

MATHEUS LOPES AMORIM

**ASPECTOS CINÉTICOS E TERMODINÂMICOS DA DISPERSÃO DE
QUITOSANO EM MEIOS AQUOSOS CONTENDO ÁCIDO CÍTRICO OU
ÁCIDO LÁTICO**

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
2015

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

T

A524a
2015
Amorim, Matheus Lopes, 1990-
Aspectos cinéticos e termodinâmicos da dispersão de
quitosano em meios aquosos contendo ácido cítrico ou ácido
lático / Matheus Lopes Amorim. – Viçosa, MG, 2015.
xiii, 78f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Eduardo Basílio de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.64-72.

1. Tecnologia de alimentos. 2. Quitosana - Dispersão.
3. Ácido cítrico. 4. Ácido lático. 5. Calorimetria.
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

MATHEUS LOPES AMORIM


**ASPECTOS CINÉTICOS E TERMODINÂMICOS DA DISPERSÃO DE
QUITOSANO EM MEIOS AQUOSOS CONTENDO ÁCIDO CÍTRICO OU
ÁCIDO LÁTICO**

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: 24 de julho de 2015.




Afonso Mota Ramos
(Coorientador)



Luis Henrique Mendes da Silva
(Coorientador)



Deyse Gomes da Costa



Eduardo Basílio de Oliveira
(Orientador)

Aos meus pais, Adriane e José Maria

A minha noiva, Wanessa

Ao meu irmão, Felipe

Dedico!

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém
ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois o que seria de mim sem a fé que tenho n'Ele?

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), 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 ao projeto.

Ao professor Eduardo Basílio de Oliveira, por todos os ensinamentos e pelas orientações feitas durante a elaboração, condução dos experimentos e análise dos resultados do projeto. Pela confiança, apoio, dedicação, cuidado, e, sobretudo, por acreditar em mim como profissional.

Aos professores Afonso Mota Ramos, Álvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira, Jane Sélia Coimbra dos Reis e Luis Henrique Mendes da Silva pelo excelente convívio, pelos valiosos ensinamentos e pela preciosa colaboração como coorientadores desse trabalho.

Aos professores Éber Antônio Alves Medeiros (DTA), Cristiano Fantini Leite (UFMG), Luciano de Moura Guimarães (DPF), Nilda de Fátima Ferreira Soares (DTA) e Paulo César Stringheta (DTA). A gentil colaboração desses professores, que nos disponibilizaram os equipamentos alocados nos laboratórios por eles coordenados, foi imprescindível para a realização desse trabalho.

A professora Deyse Gomes da Costa, pela participação na banca de defesa.

Aos meus pais, José Maria de Sousa Amorim e Adriane Leal Lopes Amorim, por todo apoio, carinho e por sempre terem me incentivado a nunca parar de estudar.

A Minha noiva, Wanessa Aparecida dos Santos Soares, pelo carinho, amor e por sempre me apoiar e dar forças para superar todas as dificuldades, mesmo as mais difíceis.

Aos colegas do Laboratório de Operações e Processos, em especial ao José Antônio de Queiroz Lafetá Junior, Sabrina Késsia Gonçalves Pereira e Thaís Jordânia Silva, pela grande amizade, ótima convivência e pela essencial colaboração.

Aos colegas do DTA 2, Laura Fernandes de Melo Correia, Lucia Maria Santos Xavier, Lucas de Souza Soares, Maurício de Oliveira Leite e Thomas Valente de Oliveira, pelo carinho, atenção e amizade.

Às colegas do Laboratório de Engenharia de Processos, pela ótima amizade.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

MATHEUS LOPES AMORIM, filho de José Maria de Sousa Amorim e Adriane Leal Lopes Amorim, nasceu em Cataguases, Minas Gerais, em 13 de março de 1990.

Em março de 2008 iniciou a graduação em Engenharia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa, concluída em maio de 2013.

Em julho de 2013 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 julho de 2015.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE QUADROS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO – PROBLEMÁTICA CIENTÍFICA.....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO E REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Quitosano	4
2.1.1. <i>Estrutura molecular</i>	4
2.1.2. <i>Obtenção industrial</i>	5
2.1.3. <i>Propriedades físico-químicas e interesse tecnológico</i>	5
2.2. Dispersões de polissacarídeos em meios aquosos	10
2.3. Interações intermoleculares do quitosano em meios aquosos.....	15
2.4. Algumas técnicas analíticas aplicadas ao estudo do quitosano	23
2.4.1. <i>Viscosimetria – Determinação da massa molar média do quitosano</i>	23
2.4.2. <i>Calorimetria</i>	27
2.4.3. <i>Espalhamento de luz</i>	28
3. METODOLOGIA.....	34
3.1. Instalações	34
3.2. Material: equipamentos, reagentes e solventes	34
3.3. Caracterização preliminar do quitosano	36
3.3.1. <i>Estimativa do grau de desacetilação médio</i>	36
3.3.2. <i>Estimativa da massa molar média</i>	36
3.4. Dispersões de quitosano em meio aquoso com os ácidos orgânicos.....	37
3.4.1. <i>Quantificação do quitosano disperso</i>	37
3.4.2. <i>Cinética de dispersão do quitosano</i>	38
3.4.3. <i>Dispersibilidade máxima do quitosano</i>	38
3.5. Variação da entalpia de dispersão do quitosano em meio aquoso com os ácidos orgânicos.....	39
3.6. Condutividade elétrica e pH das dispersões de quitosano, em função da concentração de ácido adicionado	40
3.7. Potencial ζ das partículas de quitosano em meio aquoso com os ácidos orgânicos.....	40
3.8. Tratamento estatístico dos resultados.....	40
4. RESULTADOS	42
4.1. Caracterização preliminar do quitosano.....	42

4.1.1.	<i>Estimativa do grau de desacetilação médio</i>	42
4.1.2.	<i>Estimativa da massa molar média</i>	43
4.2.	Dispersões de quitosano em meio aquoso com os ácidos orgânicos	45
4.2.2.	<i>Cinética de dispersão do quitosano</i>	46
4.2.3.	<i>Dispersibilidade máxima do quitosano</i>	48
4.3.	Variação da entalpia de dispersão do quitosano em meio aquoso com os ácidos orgânicos	53
3.4.	Condutividade elétrica e pH das dispersões de quitosano, em função da concentração de ácido adicionado	56
3.5.	Potencial ζ das partículas de quitosano em meio aquoso com os ácidos orgânicos	58
5.	DISCUSSÃO	59
6.	CONCLUSÕES	63
7.	REFERÊNCIAS	64
	APÊNDICE A	73
	APÊNDICE B	74
	APÊNDICE C	75
	APÊNDICE D	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas moleculares (a) da celulose, (b) da quitina e (c) do quitosano.....	4
Figura 2 - Cinética de dispersão de pectina: (a) em um meio dispersante; (b) em um meio não-dispersante.....	13
Figura 3 - Gráfico das constantes da equação MHS: (a) Constante a em função de $DA/(pH \cdot \mu)$. (b) Constante K em função da constante a . Símbolos abertos representam resultados da literatura, linha representa a melhor equação ajustada e os símbolos fechados representam dados calculados pela equação ajustada.....	26
Figura 4 - Esquema interno de um microcalorímetro ITC.....	27
Figura 5 - Termograma de titulação típico apresentado pelo ITC, onde cada pico é referente às trocas de calor de uma injeção (a) e curva da variação da energia em função da razão molar dos ligantes, obtida a partir da integral dos picos do termograma (b).....	28
Figura 6 - Espectro Raman (A) e Infravermelho (B) de quitosano com DD = 70 % (a); DD = 75 % (b); DD = 80 % (c); DD = 85 % (d); DD = 90 % (e) e DD = 95 % (f).....	30
Figura 7 - Deconvolução dos contornos Raman de quitosano nas faixas de: 1500-1750 cm^{-1} (a) e 850-980 cm^{-1} (b) em componentes lorentziana.....	31
Figura 8 - Relação do grau de acetilação com a razão da intensidade integral das bandas à 1654/896 cm^{-1} , 1591/896 cm^{-1} e 936/896 cm^{-1} para o Raman (a) e 1654/896 cm^{-1} , 1591/896 cm^{-1} e 936/896 cm^{-1} para o infravermelho (b).....	32
Figura 9 - (a) Esquema de uma partícula carregada. (b) Esquema de uma cubeta para ELS, onde partículas carregadas se movimentam em função do campo elétrico aplicado no meio.....	33
Figura 10: Espectro Raman da amostra de quitosano.....	42
Figura 11 - Ajuste das equações de Huggins e de Kraemer aos dados experimentais.....	43
Figura 12 - Aferição do comportamento newtoniano das dispersões de quitosano utilizadas.....	44
Figura 13 - Varreduras de absorvância no UV-Vis das dispersões de quitosano em 100 mM de ácido cítrico. Varredura das concentrações 0,15; 0,25; 0,4 e 0,5 $\text{g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$ de quitosano (a) e varredura das concentrações 0,5 e 1,0 $\text{g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ de quitosano, utilizando ácido cítrico 100 mM como linha de base (b).....	45
Figura 14 - Construção das curvas analíticas para quantificação no ácido cítrico (a) e láctico (b).....	46
Figura 15 - Variação da concentração de quitosano disperso (C) em diferentes concentrações dos ácidos cítrico (a) e láctico (b), em função do tempo (t).....	47
Figura 16 - Dispersão de quitosano [$1 \text{ g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$] nos ácidos cítrico (A) e láctico (B), nas concentrações de 10 mM (a), 25 mM (b), 50 mM (c) e 100 mM (d).....	51

Figura 17 - Dispersão de quitosano [$3 \text{ g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$] em ácido cítrico (100 mM). (a) sistema obtido logo após agitação de 24 h, (b) após centrifugação e (c) após filtragem.....	52
Figura 18 - Dispersão de quitosano [$3 \text{ g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$] em ácido láctico (100 mM).	52
Figura 19 - Dispersibilidade máxima do quitosano em função da concentração dos ácidos cítrico (a) e láctico (b).	53
Figura 20 - Fluxo de calor após cada injeção de solução de ácido cítrico (a) e láctico (b) em suspensão de quitosano $1 \text{ g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$	54
Figura 21 - Variação de entalpia em função da concentração de ácido adicionado em suspensão de quitosano [$1 \text{ g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$]. Em (a) para os ácidos cítrico e láctico e em (b) somente para o ácido cítrico, com concentração na injeção de 0,18 M.....	55
Figura 22 - Condutividade elétrica (símbolos cheios) e pH (símbolos vazios) de sistemas contendo água + quitosano, ou apenas água, em função da concentração dos ácidos cítrico (a) ou láctico (b) progressivamente adicionados.....	57
Figura 23 - Potencial ζ das dispersões de quitosano nos ácidos cítrico (a) e láctico (b). Cada replicata é representada por uma cor diferente.....	58

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Exemplos de estudos recentes evidenciando a aplicabilidade do quitosano na área médico-farmacêutica.....	8
Quadro 2 - Exemplos de estudos recentes evidenciando a aplicabilidade do quitosano na área alimentícia.....	9
Quadro 3 - Ajuste para a cinética de dispersão de amostras de pectina em meios dispersante e não-dispersante.....	14
Quadro 4 - Exemplos de estudos de interações intermoleculares entre quitosano e outros compostos de interesse científico ou tecnológico.....	17
Quadro 5 - Equipamentos utilizados no presente projeto.....	34
Quadro 6 - Material utilizado na execução do projeto.....	35
Quadro 7 - Tempo de escoamento em viscosímetro e viscosidade específica calculada das dispersões de quitosano em tampão acetato.....	43
Quadro 8 - Modelos matemáticos ajustados dos dados de $C = f(t)$, sendo C a concentração de quitosano disperso, em $\text{g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$ e t o tempo, em minutos.....	49
Quadro 9 - Dispersibilidade máxima do quitosano em diferentes concentrações dos ácidos cítrico e láctico.....	50

RESUMO

AMORIM, Matheus Lopes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Aspectos cinéticos e termodinâmicos da dispersão de quitosano em meios aquosos contendo ácido cítrico ou ácido láctico.** Orientador: Eduardo Basílio de Oliveira. Coorientadores: Álvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira, Afonso Mota Ramos, Jane Sélia Coimbra dos Reis e Luis Henrique Mendes da Silva.

No presente trabalho, objetivou-se estudar a cinética de dispersão, a dispersibilidade máxima e a variação de entalpia de soluções aquosas ácidas (ácidos cítrico ou láctico) contendo quitosano. Para isso, adicionou-se $1 \text{ g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$ de quitosano às soluções aquosas de diferentes concentrações dos ácidos cítrico ou láctico (25 mM, 50 mM e 100 mM, para a cinética, e 10 mM, 25 mM, 50 mM e 100 mM, para a dispersibilidade máxima). Nos experimentos de cinética de dispersão, as dispersões de quitosano foram deixadas sob agitação por hélice (270 rpm), em temperatura controlada de $25 \text{ }^\circ\text{C}$, por 8 horas, no qual foram retiradas 14 alíquotas, em tempos determinados, para quantificação do quitosano. Foi testado o ajuste de três modelos matemáticos diferentes aos dados obtidos, sendo o modelo $C = C_A(1 - \exp(-k_A \cdot t)) + C_B(1 - \exp(-k_B \cdot t))$ aquele que melhor se ajustou em todos os casos. Nas análises de dispersibilidade máxima, observou-se que, para todas as concentrações de ácido testadas, o quitosano apresentou maior dispersibilidade no ácido láctico do que no cítrico. No estudo da variação de entalpia das dispersões de quitosano, em função da variação da concentração de ácido, observou-se que, para a adição de ácido cítrico, a variação de entalpia (ΔH) foi exotérmica ($\approx -120 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) até a concentração de $\approx 17 \text{ mM}$ do ácido, sendo ligeiramente endotérmico ($\approx 2,5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) entre $\approx 17 \text{ mM}$ e 75 mM , a partir do qual $\Delta H \approx 0$. Para o ácido láctico, o ΔH foi de $\approx -40 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, entre as concentrações de 0 mM e 52 mM . Após essa concentração, praticamente não houve mais trocas de calor perceptível ($\Delta H \approx 0$). Adicionalmente, avaliou-se a condutividade elétrica dos sistemas contendo água ou água + quitosano [$1 \text{ g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$], em função da concentração de ácido adicionado (cítrico ou láctico). Observou-se que, para o ácido cítrico, a condutividade elétrica mantinha-se praticamente constante até concentração ácida de $\approx 15,7 \text{ mM}$, enquanto que, no ácido láctico, a condutividade praticamente não se alterou entre os sistemas com ou sem quitosano. Desses resultados, levantou-se a hipótese de que os íons citrato, liberados pelo ácido cítrico, aderem à dupla camada elétrica das partículas de quitosano, reduzindo as repulsões eletrostáticas entre elas, o que explicaria os resultados obtidos. A fim de testar a hipótese levantada, avaliou-se o potencial ζ das partículas de quitosano nas soluções dos ácidos cítrico ou láctico (10 mM). Dessa forma, observou-se que os valores de potencial ζ foram de $\approx +28,5 \text{ mV}$ e de $\approx +52,1 \text{ mV}$, para os ácidos cítrico e láctico, respectivamente. Dessa forma, comprovou-se que os íons citrato aderem às partículas de quitosano, reduzindo sua dispersibilidade.

ABSTRACT

AMORIM, Matheus Lopes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2015. **Kinetic and thermodynamic aspects of chitosan dispersion in aqueous media containing citric acid or lactic acid.** Adviser: Eduardo Basílio de Oliveira. Co-advisers: Álvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira, Afonso Mota Ramos, Jane Sélia Coimbra dos Reis and Luis Henrique Mendes da Silva.

The aim of this work was to study the dispersion kinetics, the maximum dispersibility and the enthalpy change of acid aqueous solutions (citric or lactic acid) containing chitosan. For this purpose, it was added chitosan [$1 \text{ g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$] to aqueous solutions of different concentrations of lactic or citric acid (25 mM, 50 mM and 100 mM for dispersion kinetics, and 10 mM, 25 mM, 50 mM and 100 mM for maximum dispersibility). In the dispersion kinetic experiments, the chitosan dispersions were left stirring for propeller (270 rpm) at controlled temperature of 25 °C for 8 hours, at which 14 aliquots were removed at certain times, to quantify the chitosan. Three different mathematical models were fitted to the data obtained, and the model $C = C_A(1 - \exp(-k_A \cdot t)) + C_B(1 - \exp(-k_B \cdot t))$, was the best fit in all cases. In the analyzes of maximal dispersibility, it was observed that for all acid concentrations tested, chitosan showed a higher dispersibility in lactic than citric acid. In the study of the enthalpy variation of chitosan dispersions due to the variation of the acid concentration, it was observed that for the addition of citric acid, the change of enthalpy (ΔH) was exothermic ($\approx -120 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) until the acid concentration $\approx 17 \text{ mM}$. It was slightly endothermic ($\approx 2,5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) up to a concentration of 75 mM, when $\Delta H \approx 0$. For lactic acid, the ΔH was $\approx -40 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ between concentrations of 0 mM and 52 mM. After that, there were no more heat exchanges ($\Delta H \approx 0$). In addition, we evaluated the electrical conductivity of systems containing water or water + chitosan [$1 \text{ g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$], depending of the concentration of added acid (citric acid or lactic acid). It was observed that, for the citric acid, the conductivity remained virtually constant until the acid concentration $\approx 15,7 \text{ mM}$, whereas the lactic acid, the conductivity hardly changed between systems with and without chitosan. From these results, we raised the hypothesis that the citrate ions, released by citric acid, adhere to the electrical double layer of particles of chitosan, reducing the electrostatic repulsion between them, which would explain the lower maximum dispersibility and the constancy of initial conductivity to citric acid. To test this hypothesis, we evaluated the ζ potential of the particles of chitosan in solutions of citric or lactic acids (10 mM). Thus, it was observed that the ζ potential values were $\approx +28.5 \text{ mV}$ and $\approx +52.1 \text{ mV}$ to citric and lactic acids, respectively. Therefore, it was found that the citrate ions adhere to particles of chitosan, reducing its dispersibility.

1. INTRODUÇÃO – PROBLEMÁTICA CIENTÍFICA

O quitosano é um importante biopolímero derivado de subprodutos da indústria alimentícia, o qual encontra hoje uma grande gama de aplicações biotecnológicas, tais como excipiente para liberação controlada de substâncias bioativas, material para a fabricação de próteses ósseas e dérmicas, suporte para a imobilização de enzimas e a fabricação de filmes antimicrobianos e antioxidantes.

Pode ser encontrado na parede celular de alguns fungos Zigomicetos, mas industrialmente, é obtido por meio da reação de desacetilação da quitina, polissacarídeo de alta massa molar extraído de resíduos de carapaças de artrópodes processados pela indústria pesqueira, como camarões, lagostas e caranguejos. Só no ano de 2012 foram produzidos ≈ 13 milhões de toneladas de crustáceos no mundo entre aquicultura e capturados, gerando ≈ 9 milhões de toneladas de resíduos. No mesmo ano, o Brasil produziu ≈ 70 mil toneladas de crustáceos por aquicultura, o que gerou ≈ 49 mil toneladas de resíduos (FAO, 2015; FAO, 2014). Esses números demonstram a relativa facilidade de obtenção de quitosano em abundância.

Grande atenção é dada pela comunidade científica e pela indústria biotecnológica ao quitosano devido a, entre outras propriedades, seu efeito hipolipidêmico. No intestino, o quitosano interage com os sais e ácidos biliares, precipitando e formando agregados com ácidos graxos, triglicérides, colesterol e quaisquer outras espécies químicas ali presentes e passíveis de interagir com esses compostos. Dessa forma, uma parte considerável desses lipídios adsorvidos é excretada sem ser metabolizada. Em razão dessas propriedades fisiológicas, uma variedade de produtos “nutracêuticos” (quitosano em cápsulas) existe hoje no mercado [Chitosan[®] (Tiaraju); Quitosana 500[®] (Sterm Pharma); Quitosana[®] (Probiótica)], com alegações que vão desde “reductor dos níveis de colesterol no sangue” até “emagrecedor”. Apesar disso, a incorporação direta de quitosano em produtos alimentícios ácidos é difícil e ainda não é usual. Em alimentos, esse biopolímero poderia ter dois papéis simultâneos: o primeiro seria técnico-funcional, como agente espessante/estabilizante em substituição a outros polissacarídeos utilizados com esse fim (gomas xantana e guar etc.); o segundo seria um papel biofuncional, devido a sua capacidade de restringir a biodisponibilidade de lipídios no trato gastrointestinal.

Contudo, para que as propriedades funcionais do quitosano sejam exploradas em formulações alimentícias, primeiramente ele deve ser disperso no meio em que se deseja aplicá-lo. Apesar de insolúvel em água, os grupos amino existentes na estrutura molecular do quitosano lhe permitem adquirir carga positiva em meios aquosos ácidos ($RNH_2 + H^+ \rightleftharpoons RNH_3^+$), e, assim, se dispersar. Diferentes fatores intrínsecos e extrínsecos

afetam o equilíbrio dispersão/agregação do quitosano como, por exemplo, seu grau de desacetilação (% médio de grupos amina não acetilados), sua granulometria (distribuição de tamanhos iniciais das partículas sólidas), pH, temperatura e força iônica do meio, etc. A maioria desses fatores foi considerada em estudos; entretanto, de acordo com nossa análise da literatura da área até então, alguns fatores que influenciam a dispersibilidade do quitosano em meios aquosos ainda carecem de estudos específicos, como, por exemplo, o papel do tipo de ácido utilizado.

Em estudos exploratórios preliminares conduzidos por nossa equipe, observou-se haver uma grande diferença, tanto na concentração máxima de quitosano dispersível quanto nas características reológicas dessas dispersões aquosas, segundo se utiliza ácido láctico ou cítrico. Com o primeiro, o quitosano se dispersou em concentrações até 3 % m/V, após algumas horas sob agitação por hélice, mesmo em baixas concentrações desse ácido (1 % m/V). Já com o último, também a 1 % m/V, o quitosano não apresentou dispersibilidade detectável por métodos gravimétricos. (AMORIM, 2012). Isso nos sugeriu que não basta haver protonação dos grupos amina para que o quitosano se torne dispersível em meio aquoso; deve haver alguma contribuição específica do contra-íon do ácido empregado.

Esses resultados foram, todavia, empíricos e qualitativos. Para melhor compreender os fatores físico-químicos e moleculares que levam a essas diferenças, são necessários estudos cinéticos e análises instrumentais mais elaboradas do quitosano em soluções aquosas desses ácidos. Essa abordagem mais rigorosa é indispensável para determinar se um dado meio que dispersa o quitosano mais rápido seria também, necessariamente, um meio capaz de dispersar concentrações mais elevadas desse polissacarídeo, além de trazer uma melhor compreensão dos aspectos moleculares da dispersão do quitosano em meios aquosos.

Diante disso, o objetivo deste projeto de pesquisa foi tentar compreender como os dois ácidos orgânicos alimentares supracitados afetam de forma diferente a dispersão do quitosano em meio aquoso. Em específico, propôs-se avaliar a cinética de dispersão, a dispersibilidade máxima e o potencial ζ desse polissacarídeo em soluções aquosas dos ácidos cítrico e láctico. Além disso, foram avaliadas as variações de entalpia, de condutividade elétrica e de pH de dispersões de quitosano, em função da concentração desses ácidos no meio.

Espera-se, com esse conjunto de resultados, contribuir para melhorar a compreensão científica dos fenômenos envolvidos na incorporação do quitosano em meios aquosos ácidos, o que inclusive poderá possibilitar *a posteriori* novas aplicações tecnológicas.

Esse manuscrito está organizado da seguinte forma: i) um capítulo em que se apresenta um panorama da literatura sobre o quitosano, suas aplicações, sua dispersibilidade

em meios ácidos e suas interações intermoleculares com diferentes compostos, além de uma descrição das técnicas experimentais utilizadas no presente estudo; ii) um capítulo descrevendo os materiais e a metodologia experimental de cada análise executada; iii) um capítulo em que os resultados são apresentados de maneira descritiva; iv) um capítulo em que propusemos uma discussão dos resultados apresentados; v) por fim, as conclusões que obtivemos após a realização desse estudo.

2. REFERENCIAL TEÓRICO E REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Quitosano

2.1.1. Estrutura molecular

Quitosano é o nome usual do polissacarídeo poli- β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-deóxi-D-glicopirranose (Figura 1).

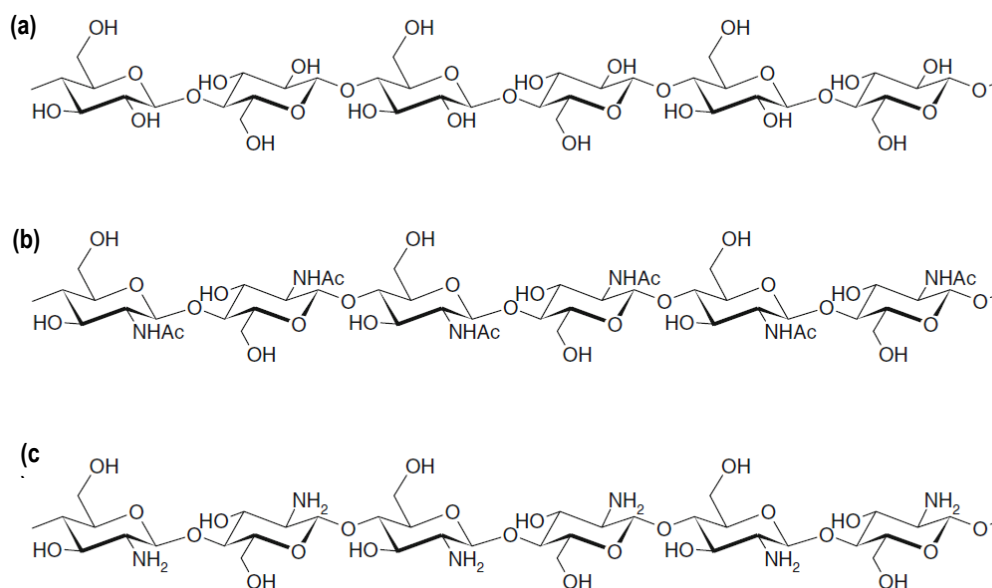


Figura 1 - Estruturas moleculares (a) da celulose, (b) da quitina e (c) do quitosano.

Fonte: Honarkar e Barikani (2009).

À temperatura e à pressão ambientes, apresenta-se sob a forma de pós ou flocos de granulometria variável, esbranquiçado, opaco, pouco denso e inodoro (SAHOO et al., 2009). É naturalmente encontrado nas paredes celulares de fungos Zigomicetos, de onde pode ser obtido com um considerável grau de pureza (FERREIRA et al., 2013). Contudo, para a obtenção desse polissacarídeo em quantidades mais expressivas (seja para estudos científicos ou para aplicações tecnológicas), o quitosano é industrialmente produzido por meio da reação de desacetilação, em meio alcalino, da quitina [poli- β (1 \rightarrow 4)-2-acetamida-2-deóxi-D-glicopirranose]. Esta última é um polissacarídeo de alta massa molar presente no exoesqueleto de artrópodes, sendo, pois, abundantemente encontrada em resíduos de carapaças de animais processados pela indústria pesqueira, como camarões, lagostas e caranguejos (FAI et al., 2011; AMORIM et al., 2005).

É válido notar que a cadeia polimérica da quitina (Figura 1b) é análoga à da celulose (Figura 1a), apenas substituindo-se os grupos hidroxil (-OH) ligados ao carbono C2 de cada

monômero por grupos acetamido (-NH-COOH). No quitosano (Figura 1c), esses grupos acetamido são em sua maioria desacetilados, tendo sido convertidos em grupo amina (-NH₂).

2.1.2. Obtenção industrial

Na obtenção industrial de quitosano, as carapaças de crustáceos são primeiro tratadas com uma solução alcalina diluída (geralmente NaOH 1-10 %) sob temperaturas entre 65 °C e 100 °C para a solubilização e remoção de proteínas. Em seguida, é feito um tratamento com solução ácida (geralmente HCl), em temperatura ambiente, para a desmineralização das carapaças. O próximo passo é a descoloração, utilizando normalmente H₂O₂ (0,5-3 %) ou NaClO (0,32 %), obtendo assim a quitina. Por fim, é feito o processo de desacetilação com solução alcalina (normalmente NaOH 40 %) (GOYCOOLEA et al., 2000). Após a desacetilação da quitina, uma grande parte dos grupos acetamido (-NHCOCH₃) da quitina são convertidos em grupos amina (-NH₂) dando efetivamente origem ao quitosano (HONARKAR e BARIKANI, 2009).

O percentual médio de grupos acetamido removidos nas cadeias do polímero é denominado “grau de desacetilação” (DD, pelo seu acrônimo inglês *degree of deacetylation*). Geralmente, considera-se que a quitina foi convertida em quitosano quando se obtêm pelo menos 50% de grupos acetamido de quitina desacetilados (ou seja, convertidos em grupos amina). Quitosanos de grau analítico disponíveis para comercialização têm grau de desacetilação entre 75 % e 90 % (SIGMA ALDRICH, 2015).

2.1.3. Propriedades físico-químicas e interesse tecnológico

O quitosano não é solúvel em água pura, mas apresenta dispersibilidade em soluções ácidas (pH < 6,5), o que não ocorre com a quitina, seu polímero precursor. Essa diferença pode ser explicada em linhas gerais pelo fato de que, em meio ácido, os grupos amina podem ser protonados e tornar-se positivamente carregados (Eq. 1), favorecendo assim a repulsão eletrostática entre as cadeias do polímero.



Isso não ocorre com os grupos acetamido da quitina. Por isso, além da massa molar média, o grau de desacetilação do quitosano é um dos fatores estruturais mais decisivos em muitas de suas propriedades físico-químicas (dispersibilidade, viscosidade da dispersão resultante, etc.) e técnico-funcionais (propriedades filmogênicas, espessantes etc.) (LIU et al., 2013).

Mesmo quando se encontra disperso em baixas concentrações, o quitosano apresenta propriedades espessantes em meios aquosos. Damian et al. (2005) relataram que dispersões de quitosano em ácido acético $1 \text{ g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$ apresentaram viscosidades variando entre 0,25 e 2,50 Pa·s, variando em função da massa molar média e do DA do quitosano utilizado nos ensaios. Além desses fatores (intrínsecos ao quitosano), a viscosidade de dispersões de quitosano poderá ser influenciada pela concentração do polímero e propriedades do meio, como a força iônica, pH e temperatura (KASAAI, 2007).

Em um recente *paper* de revisão sobre propriedades e aplicações do quitosano, Balan e Verestiuc (2014) enfatizaram características importantes desse biopolímero, como sua biodegradabilidade, atoxicidade e biocompatibilidade com tecidos humanos e animais. Essas características têm possibilitado a aplicação do quitosano em áreas bastante diversificadas, como biotecnologia, medicina, farmácia e alimentos/nutrição.

Um notável exemplo disso é a exploração do seu efeito hipolipidêmico (BALDRICK, 2010; CUI e NAIR, 2010; ENESCU e OLTEANU, 2008). No intestino, o quitosano interage com os sais e ácidos biliares, precipitando e formando agregados contendo materiais lipídicos (ácidos graxos, triglicérides e colesterol) ali presentes. Dessa forma, uma parte considerável desses lipídios retidos nos agregados é excretada sem ser metabolizada (PRABHU et al., 2012; HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ et al., 2010). Em razão dessa propriedade fisiológica, uma variedade de produtos “nutracêuticos” é atualmente encontrada no mercado (quitosano em cápsulas), com alegações que vão desde “reductor dos níveis de colesterol no sangue” até “emagrecedor”. Além disso, foram publicados em anos recentes vários estudos que objetivaram caracterizar e descrever propriedades do quitosano e suas potenciais aplicações em todas essas áreas. A título de exemplo, foram selecionados alguns desses estudos demonstrando propriedades e potenciais de aplicação do quitosano nas áreas médico-farmacêutica (Quadro 1) e alimentícia (Quadro 2).

No Quadro 1 são resumidamente apresentados alguns exemplos de estudos publicados nos últimos 3 anos, em que se demonstraram aplicações potenciais do quitosano na área médico-farmacêutica. De acordo com os estudos apresentados no Quadro 1 (página 8), uma das principais características do quitosano é a sua capacidade de auxiliar na regeneração de alguns tecidos do corpo, como do tecido conjuntivo, demonstrado por Tao et al. (2013), tecido ósseo, observado por Cao et al. (2014), e tecido epitelial, estudado por Kiliç et al. (2013). Além de auxiliar na regeneração de tecidos, o quitosano também apresentou a característica de reduzir os níveis de proteínas desencadeadoras de dermatite atópica, exibindo, inclusive, resultados melhores que o tratamento convencional, como mostrado por Choi et al. (2014). Em face disso, pode-se observar que o quitosano apresenta efetivas aplicações terapêuticas.

No Quadro 2 (página 9), são exemplificadas algumas aplicações de quitosano em produtos e/ou embalagens alimentícios. De acordo com esses estudos, as principais formas de aplicação do quitosano em alimentos são na forma de filmes e revestimentos. Isso acontece devido a sua capacidade de formação de filmes elásticos, transparentes e com permissividade seletiva de gases, além de sua atividade antimicrobiana, como mencionado por Sun et al. (2014) e Assis (2010). Desde 2003, a FAO reconhece explicitamente diversas funcionalidades do quitosano em produtos alimentícios como, por exemplo, agente de floculação, agente de endurecimento e de impermeabilização para frutos e sementes, agente de clarificação de sucos de frutas e vinhos e agente antibacteriano (FAO, 2003).

Quadro 1 - Exemplos de estudos recentes evidenciando a aplicabilidade do quitosano na área médico-farmacêutica.

Material	Objetivo/uso	Tratamentos/Ensaio	Principais Resultados	Referência
Quitosano 6-O-sulfonato	<ul style="list-style-type: none"> Hidrogéis para tratamento de deficiências ósseas em coelhos. 	<ul style="list-style-type: none"> Implantes de hidrogel em coelhos: <ol style="list-style-type: none"> hidrogel contendo fator de crescimento rhBMP-2 hidrogel contendo fator de crescimento rhBMP-2 + quitosano 6-O-sulfonato 	<ul style="list-style-type: none"> Regeneração óssea superior nos coelhos cujo hidrogel implantado continha quitosano 6-O-sulfonato. 	Cao et al. (2014)
Quitosano de baixa massa molar solúvel em água	<ul style="list-style-type: none"> Crems hidratantes antimicrobianos para tratamento de dermatite atópica induzida em ratos. 	<ul style="list-style-type: none"> Tratamento da dermatite atópica induzida em ratos: <ol style="list-style-type: none"> tratamento com solução salina tratamento com pimecrolus (Novartis®) tratamento com creme de quitosano + mel 	<ul style="list-style-type: none"> Níveis da proteína desencadeadora da dermatite foram significativamente reduzidos nos ratos cujo tratamento foi com creme de quitosano e mel. 	Choi et al. (2014)
Quitosano de alta massa molar	<ul style="list-style-type: none"> Cicatrização de feridas incisionais nas mucosas intraorais de coelhos. 	<ul style="list-style-type: none"> Tratamento das feridas incisionais nas mucosas de coelhos: <ol style="list-style-type: none"> nenhum tratamento aplicação de glutatona + quitosano aplicação apenas de quitosano aplicação apenas de glutatona. 	<ul style="list-style-type: none"> Os tratamentos com glutatona + quitosano e unicamente com quitosano proporcionaram uma maior eficácia durante a cicatrização das feridas. 	Kiliç et al. (2013)
Poli(álcool vinílico)-carboximetil-quitosano-poli(etileno glicol)	<ul style="list-style-type: none"> Avaliação de um suporte feito com o material em condrócitos de camundongos. 	<ul style="list-style-type: none"> Implante do suporte em camundongos: <ol style="list-style-type: none"> animais sadios, sem implante implante no tecido subcutâneo da região posterior do tronco 	<ul style="list-style-type: none"> Aumento significativo de condrócitos a partir do dia 14º dia Inobservância de quaisquer efeitos adversos do implante sobre o tecido. 	Lee et al. (2013)
Sulfato de carboximetil-quitosano	<ul style="list-style-type: none"> Cultivo de fibroblastos da pele de ratos. 	<ul style="list-style-type: none"> Teor de Sulfato de carboximetil-quitosano adicionado aos fibroblastos: 13,78% ou 18,44% ou 26,26%. 	<ul style="list-style-type: none"> Maior crescimento dos fibroblastos com a adição de 26,26% de Sulfato de carboximetil-quitosano 	Tao et al. (2013)
Quitosano de baixa massa molar revestido com titânio	<ul style="list-style-type: none"> Potencial antimicrobiano de titânio-quitosano para aplicação em implantologia. 	<ul style="list-style-type: none"> Atividade antibacteriana testada contra <i>Actinomyces naeslundii</i> e <i>Porphyromonas gingivalis</i> Pelos tratamentos: quitosano sem revestimento ou quitosano revestido Ti. 	<ul style="list-style-type: none"> O quitosano revestido por titânio apresentou maior inibição sobre <i>A. naeslundii</i>, O quitosano revestido por titânio não apresentou inibição significativa contra <i>P. gingivalis</i>. 	Renoud et al. (2012)

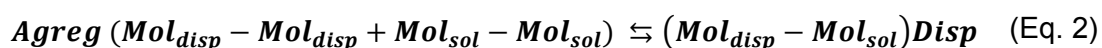
Quadro 2 - Exemplos de estudos recentes evidenciando a aplicabilidade do quitosano na área alimentícia.

Material	Objetivo	Tratamentos/Ensaio	Principais Resultados	Referência
Revestimento de quitosano (1 % m/v) preparado com azeite de oliva (plastificante)	<ul style="list-style-type: none"> Avaliar o efeito da cobertura de quitosano sobre algumas características dos figos-da-índia. 	<ul style="list-style-type: none"> Revestimento aplicado: sem revestimento ou com 1 % de ác. Acético ou com 2,5 % de ác. acético Figos-da-índia avaliados: <ol style="list-style-type: none"> <i>Opuntia albicarpa</i> <i>Opuntia ficus-indica</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Revestimento contendo 1 % de ácido acético: melhores <i>scores</i> sensoriais, foi o que melhor retardou a perda de peso de ambos figos-da-índia e o escurecimento dos figos <i>O. albicarpa</i>. 	Ochoa-Velasco e Guerrero-Beltrán (2014)
Filme de quitosano (1 % m/v) + ácido gálico	<ul style="list-style-type: none"> Desenvolver e avaliar a ação antimicrobiana de filmes de quitosano + ácido gálico. 	<ul style="list-style-type: none"> Incorporação de ácido gálico ao filme de quitosano: 0,0 % m/m ou 0,5 % m/m ou 1,0 % m/m ou 1,5 % m/m Ação antimicrobiana avaliada contra: <i>E. coli</i>, <i>S. typhimurium</i>, <i>B. subtilis</i> e <i>L. innocua</i> 	<ul style="list-style-type: none"> A incorporação de 1,5 % de ácido gálico aumentou significativamente a atividade antimicrobiana dos filmes contra todas as bactérias testadas. 	Sun et al. (2014)
Filme de quitosano de massa molar média + vitamina E e lecitina	<ul style="list-style-type: none"> Determinar o melhor método para a incorporação de vitamina E em um filme comestível de quitosano. 	<ul style="list-style-type: none"> Vitamina E (250 ou 500 mg) foi adicionada às dispersões de quitosano (1,0 %, 1,5 % e 2,0 %) por dois métodos: <ol style="list-style-type: none"> adição de vitamina E em lecitina primeiro. adição direta de vitamina E. 	<ul style="list-style-type: none"> Os resultados mostraram que, em todos os casos, a melhor forma para se adicionar a vitamina E foi junto à dispersão de quitosano. 	Lin e Pascall (2014)
Filme de quitosano (1 g·L ⁻¹)	<ul style="list-style-type: none"> Estudar a hidrofobicidade de filmes de quitosano com hexametildisilazano (HMDS). 	<ul style="list-style-type: none"> Tempo de deposição do HDMS sobre os filmes: 0 min ou 2 min ou 5 min ou 10 min 	<ul style="list-style-type: none"> Redução significativa nos parâmetros de hidrofobicidade em todos os filmes tratados com HDMS. 	Assis (2010)
Revestimento de quitosano de baixa massa molar	<ul style="list-style-type: none"> Avaliar os efeitos de revestimentos de quitosano sobre a tangerina murcote. 	<ul style="list-style-type: none"> Concentração do quitosano no revestimento: 0,05 % (m/V) ou 0,1 % (m/V) ou 0,2 % (m/V) 	<ul style="list-style-type: none"> Revestimento com 0,1 %: melhor abrandou a deterioração dos frutos Revestimento com 0,2 %: mais eficaz no controle de fungos. 	Chien, Sheu e Lin (2007)

2.2. Dispersões de polissacarídeos em meios aquosos

A dispersibilidade (ou solubilidade, quando for o caso) de proteínas e polissacarídeos é uma propriedade físico-química que condiciona as demais propriedades técnico-funcionais desses compostos. De fato, para que esses biopolímeros manifestem, em meios aquosos, propriedades espessantes, gelificantes e emulsificantes, é necessário que eles tenham sido previamente dispersos no meio (MILANI e MALEKI, 2012). Dessa forma, fica clara a relevância do estudo não apenas da dispersibilidade máxima dessas biomoléculas em um dado meio solvente e da cinética de sua dispersão, como também dos mecanismos de interação intermoleculares envolvidos nesse processo. No caso específico do quitosano, estudos sobre sua dispersibilidade em meios aquosos ácidos são relevantes para se compreender em que tipo de produtos ele pode ser disperso e como isso pode ser feito, de modo a se tirar máximo proveito de suas propriedades técnico-funcionais.

Nesse ponto, torna-se necessário estabelecer uma distinção entre os termos “solubilidade” e “dispersibilidade”. De acordo com a IUPAC, “solubilidade” é a propriedade de uma substância química (sólida, líquida ou gasosa), chamada de soluto, para se dissolver em outra (o solvente; sólido, líquido ou gasoso) e formar uma mistura homogênea (monofásica), em que cada molécula ou íon do soluto interage apenas com moléculas do solvente. Já a “dispersibilidade” se refere à propriedade de uma substância química (geralmente de massa molar elevada) se distribuir em outra, formando sistemas visualmente homogêneos, mas não necessariamente com todas as suas moléculas “individualizadas” e interagindo apenas com moléculas do solvente, podendo também interagir entre si. Isso ocorre com muitas biomacromoléculas em meio aquoso, e nessas situações as propriedades termodinâmicas da interface das partículas (propriedades óticas, elétricas, etc.) regem as propriedades termodinâmicas do sistema (IUPAC, 2014; IUPAC, 2009; ARAÚJO et al., 2010). Com essa consideração, pode-se afirmar que o quitosano e muitas outras biomacromoléculas não formam soluções verdadeiras, mas sim dispersões coloidais. Por essa razão, o termo “dispersibilidade” será utilizado quando se estiver tratando desse polissacarídeo. Tanto a solubilidade quanto a dispersibilidade ocorrem em um equilíbrio dinâmico de dois processos simultâneos e opostos: a dissolução/dispersão e a agregação das moléculas (Eq. 2).



Em que **Agreg** é o processo de agregação das partículas, **Disp** é o processo de dispersão das partículas e **Mol_{disp}** e **Mol_{sol}** são as moléculas do dispersante e do solvente, respectivamente.

O processo de dissolução/dispersão ocorre quando, no equilíbrio, predominam no sistema interações $Mol_{disp} - Mol_{sol}$, enquanto que o processo de agregação ocorre quando há preferencialmente interações $Mol_{disp} - Mol_{disp}$. O principal fator que afeta o equilíbrio dispersão-agregação é a diferença nas interações dispersante-dispersante e solvente-solvente. Na grande maioria dos casos, se o tipo de interação que ocorre no dispersante e no solvente for semelhante energeticamente (hidrofóbicas ou hidrofílicas, basicamente), eles irão interagir favoravelmente e dessa forma o equilíbrio dispersão-agregação pode ser alcançado no ponto de menor energia do sistema. Porém, se o tipo de interação que ocorre entre as moléculas do dispersante e do solvente forem diferentes, a agregação é favorecida, ou seja, a energia do sistema tende a minimizar quando as moléculas de soluto e de dispersante não interagem, o que acarreta a não dispersão (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010).

Um fator extrínseco que afeta consideravelmente a dispersibilidade de polissacarídeos é o pH. Geralmente, para polissacarídeos neutros, a solubilidade e muitas propriedades físicas das soluções resultantes (a uma dada concentração) são pouco dependentes do pH. Para polissacarídeos que possuem grupamentos eletricamente carregáveis (-COOH, -NH₂, -SO₃H etc.), a dispersibilidade e as características reológicas das dispersões resultantes são muito sensíveis ao pH (SAHA et al., 2010). De fato, em tais polissacarídeos, dependendo do pH do meio, os grupamentos funcionais podem estar majoritariamente protonados ou desprotonados e, em função disso, a molécula pode possuir carga elétrica líquida positiva, negativa ou neutra. Caso em determinado pH essas moléculas apresentem carga elétrica líquida neutra, elas apresentarão repulsão eletrostática minimizada e, assim, interações mais favoráveis entre si (macromolécula-macromolécula), o que reduz sua dispersibilidade. De maneira análoga, em meios com valores de pH nos quais as moléculas do polieletrólito possuem carga elétrica líquida não nula, a dispersão tende a ser favorecida (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010; JONES et al., 2010; DUMITRIU, 2004; DICKINSON, 2003).

Não apenas o pH, mas também o tipo de ácido pode afetar a solubilidade de polieletrólitos, como o quitosano. Os ânions oriundos da dissociação de diferentes ácidos em meio aquoso podem interagir de diferentes maneiras com a macromolécula eletricamente carregada, formando complexos estruturalmente diferentes (JANEGITZ et al., 2007; CUI, BEACH e ANASTAS, 2011; TIAN et al., 2009; PARAMESWARA et al., 2012). Dependendo da estrutura molecular do ácido, a formação desse complexo macromolécula-ácido poderá afetar tanto a dispersibilidade máxima quanto a cinética da dispersão do biopolímero, ainda que o valor do pH do meio seja o mesmo.

No tocante aos aspectos cinéticos, não foram encontrados estudos quantitativos sobre a cinética de dispersão do quitosano em certa condição de meio solvente. Todavia, um estudo

sobre a cinética de dispersão de hidrocolóides em geral, realizado por Kravtchenko et al. (1999), trouxe uma abordagem interessante para essa problemática. Os autores consideraram que, para a dispersão de polissacarídeos, o meio pode ser considerado “dispersante” ou “não-dispersante”: ao se adicionar polímeros em um solvente comum (não-dispersante), primeiro ocorre o processo de penetração das moléculas do solvente nas partículas sólidas, o que acarreta no inchaço das mesmas, com aumento de sua área específica (m^2/m^3). Assim, essas partículas adquirem características viscoelásticas, formando “grumos”, aderindo às paredes do recipiente e sobre a hélice do agitador. Esses grumos limitam a velocidade de dispersão do polímero no meio solvente, por reduzir o contato das partículas do interior com o solvente (daí a denominação de meio “não-dispersante”). Para meios dispersantes, todas as partículas dos hidrocolóides tem contato constante com o solvente, assim, para a cinética de dispersão, o modelo que melhor se ajusta é o apresentado pela equação 3, que possui a mesma forma de uma equação de cinética de primeira ordem, com dois parâmetros.

$$C = C_{\infty}[1 - \exp(-k \cdot t)] \quad (\text{Eq. 3})$$

Em que C é a concentração de hidrocolóide dispersa no tempo t , C_{∞} é a concentração máxima dispersa e k é a taxa de dispersão das partículas. Para meios não-dispersantes, considera-se que a dispersão do hidrocolóide compõe-se de dois processos simultâneos. O primeiro é a liberação/dispersão de partículas livres, com contato direto com o solvente e que dispersam rapidamente, sem formar grumos. O segundo processo é o de dispersão das partículas que ficaram agregadas nos grumos (dispersão lenta). Desta maneira, o modelo que representa de forma mais precisa esse caso é o de uma equação de cinética de primeira ordem, mas com quatro parâmetros, dois para cada processo (equação 4).

$$C = C_A[1 - \exp(-k_A \cdot t)] + C_B[1 - \exp(-k_B \cdot t)] \quad (\text{Eq. 4})$$

Nessa equação, C_A é a concentração total do hidrocolóide livre, disperso rapidamente (sem formar grumos), k_A é a taxa de dispersão das partículas livres, C_B é a concentração total de hidrocolóide preso, disperso lentamente (a partir dos grumos) e k_B é a taxa de dispersão das partículas presas nos grumos. Vale ressaltar que, em meios não-dispersantes, $k_A > k_B$, a concentração total de hidrocolóide disperso é $C_{max} = C_A + C_B$ e o índice de dispersibilidade $ID = C_A/C_{max}$ é o percentual da massa do hidrocolóide livre, que dispersou de forma rápida.

Esses modelos foram testados pelos autores utilizando pectina como hidrocolóide, água como meio não-dispersante e água + açúcar como meio dispersante. Na Figura 2 é mostrada a cinética de dispersão da pectina em meio dispersante e não-dispersante. Pode-se observar que no primeiro caso, a pectina rapidamente alcançou um platô, no qual o máximo de conteúdo foi disperso. Já no segundo caso, a pectina teve uma velocidade de dispersão

menor, ao ponto de que após 30 minutos não foi possível dispersar toda a pectina. Em virtude disso, os autores ajustaram modelos distintos para cada caso:

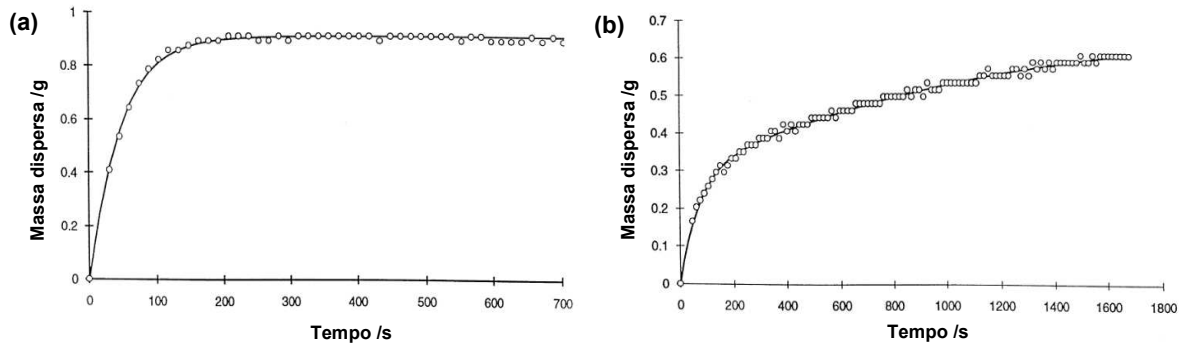


Figura 2 - Cinética de dispersão de pectina: (a) em um meio dispersante; (b) em um meio não-dispersante.

Fonte: Kravtchenko et al. (1999)

No Quadro 3, a seguir, são apresentados os valores obtidos pelos autores para o ajuste das equações 3 e 4 da cinética de dispersão de 1 grama de diferentes amostras de pectina, em 300 mL de meio dispersante ou não-dispersante.

Quadro 3 - Ajuste para a cinética de dispersão de amostras de pectina em meios dispersante e não-dispersante.

Amostra de Pectina	Meio dispersante		Meio não dispersante				
	$C = C_{\infty}[1 - \exp(-k \cdot t)]$		$C = C_A[1 - \exp(-k_A \cdot t)] + C_B[1 - \exp(-k_B \cdot t)]$				
	C_{∞} /g·(100 mL) ⁻¹	k /s ⁻¹	C_A /g·(100 mL) ⁻¹	k_A /s ⁻¹	C_B /g·(100 mL) ⁻¹	k_B /s ⁻¹	ID
1	0,32	0,021	0,12	0,019	0,21	$3,5 \times 10^{-4}$	37 %
2	0,30	0,021	0,11	0,012	0,22	$3,3 \times 10^{-4}$	34 %
3	0,28	0,021	0,12	0,013	0,22	$5,0 \times 10^{-4}$	35 %
4	0,30	0,024	0,11	0,013	0,23	$3,0 \times 10^{-4}$	32 %
5	0,30	0,025	0,11	0,017	0,23	$3,4 \times 10^{-4}$	32 %
6	0,32	0,023	0,10	0,019	0,23	$3,6 \times 10^{-4}$	31 %

Fonte: Kravtchenko et al. (1999)

De acordo com os dados do Quadro 3, os autores perceberam que a taxa de dispersão da pectina (k), em meio dispersante, é muito próximo da taxa de dispersão da pectina livre (k_A), em meio não-dispersante. Nesse último meio, os autores também perceberam que, em média, 66,5 % da massa das amostras de pectina formaram grumos ao dispersar.

No tocante à dispersibilidade, foram encontrados poucos trabalhos em que se investigou especificamente a dispersibilidade de quitosano em meios aquosos e propriedades das dispersões resultantes. É importante enfatizar que, com o quitosano *in natura*, devem ser utilizados meios aquosos acidificados, sem o qual o polímero não se dispersa. Por exemplo, Abreu et al. (2013) propuseram a aplicação de aquecimento por micro-ondas no processo de obtenção do quitosano a partir da quitina, e em seguida compararam a dispersibilidade do quitosano obtido por esse método alternativo (Qp) com os quitosanos obtido de maneira convencional (aquecimento por manta térmica) (Qv) e o comercial (Qc). Para a obtenção, misturou-se quitina e solução de NaOH 50 % na proporção de 1:5 e, após 24 horas, submeteu-se a mistura a micro-ondas (270 W) em dois ciclos de 15 minutos. A dispersibilidade dos diferentes quitosanos foi estimada a frio, adicionando-se quitosano em solução de ácido acético 2 % v/v, agitando-se por 30 min. Os autores observaram que o quitosano Qp dispersou em 5 min a temperatura ambiente, enquanto para os quitosanos Qv e Qc foi necessário aquecer o sistema a 50 °C por 30 min para que ocorresse dispersão apenas parcial. Na análise espectrofotométrica (transmitância a 660 nm), as dispersões com quitosano Qc e Qv apresentaram valores de transmitância entre 3 % e 5 %, indicando alta concentração de partículas em suspensão, que espalharam a luz. A dispersão com quitosano Qp apresentou

transmitância de 71%, indicando a dispersibilidade muito maior desse último no meio aquoso ácido. Os autores atribuíram essa diferença ao maior grau de desacetilação do quitosano Qp.

Já Ying et al. (2011) avaliaram a dispersibilidade do quitosano em água a pH neutro, mas não utilizaram o biopolímero *in natura*, e sim derivados obtidos *via* reação de Maillard com diferentes açúcares (D-glicose, D-frutose, L-ramnose, D(+)galactose, L-arabinose, D-manose, maltose e D-lactose), além de compostos resultantes da N-alquilação desses produtos de Maillard. Para avaliar a dispersibilidade, adicionou-se 0,05 g do material a 5 mL de água destilada, agitando-se por 5 h, a que seguiu-se filtração em papel (porosidade 0,45 μm) e quantificação do material retido por gravimetria. Os resultados obtidos indicaram que a dispersibilidade de todos os derivados quitosano-açúcares, antes e após a N-alquilação, foram consideravelmente maiores do que a do quitosano *in natura*. O derivado quitosano-frutose foi o que teve a maior dispersibilidade em pH neutro, atingindo 11,46 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para o produto de Maillard e 8,5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para o mesmo produto N-alquilado, respectivamente. Para avaliar a estabilidade das dispersões ao pH, adicionou-se 0,1 g do material em 10 mL de água destilada e variou-se o pH do meio gotejando-se solução de NaOH (2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) até que a alteração da absorvância da dispersão a 600 nm fosse maior que 0,1. Novamente, o derivado quitosano-frutose (sem N-alquilação) apresentou a maior estabilidade a variação de pH, não tendo apresentado variações de absorvância $> 0,1$ até que o meio atingisse pH ≈ 13 .

2.3. Interações intermoleculares do quitosano em meios aquosos

Para se compreender a influência do pH e do tipo de ácido sobre a cinética de dispersão e sobre a dispersibilidade máxima de quitosano em um dado meio aquoso, é necessário se aprofundar na compreensão molecular do sistema. Em outras palavras, é preciso uma compreensão mais clara das interações intermoleculares que são mais favoráveis entre o quitosano e as demais espécies químicas presentes no meio.

Estão disponíveis alguns trabalhos em que se buscou elucidar aspectos moleculares da interação de quitosano com uma gama variada de compostos, como proteínas (β -lactoglobulina, glicinina), antimicrobianos (ϵ -polilisina), outros polissacarídeos (gomas xantana e κ -carragena), sais (tripolifosfatos), hormônios (insulina), lipossomos e surfactantes (N-R-lauroyl-L-arginina etil éster monohidroclorida). Uma apresentação descritiva e resumida de alguns desses estudos mais recentes é mostrada no Quadro 4 (páginas 17-21), em que são citados os compostos cujas interações com quitosano foram estudadas, as técnicas e metodologias experimentais aplicadas, bem como os resultados apontados pelos autores.

Nesses estudos apresentados no Quadro 4, utilizou-se quitosano com massa molar da ordem de dezenas ou centenas de kDa e com grau de desacetilação variando entre 80 % e 95 %. Na maioria dos casos, utilizou-se quitosano comercial (fornecedores: Shandong Aokang Industrial & Commercial - China, Fluka - Suíça, Primex - Islândia, Aqua Premier Co. - Tailândia, Marine Science Co. - Japão e NOF Corporation - Japão). Em apenas um dos estudos os próprios pesquisadores extraíram o quitosano de camarões do gênero *Penaeusschmitti* (BASTOS et al., 2010).

É possível observar, nesses artigos, que o quitosano tende a interagir exotermicamente com moléculas negativamente carregadas, como goma xantana e κ -carragena (MAURSTAD et al., 2012; PINHEIRO et al., 2012). Nesses casos, o processo de interação foi entalpicamente dirigido. Nos casos em que o quitosano interagiu com moléculas positivamente carregadas, em geral a variação de entalpia foi próxima de zero, indicando que o processo foi entropicamente dirigido (CHANG et al., 2014; YUAN et al., 2013; MAURSTAD et al., 2012; BASTOS et al., 2010; GUZEY e MCCLEMENTS, 2006). Em tais casos, o parâmetro que mais influenciou os resultados foi o pH. Por exemplo, para a β -lactoglobulina, que apresenta pI em $pH = 5,2$ a variação da entalpia de interação com quitosano foi praticamente nula em $pH < 5$, enquanto que em $pH > 5$, a variação da entalpia de interação foi negativa (BASTOS et al., 2010; SOUZA et al., 2009; GUZEY e MCCLEMENTS, 2006).

Quadro 4 - Exemplos de estudos de interações intermoleculares entre quitosano e outros compostos de interesse científico ou tecnológico.

Composto Condições experimentais	Técnicas e metodologias experimentais	Principais resultados	Referên cia
<p><i>Antimicrobiano ε-polilisina</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Quitosano com 7,5 % DA + Homopolímero catiônico ε-polilisina, em tampão citrato 0,5 mM e pH = 3,5 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Calorimetria de titulação isotérmica (ITC): 5 µL de solução de ε-polilisina (1,0 % m/v) em 1,48 mL de dispersão de quitosano (0,1 % m/v). ▪ Turbidimetria a 600 nm 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ITC: $\Delta H \approx 50 \mu\text{Cal}\cdot\text{injeção}^{-1}$, provavelmente devido a repulsão de cargas positivas de quitosano e ε-polilisina. ▪ Turbidimetria: Variação não significativa da absorbância de luz em função da concentração de ε-polilisina, indicando a não formação de complexo. 	<p>Chang et al. (2014)</p>
<p><i>Glicinina</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Quitosano com 5 % DA e M_w de 300 kDa + Proteína glicinina extraída de flocos de soja, em Tampão acetato 100 mM, pH 3,5 – 4,5 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ITC: Injeções de 5 µL de dispersão de quitosano (1 µg/µL) em 1,44 mL de glicinina (1 mg/mL) ▪ Turbidimetria a 600 nm 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ITC: <ul style="list-style-type: none"> ▪ pH = 3,5: $\Delta H \approx 0$, indicando interação fraca ou nenhuma. ▪ pH = 4,5: ΔH entre -1540,93 e -26,93 kcal·mol⁻¹, indicando forte interação. ▪ Turbidimetria: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Até pH 4: não houve absorbância significativa. ▪ pH 4 – 6: leve absorbância (entre 0,2 e 0,5), indicando a formação de complexos solúveis. ▪ Acima de pH 6: grande absorbância (entre 0,5 e 2,5), indicando formação de complexos insolúveis. 	<p>Yuan et al. (2013)</p>
<p><i>Goma Xantana</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Quitosano com 20 % DA com M_w de 5 kDa ou Tri-glicosamina com M_w de 0,613 kDa ▪ Goma Xantana sonificada com $M_w \approx 0,31 \times 10^3$ kDa ou $M_w \approx 0,57 \times 10^3$ kDa 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ITC: Injeções de 7 µL de dispersão de quitosano ou tri-glicosamina (31,06 mM de glicosamina e 6,21 mM de glicosamina, respectivamente) em solução de goma xantana (0,4 ou 0,26 mM de piruvato). ▪ Imagens de microscopia de força atômica (AFM). 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ITC com as duas gomas xantana: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Tri-glicosamina: $\Delta H = 8,9$ e $11,9$ kcal·mol⁻¹, indicando um processo entropicamente dirigido. ▪ Quitosano apresentou dois estágios. O primeiro $\Delta H = -466$ kcal·mol⁻¹ e o segundo $\Delta H = 574$ e 86 kcal·mol⁻¹, indicando uma complexação inicial, seguida de agregação. ▪ Microscopia com as gomas xantana: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Tri-glicosaminas: formou-se estruturas do tipo <i>rod</i> (haste). ▪ Quitosano: formou-se estruturas do tipo <i>rod</i> (haste) entre cadeias, ou toróides, dependendo do tamanho da goma. 	<p>Maurstad et al. (2012)</p>

Composto Condições experimentais	Técnicas e metodologias experimentais	Principais resultados	Referên cia
<p><i>κ-carragena</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Quitosano com 10 % DA e M_w de $3,4 \times 10^2$ kDa ▪ κ-carragena com 76 % de pureza e M_w de $3,8 \times 10^2$ ▪ Quitosano foi disperso em solução 1 % (v/v) de ácido láctico pH 3,0 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ITC: Injeções de 10 μL de dispersão de quitosano (0,2 % m/v) em 1,75 mL de κ-carragena (0,2 % m/v). ▪ Potencial ζ dos hidrocolóides separados. ▪ Análises em microbalanças de cristais de quartzo 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ITC: $\Delta H = -19,8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, indicando interações eletrostáticas. ▪ O potencial ζ do quitosano foi de +45,83 mV e da κ-carragena foi de -56,90 mV, mostrando que os dois apresentam-se carregados eletricamente de forma oposta. ▪ Análise em microbalança: κ-carragena fornece sítios de interação para a subcamada de quitosano seguinte e aprisiona moléculas de água (aumenta viscoelasticidade). 	<p>Pinheiro et al. (2012)</p>
<p><i>Lipossomos</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Quitosano com 5 % DA e M_w de 199 kDa ▪ Lipossomos produzido com DOPG (1,2-dioleoil-sn-glicero-3fosfatidilglicerol) ▪ Lipossomos produzido com DOPC (1,2-dioleoil-sn-glicero-3fosfatidilcolina) ▪ Quitosano e lipossomos foram dispersos em tampão acetato com pH 4,48 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Análises de tamanho e potencial ζ foram realizadas nos lipossomos sem e com quitosano no meio. ▪ ITC: Injeções de 10 μL de dispersão de quitosano em 1,44 mL solução contendo lipossomos. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tamanho: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Lipossomos de DOPC: diâmetro hidrodinâmico ≈ 100 nm. Adição de quitosano fez o diâmetro aumentar. ▪ Lipossomos de DOPG: diâmetro hidrodinâmico ≈ 100 nm. A adição de quitosano fez o diâmetro aumentar, ≈ 900 nm. ▪ Potencial ζ: <ul style="list-style-type: none"> ▪ DOPC: $\zeta = 5$ mV. Quitosano fez a carga aumentar (≈ 55 mV). ▪ DOPG: Entre 5 e -80 mV. Maior fração de PG, mais negativos. Adição de quitosano fez o ζ aumentar (até 43 mV). ▪ ITC: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Quitosano-DOPC: $\Delta H \approx -100 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}$, indicando interações fracas. ▪ Quitosano-DOPG: mais exotérmica quanto maior a proporção de PG na solução (ΔH entre -3,95 e -2,19 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), indicando interações fortes entre DOPG e quitosano. 	<p>Mertins e Dimova (2011)</p>

Composto Condições experimentais	Técnicas e metodologias experimentais	Principais resultados	Referên cia
<p><i>Surfactante Surfactante catiônico N-R-lauroyl-L-arginina etil éster monohidroclorida (LAE)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Quitosano com 7,5 % DA, disperso em solução de propileno glicol, pH 3,5 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ITC: Injeções de 5 μL de LAE (1,8 % m/v) em 1,48 mL de quitosano (0,1 % m/v). ▪ Turbidimetria a 600 nm. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ITC: <ul style="list-style-type: none"> ▪ LAE-quitosano: levemente exotérmica ($\Delta H \approx -150 \mu\text{Cal-injeção}^{-1}$), provavelmente devido ao efeito de volume excluído causado pela presença de quitosano. ▪ Não houve absorbância significativa na dispersão de LAE-quitosano, o que indica a não formação de complexos. 	<p>Bonnaud et al. (2010)</p>
<p><i>Proteínas do soro do leite (WPI)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Quitosano 6,6 % DA extraído de camarões <i>Penaeus schmitti</i> ▪ WPI Lacprodan DI – 9224 ▪ Tampão acetato 100-250 mM ▪ pH = 3 – 6 ▪ Concentração de quitosano nas análises reológicas: 0,5 % - 3 % (m/m) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Determinação da massa molar média (por viscosimetria). ▪ Turbidimetria a 400 nm. ▪ ITC: Injeções de 6,85 μL de dispersão de quitosano (0,4 % m/m) em 1 mL WPI (0,5 % m/m). 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Massa molar média do quitosano em diferentes pH's: <ul style="list-style-type: none"> ▪ pH = 4,7: $M_w = 1,6 \times 10^3$ kDa. ▪ pH = 6: $M_w = 1,2 \times 10^3$ kDa. ▪ Turbidimetria: <ul style="list-style-type: none"> ▪ pH = 3: Absorbância $\approx 0,1$; indicando mínima interação. ▪ pH 4 - 6: Absorbância entre 0,5 e 1, provavelmente devido a proximidade do ponto isoelétrico do WPI. ▪ ITC: <ul style="list-style-type: none"> ▪ pH < 5: $\Delta H \approx 0$, indicando interações muito fracas. ▪ pH > 5: $\Delta H \approx -0,45$ mJ, indicando interações provavelmente com β-lactoglobulina que está negativamente carregada. 	<p>Bastos et al. (2010)</p>

Composto Condições experimentais	Técnicas e metodologias experimentais	Principais resultados	Referên cia
<p><i>Proteínas do soro do leite (WPI)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Quitosano com 10 % de DA e M_w entre 250-300 kDa ▪ Quitosano com 5 % de DA e M_w entre 150-200 kDa ▪ WPI com M_w média de 20,8 kDa ▪ Força iônica de 100 mM ▪ pH = 3 – 6 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Determinação da massa molar média (por viscosimetria). ▪ ITC: Injeções de 8,31 μL de dispersão de quitosano (0,7 % m/m) em 3 mL de solução de WPI (0,5 % m/m). ▪ Turbidimetria a 400 nm. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Massa molecular média do quitosano: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Com 90 % DD: $M_v = 330$ kDa. ▪ Com 95 % DD: $M_v = 225$ kDa. ▪ Medidas calorimétricas: <ul style="list-style-type: none"> ▪ pH < 5: $\Delta H \approx 0$, indicando não haver interação significativa. ▪ pH = 5,5: $\Delta H \approx -4000$ kJ·mol⁻¹, indicando forte interação provavelmente devido às cargas elétricas negativas do WPI. ▪ pH \approx 6: $\Delta H \approx -10000$ kJ·mol⁻¹, indicando forte interação provavelmente devido às cargas elétricas negativas do WPI. ▪ Turbidimetria: <ul style="list-style-type: none"> ▪ pH 4-6: Absorbância \approx 1, indicando a formação de complexo nessa faixa de pH. 	Souza et al. (2009)
<p><i>Insulina e tripolifosfato</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Quitosano com 15,5 % DA e M_w de 150 kDa ▪ Pentasodium tripolyphosphate (TPP) ▪ Insulina humana ▪ Ácido benzóico 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Espectroscopia ¹H NMR. ▪ Espectroscopia FTIR. ▪ ITC: Injeções de solução de 30 μL de insulina, TPP ou ácido benzoico em 2,5 de dispersão de quitosano (0,2 % m/v). 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ O ¹H NMR mostrou que não há interação c/ ác. benzóico ▪ Espectroscopia FTIR: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Presença de insulina: Algumas bandas do quitosano aumentaram e outras deslocaram (possível interação c/ insulina) ▪ Não houve mudanças de bandas do quitosano na presença de ácido benzoico. ▪ ITC: <ul style="list-style-type: none"> ▪ C/ insulina: $\Delta H > -2000$ kJ·mol⁻¹, indicando ligação iônica e/ou adsorção da insulina no quitosano. ▪ C/ TPP: $\Delta H > -44$ kJ·mol⁻¹, indicando interação fraca. ▪ C/ ácido benzóico: $\Delta H \approx 0$ kJ·mol⁻¹, indicando não haver interação significativa entre esses compostos. 	Boonson grit et al. (2008)

Composto Condições experimentais	Técnicas e metodologias experimentais	Principais resultados	Referên cia
<p><i>β-lactoglobulina</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Quitosano solúvel com 15 % de DA e M_w de 15 kDa ▪ β-lactoglobulina ▪ Tampão fosfato 5 mM ▪ pH 3 – 7 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ITC: Injeções de 10 μL de dispersão de quitosano (0,7 % m/m) em 1,48 mL de solução de β-lactoglobulina (0,5 % m/m). ▪ Mobilidade eletroforética da dispersão de quitosano com β-lactoglobulina. ▪ Medidas de turbidimetria a 600 nm. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Medidas calorimétricas: <ul style="list-style-type: none"> ▪ pH = 3: $\Delta H < 10 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, devido ambas macromoléculas estarem positivamente carregadas. ▪ pH = 6: $\Delta H \approx -1000 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, provavelmente devido às macromoléculas estarem opostamente carregadas. ▪ Medidas de mobilidade eletroforética: <ul style="list-style-type: none"> ▪ pH = 3: mobilidade independente da concentração de quitosano, indicando a não formação de algum complexo. ▪ pH = 6: mobilidade inicial negativa. A adição de quitosano levou a ficar mais positiva, indicando a formação de complexo. ▪ Turbidimetria: <ul style="list-style-type: none"> ▪ pH = 3: Sem absorção significativa, indicando não formação de complexos. ▪ pH = 6: Absorbância próxima de 1, indicando formação de complexos c/ β-lactoglobulina. 	<p>Guzey e McClements (2006)</p>

Nesses estudos, lança-se mão de técnicas experimentais variadas, como espalhamento dinâmico de luz (DLS), turbidimetria de soluções e dispersões (luz visível), potencial ζ de partículas dispersas, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), análises de microscopia de força atômica (AFM) ou, ainda, microcalorimetria de titulação isotérmica (ITC). Cada uma dessas técnicas permite evidenciar alterações em características físicas e/ou químicas dos sistemas contendo quitosano, em função da presença (e, em alguns casos, da concentração) de outras espécies químicas. Essas alterações são correlacionadas a eventos moleculares específicos e, desta forma, a consideração conjunta dos resultados permite fazer inferências sobre as interações intermoleculares entre o quitosano e moléculas de outros compostos.

Em todos os estudos analisados, foram realizadas análises por microcalorimetria de titulação isotérmica (ITC). Experimentos de ITC podem permitir a quantificação de todas as variáveis termodinâmicas da interação intermolecular (ΔG , ΔH , ΔS) entre quitosano e outros compostos. Conhecendo-se as magnitudes relativas e os sinais dessas variáveis termodinâmicas, pode-se determinar se a interação é favorável ou desfavorável ou mesmo, em alguns casos, deduzir os tipos de interações que ocorrem (ATKINS e PAULA, 2010). Por exemplo, a magnitude da variação de entalpia (ΔH) de interação quitosano/composto pode indicar se essa interação envolve a formação/ruptura de ligações covalentes ou apenas interações intermoleculares (como iônicas, ligações de hidrogênio e hidrofóbicas). Em alguns desses casos, essas análises microcalorimétricas são complementadas por análises das alterações vibracionais nas moléculas envolvidas, por meio da análise de espectros de FT-IR (BOONSONGRIT et al., 2008). De maneira similar, a análise combinada do potencial ζ e do tamanho médio das partículas no meio (qualitativamente estimado por ensaios de turbidimetria ou quantificado por DLS) podem fornecer indícios de ocorrência ou não de interação (YUAN et al., 2013; MERTINS e DIMOVA, 2011; GUZEY e MCCLEMENTS, 2006). De fato, espécies químicas eletricamente carregadas com sinais opostos tendem a interagir por atração eletrostática, favorecendo assim a formação de partículas maiores no meio (RUSSEL, SAVILLE e SCHOWALTER, 1989).

Não foi encontrado nenhum estudo em que se investigaram, especificamente, aspectos termodinâmicos da interação do quitosano com o ácido utilizado no meio aquoso para dispersá-lo. Esse conhecimento é fundamental para se entender, em escala molecular, o porquê de o quitosano apresentar dispersibilidades máximas e cinéticas de dispersão diferentes em soluções aquosas de ácidos orgânicos diferentes, mesmo quando o pH é ajustado para o mesmo valor ou os ácidos estão presentes na mesma concentração.

2.4. Algumas técnicas analíticas aplicadas ao estudo do quitosano

Nessa seção serão apresentados, de forma resumida, os princípios das técnicas que foram utilizadas nesse projeto.

2.4.1. Viscosimetria – Determinação da massa molar média do quitosano

Um método simples e rápido utilizado para determinar a massa molar média de polímeros é através da viscosimetria. O primeiro cientista a relacionar viscosidade com a massa molar foi Einstein (Equação 5) (EINSTEIN, 1906; EINSTEIN, 1911; JAMIESON e SIMHA, 2010). Essa equação é válida considerando-se que todas as partículas do soluto são esféricas, não interagem entre si e não interferem nas propriedades do escoamento do fluido circundante.

$$\eta = \eta_s(1 + 2,5\phi) \quad (\text{Eq. 5})$$

Em que η_s e η são as viscosidades do meio antes e após a adição de partículas, respectivamente, em Pa·s, e ϕ é a fração do volume das partículas esféricas, que pode ser descrita pela equação 6:

$$\phi = (C/M)N_A V_H \quad (\text{Eq. 6})$$

Em que C é a concentração de partículas, em g·mL, M é a massa molar das partículas, em g·mol⁻¹, N_A é o número de Avogadro e V_H é o volume hidrodinâmico da partícula, em mL. Substituindo a equação 6 na equação 5, tem-se a equação 7:

$$\frac{1}{C} \left(\frac{\eta}{\eta_s} - 1 \right) = 2,5 \frac{N_A V_H}{M}$$

Ou:

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = 2,5 \frac{N_A V_H}{M} \quad (\text{Eq. 7})$$

Em que $\eta_{sp} = (\eta/\eta_s - 1)$ é a viscosidade específica do meio. Entretanto, a equação 7 continua valendo apenas para partículas esféricas que não interagem entre si, o que não acontece com polímeros. Para contornar esse problema, deve-se considerar que as partículas estão infinitamente diluídas, ou seja, extrapolando sua concentração até zero, como na equação 8:

$$\lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] = \frac{2,5N_A V_H}{M} \quad (\text{Eq. 8})$$

Em que $[\eta]$ é definido como viscosidade intrínseca, em $\text{dL}\cdot\text{g}^{-1}$. Para cadeias de polímeros que se expandem e aprisionam elevado número de moléculas de solvente, o volume hidrodinâmico é grande e geralmente tem relação com a massa molar como descrito na equação 9:

$$V_H \sim M^\varepsilon \quad (\text{Eq. 9})$$

Em que o expoente ε não depende somente do grau de inchaço da cadeia do polímero e de sua rigidez, mas também de seu comportamento hidrodinâmico. Substituindo a equação 9 na equação 8, tem-se então a equação Mark–Houwink–Sakurada (MHS) obtida experimentalmente (Equação 10) (JAMIESON e SIMHA, 2010; FLORY, 1953; TANFORD, 1961):

$$[\eta] = KM^{\varepsilon-1} = KM^a \quad (\text{Eq. 10})$$

Em que K e a são constantes da equação MHS.

A constante a da equação MHS pode dar informações sobre a qualidade do solvente e, assim, a conformação do polímero no meio. Geralmente, valores da constante variando entre 0,5 e 0,8 indicam um bom solvente, ou seja, as interações polímero-solvente prevalecem sobre as interações polímero-polímero. Para o quitosano, valores da constante a variando entre 0,7 e 1,0 indicam bons solventes, no qual indica que a cadeia do quitosano está flexível, estendida ou linear, visto que as interações polímero-solvente estão favorecidas. Para valores da constante menores do que 0,58, a cadeia está espiralada de forma aleatória (JAMIESON e SIMHA, 2010; KASAAI, 2007).

Para se determinar a viscosidade intrínseca na prática, pode-se utilizar um viscosímetro capilar e medir o tempo de escoamento de dispersões com diferentes concentrações da macromolécula que se deseja determinar a massa molar média e de seu solvente. Com o tempo de escoamento, pode-se determinar a viscosidade específica η_{sp} para cada concentração (Equação 11).

$$\eta_{sp} = \frac{t - t_0}{t_0} \quad (\text{Eq. 11})$$

Em que t e t_0 são os tempos de escoamento da dispersão e do solvente, respectivamente, pelo viscosímetro capilar, em segundos. A partir das viscosidades específicas das dispersões da macromolécula, pode-se determinar a viscosidade intrínseca da macromolécula por diferentes equações, sendo as mais utilizadas às de Huggins (Equação 12) e a de Kraemer (Equação 13).

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + k_1[\eta]^2 c \quad (\text{Eq. 12})$$

$$\frac{\ln \eta_r}{c} = [\eta] - k'_1[\eta]^2 c \quad (\text{Eq. 13})$$

Em que k_1 e k'_1 são constantes obtidas através da regressão dos dados experimentais e $\eta_r = (\eta_{sp} + 1)$ é a viscosidade relativa (JAMIESON e SIMHA, 2010). O ponto negativo na determinação da massa molar média viscosimétrica é que essa técnica não leva totalmente em consideração a dispersibilidade da massa molar, sendo muito sensível ao limite superior de massas molares. Isso desvia a massa molar calculada, registrando uma massa molar maior do que o valor real.

Um estudo realizado por Kasai (2007) visou elaborar equações teóricas para determinar as constantes k e a da equação MHS para qualquer tipo de quitosano em qualquer solvente. Para tal, ele analisou diversas publicações de diferentes pesquisadores que determinaram as constantes da equação MHS experimentalmente para diferentes amostras de quitosano, em diferentes meios. O autor percebeu que a conformação da cadeia de quitosano (que influencia na constante a da equação MHS) é muito sensível às condições do meio, como pH, força iônica (μ), temperatura e concentração de ureia, além do próprio grau de desacetilação do quitosano. Em face disso, ele fez um gráfico da variação da constante a em função da relação $DA/(pH \cdot \mu)$ (note-se que: $DA = 100\% - DD$), apresentado na Figura 3a. Com esses dados, ele ajustou uma regressão que melhor descrevesse o comportamento da constante em função dessas condições do meio. Ao mesmo tempo, o autor construiu um gráfico no qual ele observa a variação da constante K em função da constante a (Figura 3b). A partir do gráfico, ajustou-se outra equação que melhor descrevesse os dados experimentais.

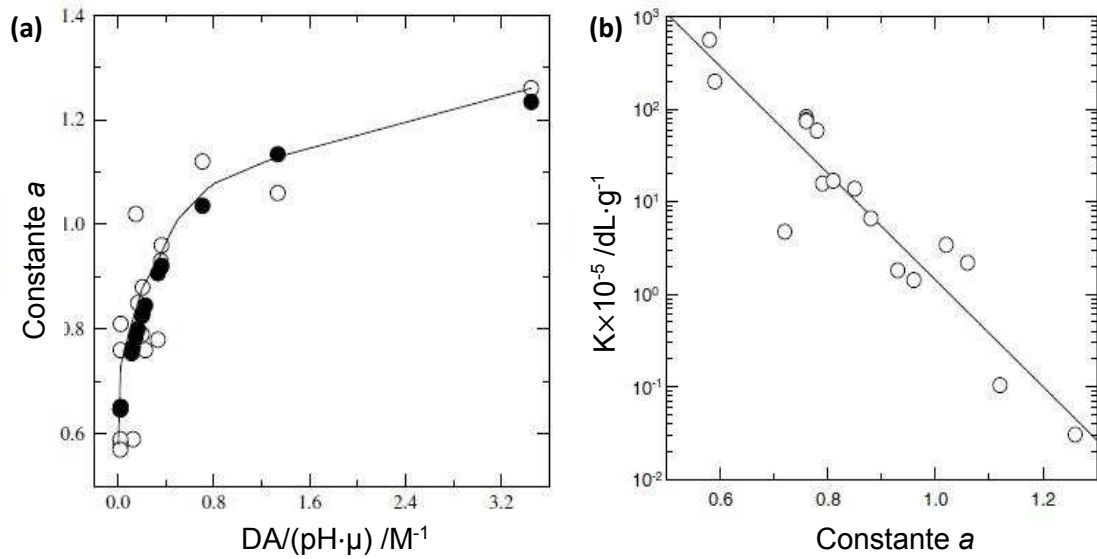


Figura 3 - Gráfico das constantes da equação MHS: (a) Constante a em função de $DA/(pH \cdot \mu)$. (b) Constante K em função da constante a . Símbolos abertos representam resultados da literatura, linha representa a melhor equação ajustada e os símbolos fechados representam dados calculados pela equação ajustada.

Fonte: Kasaii (2007)

As equações 14 e 15 representam as equações que melhor se ajustaram aos dados experimentais para a constante a e para a constante K , já levando em consideração o efeito da temperatura e da concentração de ureia na primeira.

$$a = \left(0,6202 + \frac{0,699x}{0,4806 + x} \right) + [0,003(T - 20)] + 0,06 \cdot C_{ureia} \quad (\text{Eq. 14})$$

$$\log K \cdot 10^{-5} = -5,7676 \cdot a + 5,9232 \quad (\text{Eq. 15})$$

Onde $x = DA/(pH \cdot \mu)$, T é a temperatura em $^{\circ}C$ e C_{ureia} é a concentração de ureia no meio em $mol \cdot L^{-1}$.

Por fim, o autor mencionou que para a determinação da massa molar do quitosano por viscosimetria, seria preciso usar como solvente tampão acetato ou ácido acético/cloreto de sódio, com força iônica variando entre 0,05 e 0,2 M, para garantir a completa dispersão do quitosano, minimizando interações intra e intercadeia. Foi também recomendado que a viscosidade intrínseca da amostra seja obtida pela média aritmética das viscosidades intrínsecas obtidas pelos métodos de Kraemer e Huggins.

2.4.2. Calorimetria

A grande maioria das reações químicas e das interações moleculares envolve uma variação de energia, sendo esses fenômenos acompanhados pela liberação de calor (fenômeno exotérmico) ou absorção de calor (fenômeno endotérmico). Os primórdios da calorimetria – ciência que analisa e quantifica as trocas de calor em reações químicas ou eventos físicos – remontam aos trabalhos do médico e cientista escocês Joseph Black no século XVIII (RAMSAY e DONNAN, 1918). Refinamentos progressivos dos instrumentos e métodos da calorimetria levaram o desenvolvimento, na atualidade, da ultramicrocalorimetria, que permite a medição de absorção ou liberação de quantidades muito pequenas de calor (da ordem de μJ) de substâncias, mesmo trabalhando com pequenas quantidades de amostra (MALVERN INSTRUMENTS LTD, 2015a). A microcalorimetria pode ser usada para estudar interações e reações envolvendo biomoléculas, bem como as alterações de conformação moleculares, como o dobramento e a desnaturação de proteínas. Estes fenômenos são geralmente estudados utilizando duas técnicas de calorimetria: calorimetria de varredura diferencial (*Differential Scanning Microcalorimetry* - DSC) e calorimetria de titulação isotérmica (*Isothermal Titration Calorimetry* – ITC). A técnica que foi utilizada no presente trabalho foi a do ITC. Essa técnica é aplicada no monitoramento de qualquer interação química iniciada pela adição de um componente. Baseia-se na utilização de uma “célula de referência”, uma “célula com amostra” e a injeção de um “agente titulante” (Figura 4).

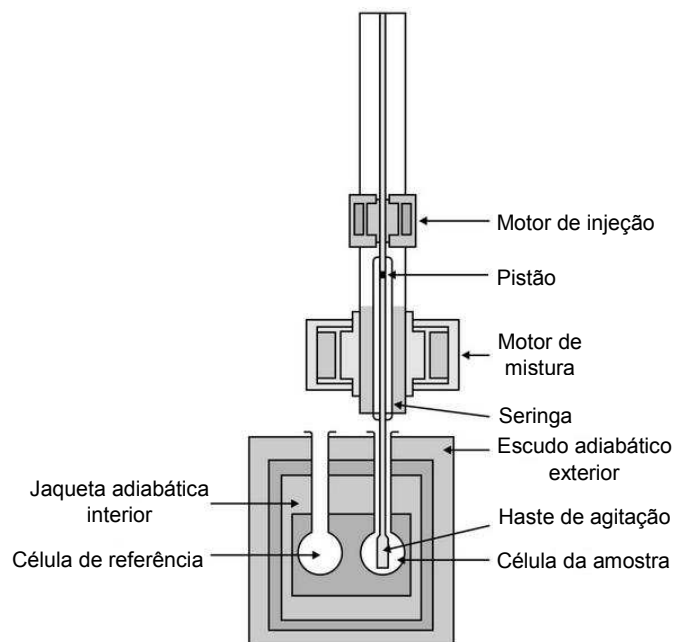


Figura 4 - Esquema interno de um microcalorímetro ITC.

Fonte: HEGYI et al. (2013)

Ao se injetar o agente titulante na célula da amostra ocorre a interação dos seus componentes que pode absorver ou liberar calor, gerando picos de energia, enquanto tais etapas não ocorrem ou ocorrem de forma diferente na célula de referência. Por meio da diferença de energia gasta para manter as duas células na mesma temperatura, pode-se avaliar com grande precisão as trocas de calor devido à interação amostra-titulante, sendo o calor liberado ou absorvido proporcional à quantidade e/ou a intensidade das ligações ou interações. Deste modo, medir a variação de entalpia (ΔH) e, em muitos casos, estimar a constante de afinidade entre as moléculas da amostra e do titulante (K_D) e a estequiometria de reação/interação (n). Com esses dados, pode-se calcular a variação de entropia (ΔS) e a variação de energia livre de Gibbs (ΔG), obtendo-se um perfil termodinâmico completo das interações (Figura 5). Devido a essas características, a microcalorimetria ITC é um dos principais métodos empregados para analisar a interação entre duas moléculas (MALVERN INSTRUMENTS LTD, 2015b; OLIVEIRA, 2012).

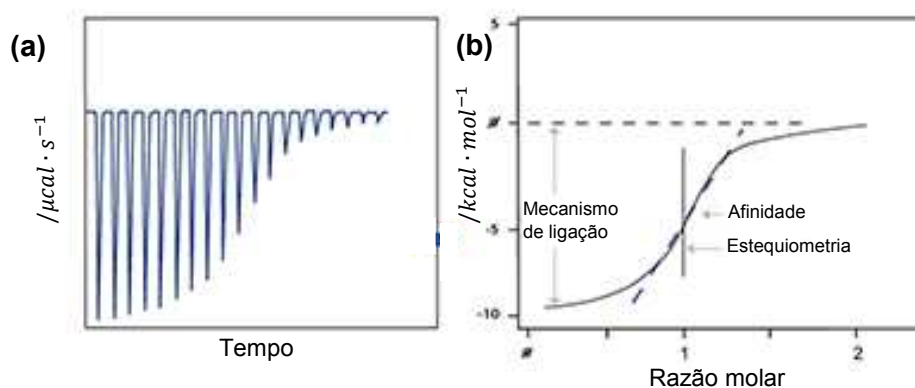


Figura 5 - Termograma de titulação típico apresentado pelo ITC, onde cada pico é referente às trocas de calor de uma injeção (a) e curva da variação da energia em função da razão molar dos ligantes, obtida a partir da integral dos picos do termograma (b).

Fonte: Malvern Instruments Ltd, 2015b.

2.4.3. Espalhamento de luz

O fenômeno do espalhamento de luz se baseia no fato de que quando um feixe de luz colide com matéria, ele pode ser espalhado em outras direções. Dessa maneira, essas moléculas servem como uma “fonte” de luz alternativa, emitindo-a (espalhando). As mudanças da frequência da luz, a distribuição angular, a polarização e a intensidade da luz espalhada são determinadas pelo formato, tamanho e interações moleculares do material. Dessa forma,

o espalhamento de luz permite obter informações sobre a estrutura e a dinâmica molecular do meio (BERNE e PECORA, 2000).

Os pilares do estudo do espalhamento de luz foram postos por Tyndall, em 1869, ao perceber que em uma sala com poeira, um feixe de luz que entrava pela janela tornava-se visível. Em 1871 Rayleigh começou com trabalhos teóricos sobre espalhamento de luz, sendo que em 1899 ele explicou que o céu é azul e o pôr do sol avermelhado devido ao preferencial espalhamento da luz azul pelas moléculas da atmosfera. Outros pesquisadores que também contribuíram nessa área da ciência foram Mie, Debye, Smoluchowski, Einstein e Raman (BERNE e PECORA, 2000; TYNDALL, 1869; STRUTT, 1899).

Os principais tipos de espalhamento de luz são: espalhamento Rayleigh, espalhamento Raman, espalhamento Mie e espalhamento Tyndall. O espalhamento Rayleigh é um tipo de espalhamento elástico (os fótons emitidos pela fonte de luz permanecem com a mesma energia após se chocar com matéria) que ocorre em partículas muito pequenas, da ordem de um décimo do tamanho do comprimento de onda da luz. O campo elétrico da fonte de luz induz a polarização dos elétrons da molécula que espalha a luz aproximadamente como um dipolo elétrico. Esse efeito é mais comum em gases e resulta em um espalhamento uniforme da luz em todas as direções, mas, preferencialmente, para comprimentos de onda menores. O espalhamento Mie é um espalhamento elástico que ocorre de forma similar ao espalhamento Rayleigh, entretanto as partículas possuem a mesma ordem de grandeza do comprimento de onda da luz incidente e o seu espalhamento não é uniforme. O espalhamento Tyndall, também conhecido como efeito Tyndall, é semelhante aos dois espalhamentos anteriores, diferenciando-se pelo tamanho das partículas serem maiores que o comprimento de onda da luz emitida. Esse efeito é mais comum em dispersões coloidais maiores, como emulsões, aerossóis e espumas, e em suspensões. Já o espalhamento Raman é um tipo de espalhamento inelástico (os fótons emitidos pela fonte de luz alteram seu conteúdo de energia após se chocar com matéria) que ocorre quando o fóton emitido pela fonte de luz interage com a molécula, alterando vibrações e rotações intra-moleculares, o que leva ao espalhamento do fóton com energia diferente daquela incidida. (STRUTT, 1871; TYNDALL, 1869; BROWN, 2014; ANDOR TECHNOLOGY LTD, 2015; HARRIS e BERTOLUCCI, 1978).

▪ **Espectroscopia Raman – Determinação do grau de desacetilação do quitosano**

O efeito Raman foi predito por Adolf Smekal em 1923, mas foi primeiramente observado em 1928, por Chandrasekhara Venkata Raman, na Índia. Esse efeito consiste no fato de que ao se incidir um feixe de luz monocromática em uma amostra, parte dos fótons desse feixe interage com suas moléculas, se espalhando com uma energia diferente da emitida, alterando assim sua frequência e comprimento de onda. Dessa maneira, o

espectrômetro Raman identifica os comprimentos de onda da luz espalhada e os quantificam por uma unidade arbitrária de intensidade (SMEKAL, 1923; RAMAN, 1928; SINGH, 2002). Essa técnica, hoje em dia, é amplamente utilizada, como, por exemplo, na detecção de narcóticos e explosivos em aeroportos (VIENNA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, 2012; VOGEL, 2008; MISRA et al., 2012), na caracterização de artefatos arqueológicos (QUINN, 2007), na detecção de fármacos falsificados sem abertura de embalagens (BBC, 2007) e, também, na determinação do grau de desacetilação do quitosano. Zajac et al. (2015) compararam dois métodos de determinação do grau de desacetilação (DD) do quitosano. Um por espectroscopia no infravermelho e outro por espectroscopia Raman, este último desenvolvido por eles. Foram utilizadas seis amostras de quitosano com grau de desacetilação conhecidos (70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % e 95 %). Na Figura 6 a seguir são apresentados os espectros Raman e Infravermelho para as diferentes amostras de quitosano, obtidos pelos autores. Através desses espectros, Zajac e sua equipe notaram que algumas bandas mudaram ligeiramente entre os quitosanos de diferentes DD's, tanto no Raman quanto no Infravermelho. As bandas que alteraram foram $1654\text{ cm}^{-1}/1658\text{ cm}^{-1}$, $1591\text{ cm}^{-1}/1595\text{ cm}^{-1}$ e $936\text{ cm}^{-1}/954\text{ cm}^{-1}$ (Raman/Infravermelho, respectivamente).

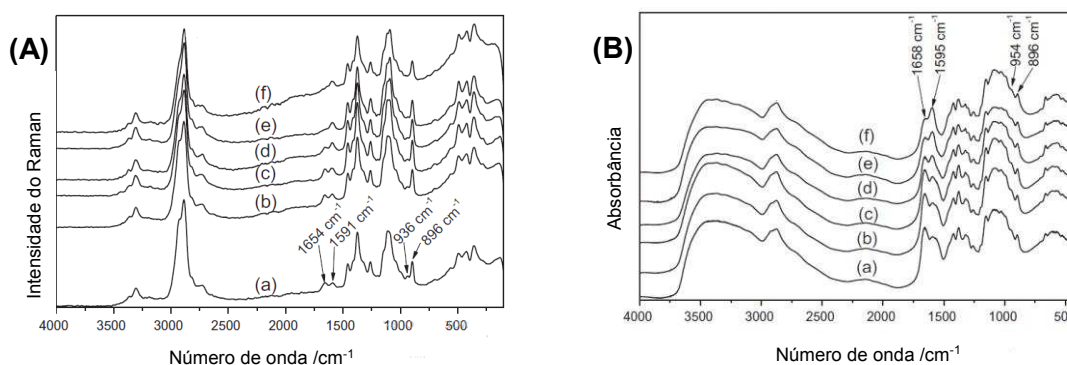


Figura 6 - Espectro Raman (A) e Infravermelho (B) de quitosano com DD = 70 % (a); DD = 75 % (b); DD = 80 % (c); DD = 85 % (d); DD = 90 % (e) e DD = 95 % (f).

Fonte: Zajac et al. (2015)

As bandas que se alteraram para quitosanos com diferentes graus de desacetilação são atribuídas ao estiramento da dupla ligação C=O ($\nu(\text{CO})$), deformação angular do grupo NH_2 no plano (δNH_2) e estiramento (C-N) ou deformação angular (N-H) fora do plano. Em face disso, os autores decidiram comparar a intensidade integral dessas bandas com um padrão interno, uma banda que não se alterou com a variação do DD dos quitosanos. A banda selecionada foi a correspondente ao número de onda 896 cm^{-1} que é atribuída às deformações angulares fora do plano de ligação =C-H. Para obter a intensidade integral dessas bandas no espectro Raman, os autores tiveram que deconvoluir os contornos dos espectros em componentes lorentziana como pode ser visto na Figura 7.

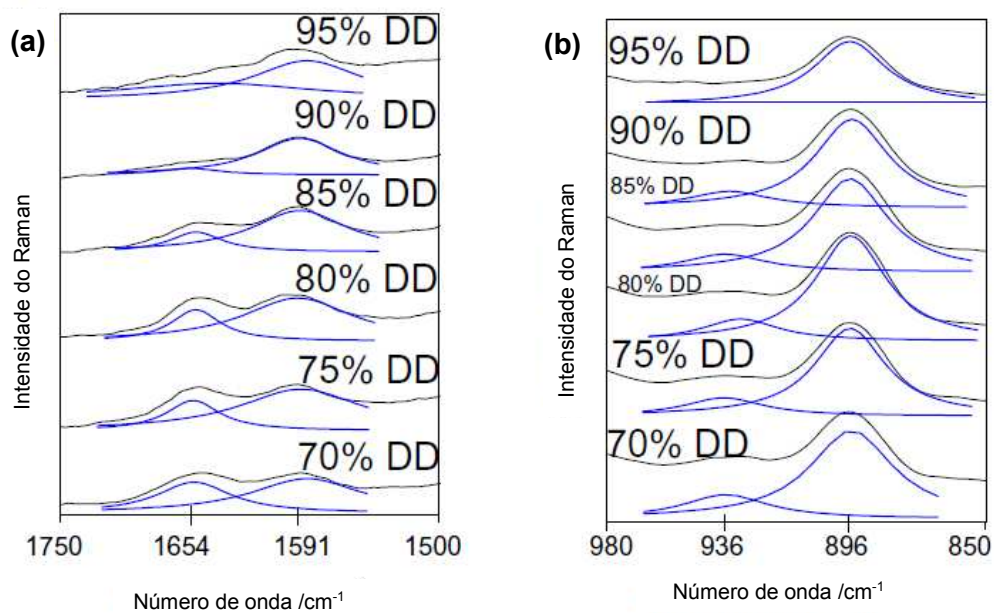


Figura 7 - Deconvolução dos contornos Raman de quitosano nas faixas de: 1500-1750 cm^{-1} (a) e 850-980 cm^{-1} (b) em componentes lorentziana.

Fonte: Zajac et al. (2015)

Com a deconvolução, os autores puderam fazer uma razão entre a intensidade integral de cada banda com a da banda padrão (896 cm^{-1}) e plotaram em um gráfico em função do grau de desacetilação do quitosano (DD), mostrado na Figura 8 a seguir. Com esses gráficos pôde-se fazer a regressão linear dos dados e assim obter uma equação da razão entre bandas em função do grau de desacetilação, tanto para o Raman, quanto para o Infravermelho.

Através dos resultados, os autores observaram que o ajuste de regressão do Raman foi superior ao ajuste do Infravermelho. Essa diferença de ajuste entre as técnicas pode ser devido a variação do teor de água presente nas amostras de quitosano analisadas, informação não publicada pelos autores. A técnica de espectroscopia no infravermelho é muito sensível a presença de água, ao modo que a técnica de espectroscopia Raman, não. Dessa maneira, se os flocos de quitosano analisados pelos pesquisadores tivessem teores de água diferentes entre si, os resultados obtidos pelo infravermelho seriam muito afetados. Isso indica que a espectroscopia Raman é mais recomendada para a determinação do grau de desacetilação do quitosano do que a espectroscopia no Infravermelho, pois não necessita de um controle rigoroso no teor de água das amostras.

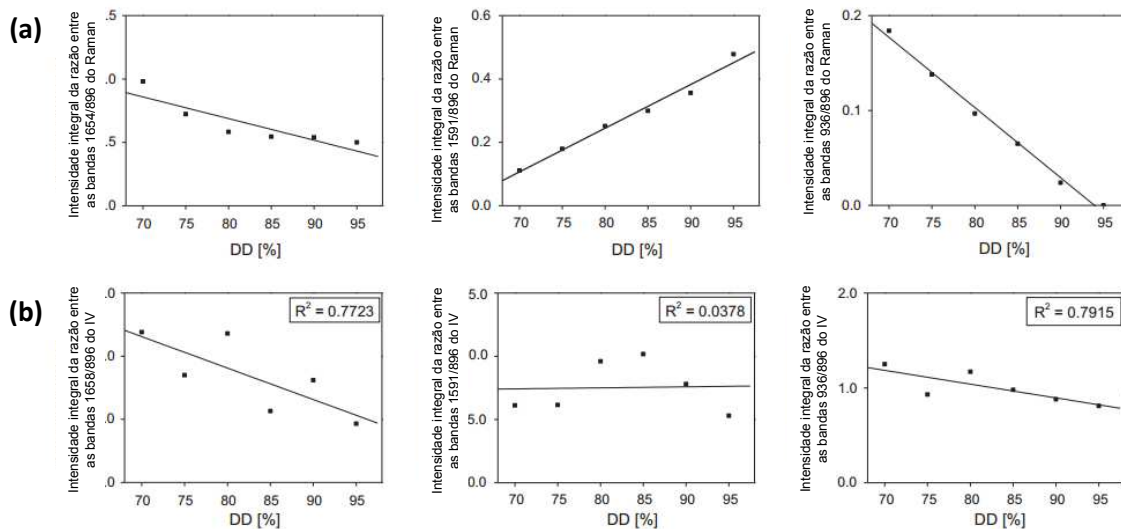


Figura 8 - Relação do grau de acetilação com a razão da intensidade integral das bandas à 1654/896 cm^{-1} , 1591/896 cm^{-1} e 936/896 cm^{-1} para o Raman (a) e 1654/896 cm^{-1} , 1591/896 cm^{-1} e 936/896 cm^{-1} para o infravermelho (b).

Fonte: Zajac et al. (2015)

As equações 16, 17 e 18 a seguir são as equações obtidas para a espectroscopia Raman da razão da intensidade integral das bandas 1654 cm^{-1} , 1591 cm^{-1} e 936 cm^{-1} , respectivamente, com a banda 896 cm^{-1} , em função do grau de desacetilação (DD).

$$A_{1654}/A_{896} = 0,017 \times DD + 2,05 \quad (R^2 = 0.8808) \quad (\text{Eq. 16})$$

$$A_{1591}/A_{896} = 0,014 \times DD - 0,86 \quad (R^2 = 0.9901) \quad (\text{Eq. 17})$$

$$A_{936}/A_{896} = 0,007 \times DD + 0,69 \quad (R^2 = 0.9962) \quad (\text{Eq. 18})$$

Onde A_{1654} , A_{1591} , A_{936} e A_{896} são as intensidades integrais das bandas 1654 cm^{-1} , 1591 cm^{-1} , 936 cm^{-1} e 896 cm^{-1} , respectivamente, e DD é o grau de desacetilação do quitosano.

▪ Espalhamento dinâmico de luz (DLS) – Determinação do potencial ζ

A técnica do espalhamento dinâmico da luz permite a determinação do potencial ζ (zeta) das partículas em suspensão. O potencial ζ é a medida da diferença de potencial elétrico entre o plano de cisalhamento da superfície das partículas e um ponto distante na solução (Figura 9a). Esse valor dá um indicativo sobre a estabilidade de dispersões coloidais. Essa técnica de espalhamento de luz, muitas vezes chamado de espalhamento eletroforético da luz (ELS), diferencia-se do espalhamento dinâmico da luz tradicional pelo fato de que, no DLS, o espalhamento varia devido ao movimento browniano das partículas e, no ELS, o

espalhamento varia devido ao movimento de partículas carregadas em solução devido à aplicação de um campo elétrico variado, como observado na Figura 9b. (IUPAC, 2008; SHAW, 2013; HUNTER, OTTEWILL e ROWELL, 1989)

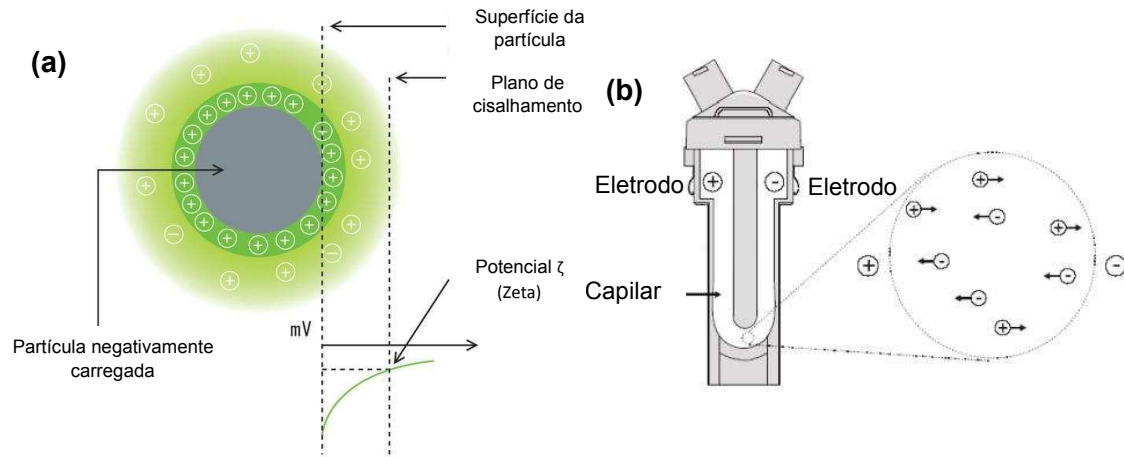


Figura 9 - (a) Esquema de uma partícula carregada. (b) Esquema de uma cubeta para ELS, onde partículas carregadas se movimentam em função do campo elétrico aplicado no meio. Fontes: Shaw, 2013.

O equipamento de DLS mede a velocidade das partículas em função do campo elétrico aplicado, determinando assim a mobilidade eletroforética (Equação 19). A partir dessa mobilidade pode-se determinar o potencial ζ pela equação de Henry (Equação 20) ou pela aproximação de Smoluchowski (Equação 21) (SHAW, 2013; HUNTER, OTTEWILL e ROWELL, 1989).

$$\mu_e = \frac{v}{|\vec{E}|} \quad (\text{Eq. 19})$$

$$\zeta = \frac{\eta \mu_e}{\varepsilon \varepsilon_0 f(\kappa a)} \quad (\text{Eq. 20})$$

$$\zeta = \frac{\eta \mu_e}{\varepsilon \varepsilon_0} \quad (\text{Eq. 21})$$

Em que μ_e é a mobilidade eletroforética, v é a velocidade das partículas, \vec{E} é o campo elétrico aplicado no meio, η é a viscosidade do meio dispersante, em Pa·s, ε e ε_0 são as permissividades no meio dispersante e no vácuo ($\text{C}^2 \cdot \text{N}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$), respectivamente, e $f(\kappa a)$ é a função de Henry.

3. METODOLOGIA

3.1. Instalações

Os experimentos foram majoritariamente conduzidos no Laboratório de Operações e Processos (DTA-UFV). As análises de microcalorimetria foram realizadas no Laboratório de Química Coloidal e Macromolecular (DEQ-UFV), as de potencial ζ no Laboratório de Embalagens (DTA-UFV) e as de espectroscopia Raman no Laboratório de Espectroscopia Raman (DPF-UFV) e no Laboratório de Espectroscopia Raman do Prof. Cristiano Fantini (UFMG).

3.2. Material: equipamentos, reagentes e solventes

No Quadro 5 estão listados os equipamentos empregados nesse estudo e, no Quadro 6, os reagentes e solventes utilizados.

Quadro 5 - Equipamentos utilizados no presente projeto.

Equipamento	Marca	Modelo	País	Precisão
Agitador de soluções do tipo Vortex	Phoenix Luferco	AP 56	Brasil	-
Agitador magnético	Tecnal	TE 0851	Brasil	-
Agitador por hélice	Marconi	MA-039	Brasil	-
Analisador de tamanho e potencial ζ	Malvern	Zetasizer Nano ZS	Inglaterra	0,1 mV
Balança analítica	Shimadzu	AUY220	Japão	1 mg
Banho termostaticado	Tecnal	TE-184	Brasil	1 °C
Banho termostaticado com laterais de acrílico	Schott	CT 52	Alemanha	0,01 °C
Bomba de Vácuo	Marconi	MA-058	Brasil	10 mmHg
Centrífuga	Eppendorf	5430	Alemanha	10 rpm
Condutivímetro	Thermo	Orion 145A+	EUA	1 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$
Densímetro	Schmidt Haensch	EDM 4000	Alemanha	0,1 $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$
Espectrofotômetro UV/Vis	Varian	Cary 50 Probe	EUA	0,001
Filtro de água	Millipore	Direct QUV3	Itália	-
Espectrômetro FT-Raman	Bruker	110/S	Alemanha	-

Equipamento	Marca	Modelo	País	Precisão
Geladeira	Consul	PRATICE 410 Biplex	Brasil	-
Incubadora com temperatura controlada	SPLabor	SP500	Brasil	1 °C
Liofilizador	Terroni	LS3000	Brasil	-
Microcalorímetro	ItcRun	4200	EUA	0,02 W
Potenciômetro	Hanna	HI 2221	EUA	0,1
Ultra freezer	Terroni	VBRTICAL-40	Brasil	1 °C
Viscosímetro capilar	Schott	Cannon- Fenske type n° 513 10	Alemanha	-

Quadro 6 - Material utilizado na execução do projeto.

Material	Descrição	Fornecedor	Lote
Acetato de sódio	Pureza ≥ 99 %.	Cromoline	10335/07
Ácido acético	Pureza $\geq 99,7$ %.	Vetec	1000895
Ácido cítrico	Grau de reagente ACS e pureza $\geq 99,5$ %.	Isofar	131835
Ácido láctico	Pureza ≥ 85 %.	Impex	00907/12
Água deionizada	Resistividade média de 18 M Ω *cm.	MiliQ	-
Filtro de seringa	Diâmetro de 33 mm, membrana de MCE e porosidade de 0,8 μ m.	Millex	R3NA93577
Membrana para filtragem	Diâm. de 45 mm, membrana de ésteres de celulose e porosidade de 0,45 μ m.	Millipore	B9EN72339
Papel filtro quantitativo	Diâm. de 125 mm e teor de cinzas de 0,00009 g.	Unifil	18068.0412
Quitossano	Massa molecular média.	Aldrich	SLBG4282V

Para todos os experimentos utilizou-se apenas um tipo de ácido de cada vez. Nos experimentos comparativos entre ácido cítrico e láctico, as respectivas soluções aquosas foram sempre preparadas com base na concentração molar, de modo a garantir o mesmo número de mol dos ácidos no meio para interagir com uma dada quantidade de quitossano.

3.3. Caracterização preliminar do quitosano

Antes da realização dos experimentos de dispersibilidade, de microcalorimetria de pHmetria, de condutivimetria e de potencial zeta, o quitosano a ser utilizado foi caracterizado com relação ao seu grau de desacetilação e quanto à sua massa molar média, conforme descrito nas duas subseções seguintes.

3.3.1. Estimativa do grau de desacetilação médio

A determinação do grau de desacetilação do quitosano foi feita por espectroscopia Raman, como descrito por Zajac et al. (2015). De forma resumida, através do FT-Raman com laser Nd:YAG, obteve-se o espectro de Raman entre 0-3500 cm^{-1} de um floco de quitosano. Fez-se a deconvolução em componentes lorentziana do contorno do espectro Raman nas faixas 850-980 cm^{-1} e 1500-1750 cm^{-1} , obtendo assim a intensidade integral das bandas 896 cm^{-1} , 936 cm^{-1} , 1591 cm^{-1} e 1654 cm^{-1} . Com a intensidade dessas bandas, calculou-se o grau de desacetilação a partir da média dos resultados das equações 16, 17 e 18.

$$A_{1654}/A_{896} = 0,017 \times DD + 2,05 \quad (\text{Eq. 16}')$$

$$A_{1591}/A_{896} = 0,014 \times DD - 0,86 \quad (\text{Eq. 17}')$$

$$A_{936}/A_{896} = 0,007 \times DD + 0,69 \quad (\text{Eq. 18}')$$

3.3.2. Estimativa da massa molar média

Para se determinar a massa molar média do quitosano, foi utilizada uma abordagem por viscosimetria de dispersões diluídas do biopolímero. Primeiramente, preparou-se 300 mL de 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), descrito como solvente ideal por Kasaai (2007). Preparou-se, então, uma dispersão estoque de quitosano em 150 mL de solução tampão [0,5 $\text{g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$], com agitação por 24 h, para garantir que todo o quitosano adicionado fosse disperso (AMORIM, 2012), sem que restassem partículas sólidas detectáveis a olho nu e o sistema não apresentasse turbidez. Essa solução foi então submetida a filtração a vácuo, com filtro quantitativo. A partir dessa dispersão estoque, foram feitas diluições de forma a se obter cinco concentrações diferentes de quitosano em dispersão [0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 $\text{g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$].

Para se obter o tempo de escoamento no viscosímetro capilar, utilizou-se o volume de 10 mL tanto para a solução tampão, como para todas as dispersões, em banho termostaticado a 25 °C, em cinco replicatas e três repetições. Dos tempos obtidos, subtraiu-se um fator de correção (fornecido pelo fabricante do viscosímetro) referente à energia cinética e a formação de vortex após passagem pelo capilar, nos escoamentos mais rápidos. Calculou-se a viscosidade específica a partir do tempo de escoamento corrigido (equação 11) e, a viscosidade intrínseca, pela média dos valores das equações de Huggins e de Kraemer, equações 12 e 13, respectivamente.

$$\eta_{sp} = \frac{t - t_0}{t_0} \quad (\text{Eq. 11}')$$

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + k_1[\eta]^2 c \quad (\text{Eq. 12}')$$

$$\frac{\ln \eta_r}{c} = [\eta] - k'_1[\eta]^2 c \quad (\text{Eq. 13}')$$

Para se certificar que as concentrações escolhidas para esse experimento de viscosimetria correspondem a fluidos newtonianos, traçou-se um gráfico $\log \eta_{sp} = f(\log(C * [\eta]))$. Se o fluido for newtoniano, esse gráfico é linear (MELLO et al., 2006). Para se determinar as constantes da equação MHS, utilizou-se as equações 14 e 15.

$$a = \left(0,6202 + \frac{0,699x}{0,4806 + x}\right) + [0,003(T - 20)] + 0,06 \cdot C_{ureia} \quad (\text{Eq. 14}')$$

$$\log K \cdot 10^{-5} = -5,7676 \cdot a + 5,9232 \quad (\text{Eq. 15}')$$

Conhecendo-se a viscosidade intrínseca e as constantes da equação MHS, pôde-se determinar a massa molar média viscosimétrica do quitosano pela equação 10.

$$[\eta] = KM^{\varepsilon-1} = KM^a \quad (\text{Eq. 10}')$$

3.4. Dispersões de quitosano em meio aquoso com os ácidos orgânicos

3.4.1. Quantificação do quitosano disperso

O método utilizado nos experimentos para efetuar a quantificação do quitosano disperso foi desenvolvido durante o projeto e baseia-se na absorbância a 285 nm (Abs_{285}) de dispersões de quitosano. Primeiramente, preparou-se 2 soluções ácidas (ácido cítrico ou ácido láctico) na concentração de 100 mM. Em seguida, preparou-se 4 dispersões de quitosano para cada solução ácida, nas concentrações (C) de 0,25; 0,5; 0,75 e 1 g·(100 mL)⁻¹, deixando

sob agitação magnética por 24 horas (AMORIM, 2012). Ao final, foram feitas duas curvas analíticas ($Ab_{S_{285}} = f(C)$), uma para cada ácido, medindo-se a absorvância das soluções ácidas, sem quitosano, e das dispersões de quitosano. Todas as medidas foram feitas com três repetições.

3.4.2. Cinética de dispersão do quitosano

Nesse experimento, estudou-se a cinética de dispersão de cinco gramas de quitosano em 500 mL de solução dos ácidos cítrico ou láctico [concentração inicial de $1 \text{ g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$], com concentrações de ácido iguais a 0 mM, 25 mM, 50 mM ou 100 mM. Esses sistemas foram agitados em agitador de hélice (270 rpm) e a temperatura controlada a 25 °C por banho termostático. O posicionamento da hélice no sistema foi feito como descrito por Kravtchenko et al. (1999), de modo a evitar que grumos aderissem às suas pás, melhorando assim a reprodutibilidade. Foram retiradas 14 alíquotas da dispersão de quitosano nos tempos 30 s; 1 min; 1,5 min; 2,5 min; 5 min; 10 min; 20 min; 30 min; 1 h; 2 h; 3 h; 5,5 h; 7 h e 8 h após o começo da agitação. Assim que retiradas, as alíquotas foram imediatamente filtradas com filtro quantitativo e encaminhadas para quantificação, como descrito na seção 3.4.1. Foram realizadas três repetições para cada sistema.

Avaliou-se o ajuste de três modelos matemáticos para os dados de *Concentração = f(tempo)*: (i) crescimento exponencial de 1ª ordem até valor máximo com 2 parâmetros (equação 3), (ii) crescimento exponencial de 1ª ordem até valor máximo com 4 parâmetros (equação 4) (KRAVTCHENKO et al., 1999) e (iii) crescimento hiperbólico (equação 22):

$$C = C_{\infty}(1 - \exp(-k \cdot t)) \quad (\text{Eq. 3'})$$

$$C = C_A(1 - \exp(-k_A \cdot t)) + C_B(1 - \exp(-k_B \cdot t)) \quad (\text{Eq. 4'})$$

$$C = \frac{C_{max} \cdot t}{k + t} \quad (\text{Eq. 22})$$

Em que C é a concentração de quitosano dispersa no tempo t, C_{max} é a concentração máxima de quitosano dispersível do sistema e k é o tempo necessário para se alcançar a metade da concentração máxima dispersível do quitosano no sistema.

3.4.3. Dispersibilidade máxima do quitosano

Para as concentrações de ácido de 0 mM, 25 mM e 50 mM, pôde-se estimar a dispersibilidade máxima do quitosano a partir das curvas da cinética de dispersão obtidas

conforme descrito na seção anterior, pois com essas concentrações de ácido no meio, o quitosano inicialmente adicionado não se dispersou totalmente.

Para as concentrações de 10 mM e 100 mM de ácido, adicionou-se um excesso de quitosano (1 g e 3 g, respectivamente) e deixou-se agitando por hélice (270 rpm) sob temperatura controlada de 25 °C por 24 horas (AMORIM, 2012). Em seguida, as amostras foram centrifugadas (7200 rpm por 20 minutos), filtradas a vácuo e quando necessário, diluídas para quantificação. Todos os experimentos foram realizados em 3 repetições.

3.5. Variação da entalpia de dispersão do quitosano em meio aquoso com os ácidos orgânicos

Para os experimentos de ITC, primeiramente soluções aquosas dos ácidos cítrico e láctico foram preparadas. Para o ácido cítrico, foram preparadas soluções nas concentrações de 0,9 M e 0,18 M. Para o ácido láctico, foi preparada solução em apenas uma concentração de 0,9 M. Utilizou-se duas concentrações para o ácido cítrico, uma menos concentrada, para ter mais detalhes da variação de entalpia (maior número de pontos) em concentrações do ácido no sistema. Para estas análises o quitosano foi previamente lavado com água deionizada, filtrado (0,45 µm) e liofilizado.

As medidas calorimétricas foram realizadas utilizando um microcalorímetro com uma cela de reação de 2,7 ml (de amostra e de referência) e de sensibilidade de 0,02 µW. As determinações da entalpia de dispersão do quitosano nas soluções ácidas foram realizadas a 25,000 °C; com aparato quimicamente e eletricamente calibrado conforme Da Silva et al. (2008). Em um ensaio, 40 alíquotas de 7 µL da solução ácida 0,9 M (cítrico ou láctico) foram injetadas em uma célula de amostra contendo (i) 2,7 mL de água ou (ii) 2,7 mL de água + 27 mg de quitosano (1 g·100 ml⁻¹). Em outro ensaio, foram injetadas 50 alíquotas de 5 µL de solução de ácido cítrico 0,18 M nas células de amostra contendo (i) ou (ii).

Por meio da integração dos picos de troca de calor para cada injeção (*i*), obtém-se a variação de entalpia ΔH_i (em µJ). Os valores de variação de entalpia molar integrada por injeção *i*, ΔH_{in} (em kJ·mol⁻¹), foram obtidos dividindo ΔH_i (em kJ) pelo número de moles de ácido adicionado, n_i , como mostrado na equação 23. Então, as parcelas de $\Delta \bar{H}_i$ em função da concentração do ácido adicionado foram obtidas e referidas como curvas de entalpia.

$$\Delta \bar{H}_i = \frac{\Delta H_i}{n_i} \quad (\text{Eq. 23})$$

3.6. Condutividade elétrica e pH das dispersões de quitosano, em função da concentração de ácido adicionado

Com o objetivo de avaliar a variação da condutividade elétrica e do pH das dispersões de quitosano, em função da concentração de ácido, primeiramente duas soluções ácidas concentradas (1,8 M) foram preparadas para cada ácido (cítrico e láctico). Em seguida, sob constante agitação magnética, dois sistemas foram preparados: (i) adicionou-se 1 g de quitosano em 100 mL de água; e (ii) apenas 100 mL de água. Para cada sistema foram adicionadas 14 injeções da solução ácida concentrada (cítrico ou láctico) de modo que a concentração do ácido no sistema variou entre 0 e 71,1 mM. Entre cada injeção esperou-se 25 minutos, de modo que o sistema atingisse o equilíbrio. Imediatamente antes de cada injeção mediu-se a condutividade elétrica e o pH dos sistemas.

3.7. Potencial ζ das partículas de quitosano em meio aquoso com os ácidos orgânicos

Para determinação do potencial ζ das partículas de quitosano, primeiramente preparou-se duas soluções ácidas, uma para cada ácido (cítrico e láctico) na concentração de 10 mM. Um grama (1 g) de quitosano foi adicionado em 100 mL de cada solução ácida e colocado sob agitação magnética por 24 horas. As dispersões de quitosano foram centrifugadas (5000 rpm por 5 minutos), filtradas com filtro de papel quantitativo e depois com filtro 0,8 μ M. As análises foram feitas em equipamento de DLS, onde o ângulo de detecção é de 173°. Com o equipamento, obteve-se a mobilidade eletroforética das partículas. Devido à baixa concentração dos ácidos no solvente (10 mM), considerou-se que a permissividade e a viscosidade do solvente eram as mesmas da água pura, dessa maneira, utilizou-se a equação 21 para calcular o potencial ζ das partículas de quitosano.

$$\zeta = \frac{4\pi\eta\mu_e}{\varepsilon\varepsilon_0} \quad (\text{Eq. 21'})$$

3.8. Tratamento estatístico dos resultados

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SAS versão 9.3 para Linux (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) licenciado pela Universidade Federal de Viçosa, exceto o teste t de student, para o qual os cálculos foram feitos diretamente.

Para os experimentos de cinética de dispersão do quitosano, foram feitas análises de regressão para o ajuste de três modelos matemáticos (equações 3, 4 e 22), em que o tempo foi a variável independente e a concentração de quitosano dispersa foi a variável dependente. A falta de ajuste foi analisada para cada um dos modelos e o nível de significância foi de $p < 0,05$. Para a análise da qualidade do ajuste dos modelos, utilizou-se como parâmetros o coeficiente de determinação (Equação 24) e o Erro Percentual Absoluto Médio (Equação 25)

$$R^2 = \frac{SQ_{exp}}{SQ_{tot}} \quad (\text{Eq. 24})$$

$$MAPE = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n \left| \frac{(O_i - P_i)}{O_i} \right| \quad (\text{Eq. 25})$$

Onde SQ_{exp} e SQ_{tot} são as somas de quadrados explicada pela equação e total, respectivamente, n é o número de observações, O_i é o i -ésimo valor observado e P_i é o i -ésimo valor previsto pela equação. A partir dos modelos ajustados para os dados de cinética de dispersão do biopolímero em meios cujas concentrações de ácido foram de 0 mM, 25 mM ou 50 mM, estimou-se a sua dispersibilidade máxima por meio da(s) constante(s) de concentração máxima dispersível do modelo de regressão que melhor se ajustou aos dados experimentais de cinética. O desvio da dispersibilidade máxima, nesses casos, foi obtido pelo intervalo de confiança de 95 % da regressão.

Nos experimentos de dispersibilidade máxima de quitosano, foram feitas análises de regressão considerando-se a concentração do ácido como a variável independente e a concentração de quitosano dispersa como a variável dependente. Foram analisados o coeficiente de determinação (R^2), o Erro Percentual Absoluto Médio (MAPE) e a falta de ajuste da equação obtida na regressão (ao nível de significância de $p < 0,05$).

Para a comparação dos valores de variação de entalpia da dispersão e potencial ζ das partículas, em que as variáveis independentes são qualitativas (tipo de ácido), os resultados foram submetidos a um teste de médias (t de student), considerando nível de significância $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Nesse capítulo serão apresentados e descritos os resultados experimentais obtidos no presente estudo. A discussão será feita em separado, no capítulo seguinte.

4.1. Caracterização preliminar do quitosano

4.1.1. Estimativa do grau de desacetilação médio

Na Figura 10 está apresentado o espectro Raman para números de onda entre 0 e 3500 cm^{-1} da amostra de quitosano utilizada nesse estudo. Em destaque, as bandas a 896 cm^{-1} , 936 cm^{-1} , 1591 cm^{-1} e 1654 cm^{-1} , das quais foi feita a deconvolução em componentes lorentziana para determinação de sua intensidade integral (A_i) (ZAJAÇ et al., 2015).

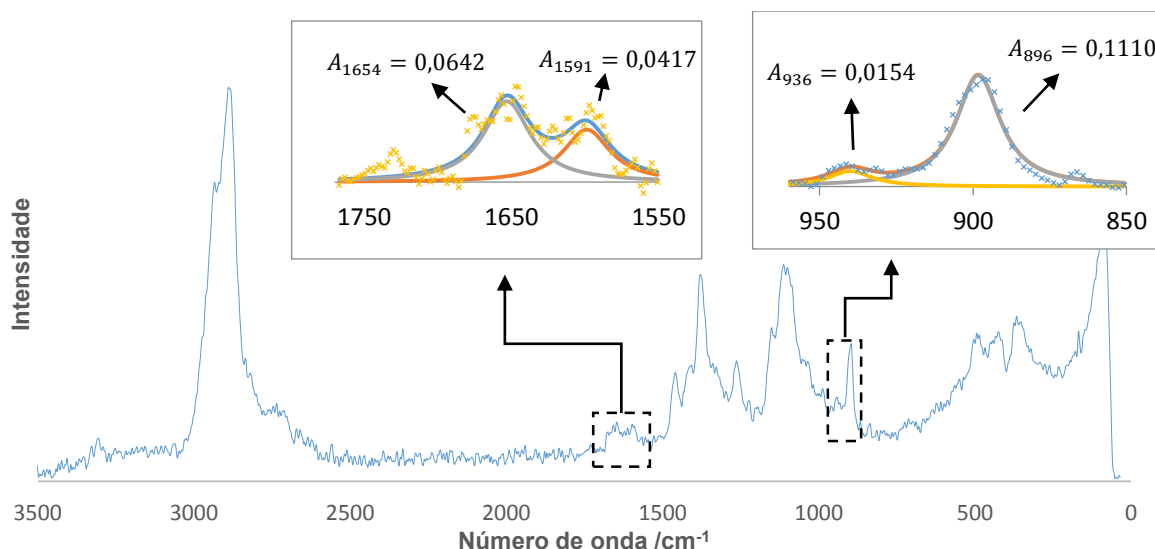


Figura 10: Espectro Raman da amostra de quitosano.

Por meio das equações 16, 17 e 18, pôde-se obter o grau de desacetilação do quitosano, para o qual se obteve os valores de 88,3 %, 78,8 % e 86,6 %, respectivamente. Dessa forma, admitiu-se que o grau de desacetilação dessa amostra de quitosano foi a média dos valores obtidos com as três equações, que é $84,6 \pm 5,1$ %. O fabricante informa que o valor de *DD* do produto está entre 75 % e 85 % (SIGMA-ALDRICH, 2015a); logo, o valor encontrado é compatível com o anunciado pelo fornecedor.

4.1.2. Estimativa da massa molar média

Por meio de ensaios de viscosimetria capilar, mediu-se o tempo de escoamento (\bar{t}) das dispersões de quitosano e, aplicando a equação 11, calculou-se as viscosidades específicas médias ($\bar{\eta}_{sp}$) das dispersões com concentrações de polímero de 0,1 a 0,5 g·(100 mL)⁻¹ (Quadro 7).

Quadro 7 - Tempo de escoamento em viscosímetro e viscosidade específica calculada das dispersões de quitosano em tampão acetato.

	Concentração de quitosano disperso /g·(100 mL) ⁻¹					
	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
\bar{t} /s	66,17 ±0,44	147,71 ±3,11	268,87 ±4,30	494,46 ±9,42	747,85 ±17,94	1.070,96 ±37,14
$\bar{\eta}_{sp}$ (Adimensional)	-	1,23 ±0,02	3,06 ±0,03	6,47 ±0,13	10,30 ±0,18	15,18 ±0,34

Construiu-se, a partir desses dados, em um gráfico $C = f(C)$ e $\ln(\eta_{sp} + 1)/C = f(C)$. Na Figura 11, são apresentados os ajustes de regressão para os dados do gráfico construído, utilizando as equações de Huggins e Kraemer (equações 12 e 13, respectivamente), conforme proposto por Kasaai (2007), para o cálculo de viscosidade intrínseca, $[\eta]$.

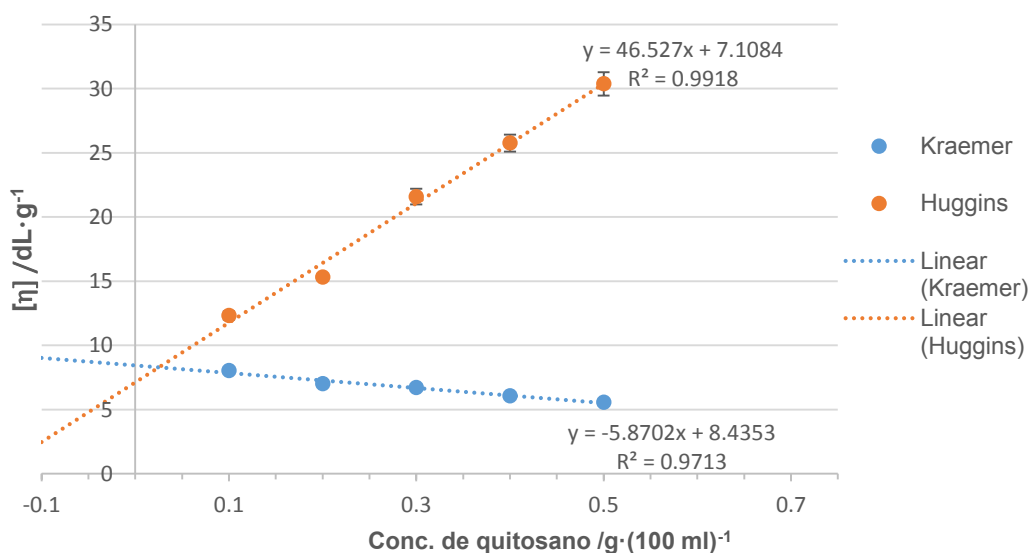


Figura 11 - Ajuste das equações de Huggins e de Kraemer aos dados experimentais.

Pela equação de Huggins, obteve-se o valor de $[\eta]_H = 7,11 \text{ dL} \cdot \text{g}^{-1}$ como viscosidade intrínseca, enquanto que pela equação de Kraemer obteve-se $[\eta]_K = 8,44 \text{ dL} \cdot \text{g}^{-1}$. Pela média desses dois valores calculados, obteve-se $[\eta] = 7,77 \text{ dL} \cdot \text{g}^{-1}$ que foi assumido como o valor de viscosidade intrínseca para dispersões do quitosano utilizado.

Adicionalmente, para verificar se nas concentrações estudadas as dispersões de quitosano apresentavam comportamento newtoniano (condição necessária para estimar a massa molar média do polímero por viscosimetria), construiu-se o gráfico $\log \eta_{sp} = f(\log(c * [\eta]))$. Como pode ser observado pela Figura 12, os dados apresentaram uma evidente tendência linear ($R^2 = 0,995$), o que significa que o comportamento das dispersões foi de um fluido newtoniano (MELLO et al., 2006). Dessa forma, o valor da viscosidade intrínseca pode ser utilizado para se estimar a massa molar média do biopolímero.

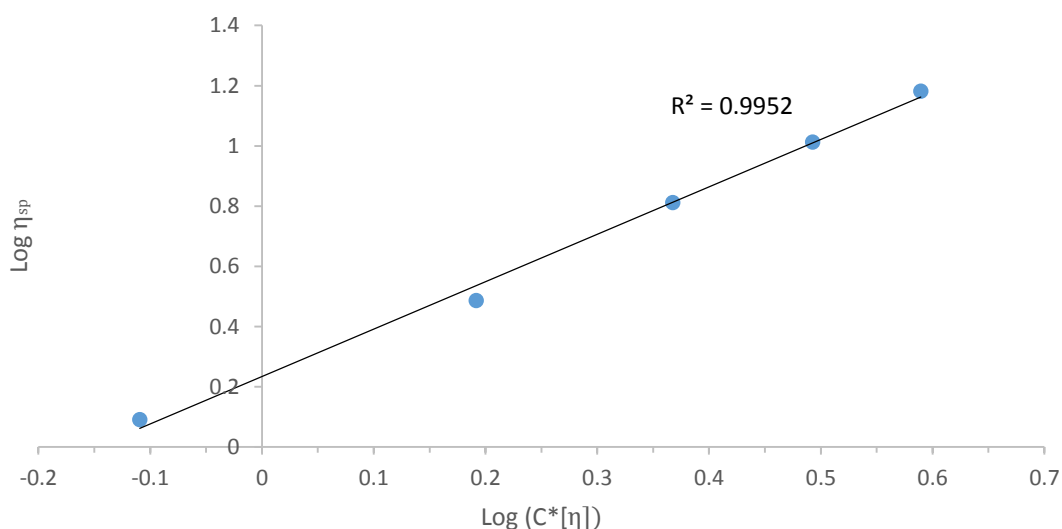


Figura 12 - Aferição do comportamento newtoniano das dispersões de quitosano utilizadas.

Assim, aplicando-se as equações 14 e 15, calculou-se os valores das constantes a (0,93) e k ($3,63 \times 10^{-5} \text{ dL} \cdot \text{g}^{-1}$), da equação MHS (equação 10) e obteve-se como massa molar média viscosimétrica para o quitosano utilizado nesse trabalho o valor de $\bar{M}_V = 540 \text{ kDa}$. De acordo com o fabricante, a massa molar média do composto situa-se entre 190 e 310 kDa, entretanto, apesar de não informado, esse valor deve ser referente a massa molar média numérica (SIGMA-ALDRICH, 2015a; SIGMA-ALDRICH, 2015b). A massa molar média numérica leva em consideração todas as moléculas para ser calculada, enquanto que a viscosimétrica leva em consideração apenas intervalos de massa molar das moléculas, o que acarreta em sensibilidade pelo limite superior. Dessa maneira, não se pode comparar os valores de massa molar média numérica com os de massa molar média viscosimétrica e

esperar que sejam iguais. O que deve ser ressaltado é que a massa molar média viscosimétrica obtida foi superior a massa molar média numérica informada pelo fabricante, como era de se esperar.

4.2. Dispersões de quitosano em meio aquoso com os ácidos orgânicos

4.2.1. Quantificação do quitosano

Para elaboração das curvas analíticas de quantificação, primeiro fez-se uma varredura de absorvância em dispersões com diferentes concentrações de quitosano [0,15; 0,25; 0,4; 0,5 e 1,0 g·(100 mL)⁻¹] com os ácidos cítrico ou láctico (100 mM), variando o comprimento de onda entre 190 e 1100 nm. No UV-Vis, observou-se que a máxima absorvância ocorreu para o comprimento de onda igual a 285 nm (na Figura 13 é mostrado a varredura para o ácido cítrico).

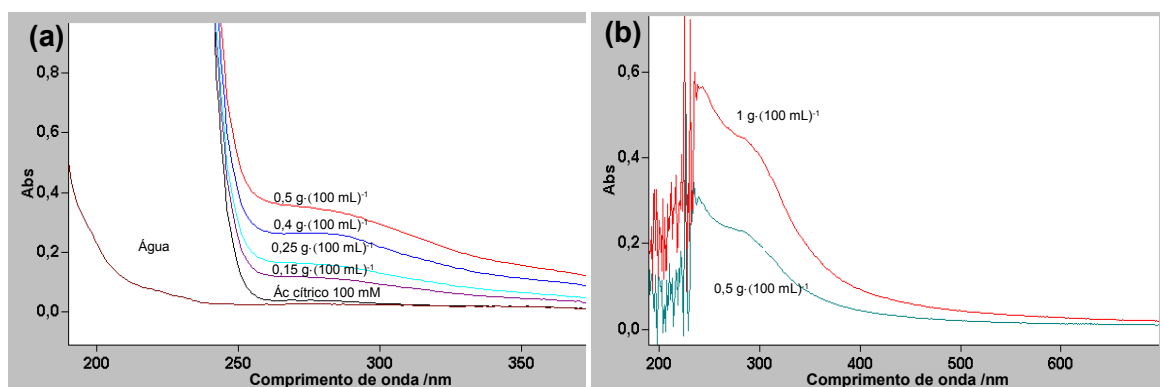


Figura 13 - Varreduras de absorvância no UV-Vis das dispersões de quitosano em 100 mM de ácido cítrico. Varredura das concentrações 0,15; 0,25; 0,4 e 0,5 g·(100 mL)⁻¹ de quitosano (a) e varredura das concentrações 0,5 e 1,0 g·100 ml⁻¹ de quitosano, utilizando ácido cítrico 100 mM como linha de base (b).

Pode-se observar pela Figura 13a que há uma ligeira variação na absorvância das dispersões em função da concentração do quitosano nesse comprimento de onda. Na Figura 13b é mostrado a varredura de absorção das dispersões de quitosano em 0,5 e 1,0 g·(100 mL)⁻¹ usando como linha de base a varredura de uma solução de ácido cítrico.

Com a absorvância máxima definida como 285 nm, construiu-se uma curva analítica para cada ácido (100 mM), utilizando as concentrações de quitosano de 0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 g·(100 mL)⁻¹ em três repetições. Os resultados são apresentados na Figura 14.

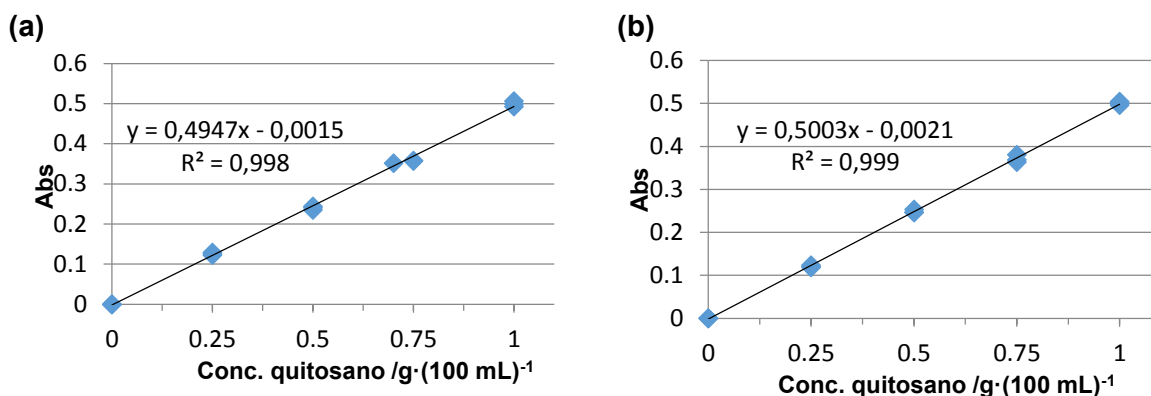


Figura 14 - Construção das curvas analíticas para quantificação no ácido cítrico (a) e láctico (b).

A partir das curvas analíticas, obteve-se as equações 26 e 27, para as dispersões em ácido cítrico e láctico, respectivamente:

$$Abs_{\lambda 285} = 0,4947 \cdot C - 0,0015 \quad (R^2 = 0,998; \text{MAPE} = 2,35 \%) \quad (\text{Eq. 26})$$

$$Abs_{\lambda 285} = 0,5003 \cdot C - 0,0021 \quad (R^2 = 0,999; \text{MAPE} = 1,39 \%) \quad (\text{Eq. 27})$$

Em que $Abs_{\lambda 285}$ é a absorvância da amostra a $\lambda = 285 \text{ nm}$ e C é a concentração de quitosano dispersa no meio, em $\text{g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$. Os valores de $R^2 \approx 1$ indicam um excelente ajuste dessas equações para os dados de $Abs_{\lambda} = f(C)$, no intervalo de $C = 0$ a $1,0 \text{ g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$. Além disso, os valores muito pequenos de MAPE ($< 2,4 \%$ em ambos os casos) indicam que os valores estimados por essas equações são muito próximos dos valores experimentais, para valores de concentração contido no intervalo estudado. Isso é indicador adicional da confiabilidade dessas equações para determinação espectrofotométrica da concentração de quitosano em dispersão.

4.2.2. Cinética de dispersão do quitosano

Para os ensaios de cinética de dispersão, foi necessário quantificar o quitosano efetivamente disperso no meio aquoso acidificado ao longo do tempo, após o início da agitação das misturas. Para isso, foram utilizadas as Equações 26 e 27, apresentadas na seção 4.2.1..

Na Figura 15, a seguir, é apresentada a cinética de dispersão do quitosano nas soluções dos ácidos cítrico (Figura 15a) e láctico (Figura 15b), nas concentrações de 0 mM; 25 mM; 50 mM e 100 mM.

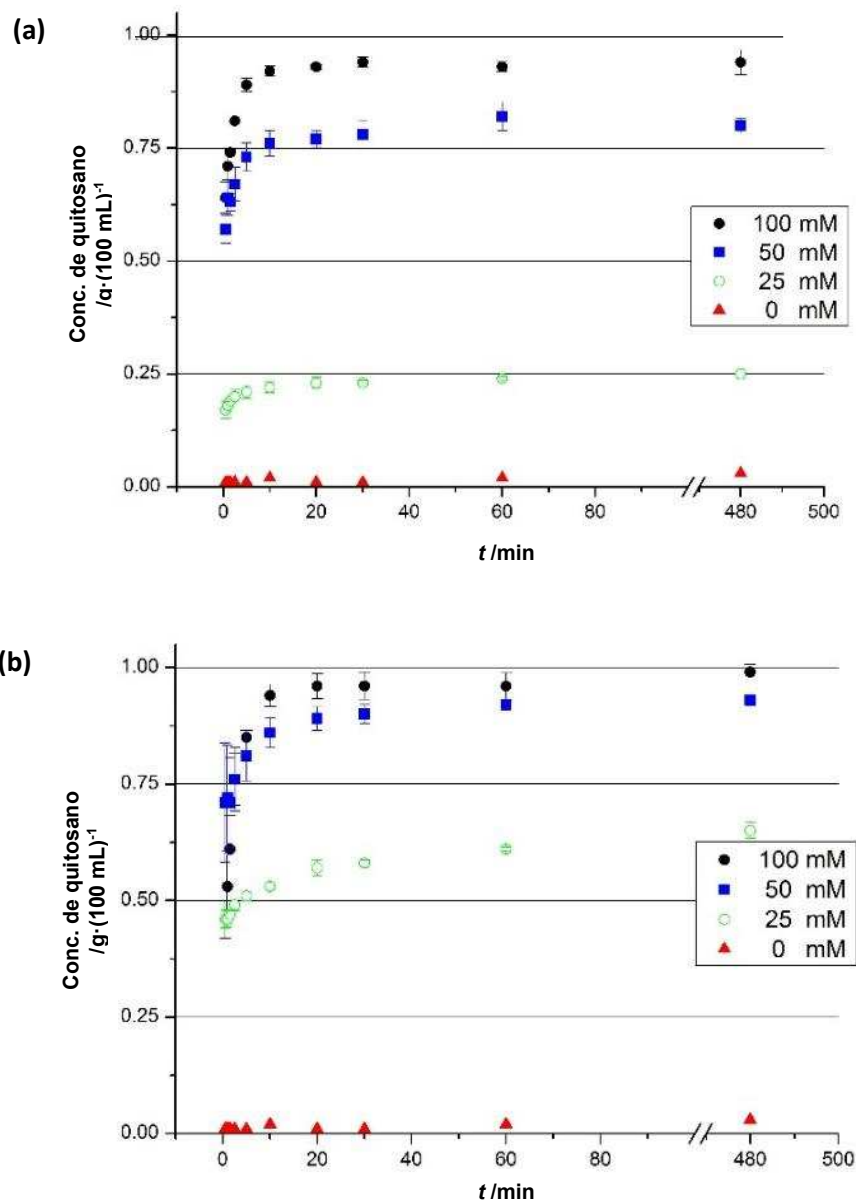


Figura 15 - Variação da concentração de quitosano disperso (C) em diferentes concentrações dos ácidos cítrico (a) e láctico (b), em função do tempo (t).

Conforme esperado, nos casos em que se utilizou apenas água (concentração de ácido = 0), não houve dispersão do biopolímero. Isso confirma o conhecimento prévio de que o quitosano só forma dispersão em meios aquosos na presença de ácidos. Para os sistemas contendo ácido, três modelos matemáticos foram ajustados, a cada curva, a partir dos dados experimentais (Equações 3, 4 e 22). No Quadro 8 são mostrados os parâmetros ajustados desses modelos, bem como o coeficiente de determinação (R^2) e o Erro Percentual Absoluto Médio (MAPE) do ajuste. Para o modelo de crescimento exponencial até valor máximo com

quatro parâmetros, calculou-se também o índice de dispersibilidade (*ID*) do quitosano em cada sistema.

Com base nos valores de R^2 e MAPE, o modelo que melhor se ajustou aos dados de cinética de dispersão foi o modelo de crescimento exponencial até valor máximo com quatro parâmetros (KRAVTCHENKO et al., 1999). Por essa razão, esse modelo será considerado, para ambos os ácidos e nas três concentrações, para as discussões subsequentes.

4.2.3. Dispersibilidade máxima do quitosano

A partir dos dados de cinética de dispersão do quitosano na ausência de ácido e nas concentrações de ácido de iguais a 25 mM e 50 mM, pôde-se determinar a dispersibilidade máxima do biopolímero nessas concentrações, por meio do modelo ajustado (crescimento exponencial até valor máximo com quatro parâmetros). Nesse modelo, a soma das constantes C_A e C_B indica a concentração máxima de quitosano que dispersou no sistema. Nas demais concentrações de ácido (10 mM e 100 mM), a determinação foi feita através da adição de excesso de quitosano no meio e quantificação direta, conforme descrito em 3.4.3. No Quadro 10 são mostradas as quantidades máximas de quitosano que dispersou nas diferentes concentrações dos ácidos cítrico e láctico.

Quadro 8 - Modelos matemáticos ajustados dos dados de $C = f(t)$, sendo C a concentração de quitosano disperso, em $\text{g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$ e t o tempo, em minutos.

Ácido (Concentração)	Hipérbole $C = \frac{C_{max} \cdot t}{k+t}$ (Eq. 22')				Crescimento exponencial até valor máximo (2 parâmetros) $C = C_{\infty}(1 - \exp(-k \cdot t))$ (Eq. 3')				Crescimento exponencial até valor máximo (4 parâmetros) $C = C_A(1 - \exp(-k_A \cdot t)) + C_B(1 - \exp(-k_B \cdot t))$ (Eq. 4')						
	C_{max} $/\text{g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$	k $/\text{min}^{-1}$	R^2	MAPE	C_{∞} $/\text{g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$	k $/\text{min}^{-1}$	R^2	MAPE	C_A $/\text{g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$	k_A $/\text{min}^{-1}$	C_B $/\text{g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$	k_B $/\text{min}^{-1}$	R^2	MAPE	ID
Cítrico (25 mM)	0,24	0,30	0,70	4,8 %	0,23	1,88	0,42	53,0 %	0,19	4,23	0,06	0,04	0,97	3,7 %	76 %
Cítrico (50 mM)	0,79	0,26	0,97	3,2 %	0,77	2,04	0,93	14,0 %	0,61	4,83	0,20	0,15	0,99	2,4 %	75 %
Cítrico (100 mM)	0,94	0,28	0,99	1,9 %	0,91	1,77	0,95	13,7 %	0,60	6,68	0,33	0,39	0,99	1,3 %	65 %
Lático (25 mM)	0,60	0,28	0,92	5,9 %	0,58	2,15	0,85	21,7 %	0,46	7,02	0,17	0,04	0,99	1,8 %	73 %
Lático (50 mM)	0,89	0,23	0,93	4,8 %	0,87	2,45	0,87	11,1 %	0,69	$\frac{67,0}{3}$	0,23	0,11	0,96	3,8 %	75 %
Lático (100 mM)	0,98	0,74	0,95	3,5 %	0,95	0,80	0,88	35,4 %	0,35	$\frac{4,16}{10^5}$	0,61	0,38	0,99	2,9 %	36 %

Quadro 9 - Dispersibilidade máxima do quitosano em diferentes concentrações dos ácidos cítrico e láctico.

Concentração do ácido /mM	Conc. máx. de quit. /g·(100 ml) ⁻¹	
	Ácido cítrico	Ácido láctico
0	0,01 ^a	0,01 ^a
10	0,07 ± 0,01 ^b	0,22 ± 0,01 ^c
25	0,25 ± 0,01 ^d	0,64 ± 0,01 ^e
50	0,80 ± 0,01 ^f	0,92 [*]
100	1,73 ± 0,23 ^g	**

Valores seguidos de letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ao nível de significância $p < 0,05$.

* Não foi possível determinar o intervalo de confiança.

** Não foi possível determinar a dispersibilidade máxima.

No sistema contendo ácido láctico 50 mM não se pôde calcular o desvio padrão da dispersibilidade máxima. Nesse sistema, a variabilidade entre as repetições nos primeiros 10 minutos da cinética de dispersão inviabilizou o cálculo do intervalo de confiança da equação de regressão. No sistema contendo ácido láctico 100 mM não foi possível determinar a dispersibilidade máxima do quitosano, pois a adição de aproximadamente 2,6 g de quitosano levou a formação de um semissólido, o que impossibilitou a centrifugação e filtragem do sistema para remoção do excesso de quitosano sólido, que não estava verdadeiramente disperso. Na Figura 16, a seguir, são mostrados os sistemas obtidos a partir da dispersão de quitosano [$1 \text{ g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$] nas soluções aquosas dos ácidos cítrico ou láctico, nas concentrações de 10, 25, 50 e 100 mM.

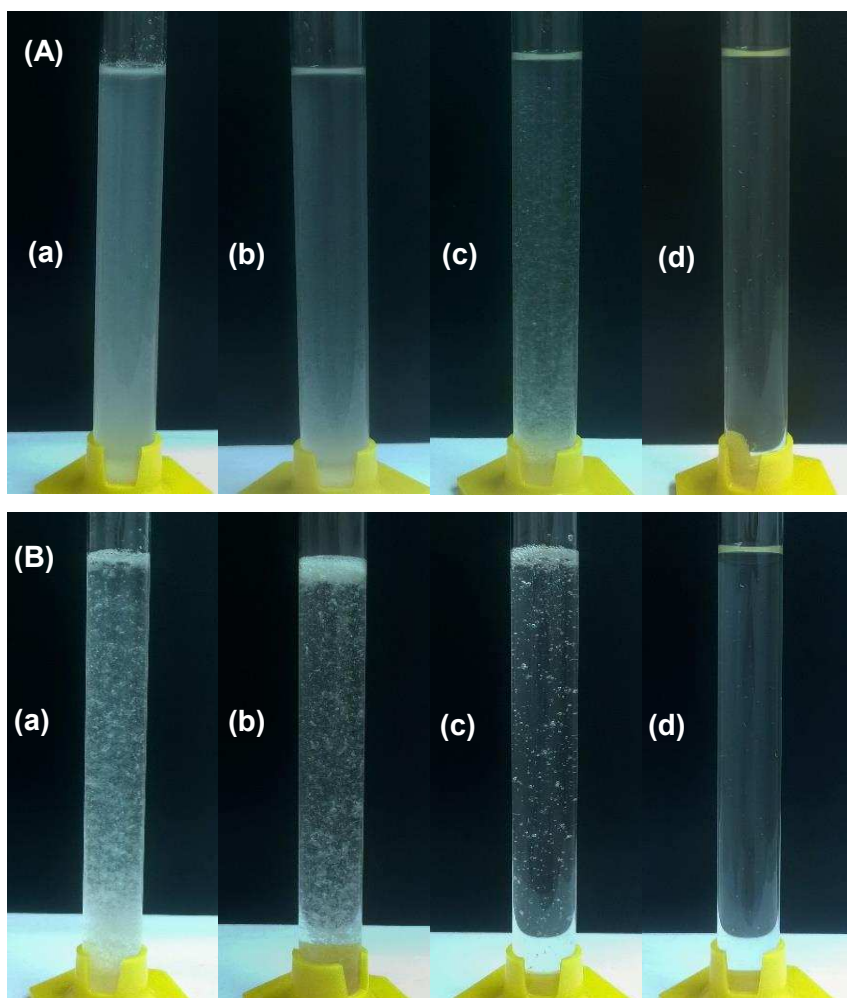


Figura 16 - Dispersão de quitosano [$1 \text{ g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$] nos ácidos cítrico (A) e láctico (B), nas concentrações de 10 mM (a), 25 mM (b), 50 mM (c) e 100 mM (d).

Na Figura 17, é mostrado o sistema obtido na adição de quitosano [$3 \text{ g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$] em solução aquosa de ácido cítrico 100 mM, durante os ensaios de dispersibilidade máxima.

Já na Figura 18, é apresentado o sistema obtido pela adição de quitosano [$3 \text{ g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$] em solução aquosa de ácido láctico 100 mM. Devido ao sistema semissólido gerado, não foi possível determinar a dispersibilidade máxima nessas condições.

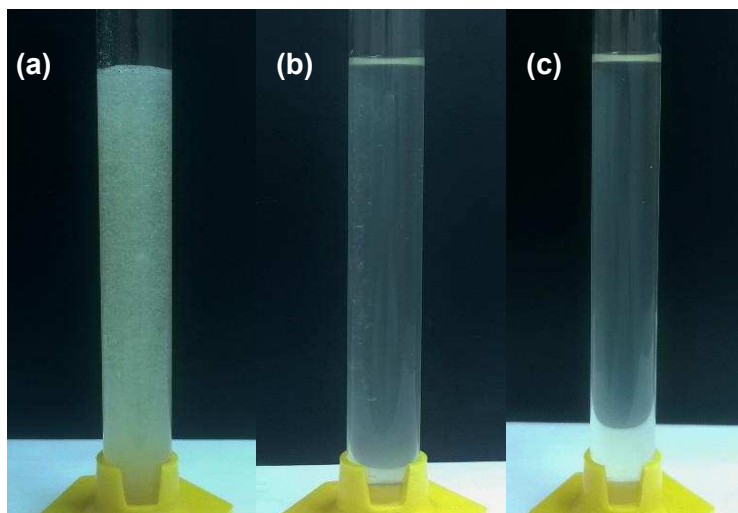


Figura 17 - Dispersão de quitosano [$3 \text{ g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$] em ácido cítrico (100 mM). (a) sistema obtido logo após agitação de 24 h, (b) após centrifugação e (c) após filtragem.

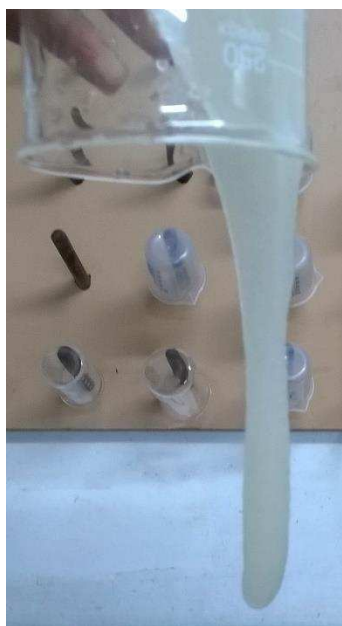


Figura 18 - Dispersão de quitosano [$3 \text{ g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$] em ácido láctico (100 mM).

Pela Figura 19 pode-se observar que tanto o ácido cítrico quanto o ácido láctico parecem apresentar a taxa de variação, dispersibilidade máxima em função da concentração de ácido, de forma linear. A equação de regressão para esses dados são apresentadas abaixo (Equações 28 e 29, para o ácido cítrico e láctico, respectivamente).

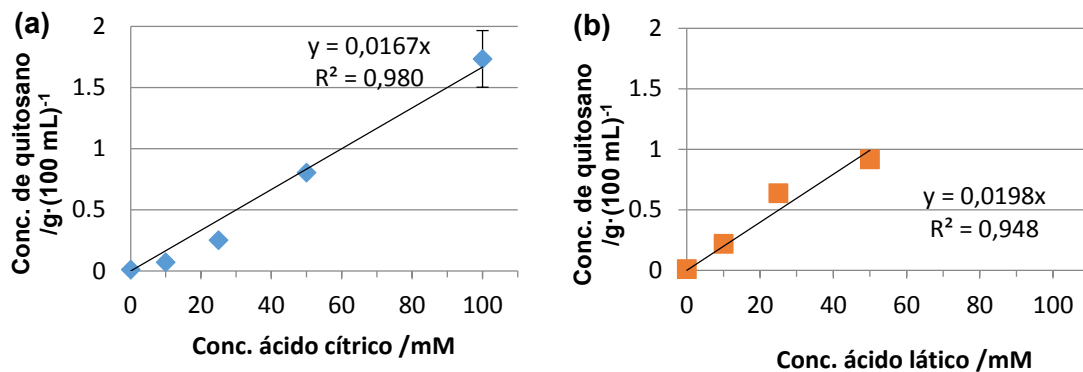


Figura 19 - Dispersibilidade máxima do quitosano em função da concentração dos ácidos cítrico (a) e láctico (b).

$$C_q = 0,0167 \cdot C_a \quad (R^2 = 0,980; \text{MAPE} = 53,0 \%) \quad (\text{Eq. 28})$$

$$C_q = 0,0198 \cdot C_a \quad (R^2 = 0,948; \text{MAPE} = 686,9 \%) \quad (\text{Eq. 29})$$

Onde C_q é a concentração máxima dispersível de quitosano, em $\text{g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$, e C_a é a concentração de ácido, em mM.

4.3. Variação da entalpia de dispersão do quitosano em meio aquoso com os ácidos orgânicos

Nos experimentos de calorimetria de titulação isotérmica (ITC), por meio das injeções de solução ácida concentrada (0,9 M para os dois ácidos e 0,18 M apenas para ácido cítrico) em suspensão de quitosano sólido em água [$1 \text{ g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$], obteve-se picos de fluxo de energia. Na Figura 20a são apresentados os picos de fluxo de energia referentes às injeções de ácido cítrico em suspensão de quitosano e na Figura 20b, são apresentados os picos de fluxo de energia referentes às injeções de ácido láctico.

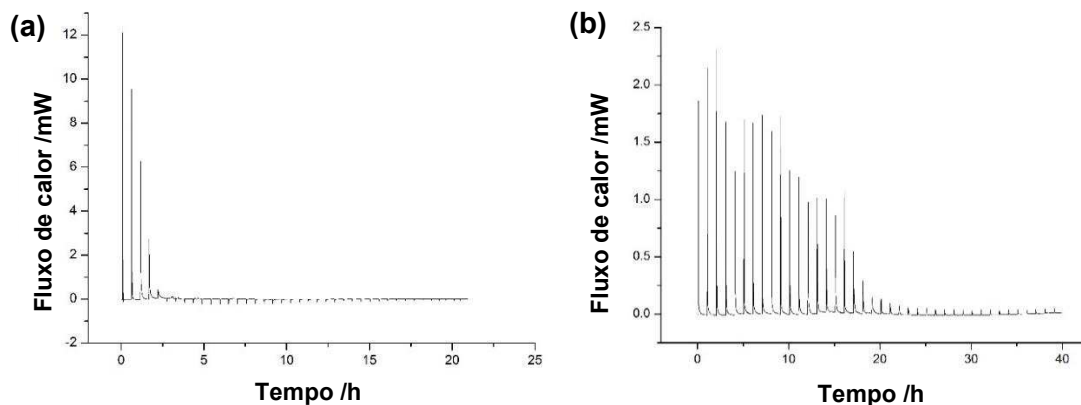


Figura 20 - Fluxo de calor após cada injeção de solução de ácido cítrico (a) e láctico (b) em suspensão de quitosano $1 \text{ g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$.

Para determinar a variação de entalpia do processo de interação do ácido com o quitosano e sua posterior dispersão, os picos foram integrados, tendo-se subtraído os valores correspondentes à diluição do ácido em água. Dessa forma, obteve-se a variação de entalpia nos sistemas em função da concentração (mM) de ácido injetado na cela do calorímetro contendo quitosano + água (Figura 21).

Pela Figura 21a, observou-se que, no início, houve um fenômeno termodinâmico exotérmico na adição de ambos os ácidos. Entretanto, para o ácido cítrico, esse fenômeno se apresentou de forma mais intensa, mas interrompendo-se em uma concentração menor de ácido, quando comparado com o ácido láctico. Para o ácido láctico, esse processo termodinâmico inicial é exotérmico e vai até a concentração de $\approx 52 \text{ mM}$ de ácido adicionado, com $\Delta H \approx -40 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. Acima dessa concentração, praticamente não há mais trocas sob a forma de calor no sistema. Já para o ácido cítrico, é possível ver que há dois processos termodinâmicos distintos. Um primeiro, exotérmico, que acontece entre as concentrações de ácido cítrico 0 e $\approx 17 \text{ mM}$, $\Delta H \approx -120 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, e outro ligeiramente endotérmico, que acontece entre $\approx 17 \text{ mM}$ e $\approx 75 \text{ mM}$ de ácido, $\Delta H \approx 2,5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$.

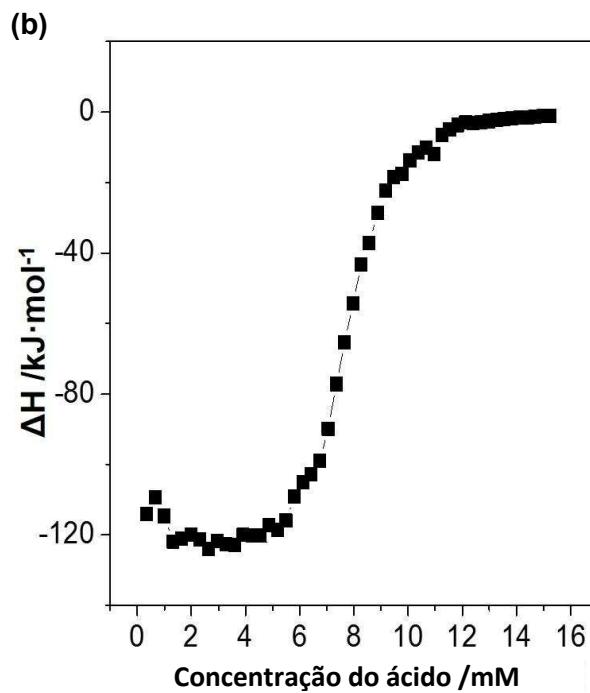
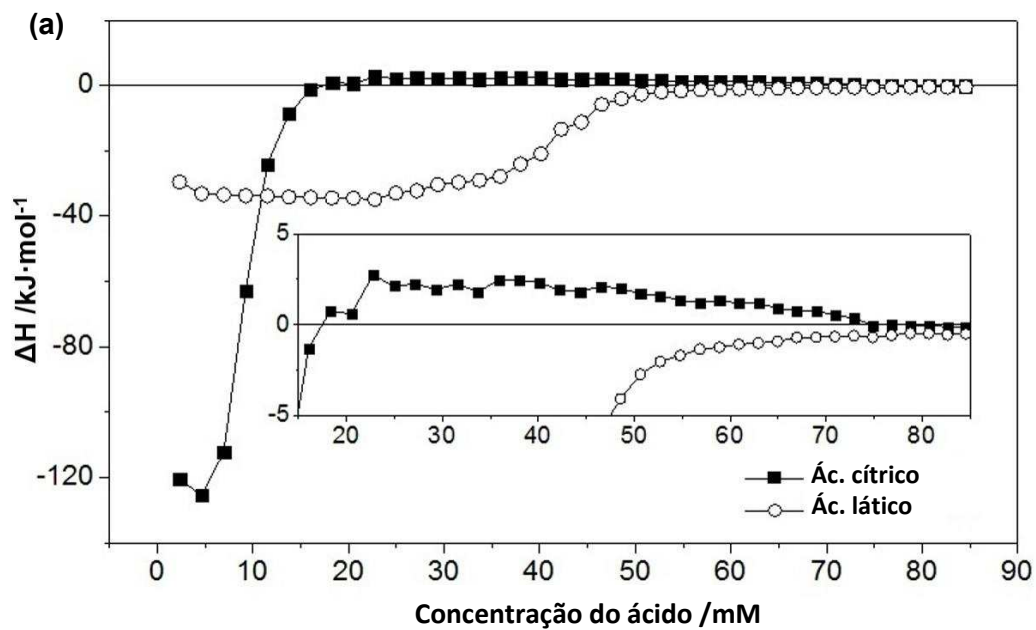


Figura 21 - Variação de entalpia em função da concentração de ácido adicionado em suspensão de quitosano [$1 \text{ g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$]. Em (a) para os ácidos cítrico e láctico e em (b) somente para o ácido cítrico, com concentração na injeção de 0,18 M.

3.4. Condutividade elétrica e pH das dispersões de quitosano, em função da concentração de ácido adicionado

Na Figura 22 são mostrados as variações da condutividade elétrica e do pH da água e de uma suspensão de quitosano em água em função da adição progressiva dos ácidos cítrico ou láctico. Tanto o pH quanto a condutividade elétrica variariam consideravelmente, a uma dada concentração de ácido, entre os sistemas contendo ou não quitosano.

No caso do ácido cítrico (Figura 22a), a condutividade do sistema contendo quitosano fica praticamente constante até que a concentração adicionada de ácido seja ≈ 15 mM, e então começa a aumentar a uma taxa semelhante à condutividade do sistema sem quitosano. Já o pH, na presença de quitosano suspenso, apresentou inicialmente valores próximos da neutralidade e decresce lentamente até $\approx 6,3$, quando a concentração de ácido cítrico foi ≈ 10 mM. Então, passou a decrescer mais acentuadamente até ≈ 20 mM de ácido, sendo o máximo decaimento a ≈ 15 mM. A partir de 20 mM, a taxa de decaimento do pH no sistema contendo quitosano passou a ser semelhante à do sistema contendo apenas água.

Já para o ácido láctico (Figura 22b), em toda a faixa de concentração de ácido avaliada, a condutividade elétrica praticamente não apresenta diferenças entre os sistemas contendo quitosano + água ou apenas água. A diferença mais nítida ocorre entre ≈ 40 e ≈ 50 mM de ácido, no qual a condutividade do sistema com quitosano apresenta uma pequena diminuição comparada ao sistema contendo apenas água. O pH, por sua vez, no sistema com quitosano permanece praticamente constante ≈ 6 até a concentração de ácido láctico no sistema atingir ≈ 40 mM. Entre as concentrações de ≈ 40 mM e ≈ 65 mM de ácido, o pH caiu mais acentuadamente no sistema contendo quitosano, com o pico de decaimento a $\approx 47,5$ mM de ácido láctico. Para concentrações superiores a 65 mM, a taxa de decaimento do pH tendeu a ser semelhante à do sistema contendo apenas água.

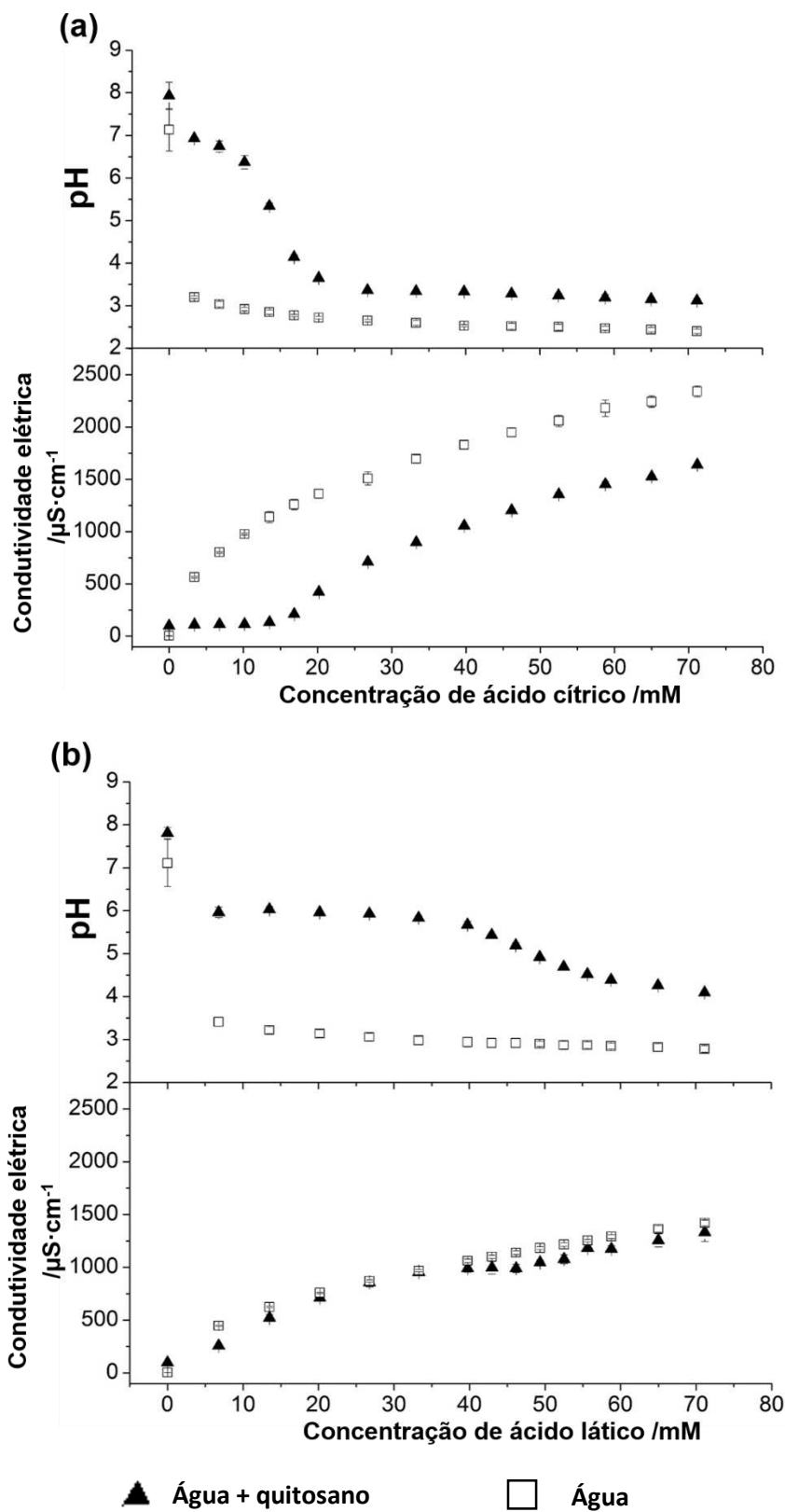


Figura 22 - Condutividade elétrica (símbolos cheios) e pH (símbolos vazios) de sistemas contendo água + quitosano, ou apenas água, em função da concentração dos ácidos cítrico (a) ou láctico (b) progressivamente adicionados.

3.5. Potencial ζ das partículas de quitosano em meio aquoso com os ácidos orgânicos

Na Figura 23 é mostrada a distribuição do potencial ζ das partículas de quitosano dispersas no meio contendo ácido cítrico ou láctico. Como se pode observar, o potencial ζ das partículas de quitosano na presença de ácido cítrico foi, no geral, positivo e menor em módulo do que o observado para o ácido láctico. A distribuição do potencial ζ no ácido cítrico foi mais variada, como pode ser visto pela Figura 23a (picos a ≈ 7 mV, ≈ 35 mV e ≈ 40 mV). Isso sugere que existem partículas de quitosano no meio com diferentes densidades de carga elétrica. Já no ácido láctico (Figura 23b), a distribuição de valores de potencial ζ foi mais uniforme (picos a ≈ 50 mV e ≈ 55 mV), sugerindo que a densidade de carga elétrica nas partículas de quitosano dispersos não apresenta uma variação tão pronunciada quanto a observada no caso dos sistemas contendo ácido cítrico.

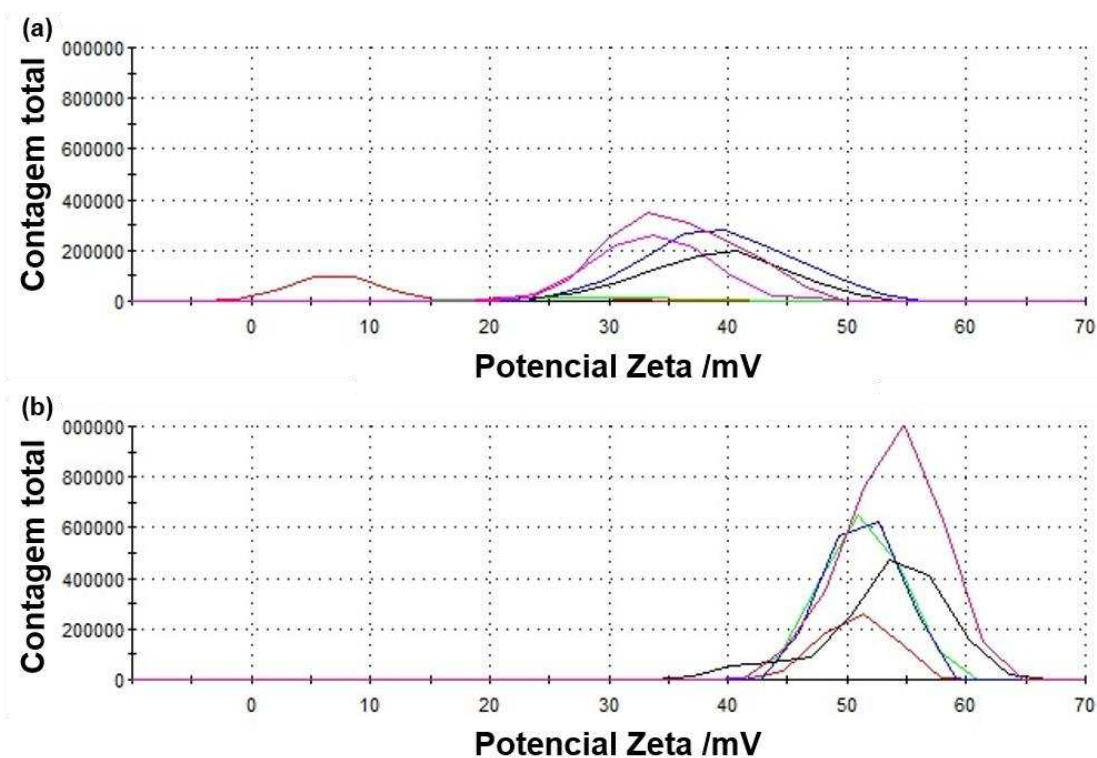


Figura 23 - Potencial ζ das dispersões de quitosano nos ácidos cítrico (a) e láctico (b). Cada replicata é representada por uma cor diferente.

O potencial ζ (zeta) das partículas de quitosano dispersas na concentração de 0,07 e 0,22 $\text{g}\cdot(100 \text{ mL})^{-1}$, nos meios aquosos contendo ácido cítrico ou láctico (10 mM), respectivamente, apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$; teste t). Para o sistema contendo ácido cítrico, o valor foi de $+28,5 \pm 13,1$ mV, ao passo que para aquele contendo ácido láctico, o valor foi de $+52,1 \pm 1,4$ mV.

5. DISCUSSÃO

Como visto anteriormente, nos ensaios para se avaliar a cinética de dispersão do quitosano em meios aquosos contendo ácido cítrico ou ácido láctico, o modelo matemático que melhor se ajustou aos dados experimentais de $Concentração = f(tempo)$, em todos os casos, foi o de crescimento exponencial até valor máximo com 4 parâmetros (Eq. 4). Esse resultado não é surpreendente, pois, durante os ensaios, observou-se que o quitosano formava muitos grumos e aderiu principalmente nas paredes do recipiente utilizado para dispersá-lo. Isso indica que, apesar de soluções acidificadas serem o principal meio para dispersar o quitosano, elas ainda assim não poderiam ser consideradas um “meio dispersante” para o quitosano, conforme a definição de Kravtchenko et al. (1999). De acordo com os modelos ajustados, nota-se que os valores de k_1 (taxa de dispersão do quitosano livre) foram maiores para meios contendo ácido láctico, quando comparados aos obtidos para meios contendo a mesma concentração de ácido cítrico. Isso indica que as soluções de ácido láctico dispersaram o quitosano livre mais rapidamente que as de ácido cítrico, e que a velocidade de dispersão do quitosano livre depende do tipo de ácido utilizado como solvente. Já os valores da constante k_2 (taxa de dispersão do quitosano em grumos) foram muito próximos para ácido cítrico e ácido láctico, em uma determinada concentração, sugerindo que a dispersão do quitosano nos grumos não depende essencialmente do tipo de ácido, mas de sua concentração.

Outro dado obtido a partir dos modelos ajustados é que, nas concentrações de ácido (em ambos os casos) de 25 mM e 50 mM, o ID (índice de dispersibilidade) foi $\approx 75\%$. Nessas concentrações de ácido, nem todo o quitosano inicialmente colocado no meio foi disperso. Entretanto, na concentração de 100 mM, o índice de dispersibilidade foi de 65 % para o ácido cítrico e 36 % para o ácido láctico, indicando que, nessa concentração dos ácidos (na qual o quitosano inicialmente adicionado foi totalmente disperso), a formação de grumos foi mais pronunciada no meio com ácido láctico. Isto está de acordo com o que foi visualmente percebido durante os experimentos (Figura 16). Uma explicação plausível para essa observação é a formação de camadas mais viscoelásticas na superfície dos grumos, quando o quitosano está presente com ácido láctico 100 mM.

Nos experimentos de dispersibilidade máxima, mostrou-se que em meios aquosos contendo ácido láctico, o quitosano se dispersou mais, quando se compara com meios com a mesma concentração de ácido cítrico. Esse resultado contraria o que foi enunciado por Pillai, Paul e Sharma (2009), segundo os quais para dispersar o quitosano, deve-se ter um número de H^+ livres no meio no mínimo suficiente para protonar todos os grupos amino do biopolímero.

Entretanto, cada molécula de ácido cítrico possui 3 grupos carboxílicos ($pK_{a1} = 3,15$; $pK_{a2} = 4,77$; $pK_{a3} = 6,40$), enquanto a molécula de ácido láctico possui apenas um ($pK_a = 3,85$). Dessa forma, em uma mesma concentração molar, o ácido cítrico pode protonar mais grupos amino, fato esse que, em teoria, levaria à maior dispersão do quitosano, o que não ocorre. Em virtude disso, presume-se que haja algum outro fenômeno, em escala molecular, que limite a dispersão do quitosano na solução de ácido cítrico, mesmo com seus grupos amino protonados.

As análises microcalorimétricas (ITC) reforçaram essa hipótese. Foram determinadas as variações da entalpia, em função da concentração molar de ácido adicionado, à medida que ocorria a protonação dos grupamentos $-NH_2$ do quitosano sólido suspenso em água e a sua posterior dispersão no meio. Na Figura 21, pode-se observar que, no início, a adição de ácido leva a uma evidente liberação de energia na forma de calor (fenômeno exotérmico) e atinge o zero nas concentrações de ácido aproximadas de 17 mM para o ácido cítrico e 52 mM para o ácido láctico. Considerando que, no equilíbrio, a quase totalidade dos hidrogênios ionizáveis das moléculas dos ácidos é de fato liberada, essas concentrações estão próximas daquelas em que 1 g de quitosano (com grau de desacetilação $\approx 84,6\%$) estaria com todos os seus grupamentos amino protonados [17,3 mM para o ácido cítrico e 46,3 mM para o ácido láctico]. Para o ácido láctico, esse valor também está muito próximo da concentração na qual $1 \text{ g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$ de quitosano estaria totalmente disperso (50,5 mM), de acordo com a equação 29. Dessa forma, para o ácido láctico, pode-se concluir que o quitosano estará totalmente disperso quando todos os seus grupos amino estiverem protonados, corroborando Pillai, Paul e Sharma (2009). Entretanto, para o ácido cítrico, ainda considerando $1 \text{ g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$ de quitosano, todos os grupos aminos já estariam teoricamente protonados após a adição de ácido até a concentração de 17,3 mM, mas a dispersibilidade máxima é observada apenas na concentração de 61,9 mM (equação 28). Em outras palavras, a maior variação da dispersibilidade máxima do quitosano ocorre com variação positiva de entalpia (entre 17 mM e 75 mM de ácido adicionado), indicando que a protonação das amins (0 à 17 mM) não é suficiente para levar à dispersão do polímero e que, possivelmente, algum efeito entrópico também esteja atuando.

Uma melhor compreensão desse fenômeno que interfere na dispersão do quitosano em ácido cítrico pode ser obtida quando se inclui uma análise dos resultados de condutivimetria, em função da concentração do ácido (Figura 22). O comportamento da variação de condutividade elétrica foi totalmente diferente entre os sistemas com ácido cítrico ou láctico. Para o ácido láctico, houve poucas diferenças da condutividade elétrica na presença ou não de quitosano no meio. Em soluções ácidas, o melhor condutor de eletricidade é o íon

H⁺, apesar de que o contra-íon ácido também é um bom condutor. Na presença de quitosano, a maior parte dos H⁺ do ácido láctico vai protonar os grupos amina do quitosano e, dessa forma, pode ser surpreendente à primeira vista que a condutividade elétrica do meio na presença e na ausência de quitosano sejam próximas. Esse fato pode ser atribuído ao efeito de condução dos íons lactato (negativamente carregados) pela cadeia do quitosano (positivamente carregado). Essa condução dos íons pela cadeia aumenta a mobilidade dos íons lactato, acarretando no aumento da condutividade elétrica instrumentalmente medida. Tal efeito também explicaria a leve queda da condutividade do ácido láctico entre 40 e 50 mM. Nessa faixa de concentração de ácido, os grupamentos amino do quitosano estão quase todos protonados, como já mencionado. Dessa forma, sem novos sítios de interação, a movimentação dos íons lactato fica limitada, o que resulta na condutividade elétrica quase constante nessa faixa. Após 50 mM de ácido láctico, praticamente todos os -NH₂ já estão protonados e, assim, tanto o H⁺ quanto o íon lactato liberados pelo ácido passam a aumentar a condutividade elétrica novamente, como em um sistema só com água. Já para o ácido cítrico, a condutividade do sistema aumentou rapidamente no meio com água; entretanto, na presença de quitosano a condutividade praticamente não se altera até que a concentração de ácido $\approx 15,7$ mM, valor este próximo daquele em que todas as aminas do quitosano estariam protonadas, como já mencionado. Dessa maneira, a constância da condutividade elétrica na presença de quitosano indica que, até a concentração de 15,7 mM do ácido cítrico, tanto o íon H⁺ quanto o contra-íon citrato praticamente não estão livres na solução para conduzir eletricidade. Os íons H⁺, naturalmente, estão protonando os grupos amins do quitosano; entretanto, a indisponibilidade do citrato em solução não seria esperada. Isso pode indicar que:

- (1) Os ânions citrato fazem interações cruzadas entre as cadeias de quitosano por meio dos seus grupos carboxílicos negativamente carregados, ou
- (2) Os ânions citrato estão aderidos à dupla camada elétrica em torno das partículas de quitosano.

Contudo, pelos resultados das análises microcalorimétricas, o fenômeno (1) é muito pouco provável, pois essas interações cruzadas teriam levado a maiores variações de entalpia durante a adição de ácido cítrico, o que não foi experimentalmente observado. A diferença que existe na variação de entalpia durante a protonação do quitosano pelo ácido láctico (≈ -40 kJ·mol⁻¹) e pelo ácido cítrico (≈ -120 kJ·mol⁻¹) se deve ao fato de o último ácido possuir três vezes mais H⁺. Em face disso, torna-se mais plausível a hipótese (2), de que o íon citrato está fazendo parte da dupla camada elétrica das partículas de quitosano.

Por fim, para fazer uma verificação adicional dessa hipótese, determinou-se o potencial ζ das partículas de quitosano dispersas em soluções aquosas de ambos os ácidos. Para isso, escolheu-se a concentração de 10 mM para os ácidos, pois o ácido cítrico provavelmente estaria tri-desprotonado e, assim, na dupla camada elétrica do quitosano, blindando suas cargas. Como pode ser visto pela Figura 23, realmente o potencial ζ das partículas do quitosano, em ácido cítrico ($\approx 28,5$ mV), permaneceram positivos, mas foram significativamente ($p < 0,05$) menores em módulo do que em ácido láctico ($\approx 52,1$ mV). Assim, muito provavelmente o ácido cítrico fica preso na dupla camada elétrica, atenuando a carga positiva das partículas de quitosano, o que diminui a repulsão eletrostática entre elas, desfavorecendo assim a sua dispersão no meio.

6. CONCLUSÕES

A dispersibilidade do quitosano em meio aquosos contendo apenas ácidos orgânicos não depende somente do valor ajustado do pH do meio, mas também do ácido utilizado para fazer esse ajuste.

Para uma mesma concentração de quitosano é necessária uma menor concentração de ácido cítrico em solução para protonar todos os grupos amino, comparado ao ácido láctico. Entretanto, isso não acarreta em melhor dispersibilidade de quitosano em soluções de ácido cítrico.

Pelos ensaios de condutivimetria das soluções de ácido cítrico, deduziu-se que, enquanto todo quitosano não estiver protonado, a condutividade do meio permanece constante, o que indica que tanto o H^+ liberado pelo ácido quanto o íon citrato resultante não permanecem livres no seio da solução. Em face disso, levantou-se a hipótese de que o íon citrato ficaria retido na dupla camada elétrica das partículas de quitosano, "blindando" parte da carga elétrica positiva dos grupos amino protonados.

Isso foi corroborado pelos resultados de medidas de potencial ζ (zeta) das partículas de quitosano em uma solução aquosa de ácido cítrico e de ácido láctico, em uma mesma concentração de ácido: mesmo no sistema com ácido cítrico, no qual mais grupos amino do quitosano estão protonados, o potencial ζ , ainda assim, se apresentou menor em módulo que no sistema contendo ácido láctico. Tal fato sustenta a hipótese de que os ânions citrato migram para a dupla camada elétrica das partículas de quitosano.

O fato de o íon citrato migrar para a dupla camada elétrica, blindando parte das cargas positivas do quitosano, e conseqüentemente diminuir a repulsão eletrostática intra- e inter-cadeias, explica a redução da velocidade de dispersão e da dispersibilidade máxima desse biopolímero nos meios contendo ácido cítrico, quando comparado ao ácido láctico.

7. REFERÊNCIAS

- AMORIM, M.L. Comportamento reológico do quitosano em meio aquoso contendo ácidos orgânicos alimentares. 34 f. Relatório final iniciação científica - PIBIC/CNPQ, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. (2012).
- ANDOR TECHNOLOGY LTD. **Scattering of Light**: An overview of the various forms of light scattering. Disponível em: <<http://www.andor.com/learning-academy/scattering-of-light-an-overview-of-the-various-forms-of-light-scattering>>. Acesso em: 01 jul. 2015.
- ARAÚJO, E.A.; ANDRADE, N.J.; CARVALHO, A.F.; RAMOS, A.M.; SILVA, C.A.S.; SILVA, L.H.M. Aspectos coloidais da adesão de micro-organismos. **Química Nova** 33 (2010) 1940-1948.
- ASSIS, O. B. G. Alteração do caráter hidrofílico de filmes de quitosana por tratamento de plasma de HMDS. **Química Nova** 33 (2010) 603-606.
- ATKINS, P.; PAULA, J. **Physical Chemistry**. 9. ed. New York: W. H. Freeman And Company (2010) 1060 p.
- BALAN, V.; VERESTIUC, L. Strategies to improve chitosan hemocompatibility: A review. **European Polymer Journal** 53 (2014) 171-188.
- BASTOS, D.S.; BARRETO, B.N.; SOUZA, H.K.S.; BASTOS, M.; ROCHA-LEÃO, M.H.M.; ANDRADE, C.T.; GONÇALVES, M.P. Characterization of a chitosan sample extracted from Brazilian shrimps and its application to obtain insoluble complexes with a commercial whey protein isolate. **Food Hydrocolloids** 24 (2010) 709-718.
- BBC. **Fake drugs caught inside the pack**: A new technique can trace counterfeit drugs while they are still in their packs, UK government scientists say. (2007). Disponível em: <<http://news.bbc.co.uk/2/hi/health/6314287.stm>>. Acesso em: 15 jul. 2015.
- BERNE, B.J.; PECORA, R. **Dynamic Light Scattering**: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics. Courier Corporation (2000) 376 p.
- BONNAUD, M.; WEISS, J.; MCCLEMENTS, D.J. Interaction of a Food-Grade Cationic Surfactant (Lauric Arginate) with Food-Grade Biopolymers (Pectin, Carrageenan, Xanthan, Alginate, Dextran, and Chitosan). **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 58 (2010) 9770-9777.

BOONSONGRIT, Y.; MUELLER, B.W.; MITREVEJ, A. Characterization of drug–chitosan interaction by ¹H NMR, FTIR and isothermal titration calorimetry. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** 69 (2008) 388-395.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução no 18, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos, constante do anexo desta portaria. (1999). Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/815ada0047458a7293e3d73fbc4c6735/RESOLUCAO_18_1999.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 21 jun. 2015.

BREU, F. O. M. S.; CAVALCANTE, L. G.; DOUDEMANT, P. V.; CASTRO, A. M.; NASCIMENTO A. P. Propriedades e características da quitosana obtida a partir do exoesqueleto de caranguejo-uçá utilizando radiação de microondas. **Polímeros** 23 (2013) 630-635.

BROWN, A.J. Spectral bluing induced by small particles under the Mie and Rayleigh regimes. **Icarus**. 239 (2014) 85-95.

CAO, L.; WERKMEISTER, J. A.; WANGA, J.; GLATTAUER, V.; McLEAN, K. M.; LIU, C. Bone regeneration using photocrosslinked hydrogel incorporating rhBMP-2 loaded 2-N, 6-O-sulfated chitosan nanoparticles. **Biomaterials** 35 (2014) 2730-2742.

CHANG, Y.; MCLANDSBOROUGH, L.; MCCLEMENTS, D.J. Interaction of cationic antimicrobial (ϵ -polylysine) with food-grade biopolymers: Dextran, chitosan, carrageenan, alginate, and pectin. **Food Research International** 64 (2014) 396-401.

CHIEN, P.-J.; SHEU, F.; LIN, H.-R. Coating citrus (Murcott tangor) fruit with low molecular weight chitosan increases postharvest quality and shelf life. **Food Chemistry** 100 (2007) 1160-116.

CHOI, C.; KIM, W.-S.; PARK, Y. H.; PARK, S.-C.; JANG, M.-K.; NAH, J.-W. Water-soluble chitosan and herbal honey compound alleviates atopic dermatitis-like lesions in NC/Nga mice. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry** 20 (2014) 499-504.

CUI, Z.; BEACH, E. S.; ANASTAS, P. T. Modification of chitosan films with environmentally benign reagents for increased water resistance. **Green Chemistry Letters And Reviews** 4 (2011) 35-40.

DAMIAN, C.; BEIRÃO, L. H.; FRANCISCO, A.; ESPÍRITO SANTO, M. L. P.; TEIXEIRA, E. Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. **Alimentos e Nutrição** 16 (2005) 195-205.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. ARTMED (2010) 900 p.

DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloids**, 17 (2003) 25-39.

DUARTE, C. M. G. Caracterização Químico-Física de Novos Polímeros Estabilizantes para Formulações da Indústria de Cosméticos. 2011. 124 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade de Coimbra, Coimbra (2011).

DUMITRIU, S. (Ed.). **Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility**. 2. ed. CRC Press (2004) 1224 p.

ECKFORD, P.D.W.; SHAROM, F.J. The reconstituted Escherichia coli MsbA protein displays lipid flippase activity. **Biochemical Journal** 429 (2010) 195-203.

EINSTEIN, A. Berichtigung zu meiner Arbeit: Eine neue Bestimmung der Molekldimensionen. **Annals of Physics** 339 (1911) 591–592.

EINSTEIN, A. Eine neue Bestimmung der Molekldimensionen. **Annals of Physics** 324 (1906) 289–306.

FAO. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Report of the 25th session of the second session of the *ad hoc* codex intergovernmental task force on fruit and vegetable juices. (2003).

FAO. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Report of the 22th session of the codex committee on food additives and contaminants. (1991).

FAO. **Appendix II – World fishery production: estimated value by groups of species**. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/fi/stat/summary/appllybc.pdf>>. Acesso em: 15 jun. 2015.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Roma, 2014. 223 p.

FERREIRA, J.A.; LENNARTSSON, P.R.; EDEBO, L.; TAHERZADEH, M.J. Zygomycetes-based biorefinery: Present status and future prospects. **Bioresource Technology** 135 (2013) 523-532.

FERRER, J.; PAEZ, G.; MARMOL, Z.; RAMONES, E.; GARCIA, H.; FORSTER, C.F. Acid hydrolysis of shrimp-shell wastes and the production of single cell protein from the hydrolysate. **Bioresource Technology** 57 (1996) 55-60.

FLORY, P.J. **Principles of polymer chemistry**. Cornell University Press: Ithaca (1953) 266–316

GOYCOOLEA, F.M.; ARGÜELLES-MONAL, W.; PENICHE, C.; HIGUERA-CIAPARA, I. Chitin and chitosan. **Novel Macromolecules In Food Systems** (2000) 265-308.

GUZEY, D.; MCCLEMENTS, D.J. Characterization of β -lactoglobulin–chitosan interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. **Food Hydrocolloids** 20 (2006) 124-131.

HARRIS, D.C.; BERTOLUCCI, M.D. **Symmetry and Spectroscopy: An Introduction to Vibrational and Electronic Spectroscopy**. Courier Corporation (1978) 550 p.

HEGYI, G.; KARDOS, J.; KOVÁCS, M.; MÁLNÁSI-CSIZMADIA, A.; NYITRAY, L.; PÁL, G.; RADNAI, L.; REMÉNYI, A.; VENEKEI, I. **Introduction to Practical biochemistry**. ELTE Faculty of Natural Sciences (2013) 210 p.

HONARKAR, H.; BARIKANI, M. Applications of biopolymers I: chitosan. **Chemical Monthly** 140 (2009) 1403-1420.

HUNTER, R.J.; OTTEWILL, R.H.; ROWELL, R.L. **Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications**. Academic Press (1989) 398 p.

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry. **Compendium of Chemical Terminology**. Blackwell Science Inc. (2014) 1622 p.

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry. **Compendium of Polymer Terminology and Nomenclature**. RSCpublishing (2009) 443 p.

IUPAC. **Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry**. IUPAC & RSC Publishing (2008) 60 p.

JAMIESON, A.M.; SIMHA, R. Newtonian Viscosity of Dilute, Semidilute, and Concentrated Polymer Solutions. In: UTRACKI, L.A.; JAMIESON, A.M. (Ed.). **Polymer Physics: From Suspensions to Nanocomposites and Beyond**. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc. (2010) 15-87.

JANEGITZ, B. C.; LOURENÇÃO, B. C.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO, O. Desenvolvimento de um método empregando quitosana para remoção de íons metálicos de águas residuárias. **Química Nova** 30 (2007) 879-884.

JONES, O.G.; LESMES, U.; DUBIN, P.; MCCLEMENTS, D.J. Effect of polysaccharide charge on formation and properties of biopolymer nanoparticles created by heat treatment of β -lactoglobulin–pectin complexes. **Food Hydrocolloids** 24 (2010) 374-383.

KASAAI, M.R. Calculation of Mark–Houwink–Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent–temperature system using experimental reported viscometric constants data. **Carbohydrate Polymers** 68 (2007) 477-488.

KILIÇ, Ç.; PEKER, E. G. G.; ACARTÜRK, F.; KILIÇASLAN, S. M. S.; CEVHER, S. Ç. Investigation of the effects of local glutathione and chitosan administration on incisional oral mucosal wound healing in rabbits. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 112 (2013) 499-507.

KRAVTCHENKO, T.P.; RENOIR, J.; PARKER, A.; BRIGAND, G. A novel method for determining the dissolution kinetics of hydrocolloid powders. **Food Hydrocolloids** 13 (1999) 219-225.

LEE, S-Y.; WEE, A-S.; LIM, C-K.; ABBAS, A. A.; SELVARATNAM, L. A.; MERICAN, M.; AHMAD, T. S. KAMARUL, T. Supermacroporous poly(vinyl alcohol)-carboxymethyl chitosan-poly(ethylene glycol) scaffold: an in vitro and in vivo pre-assessments for cartilage tissue engineering. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine** 24 (2013) 1561-1570.

LIN, S.-J.; PASCALL, M. A. Incorporation of vitamin E into chitosan and its effect on the film forming solution (viscosity and drying rate) and the solubility and thermal properties of the dried film. **Food Hydrocolloids** 35 (2014) 78-84.

LIU, T.; YANG, X.; WANG, Z.-L.; YAN, X. Enhanced chitosan beads-supported FeO-nanoparticles for removal of heavy metals from electroplating wastewater in permeable reactive barriers. **Water research** 47 (2013) 6691-6700.

MALVERN INSTRUMENTS LTD. Isothermal Titration Calorimetry: Direct, label-free measurement of binding affinity and thermodynamics of biomolecules in a single experiment. Disponível em: < <http://www.malvern.com/en/products/technology/isothermal-titration-calorimetry/default.aspx>>. Acesso em: 01 de jul. 2015b.

MALVERN INSTRUMENTS LTD. Microcalorimetry: Characterizing the interactions and stability of biomolecules. Disponível em: <<http://www.malvern.com/en/products/measurement-type/microcalorimetry/default.aspx>>. Acesso em: 01 de jul. 2015a.

MALVERN INSTRUMENTS LTD. **Dynamic Light Scattering**: An Introduction in 30 Minutes. Malvern, 8 p. Disponível em: <<http://www.malvern.com/en/support/resource-center/technical-notes/TN101104DynamicLightScatteringIntroduction.aspx>>. Acesso em: 02 jul. 2015c.

MAURSTAD, G.; KITAMURA, S.; STOKKE, B.T. Isothermal Titration Calorimetry Study of the Polyelectrolyte Complexation of Xanthan and Chitosan Samples of Different Degree of Polymerization. **Biopolymers** 97 (2012) 1-10.

MELLO, I.L.; DELPECH, M.C.; COUTINHO, F.M.B.; ALBINO, F.F.M. Viscometric Study of High-*cis* Polybutadiene in Toluene Solution. **Journal Of The Brazilian Chemical Society** 17 (2006) 194-199.

MERTINS, O.; DIMOVA, R. Binding of Chitosan to Phospholipid Vesicles Studied with Isothermal Titration Calorimetry. **Lagmuir** 27 (2011) 5506-5515.

MILANI, J.; MALEKI, G. Hydrocolloids in Food Industry. In: VALDEZ, B. (Ed.). **Food Industrial Processes - Methods and Equipment**. Intech (2012) 17-38.

MISRA, A.K.; SHARMA, S.K.; ACOSTA, T.E.; PORTER, J.N.; BATES, D.E. Single-Pulse Standoff Raman Detection of Chemicals from 120 m Distance During Daytime. **Applied Spectroscopy** 66 (2012) 1279-1285.

OCHOA-VELASCO, C. E.; GUERRERO-BELTRÁN, J. A. Postharvest quality of peeled prickly pear fruit treated with acetic acid and chitosan. **Postharvest Biology and Technology** 92 (2014) 139-145.

OLIVEIRA, C.R. Termodinâmica de adsorção de compostos fenólicos e azocorantes em nanotubos de carbono. 73 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agroquímica, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. (2012).

PARAMESWARA, P.; DEMAPPA, T.; MAHADEVAIAH; PRAKASH, Y.; SOMASHEKARAPPA, H.;

PILLAI, C.K.S.; PAUL, W.; SHARMA, C.P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress In Polymer Science** 34 (2009) 641-678.

PINHEIRO, A.C.; BOURBON, A. I.; MEDEIROS, B. G. S.; DA SILVA, L. H. M.; DA SILVA, M. C. H.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; COIMBRA, M. A.; VICENTE, A. A. Interactions between k-carrageenan and chitosan in nanolayered coatings-Structural and transport properties. **Carbohydrate Polymers** 87 (2012) 1081-1090.

QUINN, E. **Irish Classic Is Still a Hit (in Calfskin, Not Paperback)**. (2007). Disponível em: <http://www.nytimes.com/2007/05/28/world/europe/28kells.html?_r=0>. Acesso em: 15 jul. 2015.

RAMAN, C.V. A new radiation. **Indian Journal of Physics** 2 (1928) 387-398.

RAMSAY, W.; DONNAN, F.G. **The life and letters of Joseph Black, M. D.** Constable. (1918) 194 p.

RENOUD, P.; TOURY, B.; BENAYOUN, S.; ATTIK, G.; GROSGOGEAT, B. Functionalization of titanium with chitosan via silanation: Evaluation of biological and mechanical performances. **Plos One** (2012) 1-11.

RUSSEL, W.B.; SAVILLE, D.A.; SCHOWALTER, W.R. **Colloidal Dispersions**. Cambridge University Press (1989) 525 p.

SAHA, T.K.; BHOUMIK, N.C.; KARMAKER, S.; AHMED, M.G.; ICHIKAWA, H.; FUKUMORI, Y. Adsorption of methyl orange onto chitosan from aqueous solution. **Journal of Water Resource and Protection** 2 (2010) 898–906.

SHAW, R. **Dynamic Light Scattering Training: Achieving reliable nano particle sizing**. Ata Scientific Pty Ltd (2013)

SIGMA-ALDRICH. **Chitosan: medium molecular weight**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/448877?lang=pt@ion=BR>>. Acesso em: 09 jul. 2015a.

SIGMA-ALDRICH. **What are the molecular weights of the chitosan products you offer, Products 448869, 448877, and 419419?** Disponível em: <http://sigmaaldrich.custhelp.com/app/answers/detail/a_id/1718/p/129,456/session/L3RpbWUvMTQzNjQ4NDY3Ni9zaWQvczM3aTVacW0=>>. Acesso em: 09 jul. 2015b.

SINGH, R.C.V. Raman and the Discovery of the Raman Effect. **Physics In Perspective** 4 (2002) 399-420.

SMEKAL, A. Zur Quantentheorie der Dispersion. **Naturwissenschaften** 11 (1923) 873-875.

SOUZA, H.K.S.; BAI, G.; GONÇALVES, M.P.; BASTOS, M. Whey protein isolate–chitosan interactions: A calorimetric and spectroscopy study. **Thermochimica Acta** 495 (2009) 108-114.

STEPHEN, A.M.; PHILLIPS, G.O. (Ed.). **Food Polysaccharides and Their Applications**. CRC Press (2006) 752 p.

STRUTT, J.W. (Rayleigh, L.). On the scattering of light by small particles. **Philosophical Magazine**. 41 (1871) 447-454.

STRUTT, J.W. (Rayleigh, L.). On the transmission of light through an atmosphere containing small particles in suspension, and on the origin of the blue of the sky. **Philosophical Magazine**. 47 (1899) 375-394.

TANFORD, C. **Physical chemistry of macromolecules**. John Wiley Press: New York (1961) 390–412.

TAO, S.; GAO, S.; ZHOU, Y.; CAO, M.; XIE, W.; ZHENG, H.; FAN, L. Preparation of carboxymethyl chitosan sulfate for improved cell proliferation of skin fibroblasts. **International Journal of Biological Macromolecules** 54 (2013) 160-165.

TIAN, X. L.; TIAN, D. F.; WANG, Z. Y.; MO, F. K. Synthesis and evaluation of chitosan-Vitamin C complex. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences** 71 (2009) 371-376.

TYNDALL, J. On the Blue Colour of the Sky – the polarisation of skylight and on the polarisation of light by cloudy matter generally. **Philosophical Magazine**. 34 (1869) 384-394.

UN, X.; WANG, Z.; KADOUH, H.; ZHOU, K. The antimicrobial, mechanical, physical and structural properties of chitosan-gallic acid films. **LWT - Food Science and Technology** 57 (2014) 83-89.

VIENNA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY. **Finding explosives with laser beams**. (2012). Disponível em: <http://www.eurekalert.org/pub_releases/2012-02/vuot-few022712.php>. Acesso em: 15 jul. 2015.

VOGEL, Ben. **Raman spectroscopy portends well for standoff explosives detection**. (2008). Disponível em: <http://wayback.archive.org/web/20081203151346/http://www.janes.com/news/transport/business/jar/jar080829_1_n.shtml>. Acesso em: 15 jul. 2015.

YING, G.; XIONG, W.; WANG, H.; SUN, Y.; LIU, H. Preparation, water solubility and antioxidant activity of branched-chain chitosan derivatives. **Carbohydrate Polymers** 83 (2011) 1787–1796.

YUAN, Y.; WAN, Z.; YIN, S.; TENG, Z.; YANG, X.; QI, J.; WANG, X. Formation and dynamic interfacial adsorption of glycinin/chitosan soluble complex at acidic pH: Relationship to mixed emulsion stability. **Food Hydrocolloids** 31 (2013) 85-93.

ZAJĄC, A.; HANUZA, J.; WANDAS, M.; DYMIŃSKA, L. Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy** 134 (2015) 114-120.

APÊNDICE A

Estimativa do número de monômeros de glicosamina por grama de quitosano utilizado no experimento

Pela espectroscopia Raman, determinou-se que o grau de desacetilação (DD) do quitosano foi de 84,6 %. Para se estimar o número de mols de glicosamina presentes em uma grama de quitosano, utilizou-se a Equação A1.

$$Mol_{gli} = \frac{m_q}{[mm_{gli} \cdot DD + mm_{N-ac} \cdot (1 - DD)]} \cdot DD \quad (\text{Eq. A1})$$

Onde Mol_{gli} é o número de mols de glicosamina em m_q gramas de quitosano. mm_{gli} e mm_{N-ac} são as massas molares dos monômero de glicosamina e N-acetilglicosamina, respectivamente.

Considerando um grama de quitosano (m_q), o grau de desacetilação de 84,6 % (DD), a massa molar dos monômeros de glicosamina de $178,2 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (mm_{gli}) e dos monômeros de N-acetilglicosamina de $220,2 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (mm_{N-ac}), chegou-se ao valor de $4,58 \times 10^{-3}$ mols de glicosamina por grama de quitosano.

Para a maioria das dispersões estudadas nesse projeto, no qual se utilizou a concentração $1 \text{ g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$ de quitosano, a concentração molar de glicosamina foi de 45,8 mM.

APÊNDICE B

Estimativa do número médio de prótons liberados (H⁺) por molécula dos ácidos cítrico e láctico, durante os experimentos de calorimetria, pHmetria e condutivimetria, antes da protonação total do quitosano.

Para se estimar o número médio de prótons (H⁺) liberados por moléculas de ácido, utilizou-se as equações B1, para o ácido cítrico, e B2 para o ácido láctico.

$$H_C^+ = \frac{H^2 K_{a1}}{K} + \frac{2HK_{a1}K_{a2}}{K} + \frac{3K_{a1}K_{a2}K_{a3}}{K} \quad (\text{Eq. B1})$$

$$H_L^+ = \frac{K_a}{(H + K_a)} \quad (\text{Eq. B2})$$

Onde H_C^+ e H_L^+ são o número de prótons médio liberados por molécula de ácido cítrico e láctico, respectivamente, e H é a concentração de íons H⁺ no meio (em M). K_{a1} , K_{a2} e K_{a3} são as constantes de dissociação dos três grupos carboxílicos do ácido cítrico, K_a é a constante de dissociação do ácido láctico e $K = H^3 + H^2K_{a1} + HK_{a1}K_{a2} + K_{a1}K_{a2}K_{a3}$.

Para fazer os cálculos, adotou-se um valor médio de pH antes do decaimento mais acentuado que ocorre na presença de quitosano (Figura 22). Para o ácido cítrico, o valor de pH foi 6,68 e para o ácido láctico foi 5,93. Dessa maneira, o número de prótons médio liberado por molécula de ácido foi de 2,65, para o ácido cítrico, e 0,99, para o ácido láctico.

Na maioria dos experimentos deste projeto, utilizou-se dispersões de quitosano na concentração de 1 g·(100 mL)⁻¹. Pelo Apêndice A, estimou-se que, nesses sistemas, a concentração de monômeros glicosaminas foi de 45,8 mM. Em face disso, pode-se estimar a concentração de ácido necessária, no meio, para protonar todo o quitosano [1 g·(100 mL)⁻¹]. Para isso, dividiu-se a concentração de glicosamina pelo número médio de prótons liberado por molécula de ácido e, dessa maneira, obteve-se as concentrações de 17,3 mM e 46,3 mM, para os ácidos cítrico e láctico, respectivamente.

APÊNDICE C

Cinética de dispersão do quitosano em soluções aquosas dos ácidos cítrico ou láctico

Nas Figuras C1 e C2 abaixo, são mostradas as cinéticas de dispersão do quitosano [$1 \text{ g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$] nas soluções aquosas dos ácidos cítrico e láctico, respectivamente, nas concentrações 25, 50 e 100 mM.

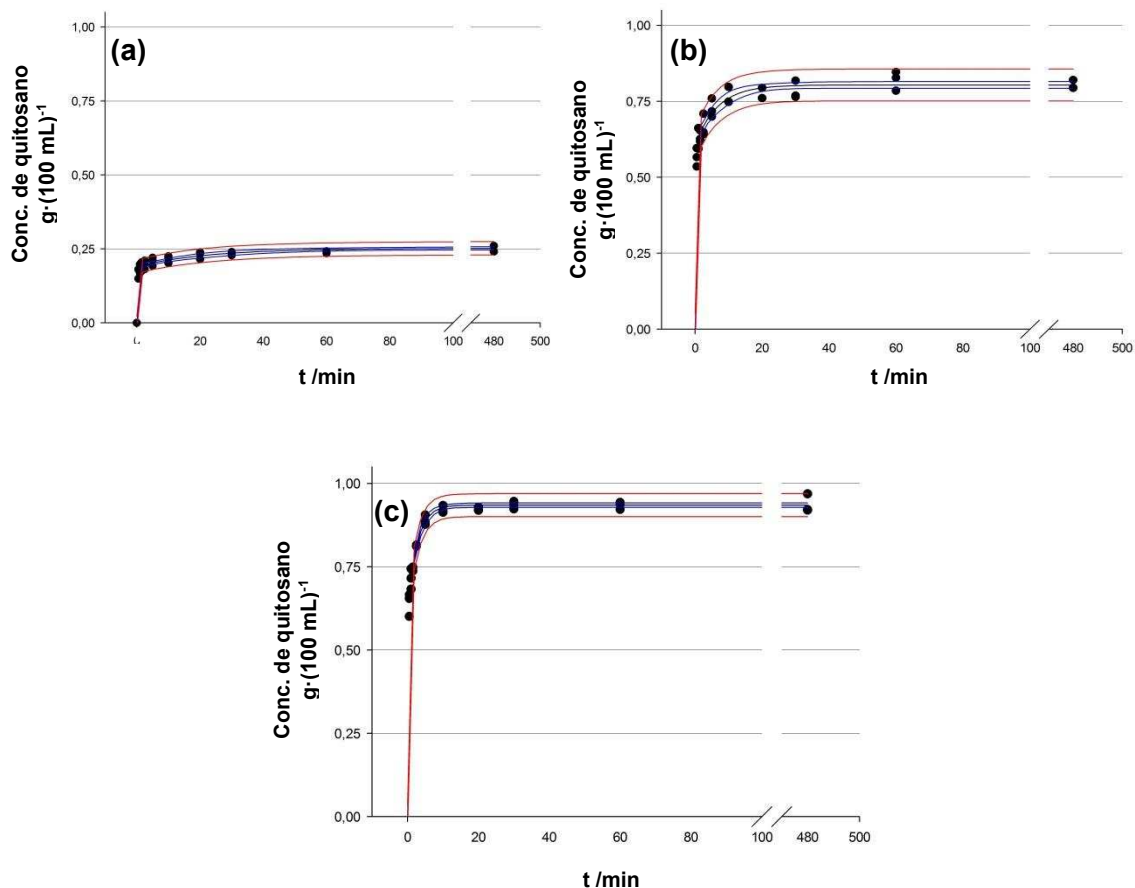


Figura C1 – Cinética de dispersão do quitosano [$1 \text{ g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$] em ácido cítrico, nas concentrações de (a) 25 mM, (b) 50 mM e (c) 100 mM. A linha negra representa o melhor ajuste para o modelo de crescimento exponencial até valor máximo com 4 parâmetros. Linhas azuis representam o intervalo de confiança da regressão a 95 % de confiança. Linhas vermelhas indicam o intervalo de predição com 95 % de confiança.

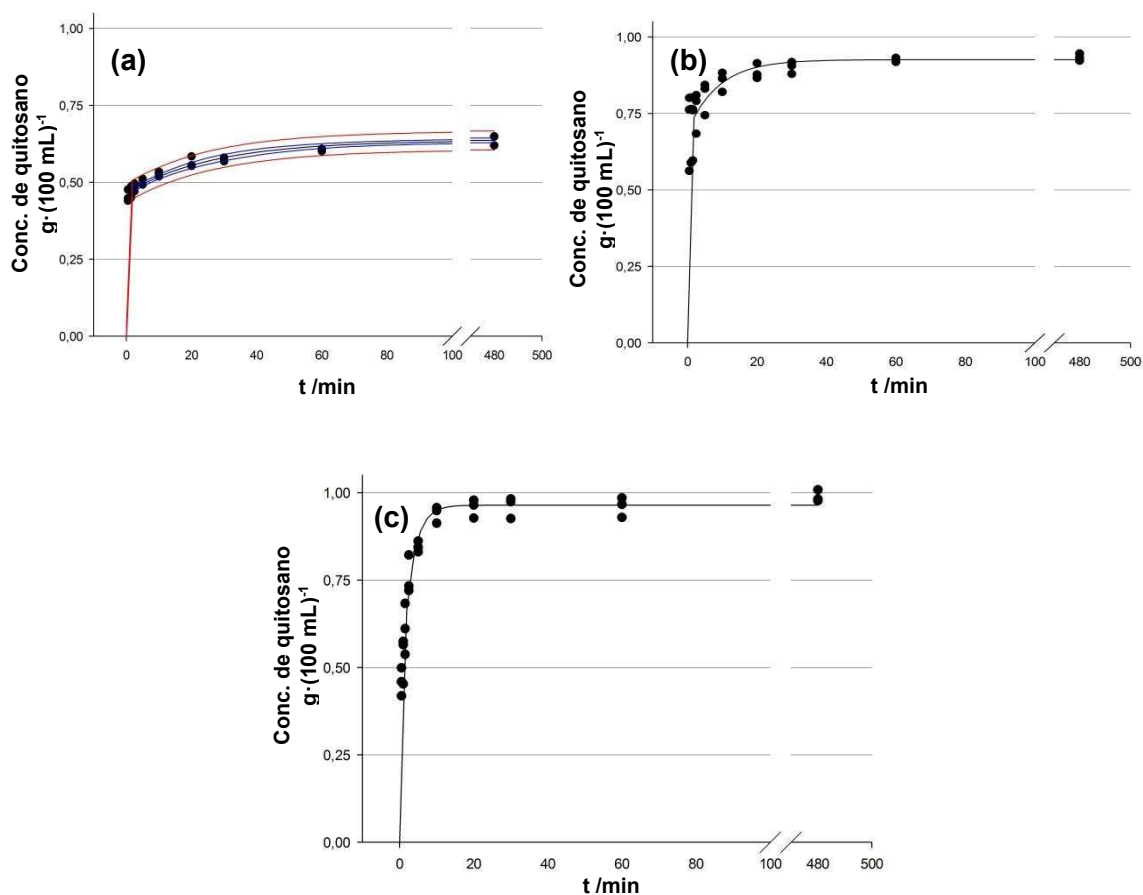


Figura C2 – Cinética de dispersão do quitosano [$1 \text{ g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$] em ácido láctico, nas concentrações de (a) 25 mM, (b) 50 mM e (c) 100 mM. A linha negra representa o melhor ajuste para o modelo de crescimento exponencial até valor máximo com 4 parâmetros. Linhas azuis representam o intervalo de confiança da regressão a 95 % de confiança. Linhas vermelhas indicam o intervalo de predição com 95 % de confiança.

APÊNDICE D

Calorimetria de diluição dos ácidos cítrico e láctico

Para se calcular a variação de entalpia da adição dos ácidos cítrico ou láctico na suspensão de quitosano, deve-se integrar os picos de fluxo de calor de suas injeções, descontando o valor de fluxo de energia dos picos das injeções de ácido em água. Na Figura D1, abaixo, é mostrado os picos de fluxo de energia para as injeções de ácido (0,9 M) em água.

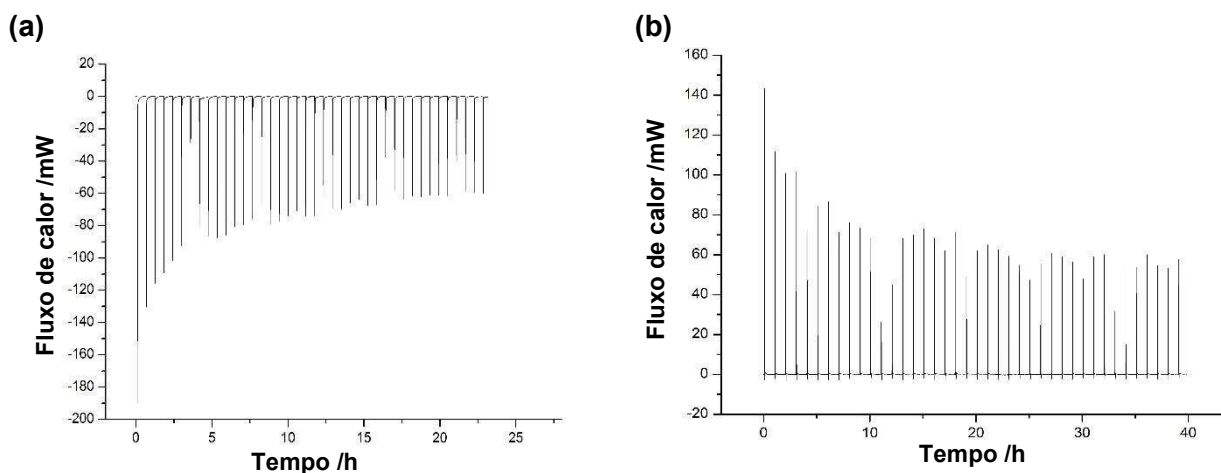


Figura D1 – Fluxo de energia das injeções, em água, dos ácidos cítrico (a) e láctico (b) na concentração 0,9 M.

Como pode ser visto pela Figura 21, o fenômeno termodinâmico exotérmico do ácido cítrico aconteceu muito rapidamente (em poucas injeções a variação de entalpia passou a endotérmica). Em face disso, para detalhar melhor o processo exotérmico, também se fez injeções com concentração menor do ácido cítrico (0,18 M) na seringa, mostrado na Figura 21b. Na Figura D2 será mostrado os picos de fluxo de energia para esse ácido, na concentração de 0,18 M.

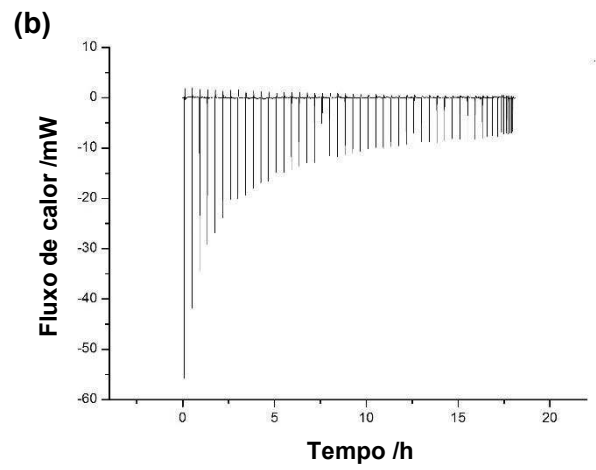
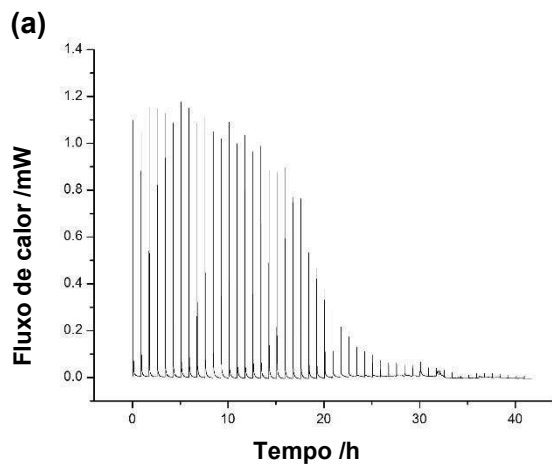


Figura D2 – Fluxo de energia das injeções de ácido cítrico (0,18 M) em suspensão de quitosano (a) e em água (b).