

MAURÍCIO PALMEIRA CHAVES DE SOUZA

**ASPECTOS CINÉTICOS E MOLECULARES DA DISPERSÃO
DE QUITOSANO EM MEIOS AQUOSOS CONTENDO
ÁCIDOS ORGÂNICOS MONOPRÓTICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S729a
2018 Souza, Maurício Palmeira Chaves de, 1989-
Aspectos cinéticos e moleculares da dispersão de quitosano em
meios aquosos contendo ácidos orgânicos monoproticos / Maurício
Palmeira Chaves de Souza. - Viçosa, MG, 2018.
xvi, 104f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Eduardo Basílio de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Quitosana. 2. Biopolímeros. 3. Ácidos orgânicos. 4.
Biotecnologia. 5. Alimentos - Embalagens. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

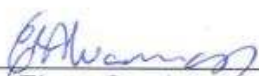
CDD 22. ed. 664.09

MAURÍCIO PALMEIRA CHAVES DE SOUZA

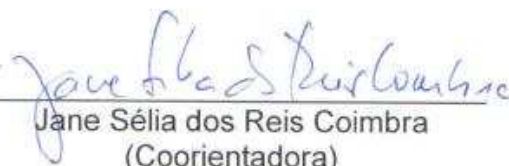
**ASPECTOS CINÉTICOS E MOLECULARES DA DISPERSÃO
DE QUITOSANO EM MEIOS AQUOSOS CONTENDO
ÁCIDOS ORGÂNICOS MONOPRÓTICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 27 de março de 2018.



Elson Santiago de Alvarenga
(Coorientador)



Jane Sélia dos Reis Coimbra
(Coorientadora)



Renata Pereira Lopes Moreira



Eduardo Basílio de Oliveira
(Orientador)

Aos meus pais, Mary e José

A Camila Pinheiro

A todos os meus mestres(as)

Aos meus amigos: Islam, Leonardo, Walkston e Ângelo.

Dedico!

“A única pessoa com a qual você pode se comparar é com você mesmo, no
passado.”

Sigmund Freud

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e aos Orixás, pois sem fé eu não conseguiria caminhar pela estrada da vida.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e aos Departamentos de Tecnologia de Alimentos (DTA) e Química (DEQ) pela oportunidade e pelos recursos investidos durante o curso. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão de recursos financeiros e equipamentos para realização deste projeto.

Ao professor Eduardo Basílio de Oliveira, por todos os ensinamentos dentro e fora de sala de aula, pelas orientações feitas durante a elaboração e escrita do projeto, bem como seu cuidado com a análise dos resultados e criteriosa correção do trabalho, pelo companheirismo, confiança, apoio, dedicação, cuidado, e, sobretudo, por me fazer acreditar que posso ir além. Aos professores Elson Santiago Alvarenga, pelos valiosos ensinamentos de química, à professora Jane Sélia Coimbra dos Reis pelo excelente convívio, amizade, importantes ajustes durante a elaboração do projeto, agradeço igualmente a estes três professores pelos valiosos ensinamentos e pela preciosa colaboração como coorientadores desse trabalho.

Ao professor Robson Teixeira (DEQ), pela paciência e disposição em me atender e ajudar com a análise dos resultados, ao professor Antônio Demuner (DEQ) pelas sugestões durante a elaboração do projeto.

Aos professores Éber Antônio Alves Medeiros (DTA), Nilda de Fátima Ferreira Soares (DTA) e Adriano Nunes-Nessi (DBV). A gentil colaboração desses professores, que nos disponibilizaram os equipamentos alocados nos laboratórios por eles coordenados, foi imprescindível para a realização desse trabalho.

À professora Renata Pereira Moreira, pela participação na banca de defesa e pela disponibilidade em me atender sempre que precisava.

A todos os colegas do Laboratório de Operações e Processos (LOP) e Laboratório de Estudos em Materiais Alimentícios (LEMA), pela grande amizade,

ótima convivência, em especial ao Lucas de Souza Soares, José Antônio de Queiroz Lafetá Junior, José Flávio Moreira, Guilherme Mendes, Gabriel Batalha, Bruna Tonole e Thomás Valente pela troca de conhecimentos e essencial colaboração para execução deste trabalho.

A Ludmylla Crepaldi, por sua grande amizade.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto e me acolheram tão carinhosamente.

BIOGRAFIA

Maurício Palmeira Chaves de Souza, filho de Mary da Silva Palmeira e José Chaves de Souza, nasceu em Salvador, Bahia, em 27 de setembro de 1989.

Em 17 de Setembro de 2009 iniciou a graduação em Farmácia, na Universidade do Estado da Bahia, concluída em novembro de 2015.

Em março de 2016 ingressou no Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na UFV, submetendo-se à defesa de sua dissertação em março de 2018.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE QUADROS.....	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIACÕES	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	2
2. OBJETIVOS	5
2.1. OBJETIVO GERAL	5
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
CAPÍTULO 1	6
1. REFERENCIAL TEÓRICO E REVISÃO DE LITERATURA	7
1.1. QUITOSANO: OBTENÇÃO E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS.....	7
1.2. APLICABILIDADE TECNOLÓGICA DO QUITOSANO	10
1.3. ÁCIDOS ORGÂNICOS DE INTERESSE TECNOLÓGICO.	18
1.4. INTERAÇÕES ENTRE POLÍMEROS E ELETRÓLITOS EM DISPERSÕES AQUOSAS	22
1.4.1. A DUPLA CAMADA ELÉTRICA EM PARTÍCULAS COLOIDAIIS DISPERSAS.	22
1.4.2. INTERAÇÕES ENTRE QUITOSANO E ÁCIDOS ORGÂNICOS EM MEIOS AQUOSOS	24
1.5. TÉCNICAS APLICADAS AO ESTUDO DAS INTERAÇÕES ENTRE QUITOSANO E ÁCIDOS ORGÂNICOS.	29
1.5.1. MASSA MOLAR VISCOSIMÉTRICA MÉDIA (MV).....	29
1.5.2. GRAU DE DESACETILAÇÃO E INTERAÇÕES INTERMOLECULARES POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO INFRAVERMELHA (FT-IR).....	32
1.5.3. DLS-ESPALHAMENTO DINÂMICO DA LUZ	37
2. REFERÊNCIAS	40
CAPÍTULO 2	52
1. INTRODUCTION	54
2. MATERIALS AND METHODS	56
2.1. MATERIALS	56
2.2. CHARACTERIZATION OF CHITOSAN	57
2.3. DEGREE OF DEACETYLATION	57
2.3.1. VISCOMETRIC MOLAR MASS.....	58
2.4. CHITOSAN DISPERSION KINETICS	60
2.5. CHITOSAN MAXIMAL DISPERSIBILITY	61

2.6.	INTERMOLECULAR INTERACTIONS BETWEEN CHITOSAN AND THE ORGANIC ACIDS	62
2.6.1.	CONDUCTOMETRIC AND POTENTIOMETRIC TITRATIONS	62
2.6.2.	POTENTIAL ζ ANALYSES	62
2.6.3.	FT-IR ANALYSES	63
2.6.4.	STATISTICAL ANALYZES	63
3.	RESULTS	65
3.1.	CHARACTERIZATION OF CHITOSAN	65
3.1.1.	DEGREE OF DEACETYLATION	65
3.2.	CHITOSAN DISPERSION KINETICS	67
3.3.	CHITOSAN MAXIMAL DISPERSIBILITY	71
3.4.	INTERMOLECULAR INTERACTIONS BETWEEN CHITOSAN AND THE ORGANIC ACIDS	72
3.4.1.	CONDUCTOMETRIC AND POTENTIOMETRIC TITRATIONS RESULTS	72
3.4.2.	POTENTIAL ζ RESULTS	75
3.4.3.	FT-IR RESULTS	76
4.	DISCUSSION	80
5.	CONCLUSIONS	85
6.	BIBLIOGRAPHY	87
	CONCLUSÃO GERAL	101

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1-Esquema de obtenção de quitosano por método químico.....	8
Figura 2-Esquema de obtenção do quitosano por método químico.....	8
Figura 3-Representação das estruturas moleculares dos ácidos orgânicos aplicados no estudo do quitosano.....	20
Figura 4-Representação gráfica da dupla camada elétrica com potenciais elétricos.....	23
Figura 5-Viscosímetro capilar Cannon-Penske	30
Figura 6-Representação esquemática de interferômetro de Michelson.....	35
Figura 7-Curva de calibração em função do grau de acetilação.....	36
Figura 8-Bandas de absorbâncias e linhas de base empregadas na determinação do GD% do quitosano.	37
Figura 9-Esquema geral de funcionamento do equipamento de ELS.....	38

CAPÍTULO 2

Figure 1-Molecular structures of the organic acids acetic, glycolic, propionic and lactic.....	55
Figure 2-Chitosan spectrum followed by the deconvolution of bands highlighted in their lorentzian components.....	64
Figure 3-Intrinsic viscosity estimation using the Huggins and Kraemer regressions.....	65
Figure 4-Chitosan dispersion kinetics in each of the 4 acids and in the 3 concentrations used in the study as a function of time.....	67
Figure 5-Conductivimetric and potentiometric titrations of the suspensions with and without chitosan with each of the 4 acids.	72
Figure 6-FT-IR spectra of chitosan dispersions in acidified aqueous systems.....	74
Figure 7-FT-IR spectra of lyophilized chitosan and lyophilized dispersions of chitosan in the different acids.	75
Figure 8-Comparison between the D-glucosamine (green) standard spectrum and the chitosan spectrum (blue) with emphasis on the bands used to determine its DD%.	95
Figure 9-a) Scanning of dispersion absorbances of chitosan $0.05 \text{ g. (100 mL)}^{-1}$ in 10 mmol.L^{-1} lactic acid between 190 and 1100 nm performed having zero as lactic acid $[10 \text{ mmol.L}^{-1}]$ (b) Magnification of (a) highlighting Absorbance peak at 275 nm.	96
Figure 10- Analytical curves adjusted linearly to the data presenting regression equations for ABS 275 nm for dispersion of chitosan in each of the acids.	96
Figure 11- Analytical curves adjusted linearly to the data presenting regression equations for ABS 275 nm for dispersion of chitosan in each of the acids.....	100

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-Exemplos de trabalhos que mostram diferentes campos de aplicação do quitosano	11
Quadro 2-Exemplos de aplicações do quitosano em ciências de alimentos.....	14
Quadro 3-Ácidos com aplicação alimentícia e seus respectivos códigos de identificação.....	19
Quadro 4-Exemplo de técnicas analíticas empregadas em trabalhos desenvolvidos com quitosano	26
Quadro 5-Fórmulas matemáticas utilizadas para obtenção da Mv de um polímero.	30

LISTA DE TABELAS

Table 1-Bands and equations applied in determination of DD%.....	57
Table 2-Linear regression equations used to quantify dispersed chitosan.....	60
Table 3-Mathematical model adjusted to the dispersion kinetics data $C = f(t)$	70
Table 4-Chitosan's maximum dispersibility in each acidic medium studied.	71
Table 5-Mean values for potential ζ of chitosan chains dispersed in different acidic media..	75
Table 6-Bands identified in chitosan spectra and lyophilized dispersions.....	78
Table 7-Wavenumber and chemical groups present in the chitosan spectrum	98

LISTA DE ABREVIações

$[\eta_r]$ - Viscosidade reduzida

$[\eta_{rel}]$ - Viscosidade relativa

$[\eta_{sp}]$ - Viscosidade específica

[C] - Concentração

$[\eta]$ - Viscosidade intrínseca

$a(MHS)$ - Expoente de equação de Mark-Houwink-Sakurada

Abs₂₇₅ - absorvância em comprimento de onda= 275 nm

AHA - Alfa hidroxiácidos

A_x - Intensidade absorbancia da banda de FT-IR Raman no comprimento de onda x

C_a - Concentração máxima de quitosano dispersa na etapa de desintegração

C_b - Concentração máxima de quitosano dispersa na etapa de desagregação

C_{max} - Concentração máxima quitosano disperso

DLS - Espalhamento dinâmico de Luz

GA % - Grau de acetilação percentual do quitosano

GD % - Grau de desacetilação percentual do quitosano

FT-IR - Fourier-transform infrared spectroscopy (Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier)

K (MHS) - Coeficiente da equação de Mark-Houwink-Sakurada

k_A - Taxa de dispersão do quitosano na etapa de desintegração

k_B - Taxa de dispersão do quitosano na etapa de desagregação

MAPE - Erro percentual médio absoluto

MHS - Equação de Mark-Houwink-Sakurada

M_n - Massa molar numérica média

M_v - Massa molar viscosimétrica média

O_i - Oitavo valor experimental observado

P_i - Primeiro valor previsto pelo modelo ajustado

R² - Coeficiente de determinação

t - tempo (min)

UV-Vis - Espectros nas regiões ultravioleta e do visível

ζ – zeta (potencial)

RESUMO

SOUZA, Maurício Palmeira Chaves, Universidade Federal de Viçosa, março de 2018. **Aspectos cinéticos e moleculares da dispersão de quitosano em meios aquosos contendo ácidos orgânicos monopróticos.** Orientador: Eduardo Basílio de Oliveira. Coorientadores: Jane Sélia dos Reis Coimbra e Elson Santiago de Alvarenga.

Quitosano é um polissacarídeo policatiônico de origem animal que apresenta biocompatibilidade e biodegradabilidade, que não se dispersa em água pura, apenas em meios ácidos, limitando sua aplicação a estes meios. Assim, se torna necessário determinar a dispersibilidade máxima deste biopolímero e compreender a nível molecular o seu comportamento em meios aquosos contendo ácidos que apresentam diferentes estruturas moleculares e aplicações biotecnológicas. Neste estudo caracterizou-se o quitosano quanto a sua massa molar viscosimétrica (Mv) e grau de desacetilação (GD%) e por meio de técnicas espectroscópicas, potenciométricas e condutivimétricas buscou-se compreender as interações intermoleculares deste quando disperso em meios aquosos contendo os ácidos monopróticos: glicólico, acético, propiônico e láctico. Realizou-se também a quantificação da dispersibilidade máxima e cinética de dispersão do quitosano por espectrofotometria UV-Vis a 275 nm ajustando-se aos dados um modelo matemático exponencial crescente, para cada ácido que constituiu as dispersões nas concentrações [10,30 e 50 mmol.L⁻¹], bem como foram medidos os potenciais ζ das cadeias de quitosano dispersas em cada um dos ácidos na concentração de 10mmol.L⁻¹. Utilizando o quitosano de Mv 624 KDa e GD % =77,12%, calculou-se as dispersibilidades máximas do polímero = [(0.6 0.7 e 1.35 g.(100mL)⁻¹] para as respectivas concentrações [10,30 e 50 mmol.L⁻¹] de cada um dos ácidos, utilizando modelo matemático de primeira ordem com dois termos, ajustado ($R^2 > 0.9$) aos dados de cinética. A faixa de pH encontradas para a titulação das suspensões variou de 7 a 2.5 e condutividade de 0 a 2000 $\mu\text{s.cm}^{-1}$, nos espectros de FT-IR destacaram-se bandas de NH_3^+ , OH e CO. O potencial ζ das cadeias dispersas nos diferentes ácidos não se mostrou diferentes ($p < 0.05$), apresentando-se positivo na faixa de (57,8 $\pm$ 0.9 mV). Com a análise conjunta dos dados concluiu-se, que os contra-íons decorrentes da ionização dos ácidos não interagiram de maneira significativa com os grupos amino protonados do quitosano, de modo que não afetaram a dispersão deste polímero nestes meios. Também foi observado que o processo de dispersão

da quitosana é dinâmico ocorrendo em duas etapas, uma primeira etapa, mais rápida e marcada em grande parte, pela maior extensão de protonação das cadeias do biopolímero e a segunda mais lenta, marcada principalmente pela solvatação destas cadeias protonadas.

ABSTRACT

SOUZA, Maurício Palmeira Chaves, Universidade Federal de Viçosa, March, 2018. **Kinetic and molecular aspects of the dispersion of chitosan in aqueous media containing monoprotic organic acids.** Advisor: Eduardo Basílio de Oliveira. Co-advisors: Jane Sélia dos Reis Coimbra and Elson Santiago de Alvarenga.

Chitosan is a polycationic polysaccharide of animal origin that presents biocompatibility and biodegradability, which does not disperse in pure water, only in acidic media, limiting its application to these media. Thus, it is necessary to determine the maximum dispersibility of biopolymer and index at the molecular level, its behavior in aqueous media, with different acids and applications, structural and biotechnological applications. In this study chitosan was characterized for its viscosimetric molar mass (M_v) and degree of deacetylation percentual (GD%) and by means of spectroscopic, potentiometric and conductivimetric techniques it was sought to understand the intermolecular interactions of this when dispersed in aqueous media containing the monoprotic acids: glycolic, acetic, propionic and lactic) by means of spectroscopic, potentiometric and conductivity. Quantification of the maximum and kinetic dispersion of chitosan dispersion by UV-Vis spectrophotometry at 275 nm was also performed by adjusting the exponential mathematical model for each acid that constituted the dispersions at the concentrations $[10,30 \text{ and } 50 \text{ mmol.L}^{-1}]$, as well as the pot potentials of the chitosan chains dispersed in each of the acids in the concentration of 10 mmol.L^{-1} . Using the chitosan of $M_v 624 \text{ KDa}$ and $\text{GD\%} = 77.12\%$, the maximum polymer dispersions $= [(0.6 \text{ } 0.7 \text{ e } 1.35 \text{ g.}(100\text{mL})^{-1})]$ were calculated for the respective concentrations $[10,30 \text{ e } 50 \text{ mmol.L}^{-1}]$ of each of the acids, using mathematical model of first order with two terms, adjusted ($R^2 > 0.9$) to kinetic data. The pH range found for the titration of the suspensions ranged from 7 to 2.5 and conductivity from 0 to $2000 \text{ }\mu\text{s.cm}^{-1}$, in the Infrared spectroscopy with Fourier transform (FT-IR) spectra the bands of NH_3^+ , OH and CO were highlighted. The potential ζ of the chains ($p < 0.05$), presenting positive values in the range of $(57,8 \pm 0.9 \text{ mV})$. With the analysis of the data, it was concluded that the ion-ion counter-ion did not interact with. In a significant manner with the protonated amino groups of chitosan, so that they did not affect the dispersion of this polymer in these media. It was also observed that the chitosan dispersion process is dynamic, occurring in two stages, a first step, faster and marked in large part, by the greater

protonation extension of the chains of the biopolymer and the second slower, marked mainly by the solvation of these chains protonated.

INTRODUÇÃO GERAL

Justificativa, Relevância
e Objetivos

1. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

O descarte de subprodutos advindos da produção de alimentos é hoje uma grande preocupação por parte dos governos, indústrias e sociedade. Segundo a Food and Agriculture Organization (FAO, 2017) a América Latina e Caribe vão apresentar uma expansão importante na produção aquícola que pode chegar a 3,7 milhões de toneladas em 2025, um crescimento de 39,9% em relação a 2013-15, período em que foram produzidas em média 2,7 milhões de toneladas. Em 2025 o Brasil ocupará a primeira posição na região, aumentando sua produção em 104% quando comparado aos anos 2013-2015. Estes números, além de demonstrarem a previsão de crescimento da indústria pesqueira nacional, refletem também o aumento da geração dos subprodutos oriundos do processamento dessas matérias primas. Esse cenário deve ser acompanhado por pesquisas que contribuam para reduzir o passivo ambiental gerado, agregar valor a estes materiais, ou propor aplicações para os subprodutos e/ou seus derivados. Se descartados de forma inadequada, tais subprodutos constituem um risco ambiental e para a saúde humana. Em alguns casos, o material descartado pode apresentar na sua constituição uma ou mais substâncias com grande potencial tecnológico de utilização, se recuperadas e tratadas de forma adequada, a exemplo dos exoesqueletos e das conchas de crustáceos descartados pela indústria pesqueira. Esses materiais apresentam em sua composição um polissacarídeo não hidrossolúvel denominado quitina [poli- $\beta(1\rightarrow4)$ -2-acetamida-2-deóxi-D-glicopirranose]. Trata-se do segundo polissacarídeo mais abundante na natureza (o primeiro é a celulose), e estima-se que a sua produção anual em organismos vivos é da ordem de 10^{10} - 10^{11} toneladas (REVATHI; SARAVANAN; SHANMUGAM, 2012). A partir deste biopolímero é possível obter o quitosano, um polissacarídeo dispersível em meios aquosos ácidos, com vasta e bem estabelecida aplicabilidade nas indústrias de alimentos, médica e farmacêutica (HAMED; ÖZOGUL; REGENSTEIN, 2016). Industrialmente, o quitosano é obtido pela desacetilação da quitina extraída de carapaças de camarões e caranguejos processados pela indústria pesqueira, em um processo que envolve tratamento com ácidos e bases, a temperaturas elevadas e pressões controladas. O quitosano também pode ser encontrado naturalmente em alguns fungos do gênero *Zigomicetos*. Estruturalmente, constitui-se por unidades monoméricas de $\beta(1\rightarrow4)$ -2-acetamida-2-deóxi-D-glicopirranose e $\beta(1\rightarrow4)$ -2-amino-2-deóxi-D-glicopirranose, com predominância deste último (ROBERT; ERIC; OTHERS, 1992; STEPHEN; PHILLIPS; WILLIAMS, 2006; TENG, 2011).

O quitosano é um material muito versátil do ponto de vista tecnológico e funcional: apresenta atividade antioxidante, antibacteriana, anticoagulante, além de ser seguro do ponto de vista toxicológico, biocompatível e biodegradável. (SINGH, J. *et al.*, 2009;

VINSOVA; VAVRIKOVA, 2011). A utilização de quitosano como material filmogênico com ação antibacteriana e/ou conservante para alimentos é outro relevante e atual campo de pesquisas com esse biopolímero. Além disso, é também empregado no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de compostos bioativos e/ou fármacos (RAVI; KUMAR, 2000). Por fim, uma de suas biofuncionalidades de destaque é a capacidade de se adsorver a lipídeos no trato gastrointestinal de mamíferos, reduzindo a absorção de tais compostos. Graças a essa propriedade, o quitosano tem ganhado espaço de mercado como fibra dietética (LÜTJOHANN *et al.*, 2018).

Apesar de não ser dispersível em água pura, o quitosano pode ser disperso em meios aquoso ácidos com $\text{pH} < 6,5$, pois nessas condições os grupos amino presentes na cadeia polimérica são progressivamente protonados, carregando-se positivamente e formando um polieletrólito (GOYCOOLEA; MILKOVA, 2016), o que aumenta a repulsão eletrostática intra e inter-cadeias e favorece as interações do biopolímero-água. A magnitude das alterações físico-químicas causadas pela adição de quitosano ao meio aquoso ácido (aumento de viscosidade e de densidade, por exemplo) são condicionadas ao seu grau de desacetilação e ao seu grau de polimerização (HIRANO, 1996; WANG *et al.*, 2013). Contudo, trabalhos recentes realizados por nosso grupo de pesquisa mostraram que, além do pH e dessas características do biopolímero, o tipo de ácido utilizado para reduzir o pH influencia tanto a cinética de dispersão quanto a dispersibilidade máxima do quitosano (AMORIM *et al.*, 2016; SOARES *et al.*, 2017). Tais achados indicam que interações específicas do biopolímero com os contra-íons dos ácidos não podem ser negligenciadas quando se estuda essas dispersões.

Assim, torna-se relevante investigar o comportamento deste biopolímero em meio aquoso na presença de um maior número de ácidos possível, especialmente ácidos orgânicos de interesse tecnológico farmacêutico e alimentar. A caracterização física e a compreensão, em nível molecular, de dispersões de quitosano em meios aquosos contendo tais ácidos contribuiria para alargar a gama de aplicações do biopolímero, como por exemplo espessante e estabilizante em formulações fluidas e semissólidas. Um estudo visando compreender melhor, de maneira racional, o papel específico dessas interações quitosano/contra-ânion deve ser com ácidos cujas estruturas moleculares difiram entre si de maneira sistemática.

Dada a problemática científica acima exposta, o presente trabalho propõe-se estudar dispersões de quitosano em soluções aquosas de diferentes ácidos orgânicos de interesse alimentício e farmacêutico, cujas estruturas moleculares apresentam pequenas diferenças entre si – acético (2 carbonos; 1 –OH na cadeia), glicólico (2 carbonos; 2 –OH na cadeia),

propiónico (3 carbonos; 1 –OH na cadeia) e láctico (3 carbonos; 2 –OH na cadeia). Avaliou-se a influência dos mesmos sobre a dispersibilidade máxima e a cinética de dispersão do quitosano em meios aquosos. Além disso, informações sobre as interações moleculares entre o quitosano e os diferentes ácidos foram estudadas, por métodos espectroscópicos (FT-IR) combinados a dados de potencial ζ e de titulações condutivimétricas e potenciométricas. Os resultados foram discutidos com vistas a melhorar a compreensão de como diferenças em aspectos moleculares engendram diferenças macroscópicas na dispersão desse biopolímero empregando diferentes ácidos, e poderão embasar o planejamento e desenvolvimento de formulações alimentícias e farmacêuticas empregando quitosano como espessante, estabilizante, carreador etc.

Essa dissertação está organizada da seguinte forma: primeiro, um capítulo trazendo um “referencial teórico”, que apresenta e descreve a obtenção e características físico-químicas do quitosano, algumas de suas aplicações tecnológicas, a estrutura e a importância dos ácidos orgânicos selecionados para este trabalho e, por fim, uma apresentação teórica das técnicas experimentais de que se lançou mão no presente estudo. Em seguida, um capítulo dedicado à parte experimental do trabalho, em que os materiais, a metodologia, os resultados, a discussão dos mesmos e as conclusões são trazidos sob a forma de um manuscrito de artigo, a ser submetido a um periódico de alto impacto na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos e por fim as conclusões gerais na qual se relacionou os principais resultados do trabalho com novas perspectivas para a área.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Estudar da cinética de dispersão, a dispersibilidade máxima e as interações intermoleculares de quitosano em meios aquosos contendo os ácidos orgânicos monoproticos acético, glicólico, propiônico ou láctico.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar quantitativamente a cinética de dispersão do quitosano em sistemas-modelo formados por soluções aquosas contendo ácido acético, glicólico, propiônico ou láctico, nas concentrações de 10, 30 e 50 mmol.L⁻¹, a 25 °C.
- Avaliar quantitativamente a dispersibilidade do quitosano em sistemas-modelo formados por soluções aquosas contendo ácido acético, glicólico, propiônico ou láctico, nas concentrações de 10, 30 e 50 mmol.L⁻¹, a 25 °C .
- Identificar os tipos específicos de interações intermoleculares que ocorrem entre as cadeias do quitosano e as estruturas moleculares dos ácidos orgânicos supracitados.
- Identificar e discutir as eventuais correlações entre os resultados quantitativos da cinética de dispersão e de dispersibilidade máxima com aqueles verificados nas análises das interações intermoleculares.

CAPÍTULO 1

Referencial Teórico e Revisão de Literatura

1. REFERENCIAL TEÓRICO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1. QUITOSANO: OBTENÇÃO E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

O quitosano foi observado pela primeira vez em 1859 por Rouget, que fez uma referência em um de seus trabalhos a um novo material obtido por tratamento da quitina com solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH) sob aquecimento. Ele o chamou de “quitina modificada”. A “quitina modificada” se dispersava em água acidificada, diferentemente da quitina, que não se dispersava em soluções ácidas. Em 1894 este material foi nomeado de quitosano por Hoppe-Seiler (WINTEROWD; SANDFORD, 1995). Assim como a quitina, que é seu polímero precursor, o quitosano também ocorre naturalmente em alguns organismos vivos como fungos (*Zigomicetos*) (RINAUDO, 2006); no entanto, em quantidades proporcionalmente muito pequenas. Atualmente, a principal forma de obtenção de quitosano é por meio da desacetilação da quitina extraída de exoesqueletos de crustáceos descartados pela indústria de processamento de materiais de pesca marítima.

O processo de obtenção e isolamento da quitina ocorre em três etapas: desmineralização, desproteinização e despigmentação. Em seguida, este polissacarídeo sofre desacetilação em ambiente controlado para originar o quitosano. O quitosano é quimicamente obtido pelo tratamento da quitina com solução aquosa concentrada de NaOH, que hidrolisa a maior parte dos grupos acetil, restando grupos amino ($-NH_2$) ligados ao carbono C2 de cada monômero (JUNG; ZHAO, 2011). Esse método é amplamente utilizado em escala industrial (ARBIA *et al.*, 2013). O grau de desacetilação do quitosano assim obtido depende da concentração de NaOH, da temperatura utilizada, do tempo em que o material permanece em meio reacional, razão de massa quitina/base, tamanho médio da “partícula” de quitina (superfície de contato), atmosfera da reação e a presença de agentes que causem inibição da despolimerização (TENG, 2011). Na Figura 1, está apresentado um esquema geral do processo de obtenção de quitosano utilizando esse método químico (Kim, 2010). Em “A” estão descritas as etapas de isolamento da quitina que consiste na extração do polissacarídeo dos exoesqueletos de crustáceos (principal fonte) Em “B” o processo de obtenção do quitosano a partir da quitina.

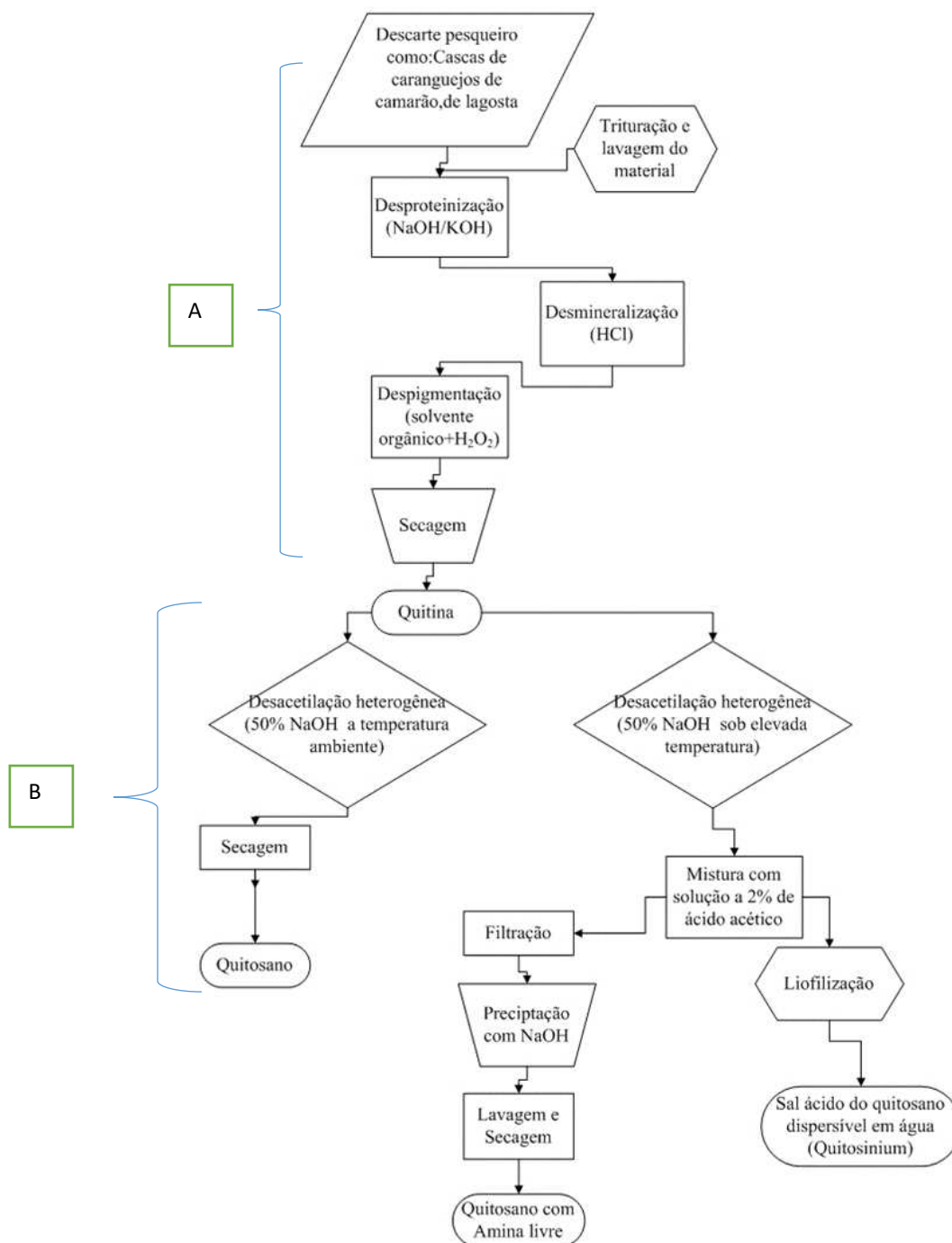


FIGURA 1-Eschema de obtenção de quitosano por método químico

Fonte: Adaptado de Kim (2010)

Uma forma alternativa de se obter quitosano é utilizando um método enzimático de desacetilação, que é promovido pela enzima “quitina desacetilase”, obtida de fungos e bactérias. Essa enzima catalisa a hidrólise da ligação entre do grupo acetil da amida nas unidades de N-acetilglucosamina, tanto na quitina quanto no quitosano (JAWORSKA, 2012). Apesar de esse método possuir maior especificidade e não causar despolimerização (pelo fato de a enzima ser regiosseletiva), é mais lento e se limita a escalas laboratoriais

(HAMED; ÖZOGUL; REGENSTEIN, 2016). Pelo método enzimático, é possível obter quitosano com grau de desacetilação elevado mais facilmente que pelo método químico, além de cadeias poliméricas de tamanhos mais uniformes (ou seja, o biopolímero menos polidisperso).

O produto da desacetilação da quitina é formalmente denominado “quitosano” quando o grau de desacetilação (GD) – que corresponde ao percentual médio de grupos amino livres do grupamento acetil ($-\text{COCH}_3$) – for superior a 50% (HAMED; ÖZOGUL; REGENSTEIN, 2016) (Figura 2). Portanto, o quitosano será formado por unidades de [poli- $\beta(1\rightarrow4)$ -2-acetamida-2-deóxi-D-glicopirranose] e [poli- $\beta(1\rightarrow4)$ -2-amino-2-deóxi-D-glicopirranose], com predominância do segundo monômero (ROBERT; ERIC; OTHERS, 1992). Macroscopicamente, temperatura e pressão ambientes, esse biopolímero apresenta-se sob as formas de pó ou flocos de granulometria variável, esbranquiçado, opaco, pouco denso e inodoro.

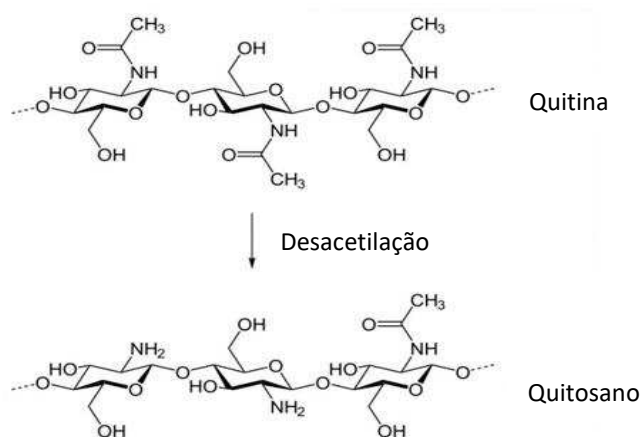


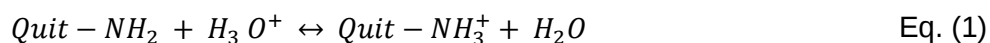
FIGURA 2-Representação da desacetilação parcial da quitina em quitosano

Fonte: Disponível em: < <http://www.drpetry.com.cn/en/pesearch.html>>. Acesso em 31 de junho de 2017

O tamanho das cadeias de quitosano – expresso como massa molar média ou como grau de polimerização (GP) médio – é um parâmetro importante a ser considerado. O GP pode ser apenas parcialmente controlado no processo de obtenção do quitosano, uma vez que durante a reação de desacetilação pode ocorrer também hidrólise das ligações entre os monômeros e não apenas dos grupos acetil (KONG *et al.*, 2010). A importância de se determinar os valores do grau de desacetilação (GD) e GP está relacionada à influência destes parâmetros sobre as propriedades físico-químicas do quitosano quando disperso em meios aquosos ácidos. O GP afeta diretamente as características biológicas e técnico-funcionais do biopolímero, como a atividade antibacteriana, e a capacidade de estabilizar e espessar emulsões e suspensões (BANO *et al.*, 2017) (AL-ASSAF; PHILLIPS; WILLIAMS, 2006); (VITURAWONG; ACHAYUTHAKAN; SUPHANTHARIKA, 2008). O aumento do GP

contribui diretamente para o aumento da viscosidade das dispersões de quitosano com o biopolímero a uma dada concentração, contribuindo, pois, para o seu efeito espessante.

O quitosano pode ser disperso em meios aquosos ácidos (pH < 6,5). Isso se deve em grande parte, ao fato de que, à medida que se acidifica o meio, os grupos amino são progressivamente protonados, carregando-se positivamente (Eq. 1), o que não ocorre com os grupos acetamido. Uma consequência disso é a intensificação da repulsão eletrostática entre as cadeias poliméricas, desfavorecendo as interações inter-cadeias (polímero-polímero) e favorecendo as interações polímero-água (AMORIM; et al., 2016)



Apesar da natureza catiônica do quitosano favorecer físico-quimicamente a sua dispersão em meios ácidos, o tipo de ácido utilizado deve ser considerado. Com efeito, recentemente, (AMORIM *et al.*, 2016) , compararam a dispersibilidade de quitosano em soluções equimolares de ácido láctico e ácido cítrico e mostraram que os contra-ânions do ácido cítrico podem ficar retidos na dupla camada elétrica das partículas de quitosano, que tem caráter catiônico, conferindo-lhe uma espécie de “blindagem” dos grupos amino protonados, limitando assim a dispersão do polímero, comparado ao meio aquoso análogo, mas contendo ácido láctico ao invés de cítrico.

1.2. APLICABILIDADE TECNOLÓGICA DO QUITOSANO

O quitosano é o único heteropolissacarídeo policatiônico de origem natural, (BANO *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2016). É um material biodegradável, biocompatível e com potencial toxicológico extremamente baixo (DL50 = 16 g/kg em ratos). Devido a essas características, sua versatilidade para aplicações tecnológicas e funcionais é imensa. O quitosano é empregado nas ciências médicas e farmacêuticas (SIVASHANKARI; PRABAHARAN, 2016a), na indústria de alimentos (SHAHIDI; ARACHCHI; JEON, 1999), na agricultura (BOONLERTNIRUN; BOONRAUNG; SUVANASARA, 2017) e na área ambiental (YANG *et al.*, 2016), com ou sem modificações em sua estrutura.

E, de fato, diferentes trabalhos na última década demonstraram a aplicabilidade do quitosano, especialmente nas ciências da saúde e ambiental, como exemplificado no Quadro 1.

Quadro 1-Exemplos de trabalhos que mostram diferentes campos de aplicação do quitosano

Material	Objetivo/Usos	Tratamento/Ensaio	Principais Resultados	Referência
Gaze cirúrgica estéril recoberta com quitosano	• Quitosano como agente hemostático no tratamento de HPP¹. • Agente coagulante.	• Pacientes: 19 pacientes com hemorragia pós-parto. • Procedimento: tamponamento uterino com gaze coberta de quitosano.	• Interrupção de todos os sangramentos • Prevenção de 5 histerectomias • Redução de 75% de histerectomias em 18 meses de uso.	(SCHMID <i>et al.</i> 2013)
1% m/v de quitosano com GD ² (70,82 e 85%) dispersos em solução de ácido acético a 1%v/v.	• Efeito do (GD), massa molar, condições ambientais força iônica e pH sobre a eficiência da floculação • Tratamento de águas	• Material: lodo anaeróbico de planta de tratamento de resíduos domésticos. • Soluções de quitosano em ácido acético com pH do meio - 5, 6 e 7 e Força iônica - 0.1M e 0.01M	• Em pH =7, Quit. GD = 85% floculou 90 % do sedimento.a 0.1M e 0.01M. • Em pH=7,0 o Quit. GD = 70% floculou 45% do sedimento.a 0.1 e 0.01M. • Em pH=5e 6 todas Quit GD = (70,82 e 85%) flocularam sedimento.	(KASEAM CHOCHO UNG., <i>et al.</i> :2006)
Quitosano GD %-80,85 e 90% Betonita ácido acético	• Capacidade da betonita modificada com quitosano de remover Cu²⁺, Cl⁻ de soluções aquosas. • Tratamento de águas.	• Betonita modificada com quitosano GD (80% 85% e 90%) • Material adsorvente: betonita : quitosano (m/m)-A-(1 : 0.005,) B-(1 : 0.01) C-(1 : 0.02) D-(1 : 0.04) , -(1 : 0.05)e controle(betonita) • Dispersão do material adsorvente em água contendo Cu₂⁺, Cl⁻	• Material B utilizando quitosano com GD=90% apresentou maior eficiência. • Material B apresentou 2x mais eficiência que Controle	(ROUSSY <i>et al.</i> ,2005)
Termogéis de (Q) ³ obtidos por dispersão em ácido acético adicionados de a (R) com e sem (D).	• Emprego de implantes farmacêuticos com partículas de fármaco, anestésico (R), com e sem anti-inflamatório(D). • Veículo biocompatível de liberação lenta de fármacos, objetivando a redução posológica	• (1) 0.5% m/v (RHCl), I em solução (2)- Q em solução, (3) 1 mg/kg D + Q (Q-D), (4) 75 mg/kg R base + Q (Q-RB-75), (5) 75 mg/kg R base e 1 mg/kg D + Q (Q-RB-75 - D), (6) 150 mg/kg R base em + Q (Q - RB-150), (7) 150 mg/kg R base e 1 mg/kg D + Q (C - RB-150- D).	• Após 6h: Tratamentos (3,4,5,7)= 100% de bloqueio neuromuscular,(6) inibiu 83% da dor enquanto (1 e2) não bloquearam a dor. Após 36h:Tratamentos (7,6 e 5)= 17% de bloqueio neuromuscular,(5) exibiu atividade anti-inflamatória	(FOLEY <i>et al.</i> , 2013)

¹ Hemorragia pós-parto

² Grau de desacetilação

³ Quitosano (Q) ,ropivacaína (R) ,dexametasona (D).

Nanopartículas de quitosano: Obtidas por Gelificação ionotrópica entre quitosano e tripolifosfato de sódio. com adição de nanocloroquina.	• Comparou a potência de fármaco teste[(Q) + (NCQ⁴)] com (CQ [tratamento padrão] na atenuação da infecção por <i>Plasmodium berghei</i> em camundongos e sua eficácia contra o estresse oxidativo induzido pelo parasita nos linfócitos . • Desenvolvimento de prófarmacos	• Quatro grupos (6 animais cada): Grupo I- controle; Grupo II- infecção por P. berghei ; Grupo III- infecção por P. berghei + CQ: 68,4 mg / kg de peso corporal) ; Grupo IV : infecção por P. Berghei + NCQ (dose eficaz de nanocloroquina , 250 mg / kg de peso corporal) . • Parasitemia avaliada utilizando análises microscópicas	• Tratamento IV usando NCQ:↓ da parasitemia em 97.40% • Tratamento III usando CQ:↓ em 88.48%. • Morte linfocitária: Grupos II 18,16% , grupo III a taxa degeneração linfocitária foi de 10,10% e grupo IV 5,21%.	(TRIPATH Y <i>et al.</i>, 2013)
CMC ⁵ obtido apartir do quitosano Quitosano Ácido cloroacético Hidroxido de sódio Propan-2-ol Metanol Isopropanol	• Sintetizar CMC e avaliar o efeito estabilizante em emulsões farmaceuticas e cosméticas	• Síntese do CMC-Alcalinização do quitosano com hidroxido de sódio. Suspensão do quitosano alcalinizado em propan-2-ol. Adição de ácido cloroacético dissolvido em isopropanol, após reação o CMC foi lavado com metanol • Emulsões- 3 emulsões (O/A), coloridas, apresentando fragancia de rosas , contendo 0.3% de carbomero (controle), 0.3% de CMC (I) e 0.5% de CMC (II) em faixa de pH (6.45-7.33)	• Síntese CMC- 50% das amida foram substituidas por grupos carboximetil, promovendo a dispersão do CMC em água. • Emulsões- Estáveis por 20 a 26 meses conservando a cor e aroma indicando que o CMC pode substituir o Carmbômero	(TZANEV A <i>et al.</i>, 2017)

⁴ Nanocloroquina (NCQ), Cloroquina (CQ)

⁵ CMC-Carboximetil- quitosano

De acordo com os dados de literatura compilados no Quadro 1, as aplicações do quitosano são bastante diversificadas; os avanços na área médico-farmacêutica sendo mais vastos e variados. O quitosano exibe um grande potencial nesses campos, por apresentar biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade, propriedades hemostáticas e antibacterianas (BANO *et al.*, 2017). Tem sido estudado como uma opção viável para, por exemplo, a produção de barreiras naturais com ação anti-inflamatória, hidratante e protetora, veículos farmacêuticos transdérmicos para liberação lenta de ativos, material de revestimento protetor de lesões e géis tópicos para veicular ativos.

Além dos estudos apresentados no Quadro 1, vale mencionar a aplicabilidade do quitosano em engenharia de tecidos biológicos. No desenvolvimento de tecidos biológicos utilizam-se materiais porosos para incorporação de células, que vão se propagar tridimensionalmente nessas matrizes. (KHADEMHOSEINI *et al.*, 2006). O quitosano é um dos materiais frequentemente utilizados como matriz de suporte, pois imita a matriz extracelular (MEC) que dá suporte aos tecidos biológicos, funcionando, pois, como uma espécie de tecido conjuntivo para a ancoragem de células, sua proliferação, e a formação de tecido em três dimensões. Além das propriedades já citadas, a aplicação como matriz tecidual para o quitosano vale-se de uma propriedade pouco estudada que é a de mimetismo tecidual. Este “tecido conjuntivo” artificial obtido a partir do quitosano apresenta uma característica ideal para um bom suporte, que é a formação de uma extensa rede constituída por poros interconectados. Esta rede confere liberdade de crescimento para as novas células, que multiplicam-se e anexam-se profundamente dentro dos suportes, permitindo assim, adesão celular, crescimento interno e reorganização, além da porosidade do material possibilitar a formação de canais através dos quais o oxigênio e os nutrientes alcançariam as células profundas no interior da suporte (CROISIER; JÉRÔME, 2013)(XU *et al.*, 2012)

Além da aplicabilidade médico-farmacêutica, existem trabalhos que tiveram como foco mostrar a aplicabilidade do quitosano em materiais para finalidades alimentares, como ilustra o Quadro 2.

QUADRO 2-Exemplos de aplicações do quitosano em ciências de alimentos

Material	Objetivo/Aplicação	Tratamento/Ensaio	Principais Resultados	Referência
Quitosano	- Efeito da ingestão de quitosano na dieta em relação à peroxidação lipídica miocárdica e das vias antioxidantes dependentes de glutatona - Alimento biofuncional com propriedades antioxidantes e hipolipemiantes.	18 ratos divididos em 2 grupos com n=9 (I jovens, II velhos) foram submetidos a dietas - Dietas: Ia e IIa – dieta controle sem quitosano; Ib e IIb - 2% de quitosano por 30 dias ; Ic e IIc - 2% de quitosano por 60 dias	- Grupo Ia e IIa -sem alteração dos parâmetros testados. - Sub-grupo IIc-apresentou menores níveis de peróxidos lipídicos que nos ratos IIa .O grupo IIc exibiu redução dos valores de colesterol (mg.dL⁻¹) total com o prolongamento da dieta: IIa (3.68±0.32); IIb(3.29±0.21); IIc(3.04±0.25).	(ANANDAN <i>et al.</i> , 2013)
Quitosano(Q) modificada obtida utilizando MFA ⁶ e EDC.	- Atividade antioxidante e antibacteriana in vitro do quitosano modificada, com MFA/EDC. - Conservante alimentício	- Modificações (MFA:EDC;Q): • Q-Ds-1-(1:1:1); Q-Ds-2-(3:3:1); Q-Ds-3-(5:5:1);Q -controle - A atividade antioxidante: Colorimétrica-radical DPPH. - Atividade antibacteriana: Contagem de células-gram-positivas (<i>S. aureus</i>, <i>L. monocytogenes</i>) gram-negativas (<i>E. coli</i>, <i>S. enteritidis</i>),	Tratamentos Q-Ds-2 e Q-Ds-3 ↓ crescimento para bactérias gram-negativas e gram-positivas .↑ atividade antioxidante (↓-IC50): Q-Ds-1 > 358,9 µg/mL; Ch-Ds-2 > 197,8 µg/mL; Ch-Ds-3 >126,7 µg/mL; Ch > 469,1 µg/mL;	(KHAN; ULLAH; OH, 2016)
Quitosano(Q) -GD = 80 e 95%, glicerol e chá verde (<i>Thea sinensis</i>)	- Filmes ativos ecológicos de quitosana incorporado com polifenóis da <i>Thea sinensis</i> (PT) com diferentes concentrações. - Embalagem ativa para conservação de alimentos	- Preparo dos Filmes- Dispersões de 4% de Q em solução ácido acético (2%v/v) e glicerol (30% da massa de quitosano), com mistura de Chá verde (10 , 20 , 30 e 40%) m/m da massa de quitosano utilizado. - Permeabilidade ao vapor de água-Gravimetria. - Atividade antioxidante-Colorimétrica- radiais DPPH	Filmes com 40% de PT apresentaram a menor permeabilidade ao vapor de água e atividade antioxidante 12 vezes maior que os outros filmes,	(WANG <i>et al.</i> , 2013)

⁶ MFA-Ácido monometilfumárico ,EDC:1-etil-3-(3dimetilaminopropil)carbodiimida).

Quitosano GD-85%, D-Xilose e macarrão semi-seco.	- Efeito antibacteriano, antioxidante e inibição do escurecimento dos (DRM⁷) obtidos por reação do quitosano-xilose. - Preservação e manutenção qualidade e segurança microbiológica em alimentos semi-secos	- Preparo do conjugado quitosano-xilose. 1%<i>m/v</i> de quitosano e 1%<i>m/v</i> de xilose dispersos em solução de ácido acético (0.5%<i>v/v</i>), pH 5.0, Preparo das amostras-DRM Aquecimento das dispersões a 80°C, por até 8h, posteriormente o macarrão foi mergulhado nesse sistema. - Atividade antibacteriana- Concentração inibitória mínima (CIM). - Atividade antioxidante-Capacidade sequestrar radical DPPH e Cobre	- DRM obtidos por 6h de aquecimento apresentaram a melhor CIM (comparado ao controle): ↓ em 40% da CIM (µg/mL) para <i>S.aureus</i> ↓ em 60% CIM e para <i>A. candidus</i>. - DRMs aquecidos por 6 e 8h: ↑ atividade antioxidante DL-50 = 1.2mg.mL⁻¹ (DPPH) e 70% de quelação do Cobre.	(ZHU <i>et al.</i> , 2013)
Quitosano succinilado: Acetona, ácido acético, anidrido succínico, acetona, d-limoneno	- Caracterização e análise do efeito temperatura sobre a desestabilização de emulsão usando quitosano succinilado com d-limoneno. - Estabilizante de emulsões	- Preparo da quitosana succinilada : Quitosano disperso em ácido acético com anidrido succínico dissolvido em acetona. - Preparo das emulsões: Controle-40% (m/m) de maltodextrina (DE-10) + 0,12% (v/v) de d-limoneno. Teste-1% (m/m) de quitosana succinilada em água + 0,12% (v/v) de d-limoneno. - Medições: Estabilidade à (-52°C). Polidispersividade- análise de tamanho das gotas (microscopia ótica).	- Preparações com quitosano: Gotículas de d-limoneno menores com 3,056 ± 0,798 µm, e o sistema pouco polidisperso - Preparações com maltodextrina: Gotículas de d-limoneno maiores com de 3,846 ± 3,058 µm e com maior polidispersividade. - Estabilidade térmica a 52°C: Emulsões de quitosano se desestabilizaram mais lentamente que com maltodextrina	(BORGOGNONI; POLAKIEWICZ; PITOMBO, 2006)

⁷ Derivados da reação de Maillard

Filmes de amido-quitosano. Óleos essenciais de: Orégano e folha de canela.	- Avaliação das propriedades de filmes mono e bicamadas com e sem os óleos essenciais. - Conservante alimentício para carne de porco	- Preparo dos filmes: Filmes CH⁸-1% (m/v) de CH disperso em Ac. Acético (1% v/v) com e sem adição de OO^c e OFC (0.25% v/v) Filmes de AMD⁹-Compressão a quente de amido (30% m/m) com mistura plastificante. Filmes bicamada CH-AMD- Compressão a quente do filme de amido sobre o de CH totalizando 3 filmes bicamada (CH-AMD¹⁰; CH-AMD-OO¹¹; CH-AMD-OFC¹²) - Medições Características mecânicas - Atividade antioxidante	- Filmes bicamada: - Maior resistência mecânica e menos elasticidade e menor transparência que os monocamada. Apresentaram menor ação antibacteriana que o filme monocamada de quitosano. A presença dos óleos essenciais não melhorou a ação antibacteriana dos filmes bicamada.	(VALENCIA -SULLCA <i>et al.</i> , 2018)
--	---	---	--	---

⁸ CH- Quitosano

⁹ AMD- Amido

¹⁰ CH-AMD- Quitosano- Amido

¹¹ CH-AMD-OO- Quitosano-Amido-óleo essencial de orégano

¹² CH-AMD-OFC- Quitosano-Amido-óleo essencial de folhas de canela

As aplicações do quitosano que, a presente, podem ser consideradas inovadoras na indústria de alimentos são menos numerosas que na área farmacêutica. Ele tem sido empregado principalmente no desenvolvimento de conservantes, como mostram os estudos compilados no Quadro 2. Contudo, nos últimos anos sua utilização em alimentos e bebidas vem sendo estudada e reconhecida (HAMED; ÖZOGUL; REGENSTEIN, 2016). Há estudos que propõem o uso desse biopolímero como fibra dietética com ação anti-dislipidemiante (ANANDAN *et al.*, 2013), antioxidante (SHAHIDI; ARACHCHI; JEON, 1999), ou ainda material protetor para frutos e sementes (WANG *et al.*, 2013; ZENG; LUO; TU, 2012). Entretanto, a maior parte dos trabalhos utilizando quitosano em tecnologia de alimentos dedica-se ao desenvolvimento de filmes para revestimento, podendo estes ser comestíveis (mais frequentemente) ou não. Tais aplicações são possíveis graças às propriedades filmogênicas, antimicrobianas e antioxidantes do quitosano, aliadas à segurança deste polissacarídeo do ponto de vista biológico e toxicológico (HIRANO, 1996; KIM, SE-KWON, 2010; TENG, 2011), já discutidas em seções precedentes.

A FAO (Food and Agriculture Organization), em 2003, aprovou o uso do quitosano como agente de clarificação e floculação, e coadjuvante em processos de filtração para sucos de fruta, concentrados de sucos de fruta, néctares de frutas e concentrados para néctares de frutas. Também tem seu uso aprovado no Japão, Itália e Finlândia com aplicação dietética (ILIU, 1998). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da Resolução no 18 de 30 de abril de 1999, passou a reconhecer o quitosano como alimento com propriedades funcionais, classificando-o como uma fibra dietética utilizada na alimentação humana com alegações de redução da absorção de gordura e colesterol. Sua ingestão diária deve ser de 3 g em alimentos sólidos (cápsulas, comprimidos e sachês) e 1,5 g em alimentos fluidos para promover os benefícios supracitados (BRASIL, 1999).

Tendo em vista sua compatibilidade biológica (exemplificada no Quadro 1) e sua aplicabilidade alimentícia (exemplificada no Quadro 2), uma proposta inovadora seria o uso direto do quitosano no desenvolvimento de formulações farmacêuticas e alimentícias, desde que estas tenham base aquosa e sejam acidificadas, para que o biopolímero seja dispersível. Para tal, é imprescindível, conhecer e caracterizar as interações entre o quitosano e as demais espécies químicas presentes no meio no qual se pretende dispersá-lo. Tal abordagem pode ser o ponto de partida para a concepção de fórmulas contendo quitosano que sejam racionalmente elaboradas, eficientes, estáveis por um período razoável de tempo e sensorialmente viáveis. E assim, é preciso que se discorra sobre aspectos

físico-químicos e tecnológicos de ácidos orgânicos relevantes nos campos da saúde e alimentos, o que é feito na seção seguinte.

1.3. ÁCIDOS ORGÂNICOS DE INTERESSE TECNOLÓGICO.

Ácidos orgânicos são compostos em sua maioria de origem natural, que podem ser oriundos do metabolismo vegetal, animal, fúngico e bacteriano. Caracterizam-se por (SNYDER, 1995):

- Possuir átomos de carbono em sua estrutura;
- Apresentar elevados valores de pK_a (na faixa de pH 3-4);
- Apresentar pelo menos um grupamento carboxila ($-\text{COOH}$).

Dentro eles, destacam-se os α -hidroxiácidos (AHA), que possuem uma ou duas hidroxilas (OH) ligadas ao carbono α (carbono subsequente à carboxila) e uma cadeia carbônica de tamanho variado. O uso de ácidos orgânicos é frequente nas indústrias de alimentos e farmacêutica. Na indústria de alimentos, são utilizados como aditivos, com função conservante, antioxidante e acidulante. Estão presentes naturalmente em alguns alimentos (p. ex.: ácido cítrico na maioria das frutas, principalmente nas cítricas; ácido málico em maçãs e bananas; ácido ascórbico em laranja e acerola; ácido tartárico em abacates e uva), além de serem gerados em alguns produtos fermentados (p. ex: ácido láctico em chucrutes e iogurtes) (BAJAJ; KAUR, 1981). Na indústria farmacêutica, alguns ácidos orgânicos, em particular AHA, têm sido usados como constituintes de cremes de rejuvenescimento facial, atenuação de manchas na pele, hidratantes e agentes anti-acne. Um exemplo emblemático é o ácido glicólico (2-hidróxietanóico), que age como esfoliante da pele, promovendo assim sua descamação superficial e ativando mecanismos biológicos que estimulam a renovação e o crescimento celular, e como clareador, por inibir tirosinases que catalisam a formação de compostos escuros constituintes de manchas.

Os ácidos orgânicos no Brasil permitidos para uso na indústria de alimentos são classificados como aditivos alimentares. Com o objetivo de harmonizar com as legislações internacionais, todos os ácidos autorizados para uso alimentício são codificados no INS (*International Numbering System*; também adotado pela ANVISA no Brasil) com números entre 200 e 699, que dependem da sua função específica. Na Resolução nº 5, de 15 de Janeiro de 2007, apresentam-se as atuais codificações pertinentes aos principais ácidos orgânicos alimentares, resumidas no Quadro-3.

QUADRO 3-Ácidos com aplicação alimentícia e seus respectivos códigos de identificação

Código Ins	Denominação
INS 210	Ácido benzoico
INS 236	Ácido fórmico
INS 260	Ácido acético
INS 270	Ácido láctico
INS 280	Ácido propiônico
INS 330	Ácido cítrico
INS 334	Ácido tartárico
INS 353	Ácido metatartárico
INS 355	Ácido adípico
INS 388	Ácido tiodipropiônico
INS 315	Ácido eritórbico
INS 300	Ácido ascórbico
INS 620	Ácido glutâmico
INS 297	Ácido fumárico
INS 574	Ácido glucônico

Fonte: Codex Alimentarius (2014)

A Resolução RDC nº 79 (2000) da ANVISA estabelece a distinção de uso dos ácidos orgânicos na indústria farmacêutica como conservante, produtos de higiene pessoal e cosméticos de graus 1 e 2 (BRASIL, 2000). A Farmacopeia Brasileira (2005) reconhece o uso dos ácidos em diversos métodos oficiais de identificação de fármacos, assim como a sua aplicação e de seus derivados em diversos tratamentos enfermidades. Dentre os ácidos orgânicos utilizados na terapêutica, os AHA – p. ex.: ácido glicólico, ácido láctico e ácido cítrico – são ativos estratégicos em dermatologia cosmética.

Segundo o parecer técnico da ANVISA nº 7 de 28 de setembro de 2001 (atualizado em 16/02/2006) o uso de AHAs e derivados, quando não feito por profissional habilitado, deve ser em concentrações inferiores a 10% calculada na forma ácida, em pH entre 3,5 e 5 (grau 1) e pH acima de 5 (grau 2) (BRASIL;2006). Alguns dos AHAs mais utilizados na indústria farmacêutica são os ácidos glicólico, láctico, cítrico e mandélico. A classificação destes ácidos como conservantes em formulações farmacêuticas para uso cosmético está associada a uma estreita faixa de concentração permitida. Por exemplo, o ácido propiônico usado em concentrações de até 0,5% (expresso como ácido) é autorizado como

conservante no Brasil e na União Europeia. No entanto, no Japão, não faz parte dos conservantes legalmente permitidos (Cosméticos & Perfumes p. 29, 51, 2015).

A seguir, são apresentadas algumas informações estruturais específicas sobre os quatro ácidos orgânicos utilizados no presente estudo: acético, glicólico, propiônico e lático (Figura 3). A escolha destes ácidos e suas concentrações de trabalho [10; 30; e 50 mmol.L⁻¹] baseou-se em suas aplicações nas áreas farmacêutica e alimentícia e por apresentarem estrutura carbônica de tamanho crescente e/ou presença ou não de grupos hidroxila, em suas cadeias, com objetivo de avaliar como essas variações estruturais impactam nas interações com o quitosano e nas respectivas dispersões aquosas.

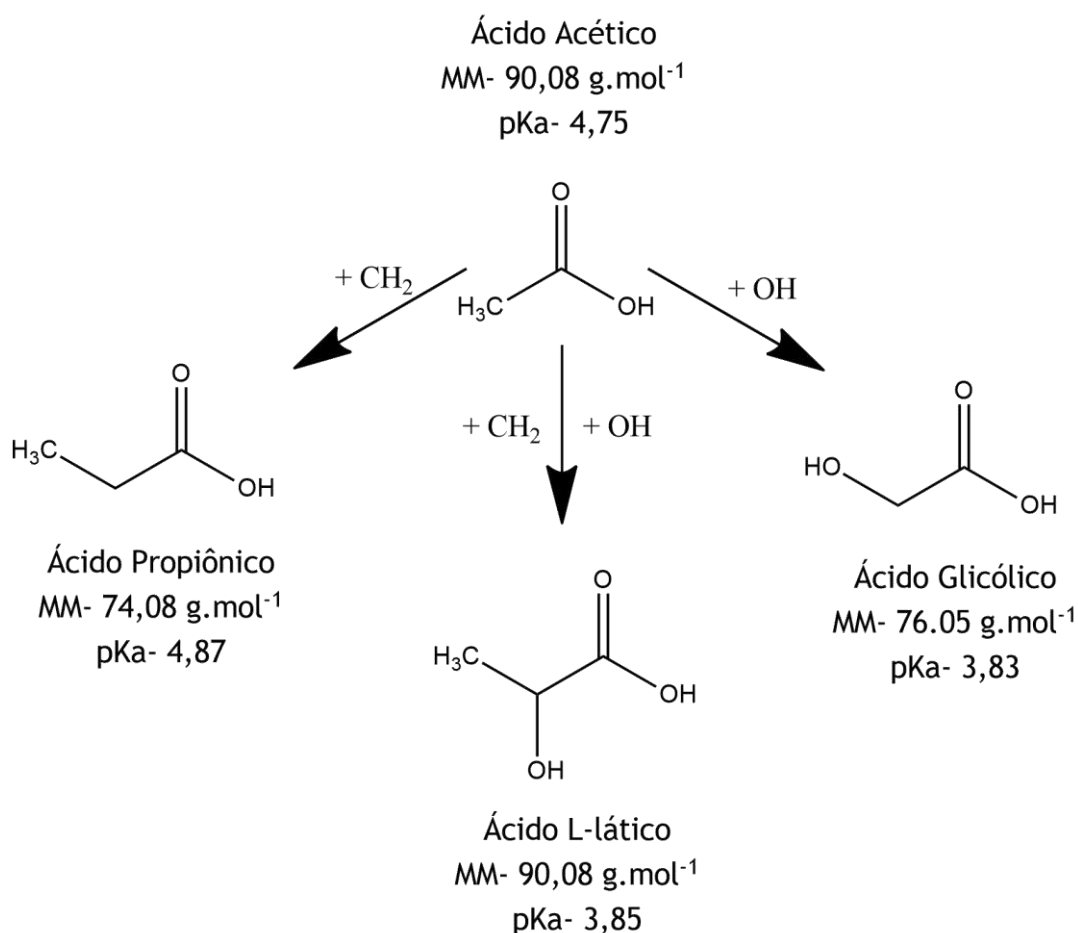


FIGURA 3-Representação das estruturas moleculares dos ácidos orgânicos aplicados no estudo do quitosano.

Analisando estruturalmente os ácidos orgânicos selecionados para o presente estudo, o ácido acético pode ser considerado como “ponto de partida” e os demais enxergados como uma variante estrutural deste (Figura 3). Além disso, esses quatro ácidos têm aplicações reconhecidas nos campos da saúde (KLAKKVOLD *et. al.*,1991) e da alimentação (KONG *et. al.*,2010). O ácido acético é retratado na literatura como o ácido

mais utilizado em trabalhos envolvendo dispersão de quitosano, nos quais soluções aquosas deste ácido foram empregadas como meio dispersor do biopolímero (COSTA, TEIXEIRA, DELPECH, SOUZA, & COSTA, 2015; KUMAR, 2000; OCHOA-VELASCO & GUERRERO-BELTRÁN, 2014; YOUNES & RINAUDO, 2015) Acerca dos demais, com exceção do lático – recentemente estudado com esse fim por Amorim et al. (2016) – a literatura carece de investigações sobre seu uso como agente dispersor de quitosano em meios aquosos.

O ácido acético é o que apresenta a menor massa molar dentre os quatro (Figura 4). Oficialmente denominado de ácido etanoico, é um líquido incolor com marcante odor acre (“vinagre”), e dentre suas aplicações destaca-se como a de conservante alimentício. Soluções a 2% deste ácido são utilizadas no tratamento de infecções otológicas. No campo farmacêutico é aplicado como regulador de pH e em como reagente para exames ginecológicos (CHAVEERACH, KEUZENKAMP, URLINGS, LIPMAN, & VAN KNAPEN, 2002; SILVA, DUPIM, & CHAZIN, 2015)

O ácido propiônico, oficialmente denominado ácido propanoico, é um líquido incolor com propriedades conservantes em alimentos, por inibir o crescimento de fungos em pães e bolos. Na indústria farmacêutica, seus ésteres dão origem ao ibuprofeno, um anti-inflamatório não esteroide (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; RASO; BARBOSA-CÁNOVAS, 2003) .

O ácido glicólico, ou ácido hidroxietanoico segundo as regras da IUPAC, é um ácido carboxílico pertencente ao grupo dos AHA. À temperatura e pressão ambientes, é um sólido cristalino, incolor e inodoro, aplicado na indústria de leite para a limpeza das tubulações, por facilitar a remoção de a caseína aderida. Por apresentar capacidade de permeação tecidual, é largamente aplicado na indústria cosmética, estimulando a produção de colágeno, é também aplicado como dermoabrasivo e no tratamento de hiperpigmentação da pele (manchas escuras) (NARDIN; GUTERRES, 1999; RASO; BARBOSA-CÁNOVAS, 2003).

O ácido lático, ou, oficialmente, ácido 2-hidroxipropanóico, também é um AHA, e apresenta maior massa molar dentre os quatro aqui estudados. Pode ser encontrado comercialmente na forma de solução concentrada líquida. Entretanto, é um sólido cristalino de sabor suave e levemente salgado, sendo produzido em processos metabólicos, como a fermentação lática. Na indústria de alimentos é utilizado com frequência como agente acidulante, flavorizante e conservante. Nas indústrias farmacêutica e médica, é reservado especialmente aos tratamentos dermatológicos como hidratante, umectante e adjuvante no

tratamento de acnes, melasmas e verrugas (BATISTUZZO; ITAYA; ETO, 2006; FREITAS; FIGUEIREDO, 2000).

1.4. INTERAÇÕES ENTRE POLÍMEROS E ELETRÓLITOS EM DISPERSÕES AQUOSAS

1.4.1. A DUPLA CAMADA ELÉTRICA EM PARTÍCULAS COLOIDAIS DISPERSAS

Do ponto de vista físico-químico, em meios aquosos ácidos o quitosano forma dispersões coloidais, e não soluções. Numa solução, uma substância química (sólida, líquida ou gasosa) chamada de soluto deve se dissolver em um solvente (sólido, líquido ou gasoso) e formar uma mistura monofásica do soluto no solvente, em que cada molécula/íon do primeiro interage predominantemente apenas com moléculas do segundo. Diferentemente, as dispersões coloidais são formadas por duas fases, uma dispersora ou contínua, e outra denominada fase dispersa, com partículas ou moléculas que, tipicamente, apresentam pelo menos uma de suas dimensões dentro do intervalo de 1 nm a 1 μ m (1×10^{-7} cm a 1×10^{-4} cm) (SHAW, 1975). Quando macromoléculas estão em dispersão no meio, originam uma interface com área de magnitude não negligenciável, graças a sua elevada razão área interfacial/volume. Nesse caso as propriedades termodinâmicas dessa interface têm um peso muito relevante nas propriedades termodinâmicas do sistema como um todo. Em um processo de dissolução/dispersão predominam interações partícula-solvente no sistema, enquanto que em processos de agregação há predomínio das interações partícula-partícula (AMORIM *et. al.*, 2016).

Do ponto de vista molecular, o quitosano em meio aquoso ácido se dispersa grandemente devido à protonação dos grupos amino pelos H^+ liberados pelos ácidos em solução, o que não é observado com a quitina (THADATHIL; VELAPPAN, 2014). De fato, o grupo acetamido presente em maiores proporções na quitina não apresenta par de elétrons livre acessível aos cátions H^+ . Esses elétrons são fundamentais para ligação do H^+ ao grupo amino presente na cadeia polimérica. Assim, as cadeias de quitosano que se encontravam mais próximas entre si e pouco acessíveis às moléculas de água de solvatação, uma vez protonadas passam a apresentar cargas elétricas positivas e começam a se repelir, facilitando o acesso/contato da água e outros elementos em solução. Dá-se então o início

da solvatação da macromolécula, o que favorecerá a dispersão do biopolímero no meio (PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009). Dessa maneira, a dispersão do quitosano é um sistema em que há partículas coloidais eletricamente carregadas (polímero) dispersas em uma solução ácida aquosa contendo íons positivos e negativos. Os contra-íons¹³ são atraídos para a superfície da partícula, e os co-íons são afastados. Tal disposição de partículas elétricas dará origem a uma dupla camada elétrica, constituída pela superfície da partícula carregada, pelos contra-íons (em relação à superfície) adsorvidos especificamente à superfície da partícula, pelos contra-íons solvatados também associados a esta superfície e, por fim, uma camada mais externa neutralizante, composta de co-íons (apresentando carga elétrica de sinal positivo), conforme ilustrado na Figura 4.

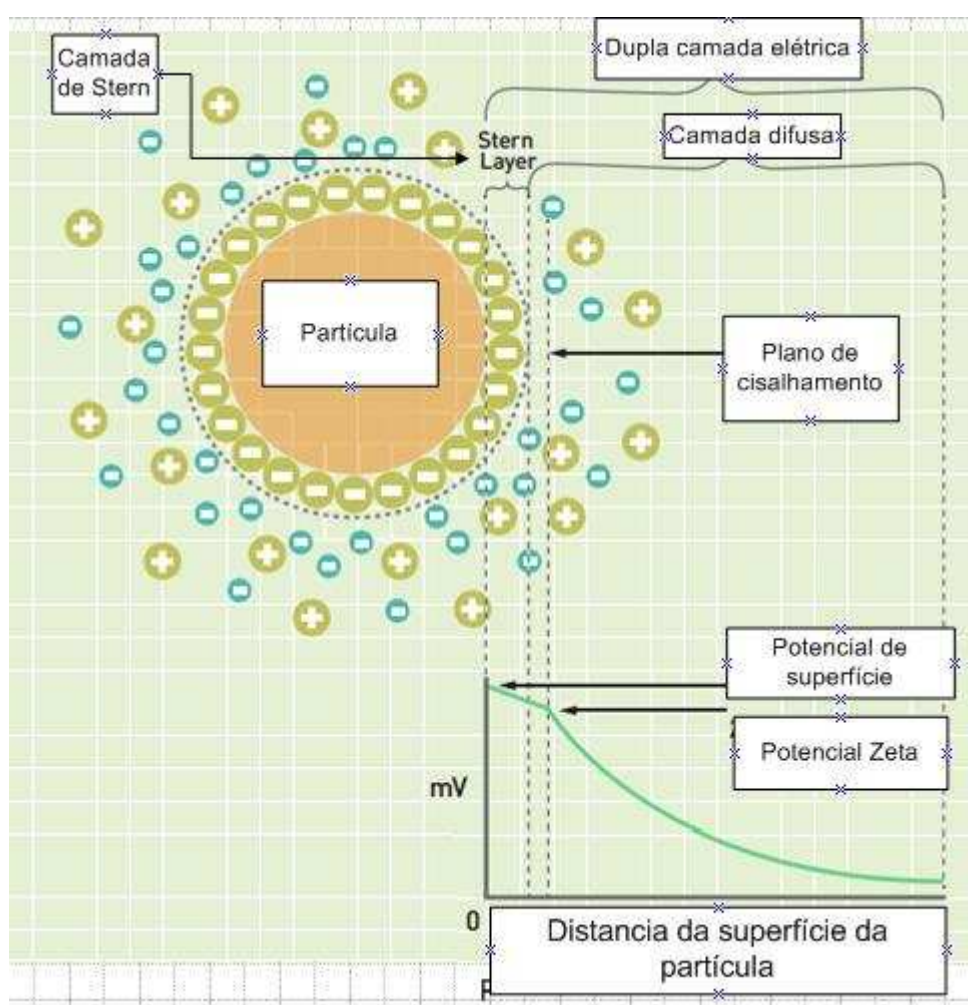


FIGURA 4-Representação gráfica da dupla camada elétrica com potenciais elétricos

Fonte: Manual zetasizer Nano. Disponível em: <<https://www.malvern.com/br/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-zs->>. acesso em 30 junho de 2017

¹³São os íons de carga oposta as da superfície do quitosano, esse caso os contra-íons apresentam carga negativa .Os co-íons apresentam cargas elétricas positivas. ¹³

De acordo com a teoria de Stern (SHAW, 1975) e conforme esquematizado na Figura 4, a dupla camada formada pode ser dividida em uma camada interna com íons hidratados e não hidratados adsorvidos à superfície e outra, mais externa, a camada difusa, em que os íons estão distribuídos de acordo com as influências de forças elétricas (AULTON, 2008). A “fronteira” entre as camadas interna e externa é denominada “plano de Stern”, que pode ser didaticamente entendido como uma linha que passa pelos centros dos contra-íons hidratados alinhados na superfície da partícula. A distância entre a superfície da partícula e o plano de Stern recebe comumente o nome de “camada de Stern”. O potencial elétrico varia linearmente desde ψ_θ (potencial de superfície) até ψ_ϕ (potencial de Stern) e decai exponencialmente até zero na dupla camada difusa, que corresponde ao final da parte externa da dupla camada. Um plano de cisalhamento é formado entre a superfície dos contra-íons hidratados e a camada difusa, em que se estabelece um potencial, denominado de “potencial zeta” (ζ). O plano de cisalhamento é uma região limite para o movimento relativo entre a partícula com os contra-íons adsorvidos em relação ao líquido solvente, ou seja, é a distância mínima onde o movimento da partícula não arrastará uma camada do líquido (SHAW, 1975). Como o potencial ζ se estabelece no plano de cisalhamento, que está localizado após o plano de Stern (consequentemente, mais próximo da camada difusa cujo potencial é 0), é comum que ψ_ζ apresente valor inferior ao encontrado para o potencial de Stern.

1.4.2. INTERAÇÕES ENTRE QUITOSANO E ÁCIDOS ORGÂNICOS EM MEIOS AQUOSOS

Interações entre o quitosano e alguns ácidos orgânicos já vêm sendo estudadas por nosso grupo de pesquisa. AMORIM *et.al*; (2016), analisaram os aspectos físico-químicos da dispersibilidade do quitosano em soluções do ácido láctico e ácido cítrico. O quitosano utilizado pelos autores apresentava grau de desacetilação 84,6% (avaliado por espectroscopia Raman) e massa molar viscosimétrica média de 540 kDa. A dispersibilidade máxima foi medida em soluções aquosas dos dois ácidos, em cinco concentrações diferentes dos ácidos (0, 10, 25, 50 e 100 mmol.L⁻¹). Foi mostrado que o quitosano apresenta maior dispersibilidade em soluções de ácido láctico, quando comparado às soluções equimolares de ácido cítrico. Os experimentos de condutivimetria, potenciometria, e microcalorimetria mostraram que a dispersibilidade do quitosano não depende apenas da concentração de íons H⁺ nos meios em questão, pois se assim fosse, o meio contendo ácido cítrico seria mais propício à dispersão do biopolímero, uma vez que esse ácido apresenta

três hidrogênios ionizáveis, e o ácido láctico que apresenta apenas um. De fato, a análise combinada dos resultados dos experimentos de condutivimetria, potenciometria, e microcalorimetria permitiu inferir que o tipo de contra-ânion que se encontra no sistema pode atenuar, na região mais externa da dupla camada elétrica, parte das cargas elétricas positivas, fato que levaria a uma repulsão eletrostática menos intensa, repulsão esta imprescindível para a dispersibilidade do quitosano. Foi esse o caso do citrato, mas não do lactato.

Para entender o comportamento do quitosano disperso em soluções aquosas de diferentes ácidos orgânicos, técnicas analíticas diversas podem ser utilizadas. As informações fornecidas por essas técnicas são de inestimável importância para uma melhor compreensão das propriedades físico-químicas e mesmo biológicas deste biopolímero. No Quadro 4, estão resumidos alguns exemplos de estudos em que se lançou mão de análises viscosimétricas, espectroscópicas e eletrocinéticas para se estudar tais propriedades.

QUADRO 4-Exemplo de técnicas analíticas empregadas em trabalhos desenvolvidos com quitosano

Técnica empregada	Parâmetro medido/estimado	Material	Metodologia	Resultados	Referência
Viscosimetria capilar	Massa molar viscosimétrica média do quitosano em diferentes pH.	• Quitosano: C1-85% GD% e C2-93% GD%. • Sol. A: ácido acético 0.3 mol/L e acetato de sódio 0.2 mol/L. • Sol. B: ácido acético 0.1 mol/L e Cloreto de sódio 0.2 mol/L. • Viscosímetro capilar de 0,63 mmol.L⁻¹ de diâmetro.	• Dispersão: (0.003 g de quitosano/mL) com pH-4.7 (A) e 2.9 (B). • Tratamento: Agitação-18h Filtração-poro 0,45µm • Medida: Estimção da massa molar viscosimétrica média (25 ± 0.05 °C).	• C1: Solução A (pH 4.7)-Mv =1.6 × 10² (g/mol). Solução B (pH 2.9)-Mv=3.0 × 10² (g/mol). • C2: Solução A (pH 4.7)-Mv =4.8 × 10² (g/mol). Solução B (pH 2.9)-Mv=6.1 × 10² (g/mol).	(COSTA <i>et al.</i> , 2015)
DLS ¹⁴ - (eletroforético)	A influência do potencial zeta sobre a atividade antibacteriana de quitosano.	• Quitosano com cerca de 90% de GD%. • Aparelho zetasizer 2000. • Culturas de <i>E. coli</i> BCRC 10675 and <i>S. aureus</i> BCRC 10780	• Medidas-Potencial zeta- e cultura celular Atividade antibacteriana-celular 100 µl de <i>E. coli</i> ou <i>S. aureus</i> com 10⁶ UFC inoculados e incubados em pH=5.0,6.0, e 7.0 contendo 150 ppm de quitosano, disperso em solução de HCl	• Quitosano com mmol.L⁻¹ >25KDa em no pH 7.0 não dispersou em água apresentaram potencial zeta >0 Não exibiu capacidade antibacteriana. • Material em pH ácido apresentou potencial zeta ≈ 19 a 20µvolts se dispersou em água.	(CHANG <i>et al.</i> , 2015)
Titulação por condutividade elétrica e pH	Variação de pH e condutividade elétrica de suspensões contendo quitosano em função da adição de ácidos	• 2 Sistemas: um contendo quitosano com 540 kDa de massa molar e 85% GD, suspenso em água e outro apenas com água • Ácidos láctico e cítrico	• Tratamento: Adição progressiva de 14 alíquotas de 120µL dos ácidos com agitação por 25min após cada adição. • Medida-Tomada de valores de pH e Condutividdde elétrica para ambos os sistemas	• Ácido cítrico- Os sistemas contendo quitosano apresentaram valores constate de pH e Cond. Até 15 mmol.L⁻¹ com posterior aumento destes parâmetros indicando protonação dos grupos NH₂. • Ácido láctico-Ambos os sistemas aumentaram semelhantemente o valor de cond. e estabilização do valor de pH para o sistema com quitosano até 40 mmol.L⁻¹.indicando uma variação no padrão de protonação do quitosano pelos diferentes ácidos.	(AMORIM; <i>et al.</i> , 2016)

¹⁴ DLS-Espalhamento dinâmico de Luz.

Técnica empregada	Parâmetro medido/estimado	Material	Metodologia	Resultados	Referência
FT-IR ¹⁵ Condutivimetria a RMN-H ¹⁶ Viscosimetria	Caracterização do quitosano : Massa molar GD Informação estrutural	• Quitosano grau analítico (QF,QA e QP). • FT-IR - Infravermelho por transformada de Fourier por transmitância. • Viscosímetro capilar • Condutímetro equipado com célula condutimétrica. • Espectrômetro de RMN-H	• Dispersões: Ácido acético a 0,5 mmol.L⁻¹. Agitação por (18 h).,Filtração poro- 5 e 0.8µm., precipitação- NH₄OH, pH final- 7.0 • Medidas-FT-IR- As informações estruturais foram obtidas utilizando 1.5mg de amostra e 100 mg de KBr para confecção da pastilha RMN-H e Condutivimetria- GD médios do quitosano. Viscosimetria- capilar- massa molar viscosimétrica média	• FT-IR-Bandas Observadas: OH e N-H (entre 3440 a 3480 cm⁻¹), C = O (entre 1661 a 1671 cm⁻¹), CH₃ (entre 1380 a 1383 cm⁻¹), angular de N-H (entre 1583 a 1594 cm⁻¹). • Viscosimetria capilar-QA (6,9x10⁴ g/mol) QF (25,2x10⁴ g/mol).(QP-não dispersou) • O Grau de desacetilação (%) encontrado pelas técnicas RMN-H e Condutimetria foi: QF-RMN=77, Cond=74,8; QA-RMN=90,2,Cond= 89,9 ;QP-RMN= 90;Cond= 89,6.	(SANTOS, <i>et al.</i> , 2003)
Viscosimetria capilar FT-IR ⁹	Caracterização química de quitosano irradiado com radiação gama. Efeito da radiação sobre a massa molar do quitosano.	• Quitosano com variado GD, extraído de cascas de lagostas. • Fonte de radiação Cobalto 60(Co⁶⁰) em equipamento Gamm a PX-30. • FT-IT RTA-Infravermelho por transformada de Fourier utilizando refletância total atenuada. • Viscosímetro capilar.	• Dispersão- 1% m/v de quitosano disperso em solução de ácido láctico a 1% v/v e 0,1% v/v de tween 80. • Tratamento-Quitosano em pó irradiado com doses de: 0, 5, 10, 20 e 50 kGy. • Medidas-FT-IR caracterizaram estruturalmente o quitosano. • Viscosimetria capilar- massa molar viscosimétrica média	• Os espectros de FTIR mostraram que a radiação não alterou a estrutura do quitosano, ou seja, não desaparecimento de grupo funcional nem surgimento de novos. • A radiação provocou redução do tamanho das cadeias de quitosano: 0 kGy- 274,636KDa; 5kGy- 245,361KDa; 10KGy- 218,704KDa; 20KGy- 125,644KDa ;50KGy- 75 971KDa.	(GARCÍA <i>et al.</i> , 2015)

¹⁵ FT-IR-Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

¹⁶ RMN-H- Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

As informações da literatura compiladas no Quadro-4 mostram diferentes técnicas que vêm sendo aplicadas no estudo de interações entre o quitosano e ácidos. A caracterização dos parâmetros intrínsecos do biopolímero (como massa molar e grau de desacetilação) pode ser realizada, por exemplo, aplicando-se uma combinação de técnicas espectroscópicas refinadas (RMN e FT-IR), como reportado por Santos *et al.* (2003). Os mesmos autores lançaram mão destes métodos, para obter informações úteis acerca da estrutura molecular dos diferentes materiais estudados, por meio da técnica de espectroscopia FT-IR identificaram as bandas típicas do quitosano e por RMN-H foi possível determinar o GD% do biopolímero.

Chang *et al.* (2015) obtiveram informações valiosas sobre o comportamento molecular de quitosano em soluções ácidas lançando mão de técnicas mais rotineiras, como viscosimetria capilar, condutivimetria e medidas de potencial zeta. Esses autores testaram a atividade antibacteriana (*E. coli* e *S. aureus*) do quitosano em diferentes condições de pH, potencial zeta e massa molar (3.3 a 300 KDa) observaram que apenas em meios com valores de pH ácido, valores positivos para potencial zeta e quitosano com massa molar < 29.2 KDa exibiram tal propriedade, indicando que a atividade antibacteriana do quitosano está associada a sua dispersibilidade, já que as condições experimentais tidas como adequadas são aquelas apropriadas para a dispersão do polissacarídeo (baixos, pH, potencial zeta positivo e quitosano de média a baixa massa molar).

Costa *et al.* (2015) determinaram a M_v do quitosano com diferentes GD (83 e 95%) e a constante α , utilizando dois sistemas tampão (Sol. A: ácido acético 0.3 mol/L e acetato de sódio 0.2 mol/L.; Sol. B: ácido acético 0.1 mol/L e Cloreto de sódio 0.2 mol/L.). A partir de dois diferentes métodos determinou-se a viscosidade intrínseca, o primeiro método foi o da extrapolação gráfica de uma dispersão diluída utilizando as regressões de Huggins (H), Kraemer (K), já o segundo método, chamado de ponto simples, utilizou-se o método Schulz–Blaschke (SB), Solomon–Ciuta (SC) e Deb–Chanterjee (DC) aplicando-se valor de 0.28 para a constante α . Como resultado do estudo obteve-se que os valores da extrapolação gráfica Huggins e Kraemer para o meio 1 foram superiores a 0,5 para as duas amostras estudadas, evidenciando uma fraca solubilização das amostras entretanto para massas molares maiores este sistema se mostrou um bom solvente, bem como foi observado que os valores encontrados para viscosidade intrínseca pelos métodos de ponto simples que podem

ser aplicados assim como a constante $\alpha = 0.28$, em ambos os solventes, as diferenças entre as massas molares encontradas foi pequena .

Dessa forma, fica clara a importância da aplicação de técnicas analíticas conjuntamente, de modo que a análise integrada dos resultados sirva para a construção de um raciocínio que leve ao entendimento do comportamento molecular do quitosano e elaboração de aproximações teóricas cada vez mais consistentes sobre os eventos em escala moleculares que governam aspectos macroscópicos (cinética de dispersão, viscosidade aparente etc.) de dispersões desse biopolímero. Para além do conhecimento adquirido sobre as dispersões, que é o objetivo da ciência *per se*, espera-se que o conjunto de análises físico-químicas adequadamente selecionadas também forneça informações que permitam expandir o leque de aplicações do quitosano em particular em formulações farmacêuticas e alimentícias fluidas ácidas.

1.5. TÉCNICAS APLICADAS AO ESTUDO DAS INTERAÇÕES ENTRE QUITOSANO E ÁCIDOS ORGÂNICOS.

1.5.1. MASSA MOLAR VISCOSIMÉTRICA MÉDIA (M_v).

O grau de desacetilação e a massa molar do quitosano são características que influenciam sobremaneira suas propriedades físico-químicas, sendo uma delas a capacidade de conferir viscosidade aos sistemas onde ele se encontra disperso (propriedades espessantes). A viscosidade de soluções ou dispersões macromoleculares diluídas se relaciona quantitativamente com o tamanho médio do biopolímero disperso, e por meio desta relação, é possível estimar a massa molar polimérica por técnicas viscosimétricas (CANEVAROLO JR, 2002). Por se tratar de uma técnica de baixo custo, rápida, e de fácil operacionalidade, a viscosimetria capilar (Figura 5) é uma importante ferramenta para a estimativa da massa molar de polímeros. Apesar de apresentar vantagens é válido destacar que a massa molar viscosimétrica não é fisicamente a massa molar ponderal dos polímeros e, no caso do quitosano em específico, dependerá de fatores intrínsecos ao polímero como grau de desacetilação, grau de polimerização médio e polidispersidade, bem como de fatores extrínsecos, tais como temperatura e solvente utilizado. Assim a massa molar

viscosimétrica média de um material deve ser criteriosamente tomada observando essas variáveis (ROBERT; ERIC; OTHERS, 1992).

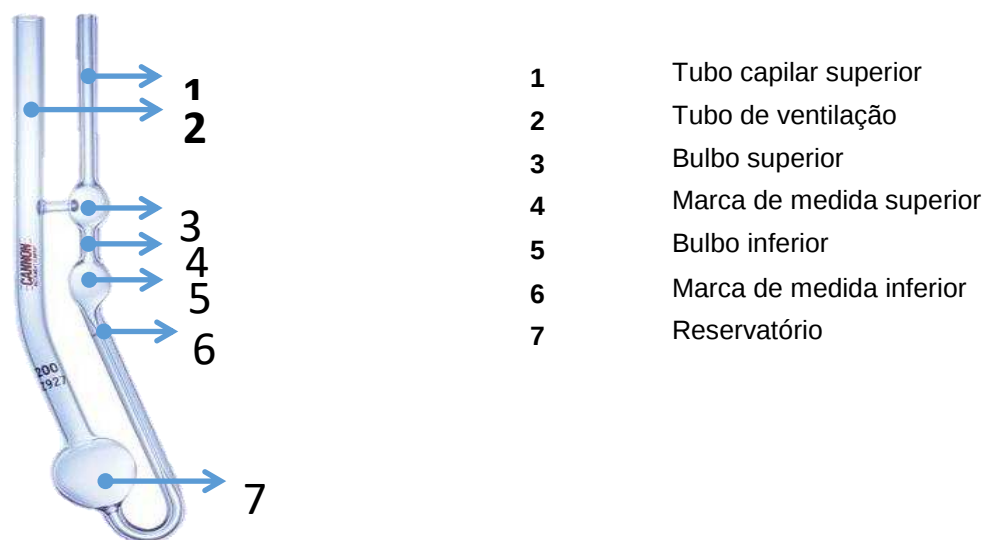


FIGURA 5-Viscosímetro capilar Cannon-Penske

O procedimento experimental está baseado na relação entre o tempo de escoamento das dispersões de quitosano (t) e da viscosidade. É possível encontrar o valor da viscosidade intrínseca de uma solução ou dispersão aplicando sucessivamente as equações que seguem no Quadro 5.

QUADRO 5-Fórmulas matemáticas utilizadas para obtenção da Mv de um polímero.

Parâmetro	Equação	
Viscosidade relativa (η_r)	$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{t}{t_0} = \frac{v}{v_0}$	Eq. (4)
Viscosidade específica (η_{sp})	$\eta_{sp} = \eta_r - 1$	Eq. (5)
Viscosidade reduzida (η_{red})	$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c}$	Eq. (6)
Relação de Huggins ($\frac{\eta_{sp}}{c}$)	$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + k_1[\eta]^2c$	Eq. (7)
Relação de Kraemer ($\frac{\ln\eta_r}{c}$)	$\frac{\ln\eta_r}{c} = [\eta]c + k_2[\eta]^2c$	Eq. (8)

Fonte: Canevarolo (2002)

Nessas equações c é a concentração do polímero, $[\eta]$ é a viscosidade intrínseca, k_1 e k'_1 são constantes obtidas através da regressão dos dados experimentais e $\eta_r = v/v_0 = (\eta_{sp} + 1)$ é a viscosidade relativa, v_0 e t_0 são a

viscosidade cinemática e o tempo de escoamento do solvente utilizado, respectivamente.

Para determinar a massa molecular viscosimétrica de um polímero em dispersão é importante saber se este fluido apresenta comportamento reológico Newtoniano, de modo que estes fluidos se caracterizam pela relação linear da taxa de deformação, $\dot{\gamma}$, e a tensão de cisalhamento, τ , (Eq. 9), com intercepto no zero (COSTA *et al.*, 2015; MELLO *et al.*, 2006).

$$\tau = \dot{\gamma} \cdot \eta \quad \text{Eq. (9)}$$

Em fluidos Newtonianos as mudanças na viscosidade são influenciadas somente pela temperatura e composição (GABAS, MENEZES & TELIS-ROMERO, 2012), de modo que se a temperatura for criteriosamente controlada as variações no tempo de fluxo são puramente em função da composição do fluido. Como a M_v é determinada a partir do tempo de fluxo do fluido através do viscosímetro capilar e a viscosidade intrínseca de um polímero em um dado solvente aumenta com a massa molar do polímero (COSTA *et al.*, 2015), torna-se possível estimar a massa molar viscosimétrica de fluídos newtonianos mediante a tomada do tempo do fluxo de um volume fixo deste fluido submetido a um controle rigoroso da temperatura.

Utilizando o tempo de fluxo de diferentes concentrações (Eq. 4) de um fluido Newtoniano é possível determinar a (η_r) que é uma medida adimensional, após determinar (η_r) , de acordo com a Eq. 5 é possível encontrar (η_{sp}) que também é uma medida adimensional. Então, como indicado na Eq. 6 a partir do valor da (η_{sp}) é possível determinar o valor da viscosidade reduzida, em $L.g^{-1}$, para cada uma das concentrações de dispersão utilizadas. Então são obtidas regressões lineares por meio das relações de Huggins (Eq. 7) e Kraemer (Eq. 8), nestas regressões lineares o valor da concentração é extrapolado para zero obtendo-se pela média destes valores a viscosidade intrínseca média $[\bar{\eta}]$.

Por fim, calcula-se a massa molar viscosimétrica média a partir da viscosidade intrínseca média. Substituindo na equação Mark–Houwink–Sakurada (MHS) (Eq. 10).

$$[\bar{\eta}] = KM^a \quad \text{Eq. (10)}$$

Na Eq. (10) $[\bar{\eta}]$ é a viscosidade intrínseca média, e K e α são as constantes viscosimétricas da Equação MHS, que não apresentam dependência da massa molar

do polímero (MAGHAMI; ROBERTS, 1988). A constante α está relacionada com a qualidade do solvente, que repercute na conformação do polímero no meio. ($0,5 < \alpha < 0,8$ indicam de bons solventes).

Kassai (2007) desenvolveu equações matemáticas empíricas para determinar o valor das constantes K e α da equação MHS para o quitosano em qualquer tipo de solvente. O autor demonstrou que a constante α é sensível às condições do meio como pH, força iônica (μ), temperatura e concentração de uréia, além do próprio grau de desacetilação (GD) do quitosano – visto que, quanto maior o número de grupos amino livres (não acetilados), maior será a interação do polímero com o solvente, afetando assim a conformação das cadeias poliméricas. Utilizando dados experimentais e da literatura, o autor, demonstrou, que a constante α variava em função da relação $GD/(pH \cdot \mu)$, e como a constante K variava em função da constante α . De acordo com este trabalho – que se tornou uma importante referência na área – propõe-se que a determinação da massa molar viscosimétrica média seja realizada utilizando tampão solução tampão acetato 0,2 M de ácido acético + 0,1 M de acetato de sódio; pH de 4,41 e força iônica de 0,1 M, garantindo a completa dispersão do polímero. Por meio deste estudo os autores puderam determinar as equações que melhor se ajustaram às constantes α (Eq.11) e K (Eq. 12). Para o parâmetro K levou-se em consideração a temperatura e a $[C]$ de uréia.

$$\alpha = 0,6202 + \frac{0,699 \cdot GD/(pH \cdot \mu)}{(0,4806 + GD/(pH \cdot \mu))} + [0,003(T - 20)] + 0,6 \cdot [C_{uréia}] \quad \text{Eq. (11)}$$

$$\log K \cdot 10^{-5} = -5,7676 \cdot \alpha + 5,9232 \quad \text{Eq. (12)}$$

Onde T é a temperatura em $^{\circ}\text{C}$ e $[C_{uréia}]$ é a concentração de ureia no meio em mmol.L^{-1} .

1.5.2. GRAU DE DESACETILAÇÃO E INTERAÇÕES INTERMOLECULARES POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO INFRAVERMELHA (FT-IR)

A medida do grau de desacetilação (GD%) do quitosano e a análise de interações intermoleculares entre o polímero e o meio no qual este se encontra disperso são parâmetros importantes para a caracterização do material utilizado, entendimento das condições necessárias para sua dispersão e, conseqüentemente, ampliação de possibilidades de uso. Os quitosanos que apresentam $\text{GD}\% > 70\%$ se dispersam em meios aquosos acidificados, se comportando como um polieletrólito

catiônico (NASCIMENTO *et al.*, 2013). Tanto as interações intermoleculares entre o quitosano e os contra-íons dos ácidos em dispersão, quanto as alterações nas interações intramoleculares que caracterizam o GD% médio desse biopolímero, podem avaliadas utilizando a técnica de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) (ABDULKARIM *et al.*, 2013; BEIL *et al.*, 2012a; SINGH, JAY *et al.*, 2009). A medida do GD% do quitosano por FT-IR traz vantagens, por se tratar de um método rápido, prático e que demanda pouco ou nenhum preparo de amostra (KURITA, 2001). Com relação à análise das interações entre o polímero e os ácidos, a quantificação não é precisa, mas é possível realizar uma análise qualitativa pela análise do surgimento, atenuação ou supressão de bandas típicas destas interações, comparadas ao espectro do quitosano puro. Apesar de a técnica de FT-IR apresentar um erro de até 5% em suas análises (DASH *et al.*, 2011) é possível contornar este problema com a escolha de mais de uma relação entre bandas de absorbância de referência, e então fazer a média entre estes valores (ROBERT; ERIC; OTHERS, 1992; TENG, 2011).

A FT-IR utiliza-se do fato de que maioria dos compostos orgânicos e inorgânicos que possuem ligações covalentes absorvem radiação na região do infravermelho do espectro eletromagnético (PAVIA *et al.*, 2016). Essa região corresponde aos comprimentos de onda (λ) maiores que os do UV-visível (400 a 800 nm) e menores que os das micro-ondas (> 1 mm). É mais usual apresentar a região de absorção de radiação infravermelha de uma molécula ou ligação em números de onda ($\bar{\nu}$), de modo que ($\bar{\nu}$) é o inverso do comprimento de onda (Eq. 13) e é proporcional à quantidade de energia irradiada, assim a energia emitida ou absorvida a um ($\bar{\nu}$) 1000 cm^{-1} é maior que o de um ($\bar{\nu}$), 600 cm^{-1} . Dentro do espectro infravermelho os números de onda ($\bar{\nu}$) entre 4000 a 400 cm^{-1} são os mais importantes para a caracterização de compostos orgânicos, como o quitosano (Barbosa, 2007).

$$\nu(\text{cm}^{-1}) = \frac{1}{\lambda(\text{cm})} \quad \text{Eq. (13)}$$

Como os comprimentos de ondas das radiações na região do infravermelho (IV) são maiores que os da radiação ultravioleta (UV), a energia associada ao IV é menor. Assim é possível identificar interações inter e intra-moleculares e ligações químicas fracas sem o rompimento destas ligações e interações. A absorção da radiação IV pelas moléculas é convertida em energia vibracional (BARBOSA, 2007). Para que a absorção de radiação possa causar uma alteração de nível energético para

outro é necessária a absorção de um comprimento de onda específico ou quantizado para cada ligação, ou seja as moléculas só absorvem as frequências de radiação no infravermelho que equivalem às frequências vibracionais de estiramento e dobramento naturais de suas ligações químicas e/ou interações intermoleculares. A energia absorvida aumenta a amplitude destes movimentos das ligações moleculares. Entretanto só são capazes de absorver no infravermelho as ligações que apresentam momento médio dipolar diferente de 0 (zero) e que mudam em função do tempo (PAVIA *et al.*, 2016). Moléculas como $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_3$, N_2 e O_2 não são capazes de absorver radiação na região do infravermelho, por apresentarem momento dipolar zero.

Um espectrômetro de FT-IR tem seu funcionamento baseado em uma fonte de radiação que emite a energia necessária à excitação das ligações/interações presentes nas moléculas e em um detector que registra a quantidade de energia que foi absorvida pela amostra. Esses dados, associados à interpretação dos sinais decorrentes da absorção da radiação aplicando um procedimento matemático denominado “transformada de Fourier”, torna possível avaliar os diferentes movimentos vibracionais das ligações químicas das moléculas. O equipamento por transformada de Fourier com refletância total atenuada (FT-IR RTA) é atualmente mais utilizado, por se tratar de um equipamento mais rápido, sensível e por demandar menos etapas de preparo de amostras (BARBOSA, 2007; PAVIA *et al.*, 2016). O equipamento funciona de acordo com o esquema apresentado na Figura 6: é emitido um feixe de luz composto por todos os comprimentos de onda a serem medidos, e esse feixe de luz incide sobre um conjunto de espelhos (interferômetro de Michelson). Um desses espelhos se move, e cada comprimento de onda do feixe inicial é periodicamente bloqueado e transmitido. Devido à interferência entre as ondas, diferentes comprimentos de onda são modulados a diferentes taxas; logo, o feixe que sai do interferômetro possui um espectro diferente. Os dados relativos às absorções de luz para cada posição do espelho são enviados ao computador para convertê-los utilizando as transformadas de Fourier. O resultado é expresso em absorção de luz para cada comprimento de onda (BARBOSA, 2007).

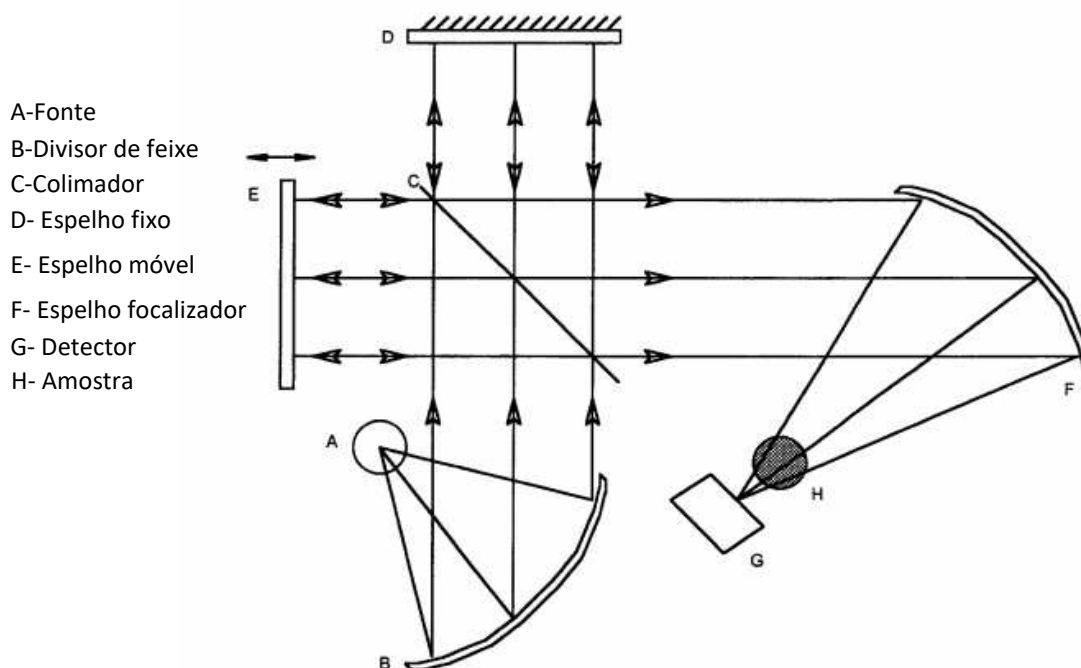


FIGURA 6-Representação esquemática de interferômetro de Michelson
Fonte:Junior, Soto.,(1995)

Diversos autores propuseram relações entre as intensidades das absorções de bandas presentes no espectro do quitosano para determinação do grau de desacetilação desse biopolímero (BRUGNEROTTO *et al.*, 2001; KIM, SE-KWON, 2010; SIVASHANKARI; PRABAHARAN, 2016b). Hajji *et al.* (2014) aplicaram FT-IR para determinar o grau de desacetilação de quitosano e diferenciar a isoforma *a* da *b*-quitina. Para determinar o GD% (83%) do quitosano os autores deconvoluíram as bandas de absorbância e utilizaram as intensidades obtidas na Eq. 14.

$$GD\% = \frac{(A_{1650} \div A_{3450})}{1.33} \times 100 \quad \text{Eq. (14)}$$

A Eq. 14 representa o procedimento (relação de bandas de absorção) sugerido pelos autores e por (HAJJI *et al.*, 2014) por apresentar a melhor adequação aos resultados encontrados pelo método de referência ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-H).

No mesmo estudo os autores determinaram da isoforma da quitina pela deconvolução das bandas de absorção do seu espectro, com posterior análise das bandas relacionadas a pontes de hidrogênio, que apareceram na forma- α em 3497 e 3439 cm^{-1} e na forma- β em 3440 cm^{-1} , bem como as bandas relacionadas a ligação de

CH₂ (forma- α 1429 cm⁻¹) e (forma- β 1436 cm⁻¹) possibilitando assim diferenciar a α -quitina da β -quitina.

Brugnerotto *et al.*, (2001) determinaram o GA de diversas amostras de quitosano e quitina por meio de FT-IR utilizando como protocolo a relação das bandas 1320 e 1420 cm⁻¹, comparando os resultados com os encontrados pela técnica de RMN. Os autores encontraram uma boa correlação linear entre os dados de FT-IR e RMN ($R^2=0.99$) para este protocolo, especialmente para amostras menos acetiladas, por meio da equação linear, $\frac{A_{1320}}{A_{1420}} = 0.38221 + 0.03133 DA$, obtida na curva de calibração mostrada na Figura 7. Desta forma é possível empregar o protocolo $(\frac{A_{1320}}{A_{1420}} - 0.38221)/0.03133$ para determinar o GA do quitosano e da quitina. Os autores observaram também, a partir de testes com amostras na forma de filme e sólida, que o protocolo testado apresenta ainda uma vantagem adicional aos outros protocolos que é a insensibilidade ao estado físico e grau de hidratação que a amostra se encontra, fornecendo resultados robustos e confiáveis em ambos os casos.

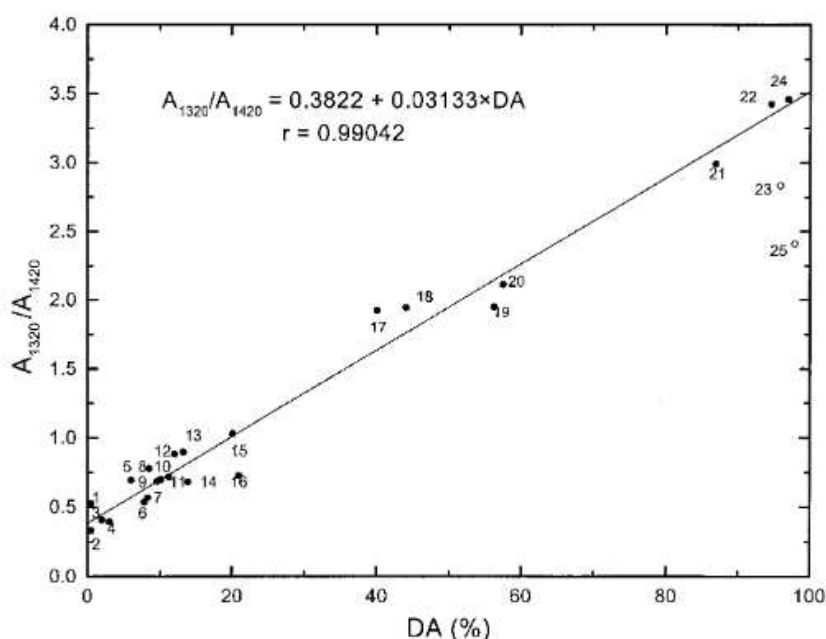


FIGURA 7-Curva de calibração em função do grau de acetilação
Fonte: Brugnerotto *et al.*, (2001)

Uma das maiores vantagens do emprego da técnica de FT-IR para determinar interações inter- e intra-moleculares e o GD% do quitosano reside no simplificado processo de preparo de amostras demandado por equipamentos de FT-IR equipados com detector RTA, sendo necessário apenas desidratar a amostra. Entretanto, a análise dos dados pode ser uma desvantagem à aplicação deste método, dada a necessidade de uma escolha muito criteriosa das bandas adequadas, a deconvolução

pertinente e precisa das absorvâncias dessas bandas e, principalmente, o traçado das linhas de base.

Czechowska *et al.* (2012) compararam diversos métodos para determinar o GD % do quitosano, incluindo FT-IR. Esses autores sugeriram a escolha de um procedimento considerando cinco bandas de absorvância e cinco linhas de base no espectro do quitosano (Figura 8), que apresentaram boa adequação ao método de referência (RMN-H). As cinco bandas destacadas na Figura 8 são relacionadas a estiramento da ligação OH (3416.95 cm^{-1}), estiramento de CH (2879.35 cm^{-1}), estiramento C=O (1658.97 cm^{-1}), deformação axial da ligação CH₂ (1420.41 cm^{-1}) e vibração da ligação da amida (1322.13 cm^{-1}).

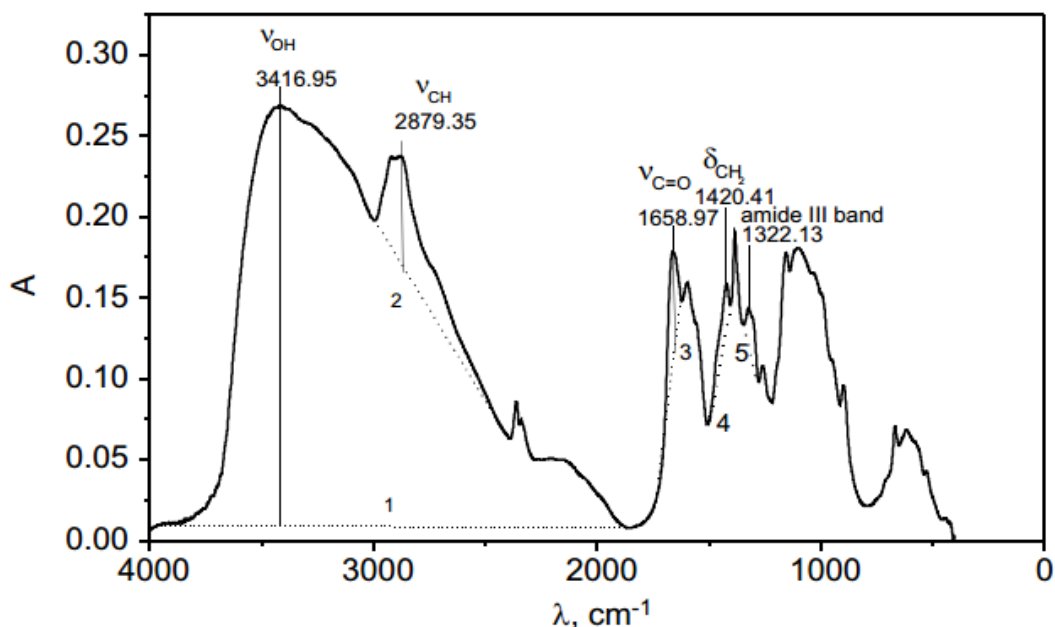


FIGURA 8-Bandas de absorvâncias e linhas de base empregadas na determinação do GD% do quitosano.

Fonte: Czechowska *et al.*, (2012)

1.5.3. DLS-ESPALHAMENTO DINÂMICO DA LUZ

O tamanho médio das partículas dispersas em um sistema coloidal, bem como a densidade de cargas elétricas nas superfícies destas partículas constituem informações muito relevantes para se entender a físico-química dos mesmos e avaliar sua estabilidade cinética. Em particular com relação ao quitosano em dispersões aquosas, a densidade das cargas elétricas superficiais em suas pode contribuir para se fazer inferências sobre a maior ou menor intensidade das interações com os contra-ânions dos ácidos utilizados para abaixar o pH do meio. O parâmetro que informa a

diferença entre potencial elétrico na superfície destas cadeias dispersas e um ponto arbitrário afastado dessa superfície (“bulk”) é o potencial zeta (ζ), que pode ser avaliado por meio de espalhamento dinâmico de luz (DLS). Os equipamentos modernos de Espalhamento de luz utilizam um laser monocromático de He-Ne (hélio e neônio), com comprimento de onda de 633 nm, como fonte de luz, o qual é convergido para a amostra por meio de uma lente focal, então a luz se choca com as partículas e se espalha (efeito Tyndal), uma porção desta luz é captada por detectores que interpretam as informações (MANUAL ZETASIZE, 2003; NOMURA *et al.*, [S.d.]). Utilizando a técnica de DLS conhecida como espalhamento de luz eletroforético (ELS) na qual se mede a velocidade de uma partícula eletricamente carregada que se movimenta em um líquido devido à ação de um campo elétrico aplicado (BHATTACHARJEE, 2016). O equipamento funciona de acordo com a Figura 9.

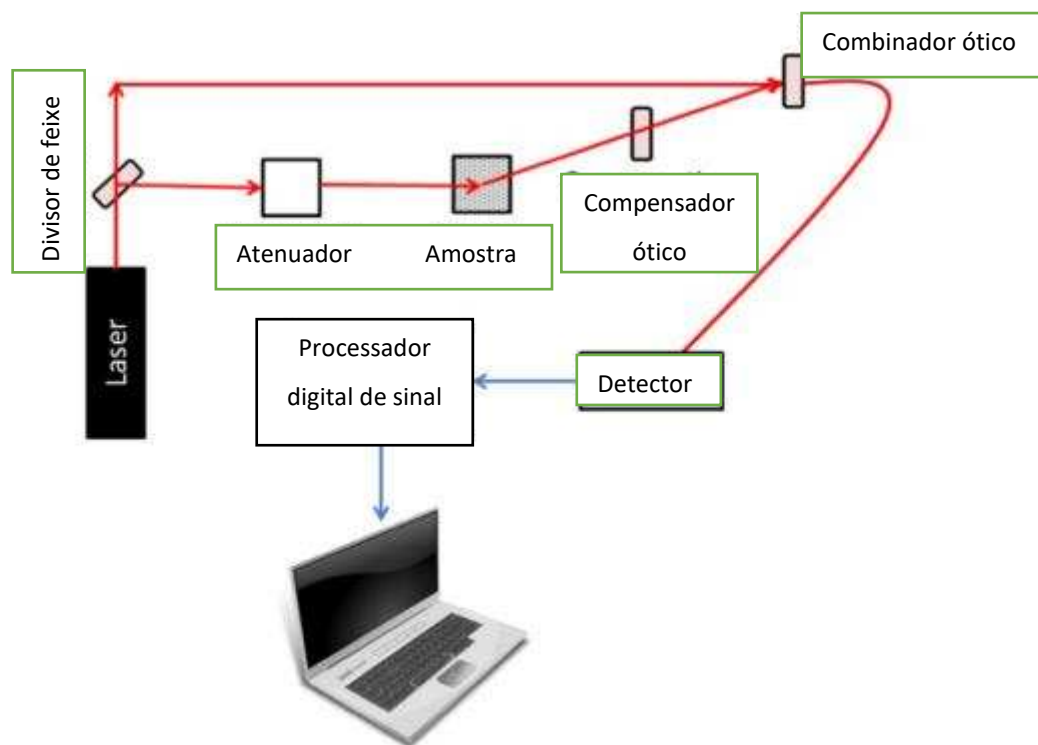


FIGURA 9-Esquema geral de funcionamento do equipamento de ELS
Fonte: Bhattacharjee (2016)

Um laser incide num divisor de feixe que divide o laser em dois, assim um dos feixes serve de feixe de referência e o outro incide sobre a amostra na qual as partículas dispersas encontram-se em constante movimento devido à influência de um campo elétrico aplicado. À medida que as partículas se movem, a luz refletida por essas partículas tem uma frequência diferente do laser original (laser de referência), a mudança de frequência é proporcional à velocidade das partículas (deslocamento

Doppler). A luz refletida da amostra é desviada, por meio de um compensador ótico, para um combinador ótico, no qual é combinada opticamente com o feixe de referência para determinar o deslocamento Doppler no detector do aparelho. A magnitude da velocidade da partícula (V) é deduzida do deslocamento Doppler, então por meio da Eq. (15) um software instalado em um microcomputador calcula a mobilidade eletroforética (μ_e) das partículas carregadas em dispersões coloidais. (BHATTACHARJEE, 2016). A partir da (μ_e) aplica-se a equação de Henry Eq. (16) para determinar o valor do potencial δ em milivolts (mV).

$$\mu_e = \frac{V}{E} \quad \text{Eq. (15)}$$

$$\mu_e = \frac{2\varepsilon_r \varepsilon_0 \zeta f(k\alpha)}{(3\eta)} \quad \text{Eq. (16)}$$

Entretanto em casos que as partículas no sistema apresentam até $1 \mu\text{m}$ o valor de $f(k\alpha) = 1.5$, então a equação de Henry é simplificada na equação Helmholtz-Smoluchowski (Eq. 17), para calcular adequadamente o potencial ζ .

$$\mu_e = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 \zeta}{\eta} \quad \text{Eq. (17)}$$

Na Eq. 17, V é a velocidade da partícula ($\mu\text{m.s}^{-1}$), E é o campo elétrico aplicado (Volts.cm^{-1}). Em Eq.16 e 17 ε_r é a permissividade relativa/constante dielétrica, ε_0 é a permissividade no vácuo, ζ é o potencial zeta e $f(k\alpha)$ é a constante de Henry η é a viscosidade à temperatura experimental (SHAW, 1975).

2. REFERÊNCIAS

ABDULKARIM, Abdulwadud *et al.* Extraction and Characterisation of Chitin and Chitosan from Mussel Shell. *Civil and Environmental Research*, v. 3, n. 2, p. 108–114, 2013. Disponível em: <<http://iiste.org/Journals/index.php/CER/article/view/4237>>.

AL-ASSAF, Saphwan; PHILLIPS, Glyn O; WILLIAMS, Peter A. Controlling the molecular structure of food hydrocolloids. *Food Hydrocolloids*, v. 20, n. 2, p. 369–377, 2006.

AMORIM, Matheus Lopes; FERREIRA, Gabriel Max Dias; SOARES, Lucas de Souza; *et al.* Physicochemical Aspects of Chitosan Dispersibility in Acidic Aqueous Media: Effects of the Food Acid Counter-Anion. *Food Biophysics*, 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11483-016-9453-4>>.

AMORIM, Matheus Lopes; FERREIRA, Gabriel Max Dias; DE SOUZA SOARES, Lucas; *et al.* Physicochemical Aspects of Chitosan Dispersibility in Acidic Aqueous Media: Effects of the Food Acid Counter-Anion. *Food biophysics*, v. 11, n. 4, p. 388–399, 2016.

ANANDAN, R. *et al.* Antiaging effect of dietary chitosan supplementation on glutathione-dependent antioxidant system in young and aged rats. *Cell Stress and Chaperones*, v. 18, n. 1, p. 121–125, 2013.

ARBIA, Wassila *et al.* Chitin extraction from crustacean shells using biological methods-a review. *Food Technology and Biotechnology*, v. 51, n. 1, p. 12, 2013.

AULTON, Michael E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. [S.l.]: Artmed, 2008.

AULTON, Michael E; TAYLOR, Kevin M G. *Aulton's Pharmaceuticals E-Book: The Design and Manufacture of Medicines*. [S.l.]: Elsevier Health Sciences, 2017.

BAJAJ, K L; KAUR, Gurdeep. Spectrophotometric determination of L-ascorbic acid in vegetables and fruits. *Analyst*, v. 106, n. 1258, p. 117–120, 1981.

BANO, Ijaz *et al.* International Journal of Biological Macromolecules Chitosan: A potential biopolymer for wound management. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 102, p. 380–383, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.047>>.

BATISTUZZO, J A O; ITAYA, M; ETO, Y. Formulário Médico Farmacêutico, 2011. *Pharmabooks, São Paulo, ed*, v. 4, p. 131, [S.d.].

BEIL, Stephan *et al.* Determination of the degree of N-acetylation (DA) of chitin and chitosan in the presence of water by first derivative ATR FTIR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, v. 87, n. 1, p. 117–122, 2012a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.025>>.

BEIL, Stephan *et al.* Determination of the degree of N-acetylation (DA) of chitin and chitosan in the presence of water by first derivative ATR FTIR spectroscopy. *Carbohydrate polymers*, v. 87, n. 1, p. 117–122, 2012b.

BHATTACHARJEE, Sourav. Review article DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, v. 235, p. 337–351, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>>.

BOONLERTNIRUN, Suchada; BOONRAUNG, Chaweewan; SUVANASARA, Raweewon. Application of chitosan in rice production. *Journal of metals, materials and minerals*, v. 18, n. 2, 2017.

BORGOGNONI, Camila Figueiredo; POLAKIEWICZ, Bronislaw; PITOMBO, Ronaldo Nogueira De Moraes. Estabilidade de emulsões de d-limoneno em quitosana modificada. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n. 3, p. 502–508, 2006.

BRUGNEROTTO, J *et al.* An infrared investigation in relation with chitin and chitosan

characterization. *Polymer*, v. 42, n. 8, p. 3569–3580, 2001.

BRUNTON, Laurence L; CHABNER, Bruce A; KNOLLMANN, Björn C. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman-12*. [S.l.]: AMGH Editora, 2012.

CAMPANA-FILHO, Sergio P. *et al.* Extração, estrutura e propriedades de α e β -quitina. *Química Nova*, v. 30, n. 3, p. 644–650, 2007.

CANEVAROLO JR, Sebastião V. *Ciência dos polímeros*. Artiliber editora, São Paulo, 2002.

CHANG, Shun Hsien *et al.* pH Effects on solubility, zeta potential, and correlation between antibacterial activity and molecular weight of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, v. 134, p. 74–81, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.072>>.

CHAVEERACH, P *et al.* In vitro study on the effect of organic acids on *Campylobacter jejuni/coli* populations in mixtures of water and feed. *Poultry science*, v. 81, n. 5, p. 621–628, 2002.

COSMÉTICOS, Utilizados E M. Conservantes. *Cosméticos & Perfumes*, 2015. , p. 28–52Disponível em: <http://www.insumos.com.br/cosmeticos_e_perfumes/artigos/conservantes_n_44.pdf>.

COSTA, Cristiane N. *et al.* Viscometric study of chitosan solutions in acetic acid/sodium acetate and acetic acid/sodium chloride. *Carbohydrate polymers*, v. 133, p. 245–250, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.094>>.

CROISIER, Florence; JÉRÔME, Christine. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, v. 49, n. 4, p. 780–792, 2013.

CZECHOWSKA-BISKUP, Renata *et al.* Determination of degree of deacetylation of chitosan-comparison of methods. *Prog. Chem. Appl. Chitin Deriv.*, v. 17, p. 5–20, 2012.

DASH, Mamoni *et al.* Statistical approach to the spectroscopic determination of the deacetylation degree of chitins and chitosans. *Carbohydrate Polymers*, v. 86, n. 1, p. 65–71, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.04.010>>.

DE ALMEIDA BARBOSA, Luiz Claudio. *Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos*. [S.l.]: Ed. UFV, 2007.

DE SOUZA SOARES, Lucas *et al.* Rheological and Physicochemical Studies on Emulsions Formulated with Chitosan Previously Dispersed in Aqueous Solutions of Lactic Acid. *Food Biophysics*, v. 12, n. 1, p. 109–118, 2017.

DONG, Ki-young *et al.* Detection of a CO and NH₃ gas mixture using carbon nanotubes. p. 8–13, 2013.

FERNANDES, Ligia Lopes. Produção e caracterização de membranas de quitosana e de quitosana com sulfato de condroitina para aplicações biomédicas. *Projeto de graduação*, 2009.

FOLEY, Patricia L. *et al.* A chitosan thermogel for delivery of ropivacaine in regional musculoskeletal anesthesia. *Biomaterials*, v. 34, n. 10, p. 2539–2546, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.12.035>>.

FREITAS, Ana Costa; FIGUEIREDO, Paulo. Conservação de alimentos. *Livro de apoio a disciplina Conservação de alimentos*. Lisboa, 2000.

GARCIA, Mario A. *et al.* Effect of molecular weight reduction by gamma irradiation on chitosan film properties. *Materials Science and Engineering C*, v. 55, p. 174–180, 2015.

GOYCOOLEA, Francisco M; MILKOVA, Viktoria. Electrokinetic behaviour of chitosan adsorbed on o/w nanoemulsion droplets. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.05.093>>.

HAJJI, Sawssen *et al.* Structural differences between chitin and chitosan extracted from three different marine sources. *International Journal of Biological Macromolecules*, p. 1–9, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.01.045>>.

HAMED, Imen; ÖZOGUL, Fatih; REGENSTEIN, Joe M. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 48, p. 40–50, 2016.

HANUZA, J; WANDAS, M; DYMIN, L. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy. v. 134, p. 114–120, 2015.

HIRANO, Shigehiro. Chitin Biotechnology Applications. *Biotechnology Annual Review*, v. 2, n. C, p. 237–258, 1996.

ILIUM, Lisbeth. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharmaceutical research*, v. 15, n. 9, p. 1326–1331, 1998.

JAWORSKA, Malgorzata M. Kinetics of enzymatic deacetylation of chitosan. *Cellulose*, v. 19, n. 2, p. 363–369, 2012.

JUNG, Jooyeoun; ZHAO, Yanyun. Characteristics of deacetylation and depolymerization of β -chitin from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) pens. *Carbohydrate research*, v. 346, n. 13, p. 1876–1884, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2011.05.021>>.

KASSAI, Mohammed R. Calculation of Mark--Houwink--Sakurada equation

viscosimetric constants for chitosan in any solvent-temperature system using experimental reported viscosimetric constants data. *Carbohydr. Polym*, v. 68, p. 447–488, 2007.

KHADEMHOSEINI, Ali *et al.* Microscale technologies for tissue engineering and biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 103, n. 8, p. 2480–2487, 2006.

KHAN, Imran; ULLAH, Shafi; OH, Deog-Hwan. Chitosan grafted monomethyl fumaric acid as a potential food preservative. *Carbohydrate polymers*, v. 152, p. 87–96, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.073>>.

KIM, Jaehyun *et al.* LC – MS / MS analysis of chitooligosaccharides. *Carbohydrate Research*, v. 372, p. 23–29, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2013.02.007>>.

KIM, Se-Kwon. *Chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives: biological activities and applications*. [S.l.]: CRC Press, 2010.

KONG, Ming *et al.* Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International journal of food microbiology*, v. 144, n. 1, p. 51–63, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012>>.

KRAVTCHENKO, T P *et al.* A novel method for determining the dissolution kinetics of hydrocolloid powders. v. 13, p. 219–225, 1999.

KUMAR, Majeti N V Ravi. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and functional polymers*, v. 46, n. 1, p. 1–27, 2000.

KURITA, Keisuke. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. v. 26, 2001.

LÜTJOHANN, Dieter *et al.* Influence of Chitosan Treatment in Obese Subjects on

Surrogate Plasma Markers of Cholesterol Metabolism. 2018.

MAGHAMI, Ghobad G; ROBERTS, George A F. Evaluation of the viscometric constants for chitosan. *Macromolecular chemistry and physics*, v. 189, n. 1, p. 195–200, 1988.

MANUAL, Zetasizer Nano Series User. Malvern instruments ltd. *Manual Version IM*, v. 100, p. 1–23, 2003.

MELLO, Ivana L. *et al.* Viscometric Study of high-cis polybutadiene in toluene solution. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 17, n. 1, p. 194–199, 2006.

NARDIN, Patricia; GUTERRES, Silvia Stanisçuaski. Alfa-hidroxi{á}cidos: Aplica{ç}{õ}es cosm{é}ticas e dermatol{ó}gicas. *Caderno de farm{á}cia. Porto Alegre, RS. Vol. 15, n. 1 (jan./dez. 1999), p. 7-14, 1999.*

NASCIMENTO, A P *et al.* Propriedades e Características da Quitosana Obtida a Partir do Exoesqueleto de Caranguejo-Uçá Utilizando Radiação de Microondas Development of New Method to Obtain Chitosan from the Exoskeleton of Crabs Using. v. 23, p. 630–635, 2013.

NIETO, Zoila *et al.* Rheological properties of aqueous dispersions of xanthan gum containing different chloride salts are impacted by both sizes and net electric charges of the cations. *Food Biophysics*, 2018.

NOMURA, Daniela A *et al.* Espalhamento Dinâmico de Luz. [S.d.].

OCHOA-VELASCO, Carlos Enrique; GUERRERO-BELTRÁN, José Ángel. Postharvest quality of peeled prickly pear fruit treated with acetic acid and chitosan. *Postharvest biology and technology*, v. 92, p. 139–145, 2014.

ORION, An. Polymer Bulletin 9. v. 190, p. 185–190, 1984.

PARK, Sung-Bin *et al.* Biopolymer-based functional composites for medical applications. *Progress in Polymer Science*, v. 68, p. 77–105, 2017.

PAULA, T Ana *et al.* T Preparação e Caracterização de Nanocompósitos Poliméricos Baseados em Quitosana e Argilo Minerais. v. 24, p. 628–635, 2014.

PAVIA, Donald L *et al.* Introduction to Spectroscopy. 2016.

PILLAI, C K S; PAUL, Willi; SHARMA, Chandra P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in polymer science*, v. 34, n. 7, p. 641–678, 2009.

RASO, Javier; BARBOSA-CÁNOVAS, Gustavo V. Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques. 2003.

RAVI KUMAR, Majeti N.V. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, v. 46, n. 1, p. 1–27, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381514800000389>%5Cn<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1381514800000389>>.

REVATHI, Masilamani; SARAVANAN, Ramachandran; SHANMUGAM, Annaian. Production and characterization of chitinase from *Vibrio* species, a head waste of shrimp *Metapenaeus dobsonii* (Miers, 1878) and chitin of *Sepiella inermis* Orbigny, 1848. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, v. 3, n. 4, p. 392–397, 2012. Disponível em: <<http://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?PaperID=21848&#abstract>>.

RINAUDO, Marguerite. Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in polymer science*, v. 31, n. 7, p. 603–632, 2006.

ROBERT, M Enick; ERIC, J Beckman; OTHERS. Chitin Chemistry, The. 1992.

ROCHA, M Angélica M; COIMBRA, Manuel A; NUNES, Cláudia. Applications of chitosan and their derivatives in beverages: a critical review. *Current Opinion in Food Science*, v. 15, p. 61–69, 2017.

SANTOS, Franciele Nicole Dos; OTHERS. Preparação e estudo de filmes automontados de quitosana e carboximetilcelulose sobre substrato de poli (ácido láctico). 2013.

SANTOS, José E. Dos *et al.* Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. *Polímeros*, v. 13, n. 4, p. 242–249, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-14282003000400009&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

SHAHIDI, Fereidoon; ARACHCHI, Janak Kamil Vidana; JEON, You Jin. Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science and Technology*, v. 10, n. 2, p. 37–51, 1999.

SHAW, Duncan J. *Introdução à Química dos Colóides e de Superfícies*. [S.l.]: E. Blücher, 1975a.

SILVA, Paula de A. S. Da; DUPIM, Mariana dos S.; CHAZIN, Eliza de L. Acetic Acid (CAS 64-19-7). *Revista Virtual de Química*, v. 7, n. 6, p. 2647–2662, 2015. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/1984-6835.20150159>>.

SINGH, J. *et al.* Preparation and properties of highly soluble chitosan-l-glutamic acid aerogel derivative. *Carbohydrate Polymers*, v. 76, n. 2, p. 188–195, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.10.011>>.

SINGH, Jay *et al.* Preparation and properties of highly soluble chitosan--l-glutamic acid aerogel derivative. *Carbohydrate Polymers*, v. 76, n. 2, p. 188–195, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.10.011>>.

SIVASHANKARI, P. R.; PRABAHARAN, M. Prospects of chitosan-based scaffolds for

growth factor release in tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.043>>.

SIVASHANKARI, P R; PRABAHARAN, M. Deacetylation modification techniques of chitin and chitosan. *Chitosan Based Biomaterials Volume 1: Fundamentals*, p. 117, 2016b.

SNYDER, Carl H. *The extraordinary chemistry of ordinary things*. . [S.l: s.n.], 1995.

STEPHEN, Alistar M.; PHILLIPS, Glyn O.; WILLIAMS, Peter A. *Food polysaccharides and their applications*. [S.l: s.n.], 2006.

TENG, Dayong. From chitin to chitosan. *Chitosan-based hydrogels: Functions and application*. [S.l.]: CRC Press Boca Raton, Florida, 2011. p. 2–33.

THADATHIL, Nidheesh; VELAPPAN, Suresh Puthanveetil. Recent developments in chitosanase research and its biotechnological applications: A review. *Food chemistry*, v. 150, p. 392–399, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.083>>.

THERON, Maria M; LUES, J F Rykers. *Organic acids and food preservation*. [S.l.]: CRC Press, 2010.

TRIPATHY, Satyajit *et al*. A novel chitosan based antimalarial drug delivery against Plasmodium berghei infection. *Acta Tropica*, v. 128, n. 3, p. 494–503, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.07.011>>.

TZANEVA, Desislava *et al*. Synthesis of Carboxymethyl Chitosan and its Rheological Behaviour in Pharmaceutical and Cosmetic Emulsions. v. 7, n. 10, p. 70–78, 2017.

VALENCIA-SULLCA, Cristina *et al*. Thermoplastic cassava starch-chitosan bilayer

films containing essential oils. *Food Hydrocolloids*, v. 75, p. 107–115, 2018.

VAZ, J M *et al.* Antibacterial coatings based on chitosan for pharmaceutical and biomedical applications. *Current pharmaceutical design*, 2018.

VINSOVA, Jarmila; VAVRIKOVA, Eva. Chitosan derivatives with antimicrobial, antitumour and antioxidant activities-a review. *Current pharmaceutical design*, v. 17, n. 32, p. 3596–3607, 2011.

VITURAWONG, Yuvarit; ACHAYUTHAKAN, Piyada; SUPHANTHARIKA, Manop. Gelatinization and rheological properties of rice starch/xanthan mixtures: Effects of molecular weight of xanthan and different salts. *Food Chemistry*, v. 111, n. 1, p. 106–114, 2008.

WANG, Liyan *et al.* Preparation and characterization of active films based on chitosan incorporated tea polyphenols. *Food Hydrocolloids*, v. 32, n. 1, p. 35–41, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.034>>.

WINTEROWD, J G; SANDFORD, P A. Chitin and chitosan. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-*, p. 441, 1995.

WU, Yinglong *et al.* Original Article A novel method for measuring dissolution kinetics of pulverized konjac flour. v. 16, n. Suppl 1, p. 188–192, 2007.

XU, Wenhua *et al.* Chitooligosaccharides and N-acetyl-D-glucosamine stimulate peripheral blood mononuclear cell-mediated antitumor immune responses. *Molecular Medicine Reports*, v. 6, n. 2, p. 385–390, 2012.

YANG, Ran *et al.* A review on chitosan-based flocculants and their applications in water treatment. *Water research*, v. 95, p. 59–89, 2016.

YOUNES, Islem; RINAUDO, Marguerite. Chitin and chitosan preparation from marine

sources. Structure, properties and applications. *Marine drugs*, v. 13, n. 3, p. 1133–1174, 2015.

ZENG, Defang; LUO, Xinrong; TU, Renjie. Application of bioactive coatings based on chitosan for soybean seed protection. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, v. 2012, 2012.

ZHU, Ke Xue *et al.* Functional properties of chitosan-xylose Maillard reaction products and their application to semi-dried noodle. *Carbohydrate Polymers*, v. 92, n. 2, p. 1972–1977, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11.078>>.

CAPITULO 2

Estudo

Experimental

Maximum dispersibility and dispersion kinetics of chitosan in aqueous media containing the organic acids acetic, glycolic, propionic, or lactic: macroscopic and molecular aspects

ABSTRACT

Chitosan is a polycationic polysaccharide, dispersible in acidic aqueous media, with great biotechnological applicability. Typically acetic acid solutions are used as dispersing media, but using other organic acids is essential to widen the applicability spectra of this biopolymer. The present study aimed to understand the molecular behavior of chitosan when dispersing it within aqueous media containing different technologically relevant organic acids (glycolic, acetic, propionic and lactic acid). The maximum dispersibility of the polymer was calculated in g.100 mL⁻¹ for acetic (0.62, 0.79 and 1.35), glycolic (0.51, 0.64 and 1.34), propionic (0.61, 0.70, 1.31) and lactic acid (0.58, 0.74, 1.30) for the acid concentration of [10, 30 and 50] mmol.L⁻¹ respectively. At 50 mmol.L⁻¹ the results were obtained by gravimetry. Using chitosan suspensions titrated with solutions of each acid (2 mol.L⁻¹). The pH values ranged from 7 to 2.5, and conductivity from 0 to 2000 $\mu\text{S.cm}^{-1}$. Chitosan was completely protonated in lactic and glycolic acids, what did not occur in propionic and acetic acids. The FT-IR spectroscopy results revealed that the NH_3^+ bands were more intense for lactic and glycolic acids indicating a greater extension of the polymer protonation and the bands of OH and CO indicated only the additive effect of the acids presence in the suspensions, these variations did not indicate possible intermolecular interactions. Potential zeta values were (57,8 $\pm$ 0.9 mV) for all acids. The results for 10 and 30 mmol.L⁻¹ were estimated by means of a mathematical model, first order with two terms, adjusted ($R^2 > 0.9$) to the dispersion kinetics data. It was concluded that the interactions between the anions at these concentrations (10, 30 and 50 mmol.L⁻¹) and the chitosan are so low that they did not significantly affect the dispersion of chitosan, therefore any of these acids can be used to disperse the chitosan.

KETWORDS

Chitosan, dispersion kinetics, FT-IR, Intermolecular interaction, maximum dispersibility, Titration,

1. INTRODUCTION

Chitosan is a polysaccharide obtained industrially by deacetylation of chitin, a polysaccharide component of arthropod exoskeletons, mainly prawns and crabs processed by fishing industry. It can also be found naturally in fungi, such as *Zygomycetes* (KIM, SE-KWON, 2010). On a structural point of view, it is a biopolymer formed by monomer units of [poly- β (1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose] and [poly- β (1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose]. The average percentage of deacetylated monomers is commonly referred as "degree of deacetylation" (DD%) (AL-ASSAF; PHILLIPS; WILLIAMS, 2006; ROBERT; ERIC; OTHERS, 1992; TENG, 2011). Even though the biopolymer can be considered theoretically as chitosan (and not chitin) when DD% > 50%, in practice chitosans found in commerce usually present DD% ~75-85 % (KIM, SE-KWON, 2010; ROBERT; ERIC; OTHERS, 1992).

Although not dispersible in pure water, chitosan can be dispersed in acidic aqueous media (pH < 6.5), because in such media $-NH_2$ (amino) groups present on the polymer chains are progressively protonated and positively charged (GOYCOOLEA; MILKOVA, 2016), which increases electrostatic repulsion intra- and inter-chains, thus favoring biopolymer water interactions. Physicochemical changes triggered by adding chitosan to acidic aqueous media (e.g.: viscosity and density increase) have their magnitude linked to chitosan DD and average molecular mass (HIRANO, 1996; WANG *et al.*, 2013). Moreover, recent studies have shown that the type of acid used to reduce pH influences both the dispersion kinetics and the maximum dispersibility of the chitosan (AMORIM *et al.*, 2016; SOARES *et al.*, 2017). In view of this, studies aiming to clarify specific interactions between this biopolymer and counter-anions from different acids are relevant and necessary to a rational understanding of this fact. In particular, organic acids are strategic in this context, due to their technological importance in medical (PARK *et al.*, 2017), pharmaceutical (VAZ *et al.*, 2018) and food (ROCHA; COIMBRA; NUNES, 2017) areas. There are several literature reports, with either fundamental or applied approaches, which address aqueous dispersions of chitosan using acetic acid solutions as dispersion medium for the biopolymer. For instance, Klokkevold (1991) achieved a reduction of blood loss by 40%, by using dressing wounds prepared with chitosan (0.2 g.100 mL⁻¹) dispersed in 0.2 % of acetic acid. In his review Sivashankari & Prabakaran, (2016), studied the development of drug delivery systems, especially growth factors for the treatment of bone lesions. For the production of this pharmaceutical form, a blend of chitosan-poly (ethylene oxide) fibers prepared by wet centrifugation method using acetic acid as

solvent was developed. It was observed that the acetic acid concentration had an effect on the surface morphology of the fibers. The fibers prepared in 2% and 5% of acetic acid showed smooth and rough surfaces, respectively. These blended fibers showed improved stability due to the increase in the total concentration of polymer provided by the ability of the acetic acid to disperse the chitosan thereby increasing fiber thickness. Borgognoni, Polakiewicz, & Pitombo, (2006) studied the stability of D-limonene emulsions with succinylated chitosan for the development of a d-limonene encapsulation agent by lyophilization. Emulsions of chitosan and D-limonene were compared with the emulsions of maltodextrin and d-limonene, since maltodextrins are widely used as flavor encapsulation agents. The succinylated chitosan was obtained by the dispersion of 10.0 g of chitosan in 500.0 mL of 3% aqueous acetic acid and, under stirring, in which 30.0 g of succinic anhydride dissolved in 120 mL of acetone with subsequent addition of sodium hydroxide in order to reach pH 9.0 and formation of a succinylated chitosan sodium salt. The emulsions were prepared by adding 0.12 mL of d-limonene in 100 mL of the aqueous solutions of maltodextrin 40% (w/w) and succinylated chitosan 1% (w/w). Homogenization occurred by the use of ultra-turrax. The droplets of the emulsions prepared with chitosan were 20% lower than those of maltodextrin-containing system and the emulsions prepared with maltodextrin showed twice the release of d-limonene using chitosan indicating that chitosan promoted a better retention of d-limonene, showing that its presence in the emulsion gives greater stability to the system.

Despite of these few examples, acetic acid is not suitable for applications in several fields (especially in foods), mainly due to its strong flavor. Hence, a proper understanding of the physicochemistry behind the dispersion of chitosan in aqueous media acidified with other organic acids is of undeniable relevance. Among such organic acids, glycolic, propionic and lactic acids deserve attention, because they have nowadays numerous technological uses. (THERON; LUES, 2010).

In addition to their technological applicability, these three acids share similarities which encourage their choice in a study centered on a structure-property perspective: they can be seen as variants of acetic acid to which $-\text{CH}_3$ (methyl) and/or $-\text{OH}$ (hydroxyl) groups are added to the molecule (Figure 1). With such systematically controlled structure differences, the influence of the acids molecular structures on chitosan dispersibility and dispersion kinetics can be more rationally analyzed, discussed and understood. Given this context, along with the scarcity of literature data on chitosan dispersions using glycolic, propionic and lactic acids, the present work intended to study quantitatively the dispersion kinetics and dispersibility of chitosan in

aqueous solutions of each of these three acids and acetic acid. Additionally, molecular interactions between chitosan and the counter-anions from different acids were studied by FT-IR spectroscopy, and also by ζ -potential, conductometry and potentiometry analyses performed on these dispersed systems. Macroscopic physicochemical aspects (chitosan dispersibility and dispersion kinetics) were discussed based on molecular features inferred from a careful examination of this set of analytical data.

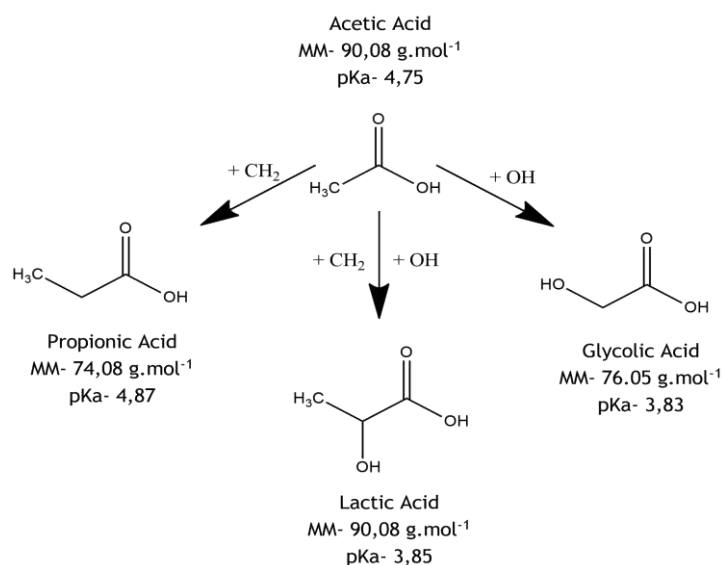


FIGURE 1-Molecular structures of the organic acids acetic, glycolic, propionic and lactic

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. MATERIALS

Chitosan was bought from Sigma-Aldrich® (USA; product ID: SLBG4282V). Glacial acetic acid (purity = 99.7%) was purchased from Vetec® (Brazil). Lactic acid (purity = 85%) was purchased from Impex® (Brazil). Propionic acid (purity = 99.5%), glycolic acid (solid form; purity = 99%), D-glucosamine·HCl (DD%> 99.5%; purity> 99.0%; product ID: 24895187) were purchased from Sigma-Aldrich® (USA). In all experiments, double distilled and deionized water (electrical resistivity = 18.2 MΩ·cm), obtained by filtration in a reverse osmosis system (QUV3; Millipore®, Italy) was used.

Before the experiments, chitosan was washed three times with double distilled and deionized water abundance. During each whasing, 5 g of chitosan powder were mixed with 500 mL of water and kept under magnetic stirring for 50 min. Next, the mixture was vacuum filtered (vacuum pump MA039; Marconi®, Brazil) through quantitative filter paper (125 mmol.L⁻¹; Unifil®, USA), the filtrate was discarded and the retained solid was recovered. This procedure was repeated twice, until the pH

(pHmeter H2221, Hanna®, USA) of the water of the filtrate was constant. After that, washed chitosan was frozen at -40 °C, lyophilized (Freeze-drying LS 3000, Terroni®, Brazil), and finally stored under refrigeration at -15 °C (Pratice 410 Biplex Cooler Consul®; Brazil) until the moment of use. This washing procedure aimed to ensure the removal of residual salts from the process for obtaining chitosan by chitin deacetylation, as well as soluble small chains (chitooligosaccharides). All other chemicals were used as acquired, without any further purification.

2.2. CHARACTERIZATION OF CHITOSAN

2.3. DEGREE OF DEACETYLATION

The average degree of deacetylation (DD%) of chitosan was estimated by applying a FT-IR spectroscopy approach, with attenuated total reflectance (ATR) (FT-IR spectrophotometer 600-IR, Varian®, USA). The spectrum of D-glucosamine·HCl (DD% > 99.5%) was recorded and compared with the spectrum of lyophilized chitosan, with regard to the intensity of specific bands (Eq.1-3; Table 1) (BEIL *et al.*, 2012b; BRUGNEROTTO *et al.*, 2001; CZECHOWSKA-BISKUP *et al.*, 2012; KIM, SE-KWON, 2010)

TABLE 1-Bands and equations applied in determination of DD%

Bands	Equations	References
$A_{1320} - \text{Amida (III)}$ $A_{1420} - \text{CH}_2$	$DA\% = \left(\frac{A_{1320}}{A_{1420}} - 0.3822 \right) \div 0.03133$ Eq.(1)	(BRUGNEROTTO <i>et al.</i> , 2001)
$A_{1655} - \text{C=O}\nu$ $A_{3450} - \text{O-H}\nu$	$DA\% = \left(\frac{A_{1655}}{A_{3450}} \times 100 \right) \div 1.33$ Eq.(2)	(SIVASHANKARI; PRABAHARAN, 2016a)
$A_{1030} - \text{C-O}\nu$	$DA\% = \frac{A_{1655}}{A_{1030}}$ Eq.(3)	(KIM, SE-KWON, 2010)

The bands were treated by deconvolution in their Lorentzian components (Peakfit 4.12 software package, Jandel Scientific), by plotting their baselines as described by Czechowska *et al.* (2012). The percentage of acetylated amino groups in the chitosan chain or mean degree of acetylation (DA%) was estimated by averaging results obtained from Eq. 1-3. Finally, DD% was calculated by simple difference (DD% = 100 - DA%).

2.3.1. VISCOMETRIC MOLAR MASS

The average viscometric molar mass (M_v) of chitosan was estimated through a classical capillary viscosimetry approach (AMORIM *et al.*, 2016; SOARES *et al.*, 2017). Chitosan was dispersed in acetate buffer (0.2 M acetic acid + 0.1 M sodium acetate; pH = 4.41 and ionic strength = 0.1 M), with biopolymer concentration [0.25 g. (100 mL)⁻¹] (Kassai, 2007). The mixture was stirred for 24 h, and then vacuum filtered (vacuum pump MA039; Marconi®; Brazil) through quantitative filter paper. From this dispersion four dilutions were prepared [0.05; 0.1; 0.15 and 0.20 g (100mL)⁻¹], using the same buffer. Using a Cannon-Fenske capillary viscometer dispersions (model 513 10, Schott®, Germany), the flow times of 10 mL of each of these five dispersions were measured. During these flow assays, the systems were sunk in water, within a thermostated bath apparatus (CT52; Schott®; USA), at 25.0 °C ± 0.1 °C. From these data, the relative Eq. (4), specific Eq. (5) and reduced Eq. (6) viscosities were sequentially calculated.

$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{t}{t_0} = \frac{v}{v_0} \quad \text{Eq. (4)}$$

$$\eta_{sp} = \eta_r - 1 \quad \text{Eq. (5)}$$

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c} \quad \text{Eq. (6)}$$

Thus, the empirical relations of Higgins Eq. (7) and Kraemer Eq. (8) were adjusted to experimental data. Then, by extrapolating of concentration $c \rightarrow 0$ (zero) in Eq. 7 and 8 and averaging the results, the average intrinsic viscosity ($[\bar{\eta}]$) was obtained.

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + k_1[\eta]^2 c \quad \text{Eq. (7)}$$

$$\frac{\ln \eta_r}{c} = [\eta] c + k_2[\eta]^2 c \quad \text{Eq. (8)}$$

The constants K and α of the Mark-Houwink-Sakurada equation Eq.(9) were calculated as described elsewhere (Kassai, 2007). And, finally, M_v was calculated by applying Eq. 9.

$$[\eta] = KM^\alpha \quad \text{Eq. (9)}$$

2.4. CHITOSAN DISPERSION KINETICS

In this study, the concentration of chitosan effectively dispersed in aqueous media acidified with monoprotic organic acids (acetic, glycolic, propionic or lactic), at different concentrations (10, 30 or 50 mmol.L⁻¹) was determined by UV-Vis spectrophotometry, (Varian spectrophotometer Cary 50 Probe; USA), as described in detail by Amorim, *et al.*, (2016). For each of the four acids (50 mmol.L⁻¹), analytical curves for chitosan dispersions were built, with biopolymer concentrations 0; 0.025; 0.05; 0.1; 0.2; 0.4; 0.6; 0.8; and 1.0 (g 100 mL)⁻¹. The obtained regressions are summarized in Table 2. In these Equations, $[C]$ represent the chitosan concentration [g (100 mL)⁻¹], $Abs_{\lambda=275nm}$ represents the absorbance at $\lambda = 275$ nm. In all cases, $R^2 > 0.998$.

TABLE 2-Linear regression equations used to quantify dispersed chitosan.

Acid	Regression
Acetic Acid	$[C] = \frac{(Abs_{\lambda=275nm} + 0.001238)}{0.4334}$
Glycolic Acid	$[C] = \frac{(Abs_{\lambda=275nm} + 0.001771)}{0.4986}$
Propionic Acid	$[C] = \frac{(Abs_{\lambda=275nm} - 0.000119)}{0.4317}$
Lactic Acid	$[C] = \frac{(Abs_{\lambda=275nm} + 0.003524)}{0.4335}$

In chitosan dispersion kinetics assays, an excess of chitosan (2 g) was added to 200 mL of each of the twelve acid solutions. systems were shaken in thermostatic bath (Tecnal[®], TE-184, Brazil), under controlled stirring (270 rpm) and temperature (25.0 ± 0.1 °C). Aliquots were withdrawn from each system at 30 s, 1 min, 2 min, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 5 h, 8 h. Each aliquot was centrifuged at 6085 *g* for 20 min (centrifuge 5430; Eppendorf[®]; Germany) and the supernatants were sequentially filtered three times, in order to ensure the removal of any non dispersed impurity. The first filtration was carried out with two layers of qualitative paper and cotton. The second filtration was performed using Millipore[®] syringe filters (0.8 µm) previously treated with acetone solution (20% v/v). Finally, a filtration was executed with syringe filters (0.8 µm) with no treatment. The concentration of dispersed chitosan was quantitated in this filtrate by applying the equations shown in Table 2.

An exponential empirical mathematical model with 4 parameters (Eq. 10; (Amorim, et al., 2016; Kravtchenko, Renoir, Parker, & Brigand, 1999) was fitted to experimental kinetics data of $C = f(t)$.

$$C = C_a * (1 - \exp(-k_a * t)) + C_b * (1 - \exp(-k_b * t)) \quad \text{Eq. (10)}$$

In Eq. 10, C is the concentration [g.(100 mL)⁻¹] of chitosan effectively dispersed in the system at the time t , C_a and C_b are the concentrations in g.(100 mL)⁻¹ of chitosan dispersed and k_a and k_b quantifies the rate of disperssion of the chitosan.

From the models that best fit the biopolymer dispersion kinetics data in the media with acid concentrations [10; 30, and 50 mmol.L⁻¹] the maximum dispersibility was estimated using the maximum dispersible concentration constants of the regression model that best fitted the kinetic experimental data. The deviation of the maximum dispersibility, in these cases, was obtained by the 95% confidence interval of the regression.

2.5. CHITOSAN MAXIMAL DISPERSIBILITY

The maximal dispersibility of chitosan in aqueous media acidified with monoprotic organic acids (acetic, glycolic, propionic or lactic), at different concentrations (10, 30 or 50 mmol.L⁻¹) was also evaluated. For systems with acid concentration of 50 mmol.L⁻¹, the maximum dispersibility of chitosan was calculated by gravimetry (analytical balance AUY220 Shimadzu® Japan). In these cases, 100 mL of aqueous solutions of each acid were added of 2 g of chitosan and kept under magnetic stirring (SL-91 / D agitator Solab® Brazil) at controlled temperature (25 ± 1 °C) for 4 hours. Then, these mistures were centrifuged at 6085 g for 20 min (centrifuge 5430; Eppendorf®; Germany). The solid fractions were collected, abundantly whashed with double distilled and deionized water, vacuum filtered (vacuum pump MA039; Marconi®; Brazil), and finally lyophilized (Freeze-drying LS 3000, Terroni®, Brazil). Then, the maximum dispersibility of chitosan was calculated by simple difference between the initial (2 g) and liophilized masses of the biopolymer. For systems consisting of 10 and 30 mmol.L⁻¹ of acid, the concentration corresponding to the maximum dispersibility was obtained from the C value determined by the equation in the dispersion kinetics experiments.

2.6. INTERMOLECULAR INTERACTIONS BETWEEN CHITOSAN AND THE ORGANIC ACIDS

In order to better comprehend, at a molecular level, the differences in dispersion kinetics and maximal dispersibility of chitosan in aqueous media when using varied organic acids, different analyses were undertaken, as described in the subsections thereafter.

2.6.1. CONDUCTOMETRIC AND POTENTIOMETRIC TITRATIONS

Electrical conductivity and pH data of chitosan suspensions to which acid was progressively added were intended to allow inferences on mobility differences of both H^+ cations and counter-anions released by the acids within an aqueous environment, with or without chitosan. In a beaker, 0.5 g of chitosan was added of distilled and deionized water to achieve the final volume of 50 mL (system I). A second beaker containing 50 mL of water was considered as the control (system II). In both systems I and II, fourteen injections of 120 μ L solution of each acid (2.0 mol.L^{-1}) were added, so the acid concentration in the medium progressively augmented from 0 to 80.6 mmol.L^{-1} . These systems were continuously kept under magnetic stirring, at $25 \pm 1^\circ\text{C}$. The time between two successive acid injections was 25 minutes, in order to reestablish chemical equilibrium (AMORIM; FERREIRA; SOARES; *et al.*, 2016). Immediately before each injection, the electrical conductivity (conductivimeter Orion 145 61 A + Thermo® USA) and pH (pHmeter H2221 Hanna®, USA) were measured and recorded. This experiment was performed for each of the four studied acids.

2.6.2. POTENTIAL ζ ANALYSES

Values and signs of ζ -potential of the surface of the dispersed chitosan were evaluated using a Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments®, U.K.) apparatus. Solutions of each acid were prepared (10 mmol.L^{-1}) and added of 0.1 g of chitosan in 20 mL of solution (0.5% m/v ;). These systems were kept under magnetic stirring for 24 hours, at $25 \pm 1^\circ\text{C}$. After that, they were centrifuged at 6085 g for 20 min (centrifuge 5430; Eppendorf®, Germany) and the supernatants were filtered sequentially through quantitative paper filter (125 mmol.L^{-1} ; Unifil®, USA) and $0.8 \mu\text{m}$ filter (MCE, Millipore®, USA). The speed and direction of the movement of dispersed chitosan chains due to the applied electric field allowed calculating the electrophoretic mobility (Eq. 11). From

it, their ζ -potential was estimated by assuming the Smoluchowski model for the electrical double layer (Eq. 12) (SHAW, 1975).

$$\mu_e = \frac{v}{|E|} \quad \text{Eq. (11)}$$

$$\zeta = \frac{4 \eta \mu_e}{\varepsilon \varepsilon_0} \quad \text{Eq.(12)}$$

In Eq. (11) and (12), μ_e ($m^2.s^{-1}.V^{-1}$) is the electrophoretic mobility, v ($m.s^{-1}$) is the speed of particles, and $|E|$ ($m.V^{-1}$) is the electric field; ε (dimensionless) is the dielectric constant of the medium, ε_0 ($C^2.N^{-1}.s^2$), is the permittivity of free space, ζ (mV) is the zeta potential, and η ($Pa.s$) is the viscosity of the medium, which was considered equal to the water viscosity in calculations, because of the low concentration of the acid in the solvent (10 mmol.L^{-1}).

2.6.3. FT-IR ANALYSES

Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy technique was applied in the mode of total attenuated reflectance (ATR), and subsequent deconvolution of the bands in their Lorentzian components. Transmittance spectra were recorded at wave numbers (ν) between 400 and 4000 cm^{-1} . These spectra were examined based on the formation or attenuation of characteristic bands, according to Czechowska-Biskup et al., 2012; Barbosa, 2007; Hanuza, Wandas, & Dymin, 2015; Cai, Jiang, Wu, & Le, 2015; Santos; *et. al.*, 2003.

2.6.4. STATISTICAL ANALYZES

All statistical analyzes were performed with the SAS program version 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), licensed by the Federal University of Viçosa. regression analysis was performed using experiments with quantitative independent variables. The adequacy of fitting of models was evaluated by R^2 (linear determination coefficient; Eq.13) and MAPE (Mean Absolute Percentual Error; Eq.14) (NIETO *et al.*, 2018).

$$R^2 = \frac{SQ_{exp}}{SQ_{total}} \quad \text{Eq.(13)}$$

$$MAPE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left| \frac{(O_i - P_i)}{O_i} \right| 100\% \quad \text{Eq.(14)}$$

In Equation 13, SQ_{exp} is the sum of squares explained by the model, and SQ_{total} is the total sum of squares. Equation 14, n is the number of observations, O_i is the i th observed value and P_i is the corresponding i th value predicted by the adjusted regression model. For analyzes comparing qualitative independent variables as acid type (zeta potential and maximum dispersibility), the results were treated by analysis of variance (ANOVA) followed by test (Tukey), at the significance level of $p < 0.05$. The kinetics of dispersion and quantification of dispersed chitosan were treated by analyzing the R^2 value of the regressions. For the conductometric and potentiometric titration results, a comparison between the means of the triplicates.

3. RESULTS

3.1. CHARACTERIZATION OF CHITOSAN

3.1.1. DEGREE OF DEACETYLATION

The FT-IR spectrum of chitosan wave numbers ranged from 4000 to 400 cm^{-1} is shown in Figure 2, along with the deconvolution in Lorentzian components of the individual intensities of bands of interest to estimate the degree deacetylation (DD%) of chitosan. In the Figure 2, we highlight the absorbance bands, deconvoluted in Lorentzian components. With data from Figure 2 and Equations 1-3 (presented in Table 1), values of DD% were respectively 74.96%, 73.26% and 83.15%. Therefore, by averaging these values, the DD% of the chitosan used in the present study was determined as $(77.12 \pm 5.28) \%$. According to the manufacturer, the DD% of this chitosan can vary from 75 % to 85 % (SIGMA-ALDRICH, 2015a). Thus, the value of the DD% experimentally estimated by us is consistent with the manufacturer's information.

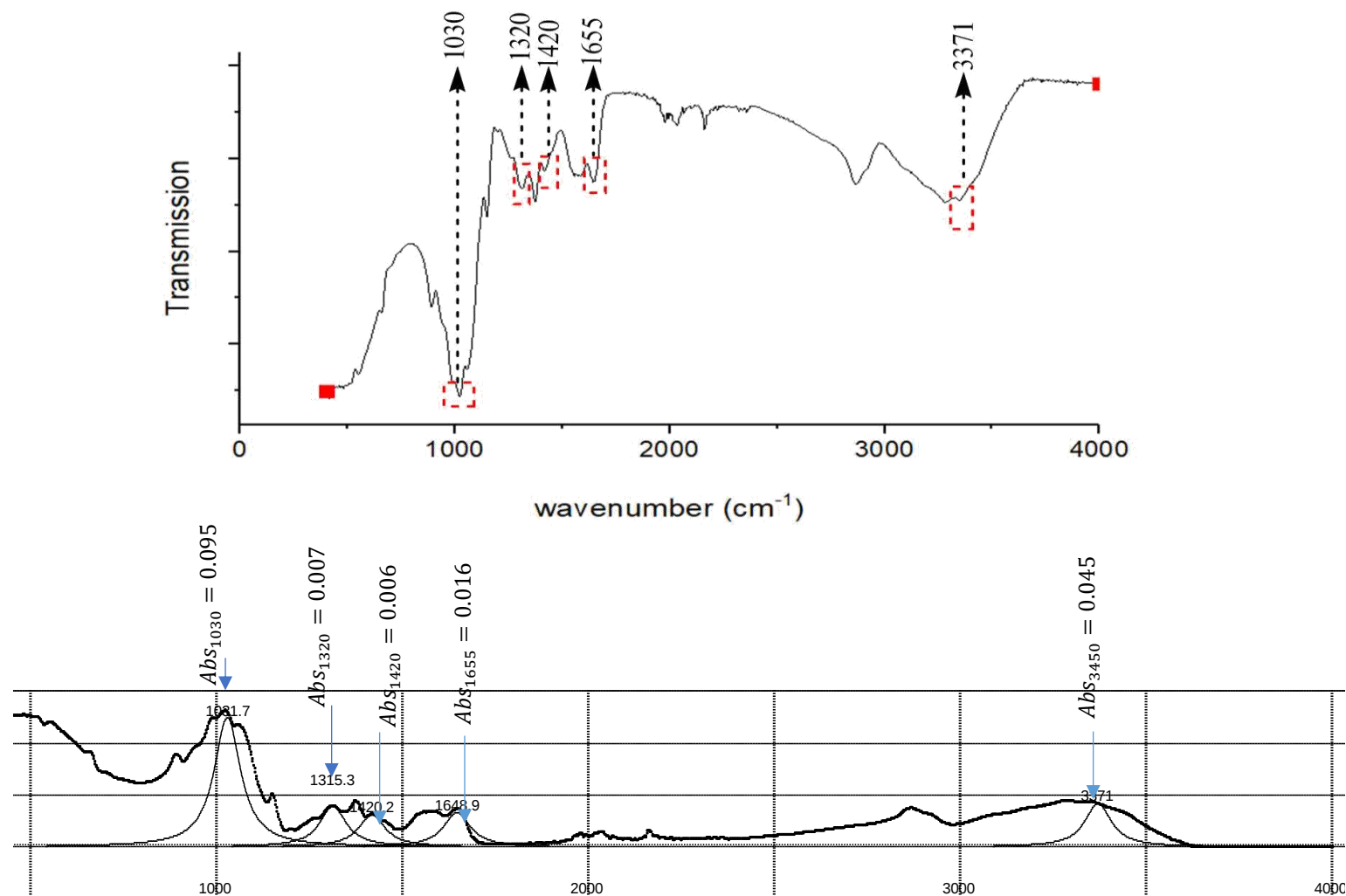


FIGURE 2-Chitosan spectrum followed by the deconvolution of bands highlighted in their lorentzian components

By using capillary flow experimental data and equations 5 and 6, graphical plots of $\frac{[\eta_{sp}]}{c} = f(c)$ and $\frac{\ln[\eta_r]}{c} = f(c)$ were constructed (Figure 3). Then, by extrapolating the value of C to zero ($c \rightarrow 0$) in these two equations the Huggins intrinsic viscosity ($[\eta]_H$) and the Kraemer intrinsic viscosity ($[\eta]_K$) were determined as, respectively, 8.90 dL (g)⁻¹ and 8.91 dL (g)⁻¹. The average intrinsic viscosity was $\overline{[\eta]} = 8.905$ dL(g)⁻¹. The values of α and K of the MHS relationship (Eq. 9), determined according to the protocol proposed by Kassai (2007), were $\alpha = 0.93$ and $K = 3.63 \times 10^{-5}$ dL (g)⁻¹. Hence, the average viscometric molar mass (M_v) of the chitosan used in the present study was estimated as 624 kDa.

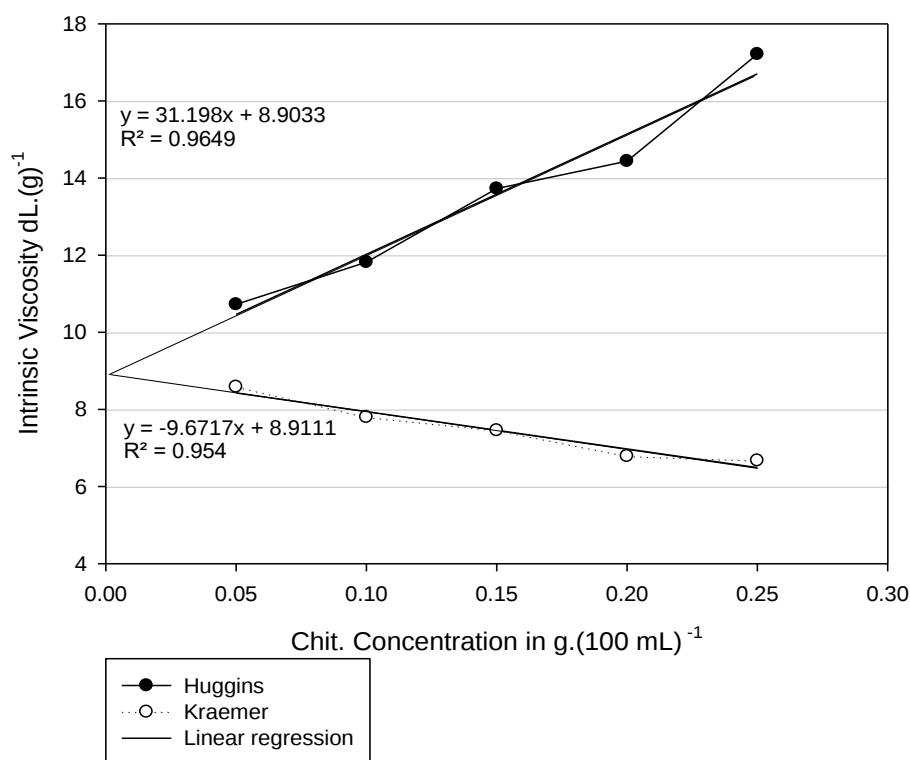


FIGURE 3-Intrinsic viscosity estimation using the Huggins and Kraemer regressions

3.2. CHITOSAN DISPERSION KINETICS

Data of concentration of dispersed chitosan as a function of time of stirring ($C = f(t)$), in aqueous systems containing acetic, glycolic, propionic or lactic acid, at concentrations 10 mmol.L⁻¹, 30 mmol.L⁻¹ or 50 mmol.L⁻¹, are graphically presented in Figure 4. The adjusted parameters of the first order kinetic model with two terms (Eq. 10) to these data, as along with the adequacy of fitting indicators – R^2 (Eq. 13) and

MAPE Eq. (14) – are given in Table 3. After adjusting the empirical kinetic model represented by Eq. 10 to these data, $R^2 \geq 0.94$ and $MAPE \leq 8.7\%$ were found for all systems, which indicates the great suitability of this model to represent the temporal variation of concentration of dispersed chitosan within these systems, *i.e.*, $C = f(t)$.

Considering systems with the same concentration of different acids, some differences could be noted. For systems containing 10 mmol.L⁻¹ of acids, during the first hour, chitosan dispersed faster in systems with lactic and propionic acids present than in those with acetic and glycolic acids. The times spent to reach the concentration plateau (C_{max}) for the systems with 10 mmol.L⁻¹ of acid, were 60 minutes for the acetic and propionic acids and 180 minutes for the glycolic and lactic acids. For systems with 30 mmol.L⁻¹ of acids, C_{max} values were reached after 180 minutes for the acetic acid and 30 minutes for glycolic, propionic and lactic acids. Finally, in systems whose acid concentration was 50 mmol.L⁻¹, C_{max} was reached after 30 minutes for all acids.

Not surprisingly, for all acids, the higher acid concentration, the greater was the plateau of chitosan concentration reached. This result is attributed to the fact that more H⁺ was released, shifting the protonation equilibrium of chitosan chains towards the charged form ($Ch - NH_2 + HA \rightleftharpoons Ch - NH_3^+ + A^-$), engendering a more pronounced electrostatic repulsion between the biopolymer chains, thus favoring their dispersion. More specifically, quantitative differences in C_{max} were found when changing either the type or the concentration of organic acids in these systems. These differences were detailed and more deeply explored in the subsequent sections.

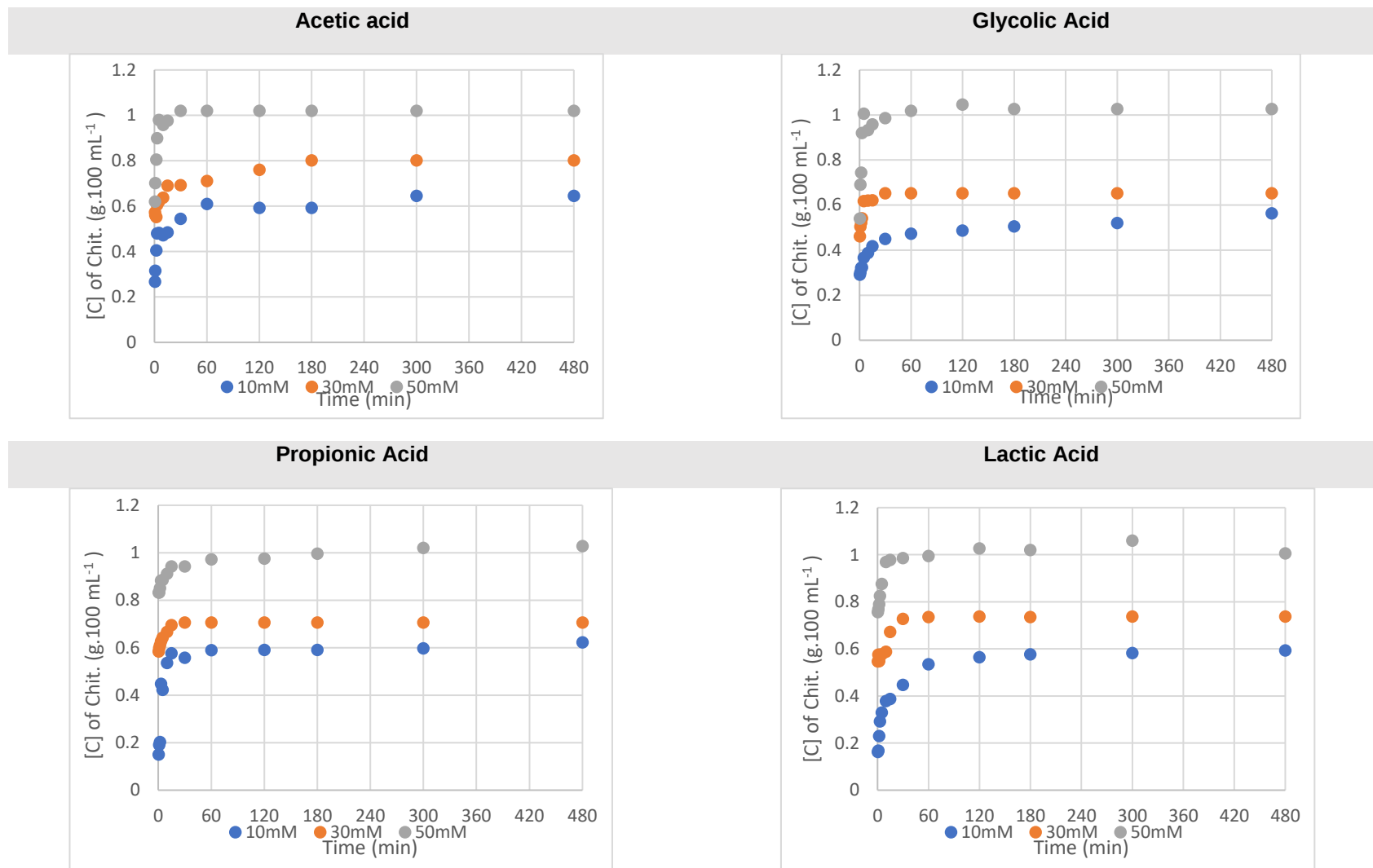


FIGURE 4-Chitosan dispersion kinetics in each of the 4 acids and in the 3 concentrations used in the study as a function of time

TABLE 3-Mathematical model adjusted to the dispersion kinetics data $C = f(t)$.

First order kinetic model with 2 terms - $C = C_a * (1 - \exp(-k_a * t)) + C_b * (1 - \exp(-k_b * t))$ ¹																					
Concentration	10 mmol.L ⁻¹							30 mmol.L ⁻¹							50 mmol.L ⁻¹						
Acid type	C _{max} g. (100 mL) ⁻¹	C _a g. (100 mL) ⁻¹	k _a /min ⁻¹	C _b g.(100 mL) ⁻¹	k _b /min ⁻¹	R ²	MAPE	C _{max} g. (100 mL) ⁻¹	C _a g.(100 mL) ⁻¹	k _a /min ⁻¹	C _b g.(100 mL) ⁻¹	k _b /min ⁻¹	R ²	MAPE	C _{max} g. (100 mL) ⁻¹	C _a g.(100 mL) ⁻¹	k _a /min ⁻¹	C _b g.(100 mL) ⁻¹	k _b /min ⁻¹	R ²	MAPE
Acetic	0.62 ±0.02	0.44 ±0.02	1.46 ±0.24	0.18 ±0.02	0.02 ±0.10	0.96	5.3%	0.79 ±0.01	0.57 ±0.01	8.51 ±7.44	0.21 ±0.02	0.03 ±0.01	0.94	2.90%	1.00 ±0.02	0.50 ±0.29	0.09 ±0.01	0.50 ±0.22	0.48 ±0.02	0.98	1.64%
Glycolic	0.51 ±0.01	0.30 ±0.01	5.00 ±2.28	0.20 ±0.02	0.04 ±0.01	0.95	3.7%	0.64 ±0.21	0.46 ±0.02	6.38 ±2.24	0.18 ±0.02	0.22 ±0.05	0.97	1.46%	1.00 ±0.02	0.57 ±0.16	5.86 ±3.58	0.43 ±0.15	0.52 ±0.16	0.94	3.72%
Propionic	0.61 ±0.05	0.55 ±0.04	0.36 ±0.06	0.06 ±0.06	0.01 ±0.02	0.94	8.7%	0.70 ±0.11	0.58 ±0.01	8.70 ±1.19	0.12 ±0.03	0.13 ±0.01	0.99	0.29%	1.00 ±0.03	0.84 ±0.01	7.51 ±2.45	0.15 ±0.01	0.04 ±0.01	0.94	1.74%
Lactic	0.58 ±0.01	0.28 ±0.02	0.98 ±0.20	0.30 ±0.02	0.03 ±0.006	0.99	5.7%	0.74 ±0.22	0.53 ±0.25	1039 ±0.01	0.2 ±0.12	0.06 ±0.10	0.96	2.01%	1.00 ±0.01	0.72 ±0.27	2998 0.01	0.28 0.16	0.14 ±0.03	0.97	1.45%

¹ For systems containing acids at 10 mmol.L⁻¹ and 30 mmol.L⁻¹, C_{max} = C_a + C_b; for systems containing acids at 50 mmol.L⁻¹, C_{max} could not be inferred from the mathematical models, and was experimentally assessed as reported in subsection 3.3.

3.3. CHITOSAN MAXIMAL DISPERSIBILITY

For systems containing 10 mmol.L⁻¹ and 30 mmol.L⁻¹ of acid, the maximum dispersibility of chitosan could be obtained directly from the adjusted models for $C = f(t)$ (Eq. 10, Table 3). In systems whose acid concentration was 50 mmol.L⁻¹, the chitosan initially added was completely dispersed, so in such cases an experimental determination of C_{max} was performed. These experiments were carried out with double the initial concentration of chitosan [2 g (100 mL)⁻¹], and the maximum dispersibility was determined as detailedly described in section 2.4. The maximal dispersibility (C_{max}) of chitosan in aqueous systems containing acetic, glycolic, propionic or lactic acid, at concentrations 10 mmol.L⁻¹, 30 mmol.L⁻¹ or 50 mmol.L⁻¹, are compiled in Table 4.

TABLE 4-Chitosan's maximum dispersibility in each acidic medium studied.

Acid	Maximal concentration of dispersed chitosan / g·100 (mL) ⁻¹		
	10 mmol.L ⁻¹	30 mmol.L ⁻¹	50 mmol.L ⁻¹
Acetic	0.62 ± 0.02 ^{aA}	0.79 ± 0.01 ^{aB}	1.35 ± 0.02 ^{aC}
Glycolic	0.51 ± 0.01 ^{bA}	0.64 ± 0.21 ^{aB}	1.34 ± 0.02 ^{abC}
Propionic	0.61 ± 0.05 ^{aA}	0.70 ± 0.11 ^{aB}	1.31 ± 0.03 ^{abC}
Lactic	0.58 ± 0.01 ^{aA}	0.74 ± 0.22 ^{aB}	1.30 ± 0.01 ^{bC}

Values followed by equal lowercase letters in the columns do not differ significantly from each other by the Tukey test at the significance level $p < 0.05$.

Values followed by equal capital letters in the lines do not differ significantly from each other by the Tukey test at the significance level $p < 0.05$.

In Table 4 it can be seen that for all systems there is a tendency to disperse higher chitosan concentrations with increasing acid concentration in the medium, and the variations from C_{max} to 10 mmol.L⁻¹ to 30 mmol.L⁻¹ are significantly lower than C_{max} variations between 30 and 50 mmol.L⁻¹ acid concentrations. Although this trend is observed in all acids tested, specifically for acetic, glycolic and lactic acids, variations in C_{max} between 10 and 30 mmol.L⁻¹ are higher than the same variations for propionic acids, which is not observed in C_{max} for 50 mmol.L⁻¹ concentration in which all systems showed a pronounced increase in C_{max} and statistically very close. For the concentration of 10 mmol.L⁻¹ acid, it is observed that the acetic and propionic acids have very close C_{max} values, differing from the glycolic acid which is significantly lower.

At 30 mmol.L⁻¹ large deviations in the measurements are observed. Due to the high viscosity of these systems it is not possible to establish a precise trend for the C_{max} data. Finally, in the concentration of 50 mmol.L⁻¹ acid it is possible to observe that acetic, glycolic and propionic acids present, although very close, C_{max} statistically superior to lactic acid.

3.4. INTERMOLECULAR INTERACTIONS BETWEEN CHITOSAN AND THE ORGANIC ACIDS

3.4.1. CONDUCTOMETRIC AND POTENTIOMETRIC TITRATIONS RESULTS

Figure 5 shows the variations of pH and electrical conductivity of aqueous systems chitosan powder (I) or a control constituted of water only (II), as acid (acetic, glycolic, propionic or lactic) was gradually added. Such titration analyses were intended to help in discussing molecular interactions, based on differences of mobility of electrically charged species (counter-anions and H⁺ cations released by the acids) within aqueous environments with or without chitosan. All the systems presented variation in pH and electrical conductivity values due to addition of acid, but these variations differed between the cases (I) and (II). In order to analyze results represented in Figure 5, it is useful to class the studied systems into two groups: those added of acids (glycolic – pKa = 3.83; lactic – pKa = 3.85) and those added of acids (acetic – pKa = 4.87; propionic – pKa = 4.75).

For systems containing chitosan that were titrated with the glycolic and lactic acids, the initial pH was ~7, decreasing fastly to about 5.5 after the addition of 15 mmol.L⁻¹ of acid. At acid concentrations ranged between 15 mmol.L⁻¹ to about 38-40 mmol.L⁻¹, pH remained practically constant, oscillating at 5.4-5.5. At acid concentrations > 40 mmol.L⁻¹, pH underwent raised new progressive drop down to about 3.5, when the acid concentration reached 80 mmol.L⁻¹. In contrast, in absence of chitosan (control systems containing water only), the addition of glycolic or lactic acids caused a progressive pH drop, typical of the dissociation of organic acids in aqueous media. The pH value dropped from ~7 to about 3.5 soon after the first acid injection, and decreased continuously until reaching ~2.3 (glycolic) and ~2.0 (lactic). Regarding the electrical conductivity, it increased from 0 to ~1250 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ at a rate practically

constant (and with values slightly higher for systems without chitosan) until the acid concentration reached about 50 mmol.L⁻¹. At higher acid concentrations, the values of measured electrical conductivity tended to be very close for systems with and without chitosan, and raised to a similar rate up to about 1700 $\mu\text{S.cm}^{-1}$, when the acid concentration reached 80 mmol.L⁻¹ within the systems. With regard to systems containing chitosan that were titrated with acetic and propionic acids, the initial pH was also ~ 7 and decreased to about 5.6-5.8 after adding 15mmol.L⁻¹ of acid to the systems. Next, for concentrations of acid > 15 mmol.L⁻¹, pH decreased slowly, but continuously, until reaching ~ 4.7 , when the concentration of added acid was about 80 mmol.L⁻¹. In systems without chitosan, (control systems containing water only), the addition of acetic or propionic acids caused a fast pH drop from ~ 7 to about 3.8 soon after the first acid injection, and decreased continuously until reaching ~ 2.9 , when the concentration of acid attained 80 mmol.L⁻¹. The electrical conductivity of the systems titrated with acetic and propionic acids exhibited a behavior inverse to the observed for the glycolic and lactic acids: The electrical conductivity of systems increased as more acid was added, independently on the presence or absence of chitosan, in systems containing chitosan. Nevertheless, in systems containing chitosan, both the increase rate and the value of the electrical conductivity were higher than the observed for the control containing only water, at a given acid concentration. The final electrical conductivity values in systems with chitosan, when the concentration of acid arrived at 80 mmol.L⁻¹, were about 1250 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ (propionic) and 1600 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ (acetic). In the control systems without chitosan (water only), these final values were about 850 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ (propionic) and 1100 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ (acetic).

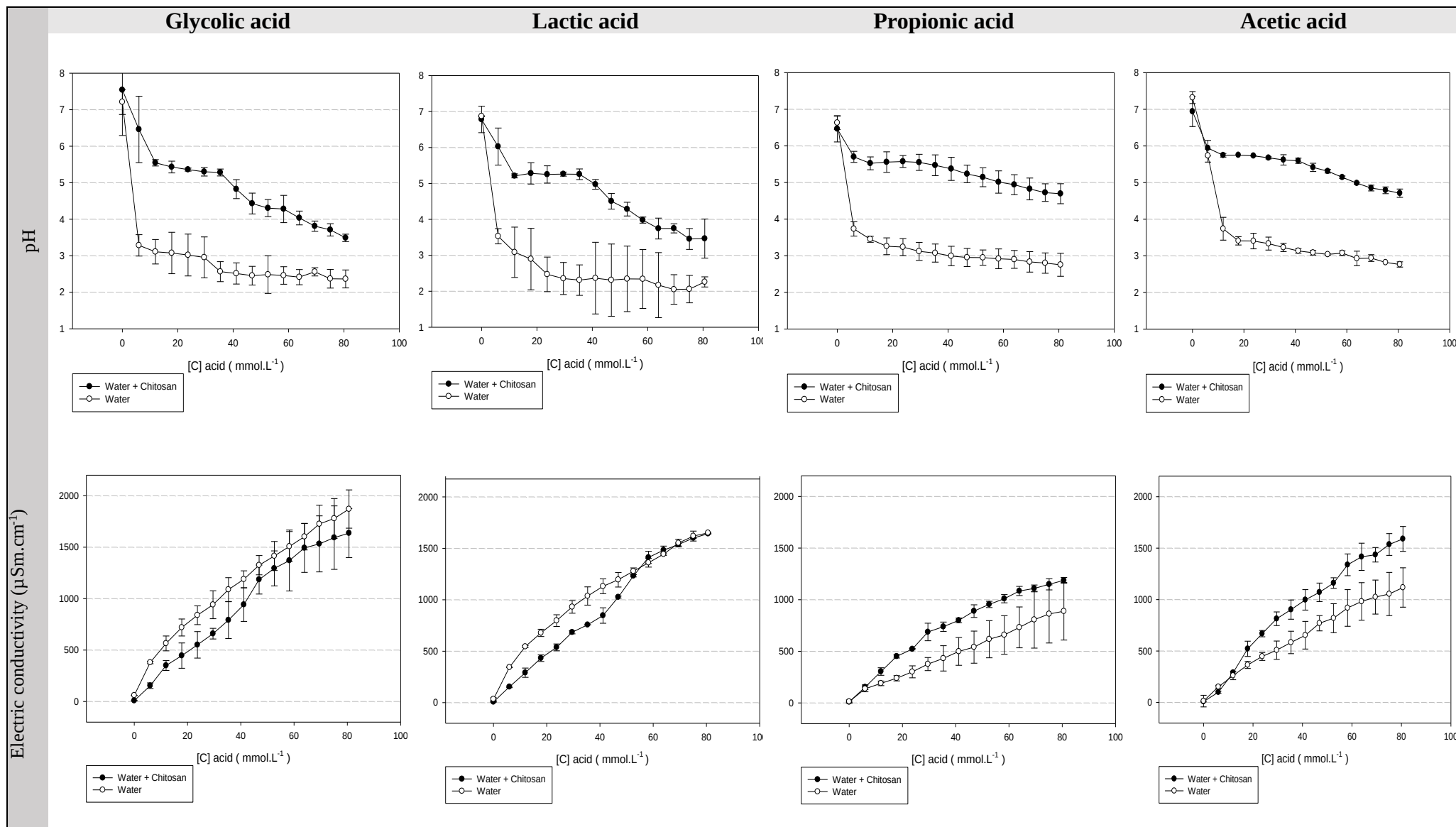


FIGURE 5-Conductivimetric and potentiometric titrations of the suspensions with and without chitosan with each of the 4 acids.

3.4.2. POTENTIAL ζ RESULTS

In Table 5, the ζ -potential values of the chitosan effectively dispersed in the aqueous systems containing 10 mmol.L⁻¹ of the acids glycolic, lactic, propionic or acetic are presented. Firstly, it is noteworthy that ζ -potential values were positive (+), emphasizing the fact that the interfacial electric charges resulted from the protonation of the amino groups of the chitosan.

TABLE 5-Mean values for potential ζ of chitosan chains dispersed in different acidic media

Acid	ζ potential (mV)
Acetic	+58.23 $\pm$ 2.06 ^a
Glycolic	+56.62 $\pm$ 3.05 ^a
Propionic	+57.16 $\pm$ 2.71 ^a
Lactic	+59.45 $\pm$ 2.64 ^a

Values followed by equal lowercase letters do not differ significantly from each other by the Tukey test at the significance level $p < 0.05$.

Similarly, to what was done to analyze results of conductometry and potentiometry in section 3.4, one could consider these acids by pairs in order to analyse the ζ -potential magnitudes, since the acids studied differ in number of carbon atoms (2 or 3) and in the presence/absence of a hydroxyl group bound to the carbon adjacent to the carboxyl group. No clear trend could be identified in these results. Indeed, when comparing acids having 2 carbons (acetic and glycolic) with those containing 3 carbons (propionic and lactic), no statistically significant difference ($p < 0.05$) was identified between their $|\zeta$ -potential|. If one considers simple acids (acetic and propionic) *versus* hydroxylated acids (glycolic and lactic), again, no statistically significant difference ($p < 0.05$) was identified for their $|\zeta$ -potential| values. In summary, the ζ -potential of dispersed chitosan chains did not show significant differences in their magnitudes ($p < 0.05$). This finding indicated that the density of electric charges on the interfaces of the dispersed biopolymer chains was not significantly influenced by the type of acid, among these four, used to obtain the dispersions.

3.4.3. FT-IR RESULTS

Intermolecular interactions between the chitosan and the acids that constituted the dispersion media were also studied by FT-IR technique, in the mode of total attenuated reflectance (ATR). As shown in Figure 6, due to the great amount of water present in the systems, only the bands related to the vibrations of the water OH bonds (Barbosa, 2007), namely 3300 cm^{-1} (νOH) and 1650 cm^{-1} (γOH) appear in spectra, precluding the analysis of the studied systems without removing the water. Therefore, the dispersions were lyophilized and the obtained solids were reanalyzed. In Figure 7, FT-IR spectra for these lyophilized systems are presented. After the deconvolution of the bands of interest (Figure 7) in their Lorentzian components, similarities and differences between the spectra were evidenced. In addition, bands that presented changes in their integral intensity were identified. These bands are identified in Table 6 with their respective wave numbers and the molecular vibration attributed to them. From results presented in Figure 7 and Table 6, in two regions were considered for the analysis of the spectra: i) wave numbers $\geq 2500\text{ cm}^{-1}$ and ii) wave numbers $\leq 2000\text{ cm}^{-1}$.

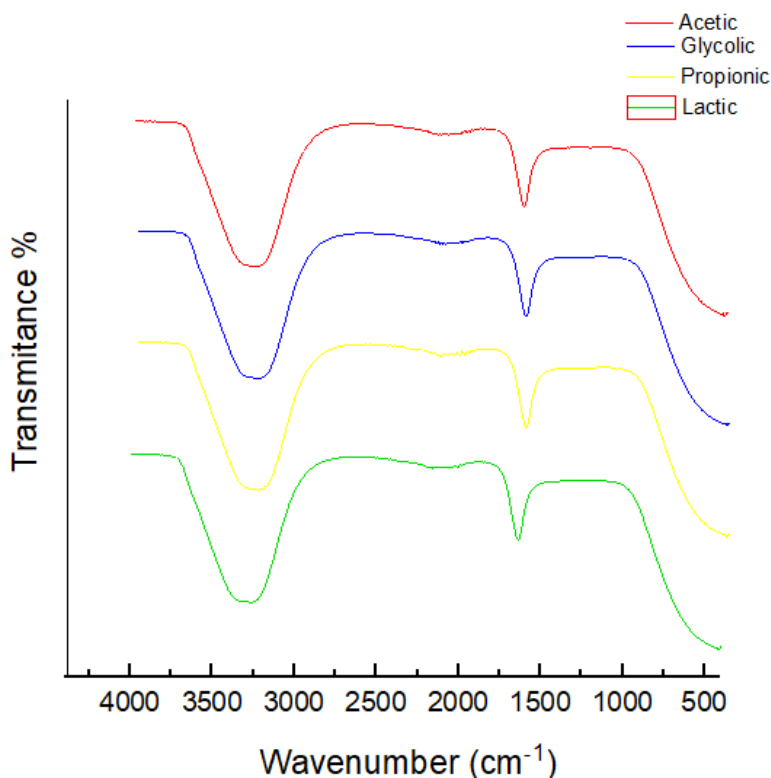


FIGURE 6-FT-IR spectra of chitosan dispersions in acidified aqueous systems

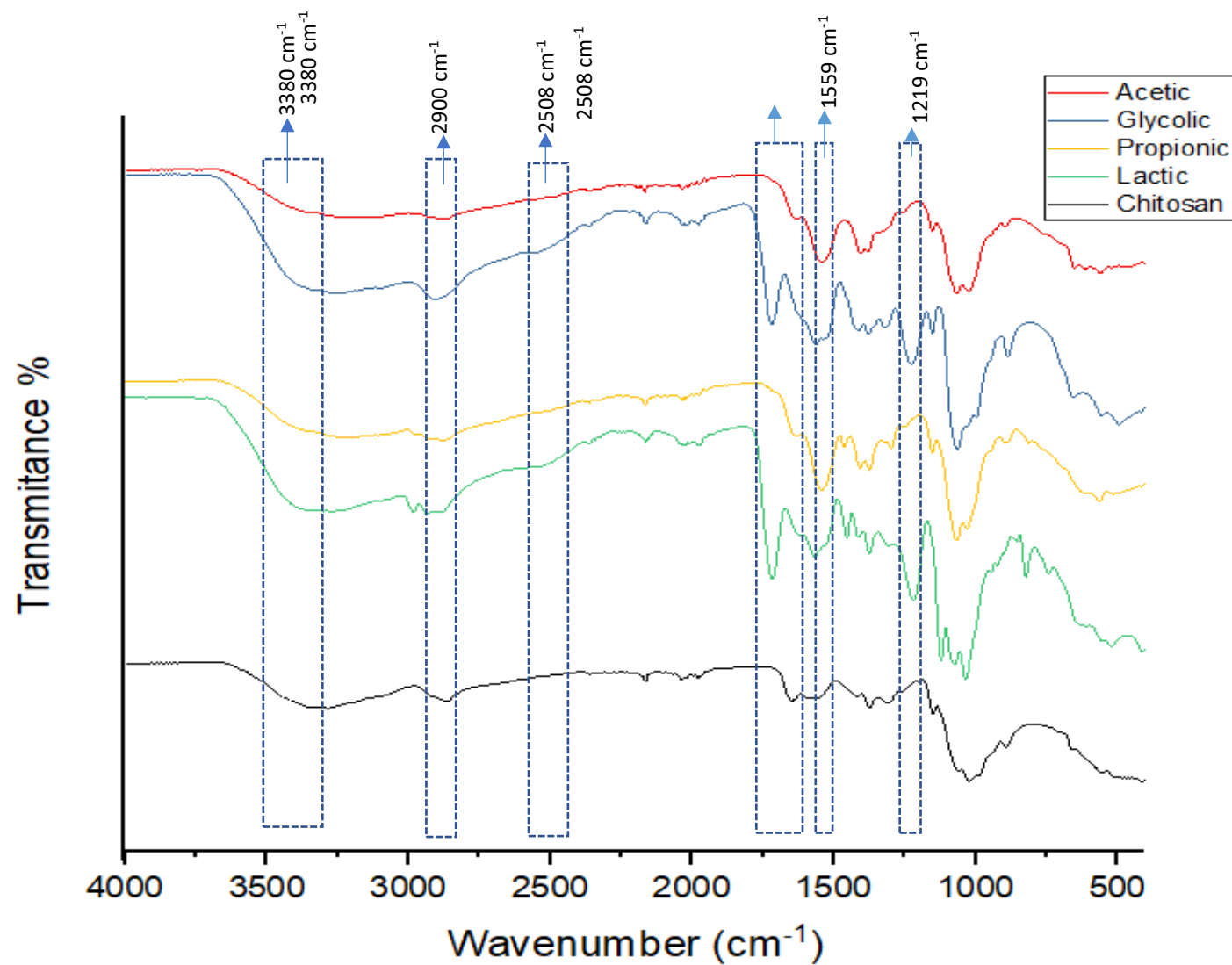


FIGURE 7-FT-IR spectra of lyophilized chitosan and lyophilized dispersions of chitosan in the different acids.

TABLE 6-Bands identified in chitosan spectra and lyophilized dispersions.

Wave number (cm ⁻¹)	Chemistry group
3380	ν OH (stretching)
2900	ν CH (assimetric stretching)
2508	ν NH ₃ ⁺ (simetric stretching)
1720	ν C=O of. Carbox. Acid. (simetric stretching)
1655	C=O of Amide (simetric stretching)
1559	ν COO ⁻ of carboxilate ion (simetric stretching)
1464	ν COO ⁻ of Íon carboxilato (simetric stretching)
1219	ν C-O (carbox. Acid)

BARBOSA, 2007; HIRANO, 1996; PAULA *et al.*, 2014

In the first one (wave numbers ≥ 2500 cm⁻¹), a discrete band appeared at 2508 cm⁻¹, in all treatments except for pure chitosan, indicating presence of protonated amino group NH₃⁺ (BARBOSA, 2007). This band was particularly attenuated in spectra obtained for systems containing acetic and propionic acids. The band at 2900 cm⁻¹ in propionic and lactic acids corresponds to the asymmetric stretch of C-H bond (HANUZA *et al.*, 2015), fact explained by the presence only of these bonds in the chains of these acids, in addition to C-C bonds. At 3300 cm⁻¹, the spectra obtained for systems containing α hydroxy acids (AHA; glycolic and lactic) exhibited bands more intense than the three other systems.. Indeed, this band is indicative of the axial deformation of the O-H bond (Hanuza *et al.*, 2015), which is present lactic and glycolic acids side chains. In the second region of the spectra (wave numbers ≤ 2000 cm⁻¹), bands at 1736 cm⁻¹, 1559 cm⁻¹ and 1219 cm⁻¹ were identified. The bands related to the C=O bond present in carboxylic acids (both COOH and COO-) were identified at 1736 cm⁻¹ and 1559 cm⁻¹ (DONG *et al.*, 2013). The band at 1736 cm⁻¹ is related to the COOH group, and appeared in spectra of lactic and glycolic acids systems, but was not visualized in spectra of the remaining systems. This occurred due to the displacement of this band to larger wave numbers, because in AHA the α -carbon is bound to an O, which is an electronegative element, increasing the dipole moment of this bond and thus promoting radiation absorption at larger (ν). In acetic and propionic acids, this band is analogous to that seen at 1559 cm⁻¹. As acetic and propionic acids do not possess a hydroxyl group bound to α -carbon, contrarily to the AHA, this same band moved to a smaller wave number (PAULA

et al., 2014). The bands at around 1559 cm^{-1} present in all spectra are related to amide groups of chitosan (acetylated monomers). Finally, the band corresponding to 1219 cm^{-1} , present only in the spectra of systems containing AHA, is related to the presence of the C-O bond stretching (PAULA *et al.*, 2014). It was inferred that the fact that this band is only seen in the AHA spectra is due to the presence of a non-ionizable H bound to O, assuming that all the acids used for the study were ionized, since the only ionizable H acetic and propionic acids were bound to O and in their spectra could not be visualized in the band corresponding to such binding.

The analysis of the intermolecular interactions of the present study was mainly focused on electrostatic attractions between the protonated chitosan amino groups and the negatively charged carboxyl of the acid counter-anions. Theoretically, the corresponding band would appear at 3300 cm^{-1} , which is also related to the vibration (ν) of the O-H bond (BARBOSA, 2007). As shown in Figure 7 and Table 6, the band at 3300 cm^{-1} for systems containing AHA. Such result can be attributed to the presence of O-H bonds in the molecules of these acids. However, as the experiment was carried out in freeze-dried samples, it was not possible to relate this intensity to the existence of type-specific interactions between chitosan and acid counter-ions and even less relate it to water interaction, since the systems were found in a condensed (lyophilized) phase. However, as demonstrated by the data, especially the band related to the NH_3^+ group (2508 cm^{-1}), it was possible to confirm the hypothesis that emerged with the titration experiments: acids such as glycolic and lactic acid are able to protonate more amino groups than the acetic and propionic acids.

4. DISCUSSION

As observed in the chitosan characterization experiments, their M_v (= 620 KDa) and DD% (= 77%) presented values slightly different from those reported by Amorim et al. (2016) and Soares et al. (2017), M_v = 540 KDa; DD = 85%. This difference can be attributed to the fact that, in the present study, chitosan washing removed the salts obtained from the industrial production of the biopolymer, as well as the chitooligosaccharides which are chitosan oligomers of up to 20 monomeric units having a mean molar mass <0.39 (KIM *et al.*, 2013). In addition, it has been reported in the literature that the lower the chitooligosaccharide chains, the higher the degree of deacetylation of these oligomers (KIM *et al.*, 2013) and water solubility (CHOI *et al.*, 2012). Thus it was expected that the DD% value would be lower and M_v higher when obtained for the chitosan washed. Kumar *et al.* (2005) found DD = 74% for washed chitosan, also using the FT-IR technique, corroborating the results found in the present study.

Data analysis of the dispersion kinetics assays (Table 3) for this chitosan with DD = 75% and M_v = 640 KDa in aqueous systems containing the studied acids showed that the mathematical model that presented an acceptable fit for $(100 \text{ mL})^{-1}$ of dispersed chitosan = $f(t)$, was from the first order with 2 terms which is in agreement with other studies in which the kinetics of dispersion of polysaccharides in aqueous media, (AMORIM; *et al.*, 2016; KRAVTCHENKO *et al.*, 1999; WU *et al.*, 2007). The suitability of this model to kinetic experimental data suggests that the dispersion of chitosan occurs mechanistically in two steps (I and II) as well as with tablets and capsules (AULTON; TAYLOR, 2017): I) Disintegration of the solid; II) Breakdown of chains.

In step I, when the chitosan is in contact with the aqueous medium containing acid occurs the disintegration of the particles of the solid. These particles are made up of innumerable chains of chitosan packed together. The most external and exposed chains in this solid (chitosan granule) begin to be protonated by the proton (H^+) of the already ionized acids in the medium, thus beginning to repel, because they present the same signal of surface electric charge (positive) and the solid fragments into progressively smaller parts (lumps). These lumps present gelatinous appearance due to the partial solvation of chitosan and the still existing contact between different strands forming the granule. The rate at which this occurs can be inferred in Table 3, as they are correlated to the K_a values. In stage II, at the end, the chains were finely distributed in the middle, and it can be understood as the disaggregation of the chains: the chains of the lumps are already accessible to the free

protons (H^+) in the solvent. Thus, with their gradual protonation and their consequent interrelation, dispersion of the biopolymer is terminated in the fluid medium. The rate at which this process occurs is related to the k_b values. It is important to note that the k_a values were in all cases higher than the k_b values, indicating that the disintegration process of the particles of the solid was faster than the disintegration of the chains. In addition, the values indicated by C_a also tended to be higher than those of C_b reinforcing this hypothesis that step I presents greater contribution in the speed of the chitosan dispersion process than step II in aqueous systems containing acetic, glycolic, propionic and lactic acids (10 to 50 mmol.L⁻¹).

Before discussing the conductivity and potentiometry data, it is valid to emphasize that acidified aqueous systems containing a fixed amount of chitosan must have pH values ≤ 4.5 , so that chitosan is completely protonated (ORION, 1984). As the systems using acetic and propionic acids ($pK_a \geq 4.7$) did not present pH lower than 4.5 (Figure 5), it can be inferred that even at the end of the titration the chitosan was still partially protonated and in turn capturing protons H^+ , so the acid still continued to be ionized when compared to systems of these same acids without chitosan. For all systems containing only water, in all tested acids (glycolic/lactic and acetic/propionic), the steady state was reached more rapidly, as can be seen in the $pH = f(C_{acid})$ graphs (Figure 5). This, justifies the substantially lower values observed for the electrical conductivities in the systems containing acetic and propionic acids, when compared to the systems that used the glycolic and lactic acids, both $pK_a \leq 3.85$. Figure 5 shows that the systems composed of chitosan and the weak acids (acetic and propionic) exhibited curves of electrical conductivity with values higher than the systems containing only water. This result was expected because chitosan-containing systems presented in theory a higher quantity of electrically charged species due to the contributions of the partially protonated chitosan poly-anion, the H^+ and the counterions whose equilibrium was displaced to the formation of them by the presence of chitosan. The fact that the protonation of chitosan is still ongoing in these systems explains the situation: the amount of species loaded in these systems is greater than in the corresponding systems without chitosan containing only water and the acids added progressively whose equilibrium is determined only by pK_a . The protonation of chitosan caused the displacement of the equilibrium towards the ionization of the acids forming more electrically charged species, as the NH_2 groups of chitosan captured the H^+ protons of the medium. Further evidence that the protonation of chitosan by the acetic and propionic acids was lower, or at least not as extensive as that observed for glycolic and lactic acids, was the presence of a band at 2508 cm^{-1} (NH_3^+) more expressive the glycolic and lactic acids (Figure 7). In the same way,

another fact that reinforced this inference is the fact that the values of conductivity = $f(c_{acid})$ for the systems with and without chitosan titrated with the acetic and propionic acids were shown to be smaller than those of the glycolic and lactic acids, which was justified by the observation that in all cases the pH of the chitosan systems was lower than the water-only systems, since chitosan captured the H⁺ protons (representing the pH value). Indicating that the lower the pKa of the acids the higher the protonation of chitosan.

In the case of chitosan-containing systems (Figure 5), it was observed that, despite the maximum values recorded for the systems containing the acetic and propionic acids (propionic = 1200 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ e acetic = 1560 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) were smaller than for systems containing glycolic and lactic acids, both = 1700 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, electrical conductivity curves for all acids in the concentration range, [40 to 50 mmol.L⁻¹], tend to approach an especially 0 to 1000 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, exhibiting substantially the same rate and growth or slope. This fact that was not observed for the electrical conductivities of the systems containing only water. In these systems the curves related to the glycolic and lactic acids obeyed a different tendency (inclination), presenting high growth rates (glycolic and lactic 1700 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) when compared to the conductivity curves observed for the weak acids, which presented a lower conductivity (inclination) rate (propionic = 800 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ and acetic = 1100 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$). These values diverge between the two groups of acids (glycolic/lactic and acetic/propionic), indicating that in these systems, containing only water, the only factor that altered the electrical conductivity were the pKa values of the acids, but in the systems containing chitosan, the presence of the polymer appeared to be able to approximate the inclinations of the conductivity curves of the different systems containing different acids. This can be justified by the hypothesis that the gradual uptake of the H⁺ protons from the acids to the protonation of the chitosan chains (pH of the chitosan-containing systems are higher than the pH of those without the biopolymer) would leave free counterions in the systems and contributed to the increase of electrical conductivities. This statement can be more easily understood when we take the electrical conductivities of chitosan-containing systems titrated by the acetic and propionic acids for comparison. The systems containing chitosan titrated with propionic acid have lower values of conductivity than for systems titrated with acetic acid. This was due to the fact that the counter ions released by propionic acid (propionate MM = 77.08) presented less electrical mobility than the (acetate MM = 59.05) (Nogueira, 2011), reinforcing the hypothesis of the few interactions of the counter-ion with the protonated chitosan chains. When conducting the same analysis for the electrical conductivity data of the systems containing chitosan titrated with the glycolic and lactic acids, it was possible to note that, in general, the both conductivities showed close values, however, higher than those recorded

for acetic and propionic acids and the values of pH were also much lower (final pH <4.0) than the pH of the acetic and propionic acids (final pH > 4.5). Knowing that chitosan is completely protonated at pH ≤ 4.5, it is possible to infer that the high maximum conductivities of the glycolic and lactic acids are the result of the additional effect of both counterions released by these acids and the H⁺ protons that are no longer captured by the chains of chitosan. In both cases (glycolic/lactic and acetic/propionic) acids studied, the pK_a values of the acids are more important for the protonation and consequent dispersion of the chitosan than the molecular structure of the acid or its counterion.

All this analysis leads us to the following point of view: that the acid concentrations were so low and the interactions between the counterions and the chitosan were so few that it was not possible to identify them in the FT-IR spectrum. Data related to FT-IR analysis did not exhibit prominent OH bands (3300 cm⁻¹) that justified such expected interactions between the acid counter ion and the amino group of chitosan (R-COO....NH₃⁺), in addition to the behavior observed for the electrical conductivities and pH, especially in the acetic and propionic acids in which the released H⁺ of chitosan, it was possible to infer that the counter ions contributed actively to increase the conductivity of the chitosan-containing systems, suggesting that these electrically charged species could be solvated by water, as well as the protonated or partially protonated chitosan, instead of interacting between itself in significant proportions to alter the dispersion of chitosan in these media. Thus, the hypothesis that the ions are mostly free in the aqueous medium is supported by the analysis of the data for conductivity, pH and FT-IR, it is very probable that these interactions have very low intensity, to have been identified in the spectroscopic analyzes. This hypothesis stems from the maximum dispersibility values of chitosan (Table 4), which were the same or very close for all acids. The hypothesis is further reinforced by the data of Figure 6, which shows that the amount of water in the aqueous systems was so abundant that the FT-IR spectra were completely overlapped by the OH bands, showing that by a kinetic question it is very probable that the water molecules interact and solvate the counter ions and the chitosan present in the medium before the counterions can interact with the amino group of the chitosan. Finally, another experimental evidence corroborating this hypothesis is the high and positive zeta potential values (Table 5), for chitosan dispersed in solution of these four acids (= + 57mV). Such a zeta potential value, found for chitosan dispersions in 10 mmol.L⁻¹ acid, indicated that the dispersion of small amounts of chitosan as seen in Table 3, kinetics [0.6 g (100 mL⁻¹)] in aqueous media containing very diluted monoprotic acids are little dependent on the influence of the counterions of these acids. Thus, even with the structural

and pk structures, the values studied here protonated a chitosan chain, thus satisfying the fundamental conditions for a dispersion of polymer in the aqueous medium.

5. CONCLUSIONS

The dispersibility of chitosan in aqueous media containing low concentrations of monoprotic acids with small variations in their chains did not appear to be influenced by the counterions of these acids. Since differences in the dispersibility of this polymer were not recorded to reinforce the contrary reason. The dispersion of chitosan in these same acids did not seem to depend on the complete protonation of their $\text{NH}_2 \rightarrow \text{NH}_3^+$ groups, a fact that could be verified by the FT-IR data and the values found for the experiments that measured pH for acids with final $\text{pH} > 4.5$. This statement indicates that the dispersion of chitosan in these acids depends only on the pK_a value of the acid and the medium pH meeting the necessary conditions to cause electrostatic repulsion between the polymer chains by protonation of some amino groups thus allowing the water to interact with these chains, solvating the previously inaccessible chains and thus dispersing the polymer. The suggested proposal for the process of chitosan dispersion in acidic aqueous media based on two stages (the first one being marked mainly by the protonation of the external or more accessible amino groups to the solvent, and the second characterized by access to the innermost chains of the solid) was supported by the interpretation of the mathematical model obtained and adjusted for the quantitative kinetic data, being the result of a chemical and mathematical formalism acceptable for its interpretation. The FT-IR technique proved to be efficient and fast to determine both the qualitative characteristics (typical bands) and the quantitative characteristics (DD%) of the polymer without the need for laborious preparation of the sample, however, to identify intermolecular interactions between chitosan, water, and the acids at the concentrations used, it did not appear to be the most suitable technique when used alone. Using simple techniques such as pH measurement and electrical and potential conductivity ζ it was possible to relate FT-IR data and to perform a satisfactory analysis of the interactions between acids and chitosan. The results obtained in this work will contribute to improve the understanding of fundamental aspects of the behavior of chitosan in acidic aqueous media and, as an alternative, could support the planning and development of food and pharmaceutical formulations using chitosan. As a prospect for elucidating the behavior of chitosan dispersed in other organic acids, its necessary to study chitosan dispersions in more concentrated acid solutions, avoiding the inconvenience of lyophilizing the samples and losing the possible interactions between the water and the Polymer which are fundamental to such study, besides the analysis of the behavior of chitosan dispersed in media containing mono-, di- and triprotic acids by hydrogen nuclear magnetic resonance (H-

NMR) in order to understand the behavior of different types of chains in the dispersion process and possible interactions with polyionic ions.

6. BIBLIOGRAPHY

ABDULKARIM, Abdulwadud *et al.* Extraction and Characterisation of Chitin and Chitosan from Mussel Shell. *Civil and Environmental Research*, v. 3, n. 2, p. 108–114, 2013. Disponível em: <<http://iiste.org/Journals/index.php/CER/article/view/4237>>.

AL-ASSAF, Saphwan; PHILLIPS, Glyn O; WILLIAMS, Peter A. Controlling the molecular structure of food hydrocolloids. *Food Hydrocolloids*, v. 20, n. 2, p. 369–377, 2006.

AMORIM, Matheus Lopes; *et al.* Physicochemical Aspects of Chitosan Dispersibility in Acidic Aqueous Media: Effects of the Food Acid Counter-Anion. *Food Biophysics*, 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11483-016-9453-4>>.

ANANDAN, R. *et al.* Antiaging effect of dietary chitosan supplementation on glutathione-dependent antioxidant system in young and aged rats. *Cell Stress and Chaperones*, v. 18, n. 1, p. 121–125, 2013.

ARBIA, Wassila *et al.* Chitin extraction from crustacean shells using biological methods-a review. *Food Technology and Biotechnology*, v. 51, n. 1, p. 12, 2013.

AULTON, Michael E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. Artmed, 2008.

AULTON, Michael E; TAYLOR, Kevin M G. *Aulton's Pharmaceuticals E-Book: The Design and Manufacture of Medicines.*: Elsevier Health Sciences, 2017.

BAJAJ, K L; KAUR, Gurdeep. Spectrophotometric determination of L-ascorbic acid in vegetables and fruits. *Analyst*, v. 106, n. 1258, p. 117–120, 1981.

BANO, Ijaz *et al.* International Journal of Biological Macromolecules Chitosan : A potential biopolymer for wound management. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.

102, p. 380–383, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.047>>.

BATISTUZZO, J A O; ITAYA, M; ETO, Y. Formulário Médico Farmacêutico, 2011. *Pharmabooks, São Paulo, ed*, v. 4, p. 131, [S.d.].

BEIL, Stephan *et al.* Determination of the degree of N-acetylation (DA) of chitin and chitosan in the presence of water by first derivative ATR FTIR spectroscopy. *Carbohydrate polymers*, v. 87, n. 1, p. 117–122, 2012b.

BHATTACHARJEE, Sourav. Review article DLS and zeta potential – What they are and what they are not ? *Journal of Controlled Release*, v. 235, p. 337–351, 2016.

BOONLERTNIRUN, Suchada; BOONRAUNG, Chaweewan; SUVANASARA, Raweewon. Application of chitosan in rice production. *Journal of metals, materials and minerals*, v. 18, n. 2, 2017.

BORGOGNONI, Camila Figueiredo; POLAKIEWICZ, Bronislaw; PITOMBO, Ronaldo Nogueira De Moraes. Estabilidade de emulsões de d-limoneno em quitosana modificada. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n. 3, p. 502–508, 2006.

BRUGNEROTTO, J *et al.* An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, v. 42, n. 8, p. 3569–3580, 2001.

BRUNTON, Laurence L; CHABNER, Bruce A; KNOLLMANN, Björn C. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman-12*. AMGH Editora, 2012.

CAMPANA-FILHO, Sergio P. *et al.* Extração, estrutura e propriedades de α e β -quitina. *Química Nova*, v. 30, n. 3, p. 644–650, 2007.

CANEVAROLO JR, Sebastião V. *Ciência dos polímeros*. Artiliber editora, São Paulo, 2002.

CHANG, Shun Hsien *et al.* pH Effects on solubility, zeta potential, and correlation between antibacterial activity and molecular weight of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, v. 134, p. 74–81, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.072>>.

CHAVEERACH, P *et al.* In vitro study on the effect of organic acids on *Campylobacter jejuni/coli* populations in mixtures of water and feed. *Poultry science*, v. 81, n. 5, p. 621–628, 2002.

COSMÉTICOS, Utilizados E M. Conservantes. *Cosméticos & Perfumes*, 2015. , p. 28–52. In:<http://www.insumos.com.br/cosmeticos_e_perfumes/artigos/conservantes_n_44.pdf>.

COSTA, Cristiane N. *et al.* Viscometric study of chitosan solutions in acetic acid/sodium acetate and acetic acid/sodium chloride. *Carbohydrate polymers*, v. 133, p. 245–250, 2015..

CROISIER, Florence; JÉRÔME, Christine. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, v. 49, n. 4, p. 780–792, 2013.

CZECHOWSKA-BISKUP, Renata *et al.* Determination of degree of deacetylation of chitosan- comparision of methods. *Prog. Chem. Appl. Chitin Deriv.*, v. 17, p. 5–20, 2012.

DASH, Mamoni *et al.* Statistical approach to the spectroscopic determination of the deacetylation degree of chitins and chitosans. *Carbohydrate Polymers*, v. 86, n. 1, p. 65–71, 2011.

DE ALMEIDA BARBOSA, Luiz Claudio. *Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos*. Ed. UFV, 2007.

DE SOUZA SOARES, Lucas *et al.* Rheological and Physicochemical Studies on Emulsions Formulated with Chitosan Previously Dispersed in Aqueous Solutions of Lactic Acid. *Food Biophysics*, v. 12, n. 1, p. 109–118, 2017.

DONG, Ki-young *et al.* Detection of a CO and NH₃ gas mixture using carbon nanotubes. p. 8–13, 2013.

FERNANDES, Lúcia Lopes. Produção e caracterização de membranas de quitosana e de quitosana com sulfato de condroitina para aplicações biomédicas. *Projeto de graduação*, 2009.

FOLEY, Patricia L. *et al.* A chitosan thermogel for delivery of ropivacaine in regional musculoskeletal anesthesia. *Biomaterials*, v. 34, n. 10, p. 2539–2546, 2013.

FREITAS, Ana Costa; FIGUEIREDO, Paulo. Conservação de alimentos. *Livro de apoio a disciplina Conservação de alimentos*. Lisboa, 2000.

GARCÍA, Mario A. *et al.* Effect of molecular weight reduction by gamma irradiation on chitosan film properties. *Materials Science and Engineering C*, v. 55, p. 174–180, 2015.

GOYCOOLEA, Francisco M; MILKOVA, Viktoria. Electrokinetic behavior of chitosan adsorbed on o/w nanoemulsion droplets. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2016.

HAJJI, Sawssen *et al.* Structural differences between chitin and chitosan extracted from three different marine sources. *International Journal of Biological Macromolecules*, p. 1–9, 2014.

HAMED, Imen; ÖZOGUL, Fatih; REGENSTEIN, Joe M. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 48, p. 40–50, 2016.

HANUZA, J; WANDAS, M; DYMIN, L. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy. v. 134, p. 114–120, 2015.

HIRANO, Shigehiro. Chitin Biotechnology Applications. *Biotechnology Annual Review*, v. 2, n. C, p. 237–258, 1996.

ILIUM, Lisbeth. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharmaceutical research*, v. 15, n. 9, p. 1326–1331, 1998.

JAWORSKA, Malgorzata M. Kinetics of enzymatic deacetylation of chitosan. *Cellulose*, v. 19, n. 2, p. 363–369, 2012.

JUNG, Jooyeoun; ZHAO, Yanyun. Characteristics of deacetylation and depolymerization of β -chitin from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) pens. *Carbohydrate research*, v. 346, n. 13, p. 1876–1884, 2011.

KASSAI, Mohammed R. Calculation of Mark--Houwink--Sakurada equation viscosimetric constants for chitosan in any solvent-temperature system using experimental reported viscosimetric constants data. *Carbohydr. Polym*, v. 68, p. 447–488, 2007.

KHADEMHOSEINI, Ali *et al.* Microscale technologies for tissue engineering and biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 103, n. 8, p. 2480–2487, 2006.

KHAN, Imran; ULLAH, Shafi; OH, Deog-Hwan. Chitosan grafted monomethyl fumaric acid as a potential food preservative. *Carbohydrate polymers*, v. 152, p. 87–96, 2016.

KIM, Jaehyun *et al.* LC – MS / MS analysis of chitooligosaccharides. *Carbohydrate Research*, v. 372, p. 23–29, 2013.

KIM, Se-Kwon. *Chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives: biological activities and applications*. [S.I.]: CRC Press, 2010.

KONG, Ming *et al.* Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International journal of food microbiology*, v. 144, n. 1, p. 51–63, 2010.

KRAVTCHENKO, T P *et al.* A novel method for determining the dissolution kinetics of hydrocolloid powders. v. 13, p. 219–225, 1999.

KUMAR, Majeti N V Ravi. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and functional polymers*, v. 46, n. 1, p. 1–27, 2000.

KURITA, Keisuke. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. v. 26, 2001.

LÜTJOHANN, Dieter *et al.* Influence of Chitosan Treatment in Obese Subjects on Surrogate Plasma Markers of Cholesterol Metabolism. 2018.

MAGHAMI, Ghobad G; ROBERTS, George A F. Evaluation of the viscometric constants for chitosan. *Macromolecular chemistry and physics*, v. 189, n. 1, p. 195–200, 1988.

MANUAL, Zetasizer Nano Series User. Malvern instruments Ltd. *Manual Version IM*, v. 100, p. 1–23, 2003.

MELLO, Ivana L. *et al.* Viscometric Study of high-cis polybutadiene in toluene solution. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 17, n. 1, p. 194–199, 2006.

NARDIN, Patricia; GUTERRES, Silvia Stanisçuaski. Alfa-hidroxi{á}cidos: Aplicações cosméticas e dermatológicas. *Caderno de farmácia. Porto Alegre, RS. Vol. 15, n. 1 (jan./dez. 1999), p. 7-14*, 1999.

NASCIMENTO, A P *et al.* Propriedades e Características da Quitosana Obtida a Partir do Exoesqueleto de Caranguejo-Uçá Utilizando Radiação de Microondas Development of New Method to Obtain Chitosan from the Exoskeleton of Crabs Using. v. 23, p. 630–635, 2013.

NIETO, Zoila *et al.* Rheological properties of aqueous dispersions of xanthan gum containing different chloride salts are impacted by both sizes and net electric charges of the cations. *Food Biophysics*, 2018.

NOMURA, Daniela A *et al.* Espalhamento Dinâmico de Luz. [S.d.].

OCHOA-VELASCO, Carlos Enrique; GUERRERO-BELTRÁN, José Ángel. Postharvest quality of peeled prickly pear fruit treated with acetic acid and chitosan. *Postharvest biology and technology*, v. 92, p. 139–145, 2014.

ORION, An. Polymer Bulletin 9. v. 190, p. 185–190, 1984.

PARK, Sung-Bin *et al.* Biopolymer-based functional composites for medical applications. *Progress in Polymer Science*, v. 68, p. 77–105, 2017.

PAULA, T Ana *et al.* T Preparação e Caracterização de Nanocompósitos Poliméricos Baseados em Quitosana e Argilo Minerais. v. 24, p. 628–635, 2014.

PAVIA, Donald L *et al.* Introduction to Spectroscopy. 2016.

PILLAI, C K S; PAUL, Willi; SHARMA, Chandra P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in polymer science*, v. 34, n. 7, p. 641–678, 2009.

RASO, Javier; BARBOSA-CÁNOVAS, Gustavo V. Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques. 2003.

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

REVATHI, Masilamani; SARAVANAN, Ramachandran; SHANMUGAM, Annaian. Production

and characterization of chitinase from *Vibrio* species, a head waste of shrimp *Metapenaeus dobsonii* (Miers, 1878) and chitin of *Sepiella inermis* Orbigny, 1848. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, v. 3, n. 4, p. 392–397, 2012.

RINAUDO, Marguerite. Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in polymer science*, v. 31, n. 7, p. 603–632, 2006.

ROBERT, M Enick; ERIC, J Beckman; OTHERS. Chitin Chemistry, The. 1992.

ROCHA, M Angélica M; COIMBRA, Manuel A; NUNES, Cláudia. Applications of chitosan and their derivatives in beverages: a critical review. *Current Opinion in Food Science*, v. 15, p. 61–69, 2017.

SANTOS, Franciele Nicole Dos; OTHERS. Preparação e estudo de filmes automontados de quitosana e carboximetilcelulose sobre substrato de poli (ácido láctico). 2013.

SANTOS, José E. Dos *et al.* Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. *Polímeros*, v. 13, n. 4, p. 242–249, 2003.

SHAHIDI, Fereidoon; ARACHCHI, Janak Kamil Vidana; JEON, You Jin. Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science and Technology*, v. 10, n. 2, p. 37–51, 1999.

SHAW, Duncan J. *Introdução à Química dos Colóides e de Superfícies*. E. Blücher, 1975a.

SILVA, Paula de A. S. Da; DUPIM, Mariana dos S.; CHAZIN, Eliza de L. Acetic Acid (CAS 64-19-7). *Revista Virtual de Química*, v. 7, n. 6, p. 2647–2662, 2015.

SINGH, J. *et al.* Preparation and properties of highly soluble chitosan-l-glutamic acid aerogel derivative. *Carbohydrate Polymers*, v. 76, n. 2, p. 188–195, 2009.

SINGH, Jay *et al.* Preparation and properties of highly soluble chitosan--l-glutamic acid aerogel derivative. *Carbohydrate Polymers*, v. 76, n. 2, p. 188–195, 2009.

SIVASHANKARI, P. R.; PRABAHARAN, M. Prospects of chitosan-based scaffolds for growth factor release in tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016a.

SIVASHANKARI, P R; PRABAHARAN, M. Deacetylation modification techniques of chitin and chitosan. *Chitosan Based Biomaterials Volume 1: Fundamentals*, p. 117, 2016b.

SNYDER, Carl H. *The extraordinary chemistry of ordinary things*. 1995.

STEPHEN, Alistar M.; PHILLIPS, Glyn O.; WILLIAMS, Peter A. *Food polysaccharides and their applications*. 2006.

TENG, Dayong. From chitin to chitosan. *Chitosan-based hydrogels: Functions and application*. [S.l.]: CRC Press Boca Raton, Florida, 2011. p. 2–33.

THADATHIL, Nidheesh; VELAPPAN, Suresh Puthanveetil. Recent developments in chitosanase research and its biotechnological applications: A review. *Food chemistry*, v. 150, p. 392–399, 2014.

THERON, Maria M; LUES, J F Rykers. *Organic acids and food preservation*. [S.l.]: CRC Press, 2010.

TRIPATHY, Satyajit *et al.* A novel chitosan based antimalarial drug delivery against Plasmodium berghei infection. *Acta Tropica*, v. 128, n. 3, p. 494–503, 2013.

TZANEVA, Desislava *et al.* Synthesis of Carboxymethyl Chitosan and its Rheological Behaviour in Pharmaceutical and Cosmetic Emulsions. v. 7, n. 10, p. 70–78, 2017.

VALENCIA-SULLCA, Cristina *et al.* Thermoplastic cassava starch-chitosan bilayer films containing essential oils. *Food Hydrocolloids*, v. 75, p. 107–115, 2018.

VAZ, J M *et al.* Antibacterial coatings based on chitosan for pharmaceutical and biomedical applications. *Current pharmaceutical design*, 2018.

VINSOVA, Jarmila; VAVRIKOVA, Eva. Chitosan derivatives with antimicrobial, antitumour and antioxidant activities-a review. *Current pharmaceutical design*, v. 17, n. 32, p. 3596–3607, 2011.

VITURAWONG, Yuvaret; ACHAYUTHAKAN, Piyada; SUPHANTHARIKA, Manop. Gelatinization and rheological properties of rice starch/xanthan mixtures: Effects of molecular weight of xanthan and different salts. *Food Chemistry*, v. 111, n. 1, p. 106–114, 2008.

WANG, Liyan *et al.* Preparation and characterization of active films based on chitosan incorporated tea polyphenols. *Food Hydrocolloids*, v. 32, n. 1, p. 35–41, 2013.

WINTEROWD, J G; SANDFORD, P A. Chitin and chitosan. *Food Science And Technology-New York-Marcel Dekker-*, p. 441, 1995.

WU, Yinglong *et al.* Original Article A novel method for measuring dissolution kinetics of pulverized konjac flour. v. 16, n. Suppl 1, p. 188–192, 2007.

XU, Wenhua *et al.* Chitooligosaccharides and N-acetyl-D-glucosamine stimulate peripheral blood mononuclear cell-mediated antitumor immune responses. *Molecular Medicine Reports*, v. 6, n. 2, p. 385–390, 2012.

YANG, Ran *et al.* A review on chitosan-based flocculants and their applications in water treatment. *Water research*, v. 95, p. 59–89, 2016.

YOUNES, Islem; RINAUDO, Marguerite. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine drugs*, v. 13, n. 3, p. 1133–1174, 2015.

ZENG, Defang; LUO, Xinrong; TU, Renjie. Application of bioactive coatings based on chitosan for soybean seed protection. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, v. 2012, 2012.

ZHU, Ke Xue *et al.* Functional properties of chitosan-xylose Maillard reaction products and their application to semi-dried noodle. *Carbohydrate Polymers*, v. 92, n. 2, p. 1972–1977, 2013.

SUPPLEMENTARY METERIAL

A. VISCOSIMETRIC EXPERIMENTS

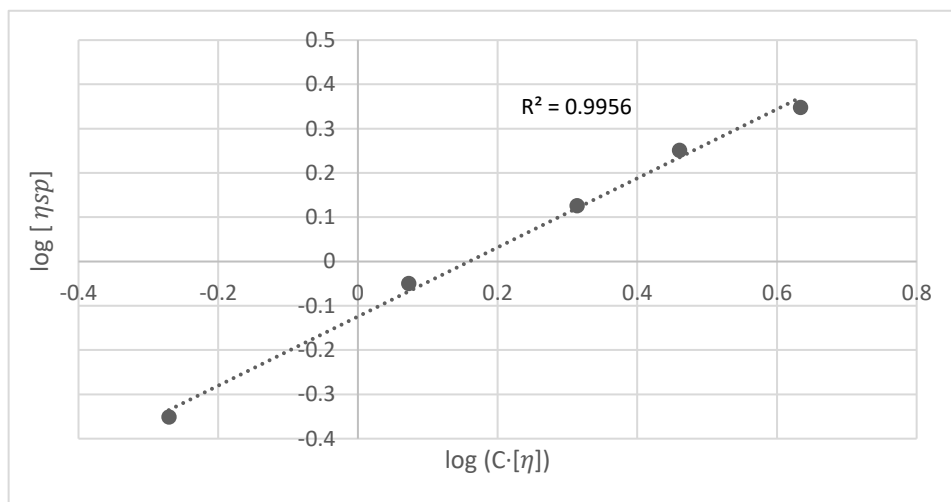


FIGURA 8-Linear regression adjusted to the experimental data confirming the newtonian behavior of the chitosan dispersions.

B. DEACETYLATION DEGREE (DD %)

In Table 7, the bands and their respective wave number values (ν) are listed in Figure 1, along with the types of vibrations to which they are associated.

TABLE 7-Wavenumber and chemical groups present in the chitosan spectrum

wavenumber (cm ⁻¹)	Chemical group
3570-3200 or 3450	OH ν bind NH ₂
2878	C-H ν (simetric)
1900-1500 or 1658	C=O ν Amide
1465 or 1423	OH and CH ₂ (scisor)
1340-1250 or 1379	C-N (terciary)
1321	C-N (primary)
1300-1000 or 897	C-O

(CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007; CZECHOWSKA-BISKUP *et al.*, 2012; DE ALMEIDA BARBOSA, 2007; DONG *et al.*, 2013; FERNANDES, 2009; HANUZA; WANDAS; DYMIN, 2015; PAULA *et al.*, 2014; SANTOS, FRANCIELE NICOLE DOS; OTHERS, 2013)

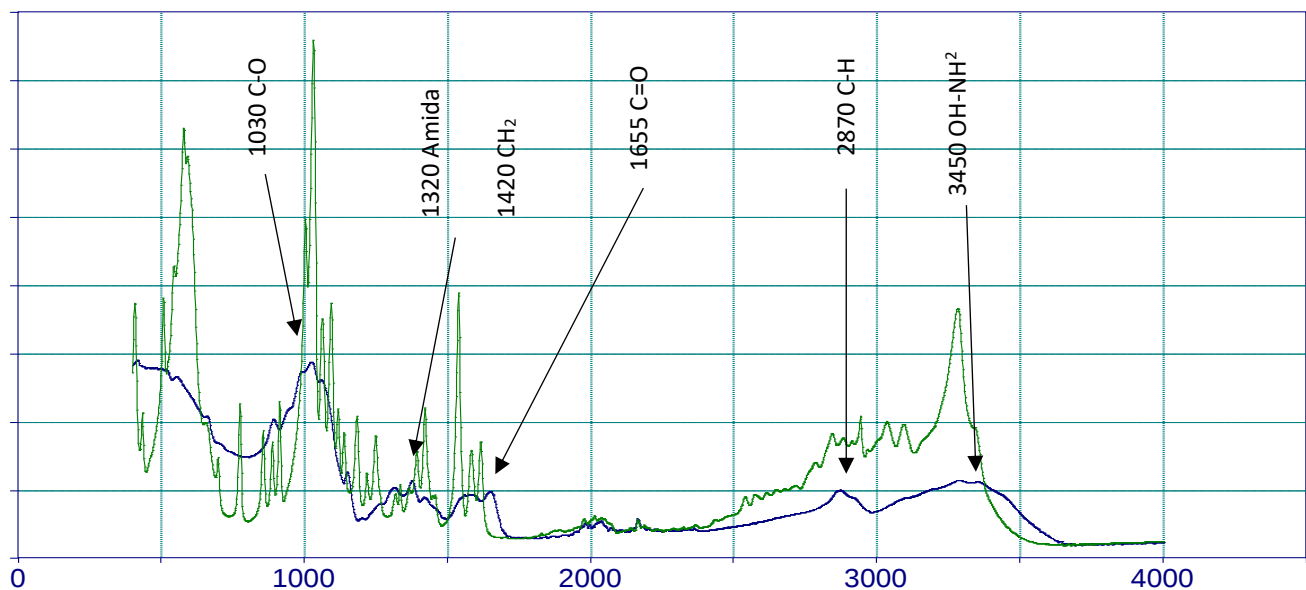


FIGURE 9-Comparison between the D-glucosamine (green) standard spectrum and the chitosan spectrum (blue) with emphasis on the bands used to determine its DD%.

C. DISPERSIONS EXPERIMENTS.

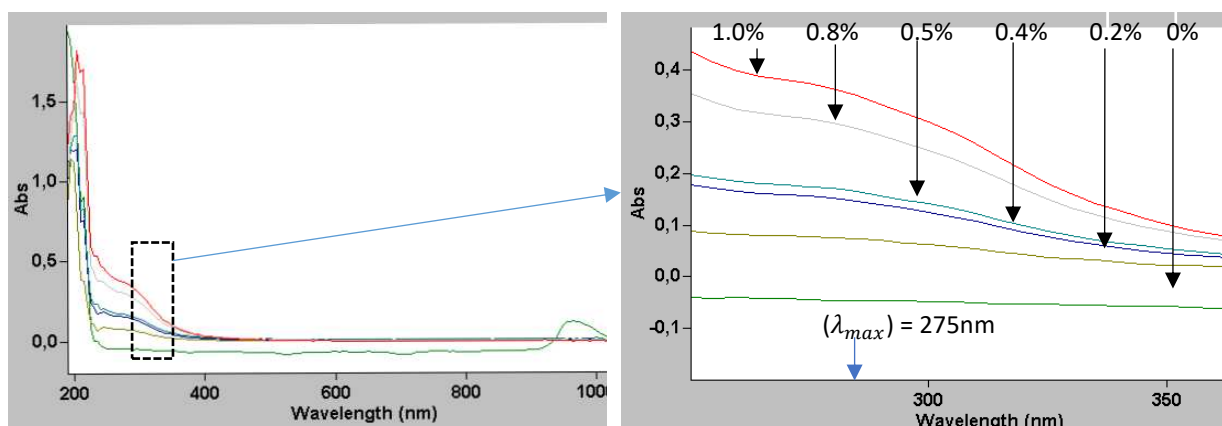


FIGURE 10-a) Scanning of absorbances of chitosan dispersions in different concentrations 0.2 - 1.0 g. (100 mL)⁻¹ in lactic acid at 50 mmol.L⁻¹ in the wavelength range between 190 and 1100 nm using as the baseline lactic acid [50 mmol.L⁻¹] (b) Magnification of (a) with emphasis on the Absorbance peak at 275 nm.

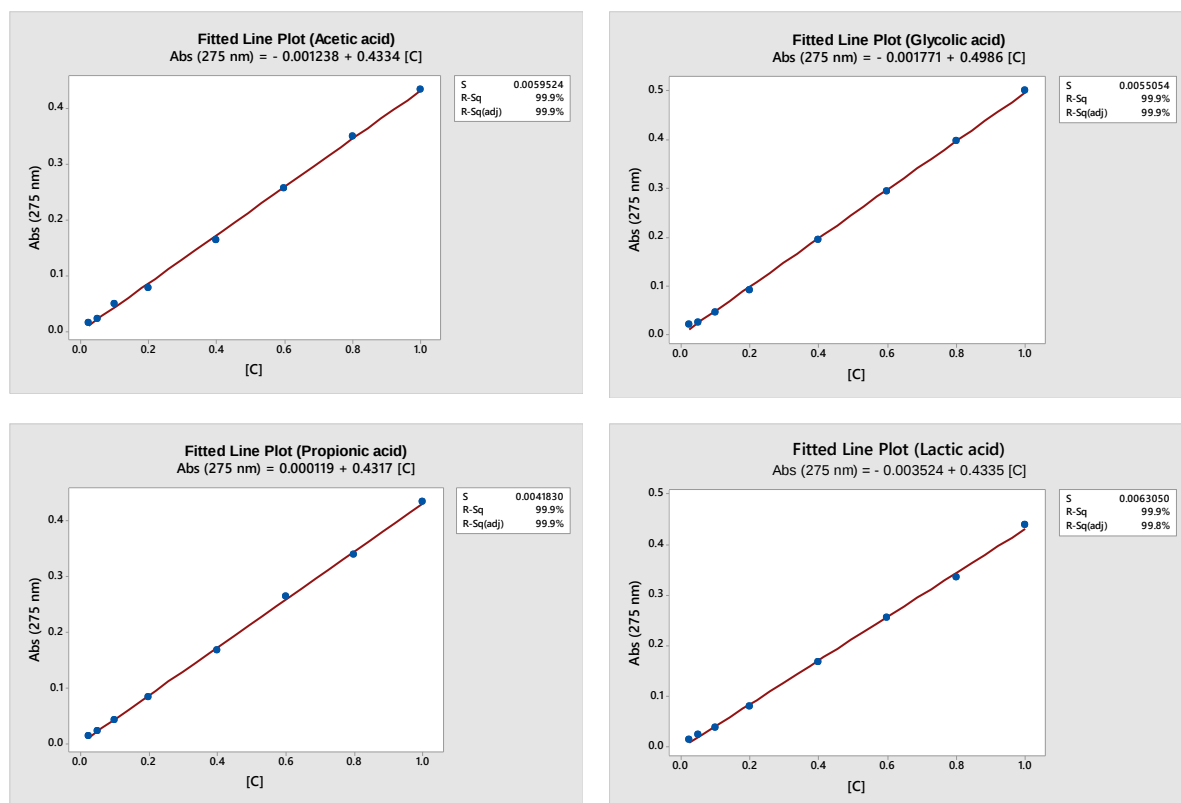


FIGURE 8- Analytical curves adjusted linearly to the data presenting regression equations for ABS 275 nm for dispersion of chitosan in each of the acids.

CONCLUSÃO GERAL

O presente estudo trouxe informações úteis no avanço e desenvolvimento de novos produtos utilizando dispersões de quitosano, de modo que as principais contribuições foram relacionadas com dados quantitativos para dispersibilidade máxima do quitosano em diferentes meios ácidos, a sugestão de um modelo de dispersão do quitosano, além de mostrar que o emprego de técnicas amplamente difundidas, fácil operacionalização e de relativo baixo custo podem contribuir com dados robustos para o progresso do estudo cinético e molecular deste biopolímero, permitindo assim começar a entender os tipos de interações que ocorrem entre este polímero e o meio no qual se encontra disperso. Dados quantitativos como potencial ζ , e dispersibilidade máxima servem para ampliar o acervo de informações sobre o quitosano, embasando novas aplicações deste biopolímero nas mais diversas áreas (ex: saúde, alimentos, agricultura). O fato de não terem sido observadas grandes ou nenhuma diferença, tanto do potencial ζ , quanto na dispersibilidade máxima do quitosano entre os sistemas, contendo a mesma concentração dos ácidos, nas condições testadas fornece, a quem se destina utilizar este biopolímero, uma justificativa científica e liberdade para escolher qual destes sistemas que melhor se adequa às suas necessidades. Os resultados de potencial ζ serviram para entender como os íons se comportam com relação ao quitosano, bem como para confirmar o uso deste biopolímero como agente estabilizante cinético em sistemas dispersos com aplicação nas indústrias alimentícias e farmacêutica.

O emprego de técnicas usuais, de fácil operacionalização e de relativo baixo custo, forneceram resultados consistentes abrindo precedentes para muitos grupos de pesquisas estudarem o quitosano, já que tais metodologias não demandam grandes adaptações nos laboratórios, além do fato deste polissacarídeo poder ser obtido pela própria equipe de pesquisadores, extraíndo-se o material a partir de exoesqueletos de crustáceos. Outro possível campo de estudo tendo o quitosano com tema é o desenvolvimento de métodos de obtenção deste polímero que sejam capazes de isolá-lo com características desejáveis como controle no GD e do tamanho das cadeias, por métodos cada vez mais baratos, sustentáveis, rápidos e eficientes, como por exemplo: por meio do uso de enzimas.

Outro importante resultados deste trabalho foi a sugestão, por meio de um modelo matemático ajustado aos dados de cinética, para a dispersão deste biopolímero nos meios ácidos testados, o qual pode servir de base para aplicações industriais e pesquisas que visem aprimorar/utilizar este modelo. Esta proposta desperta no pesquisador inquietação sobre o comportamento deste biopolímero em outros meios, tornando o estudo do quitosano ainda mais estimulante, abrindo precedentes para estudos cujo principal tema seja a sugestão e/ou aperfeiçoamento de modelos que expliquem o processo de dispersão deste biopolímero nos meios aquosos acidificados pelos mais diversos ácidos. Como perspectiva, surge a necessidade de se estudar o comportamento cinético e molecular do quitosano em meios aquosos contendo ácidos com diferentes graus de ionização (ácidos mono-, di- e triprótico), comparando com resultados e modelos apresentados, (apenas para ácidos monopróticos), por meio de técnicas aqui empregadas como medida de potencial zeta, titulações condutivimétricas e potenciométrica, FT-IR, associadas a outras técnicas que permitam determinar com maior grau de especificidade interações inter- e intramoleculares (RMN-H e C) e como essas interações interferem nos processo de dispersão do quitosano.

O estudo de dispersões de quitosano apresenta uma limitação que precisa ser tema de novos estudos que é a dificuldade para uniformizar o conteúdo disperso por meio da filtração, este processo se mostrou deveras laborioso, devido a elevada viscosidade dos sistemas e como uma possível fonte de erros, que pôde ser controlada no presente trabalho, por meio de filtrações sucessivas, metodologia adaptada de acordo como exposto na metodologia, entretanto são necessários estudos que tenham por objetivo tornar esta etapa mais rápida. Como sugestão para futuros estudos com dispersões de quitosano, trago a recomendação de limitar-se, inicialmente, a estudar dispersões mais diluídas deste polímero como por ex: Cmax - 0.5% (m/v).

Ao longo deste trabalho um gama de possibilidades de aplicação do quitosano se apresentou, destas uma se destacou, devido ao número de trabalhos que objetivam, por meio de reações químicas obter um quitosano solúvel, nestes trabalhos por vezes utilizou-se de métodos caros e laboriosos. Durante a execução

deste estudo notou-se que ao liofilizar as dispersões de quitosano nos sistemas acidificados, não importando tipo e concentração do ácido (entre os trabalhados), era possível ressuspender este material, sendo necessária apenas a reidratação, de modo que a quantidade de água utilizada era capaz de ajustar o pH do sistema. Essa observação pode constituir uma alternativa, quando as aplicações permitirem, às modificações moleculares que objetivam obter um quitosano solúvel. Essa observação pode ser o primeiro passo para o desenvolvimento de bases prontas com aplicações deste material principalmente na dermatologia e para alimentos desidratados.

O quitosano é um material versátil do ponto de vista técnico e biofuncinal e é também o único polissacárideo catiônico de origem animal. Estudar o seu comportamento em sistemas acidificados foi, igualmente, uma experiência única, desafiadora, estimulante e enriquecedora.