and chitosan in: Chitin Handbook*; Muzzarelli, R.A.A.; Peter, M.G. (Ed.); European Chitin Society; **1997**; p.475
- 8- Blackwell, J.; Parker, K.D.; Rudall, K.M.; *Journal of Molecular Biology*; **1967**; 28; 383
- 9- Jaworska, M.; Sakurai, K.; Gaudon, P.; Guibal, E.; *Polymer International*; **2003**; 52; 198
- 10- Aoi, K.; Seki, T.; Okada, M.; Sato, H.; Shin-ichi, M.; Ohtani, H.; Tsuge, S.; Shiogai, Y.; *Macromolecular Chemistry and Physics*; **2000**; 201; 1701
- 11- Campana Filho, S.P.; Singnini, R.; *Polímeros: Ciência e Tecnologia*; **2001**; 11; p.169

- 12- Abram, A.P.; Higuera, I.; *Generalidades en: Quitina y Quitosano*; Pastor A. (Ed.); Pontificia Universidad Católica del Perú –CYTED-CIAD; **2004**; p.25
- 13- Mima, S.; Miya, R.; Iwamoto, R.; Yoshikawa, S.; *Journal of Applied Polymer Science*; **1983**; 28; 1909
- 14- Domard, A.; Rinaudo, M.; *International Journal of Biological Macromolecules*; **1983**; 5; 49
- 15- Kurita, K.; Sannan, T.; Iwakura, Y.; *Makromolekulare Chemie*; **1977**; 178; 3197
- 16- Kurita, K.; Hirakawa, M.; Mori, T.; Nishiyama, Y.; *Facile preparation of tritylated and trimethylsilylated derivatives starting from β -chitin in: Advances in Chitin Science Vol II*; Domard, A.; Roberts, G.A.F.; Vårum, K.M. (Ed.); Jacques André Publishers; Lyon; **1998**; p.355
- 17- Okuyama, K.; Noguchi, K.; Kanenari, M.; Egawa, T.; Osawa, K.; Ogawa, K.; *Carbohydrate Polymers*; **2000**; 41; 237
- 18- Rinaudo, M.; Domard, A.; *Solution properties of chitosan in: Chitin and Chitosan*; Skjak-Braek, G.; Anthonsen, T.; Sandford, P. (Ed.); Elsevier Science Publishers; London; **1989**; p.71
- 19- Santos, J.E.; Soares, J.P.; Dockal, E.R.; Campana Filho, S.P.; Cavalheiro, E.T.G.; *Polímeros: Ciência e Tecnologia*; **2003**; 13; 242
- 20- Canella, K.M.N.C.; Garcia, R.B.; *Química Nova*; **2001**; 24; 13
- 21- Curotto, E.; Aros, F.; *Analytical Biochemistry*; **1993**; 211; 240
- 22- Prochazkova, S.; Vårum, K.M.; Østgaard, K.; *Carbohydrate Polymers*; **1999**; 38; 115

- 23- Argüelles, W.; Caballero, A.H.; Acosta, N.; Galed, G.; Gallardo, A.; Miralles, B.; Peniche, C.; Román, J.S.; *Caracterización de Quitina y Quitosano en: Quitina y Quitosano*; Pastor A. (Ed.); Pontificia Universidad Católica del Perú –CYTED-CIAD; **2004**; p.155
- 24- Muzzarelli, R.A.A.; Rocchetti, R.; Stanic, V.; Weckx, M.; *Methods for the determination of the degree of acetylation of chitin and chitosan in: Chitin Handbook*; Muzzarelli, R.A.A.; Peter, M.G. (Ed.); European Chitin Society; **1997**; p.109
- 25- Bough, W.A.; Salter, W.L.; Wu, A.C.M.; Perkins, B.E.; *Biotechnology and Bioengineering*; **1978**; 20; 1931
- 26- Terbojevich, M.; Cosani, A.; *Molecular weight determination of chitin and chitosan in: Chitin Handbook*; Muzzarelli, R.A.A.; Peter, M.G. (Ed.); European Chitin Society; **1997**; p.87
- 27- Li, Q.; Dunn, E.T.; Grandmaison, E.W.; Goosen, M.F.A.; *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*; **1992**; 7; 370
- 28- Chang, K.L.B.; Lee, J.; Fu, W.; *Journal of Food and Drug Analysis*; **2000**; 8; 75
- 29- Roberts, G.A.F.; *Chitin Chemistry*; Macmillan; London; **1992**; p.249
- 30- Aronson, N.N.Jr.; Halloran, B.A.; Alexyev, M.F.; Madura L.A.J.D.; Pasupulati, L.; Worth, C.; van Roey, P.; *Biochemical Journal Immediate Publication*; **2003**; 376; 87
- 31- Somorin, O.; Nishi, N.; Tokura, S.; Nogushi, J.; *Polymer Journal*; **1979**; 11; 391
- 32- Tokura, S.; Nishi, N.; Somorin, O.; Nogushi, J.; *Polymer Journal*; **1980**; 12; 695
- 33- Nishi, N.; Nogushi, J.; Tokura, S.; Shiota, H.; *Polymer Journal*; **1979**; 11; 27
- 34- Szosland, L.; *Di-O-butrylchitin in: Chitin Handbook*; Muzzarelli, R.A.A.; Peter, M.G. (Ed.); European Chitin Society; **1997**; p.53

- 35- Monagas, S.A.F.; *Revista Cubana de Farmacia*; **1998**; 32; 125
- 36- Nakamatsu, J.; Rodríguez, N.; *Química de la Quitina y el Quitosano en: Quitina y Quitosano*; Pastor A. (Ed.); Pontificia Universidad Católica del Perú – CYTED-CIAD; **2004**; p.75
- 37- Kurita, K.; Shimada, K.; Nishiyama, Y.; Shimojoh, M.; Nishimura, S.; *Macromolecules*; **1998**; 31; 4764
- 38- Zou, Y.; Khor, E.; *Biomacromolecules*; **2005**; 6; 80
- 39- Kurita, K.M.; Yoshino, H.; Yolota, K.; Ando, M.; Inoue, S.; Ishii, S.; Nishimura, S.; *Macromolecules*; **1992**; 25; 3786
- 40- Nishimura, S.; Kohgo, O.; Kurita, K.; Vittavatvong, C.; Kusukhara, H.; *Chemistry Letters*; **1991**; 243
- 41- Naggi, A.M.; Torri, G.; Compagnoni, T.; Casu, B.; *Synthesis and physico-chemical properties of the polyampholyte chitosan 6-sulfate in: Chitin in Nature and Technology*; **1986**; p.371
- 42- Holme, K.R.; Perlin, A.S.; *Carbohydrate Research*; **1997**; 302; 7
- 43- Lang, G.; Maresch, G.; Birkel, S.; *Hydroxyalkyl chitosans in: Chitin Handbook*; Muzzarelli, R.A.A.; Peter, M.G. (Ed.); European Chitin Society; **1997**; p.61
- 44- Lang, G.; Wendel, H.; Birkel, S.; *Quaternary Chitosan Salts in: Chitin Handbook*; Muzzarelli, R.A.A.; Peter, M.G. (Ed.); European Chitin Society; **1997**; p.67
- 45- Wang, X.; Ma, J.; Wang, Y.; He, B.; *Biomaterials*; **2001**; 22; 2247
- 46- Harmon, R.E.; De, K.K.; Gupta, S.K.; *Carbohydrate Research*; **1973**; 31; 407

- 47- Kurita, K.; Hirakawa, M.; Nishiyama, Y.; *Chemistry Letters*; **1999**; 28; 771
- 48- Hirano, S.; *N-acyl, N-arylidene and N-alkylidene chitosans, and their hydrogels in: Chitin Handbook*; Muzzarelli, R.A.A.; Peter, M.G. (Ed.); European Chitin Society; **1997**; p.71
- 49- Airoidi, C.M.O.A.Jr.; *International Journal of Macromolecules*; **1999**; 26; 119
- 50- Juang, R.; Tseng, R.; *Advances in Environmental Research*; **2002**; 6; 171
- 51- Muzzarelli, R.A.A.; Tanfani, F.; Emanuelli, M.; Mariotti, S.; *Carbohydrate Research*; **1982**; 107; 199
- 52- Muzzarelli, R.A.A.; Weckx, M.; Filippini, O.; Lough, C.; *Carbohydrate Polymers*; **1989**; 11; 307
- 53- Lee, Y.M.; Shin, E.M.; Noh, S.T.; *Angewandte Makromolekulare Chemie*; **1991**; 192; 169
- 54- Sashiwa, H.; Shigemasa, Y.; Roy, R.; *Chemistry Letters*; **2000**; 29; 862
- 55- Orienti, I.; Luppi, B.; Zecchi, V.; *Journal of Cosmetic Science*; **1999**; 50; 307
- 56- Skorik, Y.A.; Gomes, C.A.R.; Vasconcelos, M.T.S.D.; Yatluk, Y.G.; *Carbohydrate Research*; **2003**; 338; 271
- 57- Bronsted, J.; Kopecek, J.; *Biomaterials*; **1991**; 12; 584
- 58- Guggi, D.; Bernkop-Schnürch, A.; *International Journal of Pharmaceutics*; **2003**; 252; 187
- 59- Mitani, T.; Ishii, H.; *Synthesis of chitosan-amino acid and chitosan-peptide conjugates and their use in heavy metal uptake in: Chitin Handbook*; Muzzarelli, R.A.A.; Peter, M.G. (Ed.); European Chitin Society; **1997**; p.77

- 60- Varma, A.J.; Deshpande, S.V.; Kennedy, J.F.; *Carbohydrate Polymers*; **2004**; 55; 77
- 61- Moffatt, M.F.; Cookson, W.O.C.; *Nature Medicine*; **1999**; 5; 380
- 62- Illum, L.; Jabbal-Gill, I.; Hinchcliffe, M.; Fisher, A.N.; Davis, S.S.; *Advanced Drug Delivery Reviews*; **2001**; 51; 81
- 63- Guggi, D.; Krauland, A.H.; Bernkop-Schnürch, A.; *Journal of Controlled Release*; **2003**; 92; 125
- 64- Hirano, S.; *Polymer International*; **1999**; 48; 732
- 65- Mao, J.; Zhao, L.; De Yao, K.; Shang, Q.; Yang, G.; Cao, Y.; *Journal of Biomedical Materials Research Part A*; **2003**; 64; 301
- 66- Zhang, Y.; *Tissue Engineering*; **2003**; 9; 337
- 67- Tokura, S.; Tamura, H.; *Biomacromolecules*; **2001**; 2; 417
- 68- Thanou, M.; Verhoef, J.C.; Marbach, P.; Junginger, H.E.; *Journal of Pharmaceutical Sciences*; **2000**; 89; 951
- 69- Felt, O.; Buri, P.; Gurny, R.; *Drug Development and Industrial Pharmacy*; **1998**; 24; 979
- 70- Illum, L.; *Pharmaceutical Research*; **1998**; 15; 1326
- 71- Kanauchi, O.; Deuchi, K.; Imasato, Y.; Shizukuishi, M.; Kobayashi, E.; *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*; **1995**; 59; 789
- 72- Hirano, S.; *Biotechnology Annual Review*; **1996**; 2; 237

- 73- Peniche, C.; Aguilar, M.R.; Aranaz, I.; Mayorga, A.; Paños, I.; Román, J.S.; Tapia, C.; *Aplicaciones en Ciencias de la Vida en: Quitina y Quitosano*; Pastor A. (Ed.); Pontificia Universidad Católica del Perú – CYTED-CIAD; **2004**; p. 267
- 74- Kumar, M.R.; *Reactive & Functional Polymers*; **2000**; 46; 1
- 75- Senso, A.; Oliveros, L.; Minguillón, C.; *Journal of Chromatography A*; **1999**; 839; 15
- 76- Franco, P.; Senso, A.; Oliveros, L.; Minguillón, C.; *Journal of Chromatography A*; **2001**; 906; 155
- 77- Senso, A.; Franco, P.; Oliveros, L.; Minguillón C.; *Carbohydrate Research*; **2000**; 329; 367
- 78- Franco, P.; Senso, A.; Minguillón, C.; Oliveros, L.; *Journal of Chromatography A*; **1998**; 796; 265
- 79- Yashima, E.; *Journal of Chromatography A*; **2001**; 906; 105
- 80- Baba, Y.; Matsumura, N.; Shimori, K.; Kawano, Y.; *Analytical Sciences*; **1998**; 14; 687
- 81- Inukai, Y.; Chinen, T.; Matsuda, T.; Kaida, Y.; Yasuda, S.; *Analítica Chimica Acta*; **1998**; 371; 187
- 82- Baba, Y.; Noma, H.; Nakayama, R.; Matsushita, Y.; *Analytical Sciences*; **2002**; 18; 359
- 83- Guibal, E.; Milot, C.; Roussy, J.; *Chitosan gel beads for metal ion recovery in: Chitin Handbook*; Muzzarelli, R.A.A.; Peter, M.G. (Ed.); European Chitin Society; **1997**; p.423
- 84- Ruiz, M.; Sastre, A.M.; Guibal, E.; *Reactive & Fuctional Polymers*; **2000**; 45; 155
- 85- Wang, Y.; Guo, M.; Jiang, Y.; *Journal of Chromatography A*; **2002**; 952; 79

- 86- Rhee, J.; Jung, M.; Paeng, K.; *Analytical Sciences*; **1998**; *14*; 1089
- 87- Mathur, N.K.; Narang, C.K.; *Journal of Chemical Education*; **1990**; *67*; 938
- 88- Tikhonov, V.E.; Radigina, L.A.; Yamskov, Y.A.; *Carbohydrate Research*; **1996**; *290*; 33
- 89- Guibal, E.; Sweeney, N.V.O.; Zikan, M.C.; Vincent, T.; Tobin, J.M.; *International Journal of Biological Macromolecules*; **2001**; *28*; 401
- 90- Liu, X.D.; Tokura, S.; Haruki, M.; Nishi, N.; Sakairi, N.; *Carbohydrate Polymers*; **2002**; *49*; 103
- 91- Cervera, M.L.; Arnal, M.C.; Guardia, M.; *Analytical and Bioanalytical Chemistry*; **2003**; *375*; 820
- 92- Rhazi, M.; Desbrières, J.; Tolaimate, A.; Rinaudo, M.; Vottero, P.; Alagui, A.; *Polymers*; **2002**; *43*; 1267.
- 93- Bassi, R.; Prasher, S.O.; Simpson, B.K.; *Separation Science and Technology*; **2000**; *35*; 547
- 94- Rhazi, M.; Desbrières, J.; Tolaimate, A.; Rinaudo, M.; Vottero, P.; Alagui, A.; ElMeray, M.; *European Polymer Journal*; **2002**; *38*; 1523
- 95- Hall, L.D.; Yalpani, M.; *Carbohydrate Research*; **1980**; *83*; C5 (preliminary communication)
- 96- Inoue, K.; Ohto, K.; Yoshizuka, K.; Yamaguchi, T.; Tanaka, T.; *Bulletin of Chemical Society of Japan*; **1997**; *70*; 2443
- 97- Juang, R.; Ju, C.; *Industrial & Engineering Chemistry Research*; **1997**; *36*; 5403

- 98- Rodrigues, C.A.; Laranjeira, M.C.M.; Fávere, V.T.; *Polymer*; **1998**; 39; 5121
- 99- Nagib, S.; Inoue, K.; Yamaguchi, T.; Tamaru, T.; *Hydrometallurgy*; **1999**; 51; 73
- 100- Becker, T.; Schalaak, M.; Strasdeit, H.; *Reactive & Functional Polymers*; **2000**; 44; 289
- 101- Hata, H.; Onishi, H.; Machida, Y.; *Biomaterials*; **2000**; 21; 1779
- 102- Lee, K.; Oshima, M.; Takayanagi, T.; Motomizu, S.; *Analytical Sciences*; **2000**; 16; 731
- 103- Lee, S.; Mi, F.; Shen, Y.; Shyu, S.; *Polymer*; **2001**; 42; 1879
- 104- Cárdenas, G.; Orlando, P.; Edelio, T.; *International Journal of Biological Macromolecules*; **2001**; 28; 167
- 105- Guibal, E.; Ruiz, M.; Vincent, T.; Sastre, A.; Mendoza, R.; *Separation Science and Technology*; **2001**; 36; 1017
- 106- Tang, L.; Hon, D.; *Journal of Applied Polymer Science*; **2001**; 79; 1476
- 107- Svahn, C.M.; Gyllander, J.; *Journal of Chromatography*; **1979**; 170; 292
- 108- Albert, A.; Serjeant, E.P.; *Ionization Constants of Acids & Bases: a Laboratory Manual*; Butler & Tanner; London; **1962**; p. 24
- 109- Vasconcelos, M.T.S.D.; Machado, A.A.S.C.; *Revista Portuguesa de Química*; **1991**; 12; 120
- 110- Sabatini, A.; *Talanta*; **1974**; 21; 53
- 111- Gans, P.; Vacca, A.; Sabatini, A.; *Journal of Chemical Society Dalton Transactions*; **1985**; 1195

- 112- Integrated Spectral Data Base System for Organic Compounds-SDBS; *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)*; Japan; <http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/menu-e.html>; **Janeiro 2005**
- 113- Vårum, K.M.; Anthonsen, M.W.; Grasdalen, H.; Smidsrød, O.; *Carbohydrate Research*; **1991**; 211; 17
- 114- Park, J.W.; Choi, K.H.; Park, K.K.; *Bulletin of Korean Chemical Society*; **1983**; 4; 68
- 115- Tirkistani, F.A.A.; *Polymer Degradation and Stability*; **1998**; 60; 67
- 116- Rueda, D.R.; Secall, T.; Bayer, R.K.; *Carbohydrate Polymers*; **1999**; 40; 49
- 117- Prashanth, K.V.H.; Kittur, F.S.; Tharanathan, R.N.; *Carbohydrate Polymers*; **2002**; 50; 27
- 118- Kittur, F.S.; Prashanth K.V.H.; Sankar, K.U.; Tharanathan, R.N.; *Carbohydrate Polymers*; **2002**; 49; 193
- 119- Sato, H.; Mizutani, S.; Ohtani, H.; Tsuge, S.; Aoi, K.; Seki, T.; Okada, M.; *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*; **2002**; 64; 177
- 120- Bodanszky, M.; *Peptide Chemistry A Practical Textbook*; Springer-Verlag; Berlin-Tokyo; **1988**; p.63
- 121- Radau, G.; *Monatshefte für Chemie*; **2003**; 134; 1033
- 122- Vårum, K.M.; Ottøy, M.H.; Smidsrød, O.; *Carbohydrate Polymers*; **2001**; 46; 89
- 123- Perrin, D.; *Stability Constants of Metal-Ion Complexes (Part B: Organic Ligands)*; Pergamon; Oxford; **1979**

- 124-** Sillén, L.G.; Martell, A.E.; *Stability Constants of Metal-Ion Complexes (Special Publication; 25; supl 1)*; The Chemical Society; London; **1971**
- 125-** Domard, A.; *International Journal of Biological Macromolecules*; **1987**; *9*; 98
- 126-** Monteiro, O.A.C.; Airoidi, C.; *Journal of Colloid and Interfacial Science*; **1999**; *212*; 212
- 127-** Micera, G.; Deiana, S.; Dessi, A.; Decock, P.; Dubois, B.; Kozłowski, H.; *Inorgânica Chimica Acta*; **1985**; *107*; 45
- 128-** Santos, C.; Mateus, M.L.; Santos, A.P.; Moreira, R.; Oliveira, E.; Gomes, P.; *Bioinorganic & Medicinal Chemistry Letters*; **2005**; *15*; 1595
- 129-** Araújo, M.S.; Bom, J.; Capela, R.; Casimiro, C.; Chambel, P.; Gomes, P.; Iley, J.; Lopes, F.; Morais, J.; Moreira, R.; Oliveira, E.; Rosário, V.; Vale, N.; *Journal of Medicinal Chemistry*; **2005**; *48*; 889

