



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

## **Modificação da superfície da quitosana através da reação de sulfatação semi-heterogênea**

Acadêmico: Alexandre Boeira Cavalheiro

Orientador: Prof. Dr. Mauro César Marghetti Laranjeira

Florianópolis, 2009.

ALEXANDRE BOEIRA CAVALHEIRO

**Modificação da superfície da quitosana através da reação de  
sulfatação semi-heterogênea**

Trabalho apresentado ao Curso de  
Química da Universidade Federal de  
Santa Catarina como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. Mauro César Marghetti Laranjeira

Florianópolis, 2009

ALEXANDRE BOEIRA CAVALHEIRO

**Modificação da superfície da quitosana através da reação de sulfatação semi-heterogênea**

Trabalho apresentado ao Curso de Química da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Química.

Aprovado em 23 de novembro de 2009

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Marcos Aires de Brito - UFSC

---

Dra. Maryene Alves Camargo

---

Prof. Dr. Mauro César Marghetti Laranjeira - UFSC

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, sempre presente em todos os momentos;

Ao Prof. Dr. Mauro C. M. Laranjeira, do Departamento de Química da UFSC, pela orientação do trabalho;

À Universidade Federal de Santa Catarina;

Ao Departamento de Química e Coordenadoria de Graduação pelo suporte prestado;

À Central de Análises do Departamento de Química pelas análises;

Ao Laboratório de Caracterização Microestrutural do Departamento de Engenharia Mecânica pelas análises;

Aos técnicos e bolsistas que contribuíram para a obtenção dos resultados;

A FAPEU pela concessão a bolsa;

Agradeço a todos os colegas do laboratório QUITTECH, Alexandre Parize, Bethânia Horts, Rogério Laus, Caroline Motta, Georgia Vanz, Loreana Lacerda, Luciano Vitali, Ricardo Ploncoski, Francielly Cesconeto, em especial, Denice Vicentini e Elaine Carvalho pelos conhecimentos compartilhados e colaboração na realização deste trabalho;

Com muito amor agradeço aos meus maravilhosos pais, José e Elige, por terem acreditado em mim e a quem me falta palavras para agradecer, e tudo que dissesse não seria o suficiente para agradecer por todo o apoio, dedicação e amor concedidos;

Com muito amor agradeço também a meu irmão Fernando. Obrigado Fernando por todo apoio, companheirismo e incentivo;

Agradeço também com muito amor a minha namorada Fernanda, por todo amor, pelo carinho, pela alegria e confiança. Agradeço principalmente pelo seu companheirismo, estando comigo nos bons e nem tão bons momentos, me fazendo sorrir quando eu estava triste. Por ser tão especial e fundamental na minha vida;

A todos os amigos que cultivei durante esses anos de faculdade;

Agradeço também a todos os professores do Departamento de Química, por terem contribuído de alguma forma para minha formação;

## RESUMO

O vírus da mancha branca (WSSV) é um vírus encontrado tanto em fazendas de camarão como no ambiente natural. Afeta diferentes tipos de camarões e é caracterizado por atacar uma ampla variedade de tecidos e por altas e rápidas mortalidades nas populações afetadas. Os sinais são manchas brancas na carapaça, muitas vezes acompanhadas de uma coloração avermelhada no corpo do animal. Os Polissacarídeos naturalmente sulfatados constituem um grupo de grande importância tecnológica e vem sendo empregados em várias aplicações médicas, principalmente no tratamento de doenças cardiovasculares e trombose. Entre os polissacarídeos naturalmente sulfatados com atividade anticoagulante destacam-se as fucoidanas, que são polissacarídeos extraídos de algas marinhas e empregados como agentes antivirais no tratamento do vírus da mancha branca no cultivo de camarões marinhos. Neste trabalho a quitosana (QTS) foi modificada quimicamente através de uma reação de sulfatação visando a potencial aplicação como antiviral e anticoagulante, principalmente para o vírus da mancha branca. A modificação química da superfície da QTS com ácido clorossulfônico foi realizada em meio semi-heterogêneo para obter a QTS na sua forma sulfatada (QTSS). A QTS modificada foi caracterizada por espectroscopia no infravermelho (IV), microscopia eletrônica de varredura, (MEV-EDX), análise termogravimétrica (TG) e calorimetria diferencial de varredura (DSC). Estas análises permitiram caracterizar e verificar a modificação química da superfície da QTS. O valor de massa recuperada na reação foi de 53%.

Palavras chave: Quitosana, Quitosana Sulfatada, Antiviral e Anticoagulante.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>QTS</b>	Quitosana.
<b>QT</b>	Quitina.
<b>QTSS</b>	Quitosana sulfatada.
<b>WSSV</b>	Vírus da mancha branca.
<b>IV</b>	Espectroscopia no infravermelho.
<b>TG</b>	Análise termogravimétrica.
<b>DSC</b>	Calorimetria de varredura diferencial.
<b>Tg</b>	Transição Vítreia.
<b>MEV</b>	Microscopia eletrônica de varredura.
<b>EDX</b>	Energia dispersiva de raios X.
<b>DMF</b>	Dimetilformamida.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura molecular da QTS.
- Figura 2.** Estrutura molecular da Heparina.
- Figura 3.** Estrutura molecular do monômero da Fucoidana
- Figura 4.** Esquema de preparação da QTSS.
- Figura 5.** Esquema da reação de sulfatação da QTS.
- Figura 6.** Espectro no infravermelho: a) QTS e b) QTSS.
- Figura 7.** Fotomicrografias da QTS e sua respectiva EDX.
- Figura 8.** Fotomicrografias da QTSS e EDX.
- Figura 9.** Análise de TGA para: a) QTS e b) QTSS.
- Figura 10.** Análise de DSC para a QTS.
- Figura 11.** Análise de DSC para a QTSS.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>8</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>9</b>
<b>2.1. Biopolímero Quitosana (QTS).....</b>	<b>9</b>
<b>2.2. Polissacarídeos Sulfatados.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2.1. Heparina.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2.2. Fucoídano .....</b>	<b>12</b>
<b>2.3. Estudos referentes a alguns polissacarídeos sulfatados.....</b>	<b>12</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1. Objetivo Geral.....</b>	<b>16</b>
<b>3.2. Objetivos Específicos.....</b>	<b>16</b>
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>17</b>
<b>4.1. Materiais.....</b>	<b>17</b>
<b>4.2. Métodos.....</b>	<b>17</b>
<b>4.2.1. Preparação da Quitosana Sulfatada.....</b>	<b>17</b>
<b>4.2.2. Caracterizações QTSS.....</b>	<b>19</b>
<b>4.2.2.1. Espectroscopia no Infravermelho (IV).....</b>	<b>19</b>
<b>4.2.2.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV-EDX).....</b>	<b>19</b>
<b>4.2.2.3. Análise Termogravimétrica (TG).....</b>	<b>20</b>
<b>4.2.2.4. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....</b>	<b>20</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>5.1. Espectroscopia no Infravermelho (IV).....</b>	<b>22</b>
<b>5.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV-EDX).....</b>	<b>23</b>
<b>5.3. Análise Termogravimétrica (TG).....</b>	<b>24</b>
<b>5.4. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....</b>	<b>26</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>28</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>29</b>



## 1. INTRODUÇÃO

Polissacarídeos naturais constituem um grupo de grande importância tecnológica e vêm sendo empregados em várias aplicações industriais e médicas.<sup>1</sup> Em aplicações médicas a importância do estudo de polissacarídeos sulfatados está ligada à incidência de doenças cardiovasculares que vêm aumentando consideravelmente nos últimos anos, não só nos países desenvolvidos como também em países de terceiro mundo, pois está na maioria dos casos, relacionada com várias características do modo de vida da população, tais como sedentarismo, hábitos alimentares incorretos, stress, dentre outros.<sup>2</sup>

Neste contexto, o estudo de polissacarídeos naturais e/ou quimicamente modificados é justificado e relevante, uma vez que partes da estrutura destes polissacarídeos podem ser reconhecidas pelo sistema de coagulação e podem impedir que a mesma se efetue podendo ser um anticoagulante alternativo à conhecida heparina.

Entre os polissacarídeos naturalmente sulfatados com atividade anticoagulante destacam-se as fucoidanas, que são polissacarídeos extraídos de algas marinhas e empregados como agentes antivirais no tratamento do vírus da mancha branca no cultivo de camarões marinhos.<sup>3</sup>

No caso de polissacarídeos sulfatados modificados quimicamente com atividade anticoagulante ou antiviral destacam-se as glucanas, as galactoglucomananas, as galactomananas, e dextranas sulfatadas.<sup>4</sup>

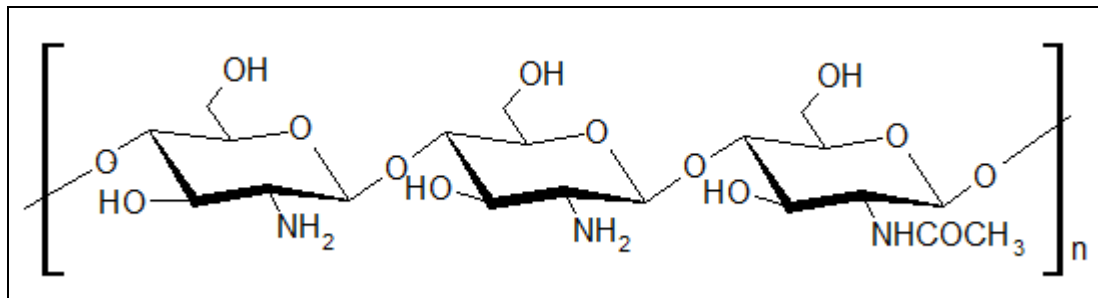
Neste trabalho foi preparada a QTSS para uma possível aplicação como substituinte da fucoidana no tratamento do vírus da mancha branca, o qual é encontrado tanto em fazendas de camarão como no ambiente natural. Este vírus afeta diferentes tipos de camarões e é caracterizado por atacar uma ampla variedade de tecidos e por altas e rápidas mortalidades nas populações afetadas. Os sinais são manchas brancas na carapaça, muitas vezes acompanhadas de uma coloração avermelhada no corpo do animal.<sup>5</sup> . A QTS e a QTSS foram caracterizadas por espectroscopia no infravermelho (IV), microscopia eletrônica de varredura, (MEV-EDX), análise termogravimétrica (TG) e calorimetria diferencial de varredura (DSC).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Quitosana

A QTS constituída por unidades 2-acetoamido-2-desoxi-D-glicopirranose e 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose ligadas por ligações  $\beta(1-4)$ , é um biopolímero natural de cadeia linear insolúvel em água, derivado da quitina (QT), mostrado na Figura 1, que é encontrado em abundância na natureza, presente nas carapaças dos crustáceos, nos exoesqueletos dos insetos e nas paredes celulares de fungos.<sup>6,7</sup> Devido ao seu caráter básico atribuído à presença do grupamento amina nas unidades repetidas e a sua biodegradabilidade, a quitosana tem sido promovido como um polímero de uso bastante promissor.<sup>6,10</sup>

A QTS possui vastas aplicações em diversas áreas, incluindo o tratamento de águas residuais, alimentos, agricultura, cosméticos, biotecnológica e indústrias farmacêuticas.<sup>8</sup>



**Figura 1.** Estrutura molecular da QTS.

Algumas das propriedades químicas da QTS, tais como viscosidade, grau de desacetilação e massa molar são dependentes das fontes de matéria-prima e métodos de preparação. Uma das propriedades mais importantes desse polímero é o seu grau de desacetilação, o qual determina a quantidade de grupos amínicos na cadeia polimérica. Uma extensão acima de 60% de grau de desacetilação da QT é suficiente para diferenciar e caracterizar quimicamente a QTS.<sup>7</sup>

Insolúvel em água, a QTS dissolve-se em ácidos orgânicos aquosos como, por exemplo, ácido acético e fórmico, bem como ácidos inorgânicos, resultando em soluções viscosas. Os grupos amino da quitosana são completamente protonados em pH próximo de 3, e as cadeias poliméricas, carregadas positivamente, são lançadas separadamente na solução, resultando na dissolução. Quando contra-íons polivalentes, como por exemplo, sulfato e fosfato estão presentes, a interação iônica entre as cadeias poliméricas pode ocorrer, apresentando como resultado um aumento da viscosidade da solução.<sup>10</sup>

Reações de modificação química da QTS, como desacetilação carboximetilação, oxidação, entre outras, estão sendo estudadas, de modo a preparar produtos que apresentem características cada vez mais específicas para determinadas aplicações. Dessa forma, muitas pesquisas têm sido realizadas, principalmente na área farmacêutica, visando o desenvolvimento de diversas formulações. As propriedades dos produtos obtidos por uma modificação química estão relacionadas em função do meio em que ocorre a reação, podendo ser homogêneo ou heterogêneo, mesmo quando todas as demais condições reacionais são mantidas constantes. Normalmente, as reações dos polímeros semicristalinos em meio heterogêneo ocorrem preferencialmente nas porções amorfas. Nestes casos, os produtos da reação apresentam geralmente certa heterogeneidade ao longo de sua cadeia polimérica.<sup>11</sup>

Recentemente, a preparação de derivados de QTS em meio homogêneo tem sido mais estudada, com a justificativa de ter um maior controle da reação e de alcançar estruturas químicas mais uniformes.<sup>11</sup>

Através da acetilação da QTS em meio homogêneo, foram obtidos tanto produtos solúveis em água quanto em géis, dependendo do grau de acetilação e das condições de preparação do produto. Em ambos os casos, considerou-se que a reação de substituição ocorre no grupamento amina. Por outro lado, poucas informações são encontradas na literatura sobre as propriedades químicas dos produtos de acetilação da QTS realizada em meio heterogêneo.

## **2.2. Polissacarídeos sulfatados**

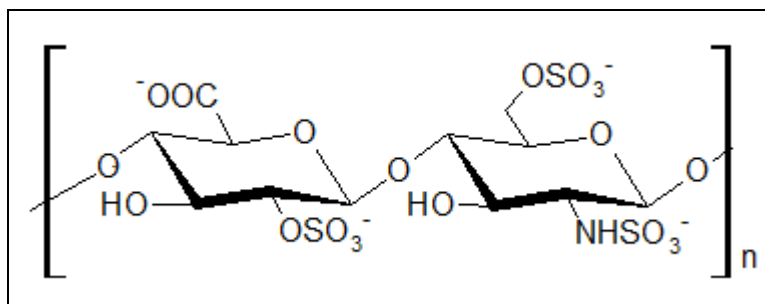
Os polissacarídeos sulfatados compreendem um complexo grupo de macromoléculas que podem ser de origem natural, semi-sintética ou sintética. Entre estes polissacarídeos podemos citar a heparina, dextrana sulfatada, quitina e quitosana sulfatada, carragenanas, fucoidanas, glicosaminoglicanas, glucanas sulfatadas galactomananas sulfatadas, galactanas sulfatadas, entre outras.<sup>9</sup>

### **2.2.1 Heparina**

Em 1916 um estudante de medicina chamado Jay McLean, descobre um agente anticoagulante presente em fígado de cães, que foi denominado mais tarde por HOWELL e HOLT de heparina.<sup>12</sup>

A heparina (Figura 2) é um polissacarídeo naturalmente sulfatado mostrado, com atividade anticoagulante, que se destaca por ser o agente anticoagulante mais estudado e utilizado, principalmente na prevenção de trombose venosa em pacientes com estado de hipercoagulopatia. Entretanto, o uso da heparina em longo prazo pode apresentar algumas reações adversas indesejáveis, tais como sangramentos e trombocitopenia induzida. Além disso, ela é obtida principalmente do intestino suíno ou bovino, podendo acarretar risco de contaminação aos pacientes por partículas virais ou outros agentes.<sup>2</sup>

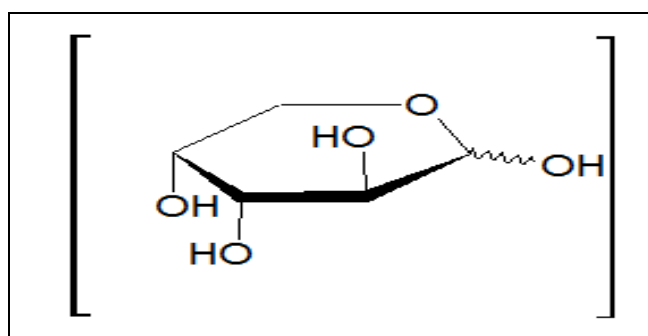
Sob o ponto de vista químico, a heparina é um polissacarídeo sulfatado com grande quantidade de cargas elétricas negativas e constitui o ácido macromolecular mais forte encontrado no organismo humano. Pode ser diferenciada de outros polissacarídeos por ser altamente ácida, resultado da grande quantidade de radicais sulfatados presentes na sua molécula.<sup>13</sup>



**Figura 2.** Estrutura molecular da Heparina.

### 2.2.2. *Fucoidana*

Fucoidana (Figura 3) é um polissacarídeo de alta massa molecular e altamente sulfatado que é extraída de algas marinhas marrons, que possui atividade anticoagulante e antitrombótica.<sup>14</sup> É formada por unidades de L-fucose em ligação  $\alpha$  (1→2) ou  $\alpha$  (1→3)-4-O-sulfatada com ramificações de unidades de D-xilose, D-galactose, ácido D-glucurônico ou sulfato nas posições 3 ou 2, e sua atividade anticoagulante é dependente da sua massa molar e da sua composição.<sup>15,16</sup>



**Figura 3.** Estrutura molecular do monômero da Fucoidana.

### 2.3. *Estudos referentes a alguns polissacarídeos sulfatados*

Neste tópico será feita uma abordagem sucinta de alguns estudos referentes à atividade anticoagulante, antiviral e antiinflamatória de alguns polissacarídeos sulfatados.

A heparina é um heteropolissacarídeo com atividade anticoagulante e sua bioatividade é em grande parte devido a sua interação com uma variedade de proteínas plasmáticas. Devido a sua bioatividade, Drozd, N. N. e col.<sup>17</sup> estudaram os efeitos anticoagulantes da combinação entre a heparina e o sulfato de QTS, onde o sulfato de QTS foi reforçado pela atividade anticoagulante da heparina. Esta mistura foi injetada em coelhos, e foi observado um efeito hemorrágico menos pronunciado do que quando utilizado somente a heparina, enquanto que a atividade anticoagulante permaneceu a mesma. A mistura diminuiu o número de plaquetas, no entanto este efeito foi menos pronunciado do que quando utilizado apenas a heparina. Dessa forma, concluiu-se que a utilização da mistura quitosana sulfatada e heparina em vez de uma dupla dose de heparina, resultou no mesmo efeito anticoagulante.

Em estudos recentes sobre polissacarídeos sulfatados isolados de algas marrons (*Sargassum fulvellum*) Zoysa, D. M. e col.<sup>18</sup> verificaram as propriedades anticoagulantes desses polissacarídeos em um tempo de tromboplastina ativada usando como ensaio, citrato de plasma de sangue humano. Os resultados mostraram uma maior atividade anticoagulante na oitava semana de fermentação, a qual foi utilizada para a purificação do polissacarídeo sulfatado que foi realizada em duas etapas: troca-iônica seguida por cromatografia. Depois de purificado foi comparado com a heparina e verificou-se que os polissacarídeos isolados de algas marrons mostrou uma menor atividade anticoagulante, mas devido ao simples e viável procedimento experimental para isolar este polissacarídeo a partir da fermentação de algas, atribui-se assim a ele um grande potencial como agente anticoagulante para a indústria farmacêutica.

Vongchan, P. e col.<sup>19</sup> realizaram um estudo sobre a atividade anticoagulante de polissacarídeos extraídos da casca de caranguejos marinhos. A sulfatação foi realizada com a adição de ácido clorossulfônico e dimetilformamida (DMF) em condições semi-heterogêneas, sendo que após essa sulfatação a quitosana polisulfatada resultante, exibiu alta solubilidade em solventes orgânicos comuns, além de ser solúvel em água o que é bastante interessante para a aplicação desejada. Como características, estes polissacarídeos apresentaram no espectro no infravermelho uma absorção entre 810 e 1240  $\text{cm}^{-1}$  atribuído à presença do grupo sulfato. A análise

elementar mostrou C, H, N, S com teores de 15,03%, 4,08%, 2,84% e 14,46%, respectivamente com um grau de substituição de 1,45. A quitosana polissulfatada foi separada por cromatografia para fornecer três produtos de diferentes pesos moleculares. As três preparações de quitosana polissulfatada revelaram uma forte atividade anticoagulante. Além disso, foi demonstrado que eles inibiram o fator Xa e a atividade da trombina, mesmo mecanismo da heparina. Todos os resultados indicaram que a quitosana polissulfatada em condições semi-heterogêneas apresentou-se como sendo um potente polissacarídeo sulfatado com atividade anticoagulante.

Mohsen, M. S. e col.<sup>20</sup> em estudos realizados sobre a atividade antiviral de polissacarídeos sulfatados concluíram que essa atividade está relacionada com o grau de sulfatação e o peso molecular do respectivo polissacarídeo.

ZHANG, H. J. e col.<sup>21</sup>, extraíram polissacarídeos sulfatados de algas verdes pela extração com água quente seguida de purificação por troca iônica em uma coluna cromatográfica. O objetivo deste estudo foi observar qual seria a relação do tamanho molecular com a atividade anticoagulante desses polissacarídeos. Dessa forma, foram preparados cinco fragmentos de diferentes pesos moleculares a partir do polissacarídeo sulfatado. A atividade destes fragmentos foi investigada a partir do tempo parcial de tromboplastina ativada, tempo de trombina e tempo de protrombina, usando plasma humano. A diminuição do tamanho molecular do polissacarídeo sulfatado em diferentes fragmentos mostrou uma redução drástica de sua atividade anticoagulante. Sendo assim, os resultados mostraram que o tamanho molecular teve um efeito importante sobre a atividade anticoagulante do polissacarídeo sulfatado e, além disso, verificou-se que uma longa cadeia seria necessária para atingir a inibição da trombina.

MESTECKINA, N. M. e col.<sup>22</sup>, estudaram a atividade anticoagulante de fragmentos com pesos moleculares variados de polissacarídeos sulfatados derivados de galactoglucomanana. Derivados sulfatados de todas as frações foram sintetizados, no qual o teor de grupos SH foi de 48,05%. Todas as preparações apresentaram atividade anticoagulante, sendo que o teste feito em seres vivos mostrou que a atividade de antitrombina foi elevada, e essa atividade não mostrou nenhuma relação com o peso molecular do derivado sulfatado. Ainda neste estudo, foi observada a capacidade de sulfatos de

galactoglucomanana formar complexos com sulfato de protamina, um clássico antídoto para a heparina.

Estudos foram realizados por ZHAO, X. e col.<sup>23</sup> sobre a atividade anticoagulante e antiinflamatória do sulfato de poliguluronato de baixo peso molecular, preparado a partir da sulfatação química do ácido poligulurônico. A estrutura do sulfato de poliguluronato foi elucidada baseando-se na análise de espectros de IV, RMN <sup>13</sup>C e RMN <sup>1</sup>H. A sulfatação ocorreu nos carbonos 2 e 3 do ácido gulurônico e o seu grau de substituição foi de 1,53, por resíduo monossacarídeo. O peso médio molecular foi por volta de 11,4 kDa determinado por cromatografia de permeação em gel de alta performance. A atividade anticoagulante e antiinflamatória do sulfato de poliguluronato foi avaliada através de testes realizados em seres vivos. Os resultados mostraram que o sulfato de poliguluronato prolongou significativamente o tempo de coagulação do sangue, além de apresentar uma considerável atividade antiinflamatória. Para determinar a potência do sulfato de poliguluronato como agente anticoagulante foi feito um ensaio biológico com intuito de comparar com a heparina. O ácido poligulurônico não apresentou nenhuma atividade anticoagulante, entretanto o sulfato de poliguluronato como visto acima apresentou considerável atividade anticoagulante mostrando assim que esta está intimamente dependente dos grupos sulfato.

MILLET J. e col.<sup>24</sup> estudaram a atividade anticoagulante de fucoidanas de baixo peso molecular, 8 kDa, obtida pela degradação química de um grupo com alto peso molecular extraído de algas marrons, e que apresentava uma forte atividade anticoagulante. A atividade anticoagulante desse novo composto foi comparada com a da heparina de baixo peso molecular (dalteparina) a partir de testes aplicados em coelhos. Assim, conclui-se que a fucoidana de baixo peso molecular apresentou ainda uma forte atividade anticoagulante, mesmo apresentando um menor efeito sobre a coagulação que a dalteparina.



### **3. OBJETIVOS**

#### ***3.1. Objetivo Geral***

Este trabalho tem por objetivo modificar quimicamente a superfície do polímero quitosana, através da reação de sulfatação semi-heterogênea.

#### ***3.2. Objetivos específicos***

- Modificar a superfície do polímero quitosana com um complexo sulfatante formado por dimetilformamida e ácido clorossulfônico;
- Caracterizar o material obtido por espectroscopia no infravermelho (IV), microscopia de varredura eletrônica, análise de energia dispersiva de raios X (MEV-EDX) e análise térmica (DSC e TGA);
- Verificar o rendimento da reação com o objetivo de otimizá-la..

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Materiais

A QTS foi adquirida pela empresa Purifarma Company, (Anápolis/GO), com grau de desacetilação de 85%. Para a etapa de diálise foi utilizada uma membrana (INLAB), com *cut-off* de peso molecular de 12.000-16.000 kDa e porosidade de 25 Å. Os demais reagentes usados foram: hidróxido de sódio e dimetilformamida (Cromato produtos químicos), ácido clorossulfônico (Vetec) e propanona (Nuclear).

### 4.2. Métodos

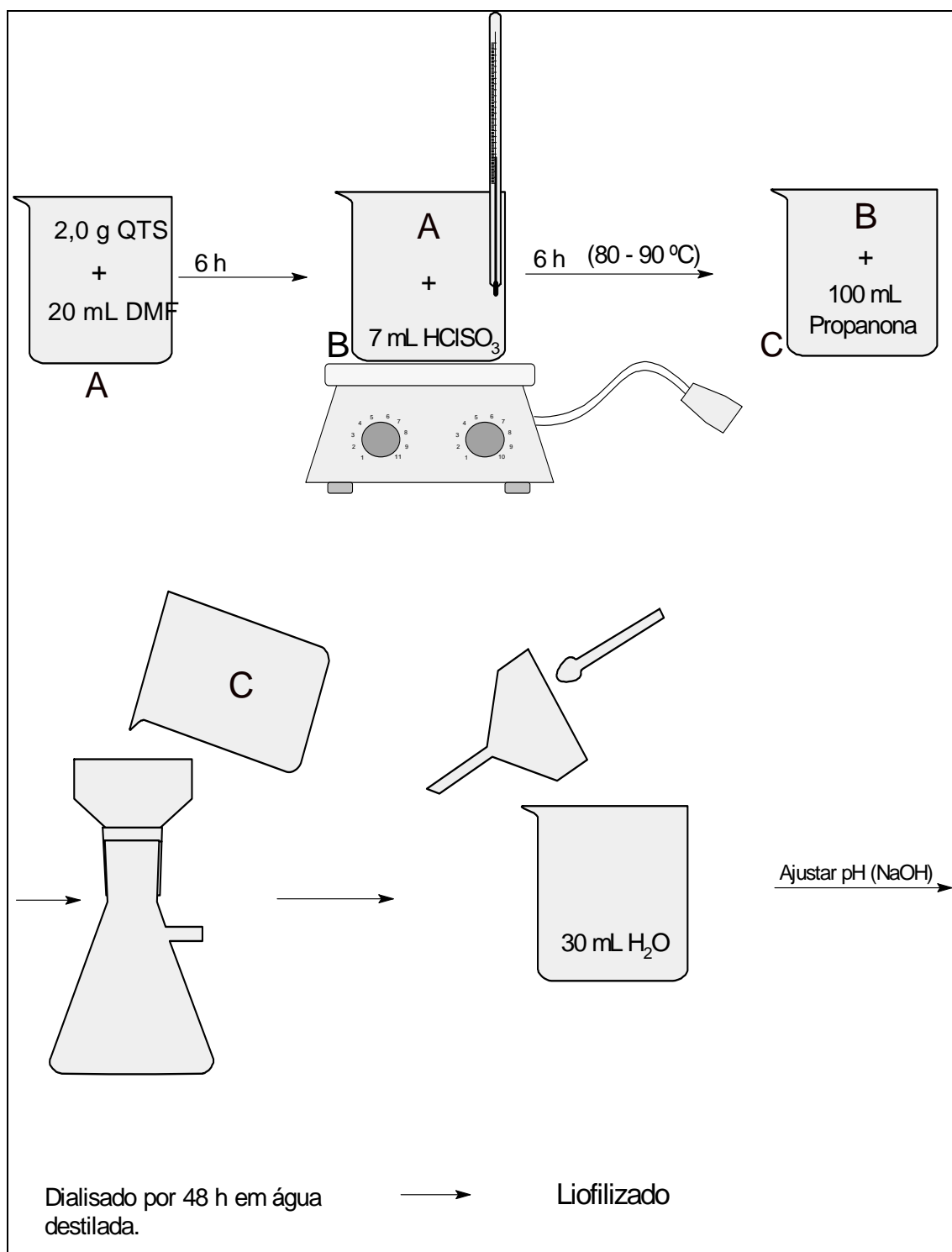
#### 4.2.1. Preparação da Quitosana Sulfatada

Polissacarídeos sulfatados podem ser preparados por diferentes métodos, assim como a sua caracterização. A metodologia foi realizada partindo-se da junção de algumas metodologias, de modo que partindo-se de uma metodologia específica a reação não estava ocorrendo.

A metodologia utilizada neste trabalho mostrada na Figura 4 será através da reação de sulfatação semi-heterogênea, que consiste em uma etapa da reação em meio heterogêneo e outra em meio homogêneo.

Em capela de exaustão, foram misturados em um béquer de 50 mL, 2,0 g de QTS com 20 mL de DMF, deixando-os em contato por 6 h. Posteriormente, foi realizada em banho de gelo, devido a reação ser muito exotérmica a reação de sulfatação do polissacarídeo pela adição de um complexo sulfatante formado pela adição de 10 mL de DMF seguida da adição de 7 mL de ácido clorossulfônico (gota a gota), durante 6 h sob agitação e com temperatura controlada entre 80 e 90 °C. Após a reação a mistura foi precipitada em um béquer de 500 mL contendo 100 mL de propanona, seguida de filtragem a vácuo para separação entre o produto e o meio reacional. O produto foi então colocado em um béquer de 100 mL e resuspenso em 30 mL de água destilada onde teve seu pH ajustado para 10 com a adição de hidróxido de sódio 20%. A solução foi colocada em uma membrana de diálise e

mergulhada em um béquer contendo água destilada por 48 h. O produto foi retirado da membrana, sendo transferido para um béquer e levado ao freezer para congelar. O produto depois de congelado foi levado ao liofilizador onde foi secado e posteriormente mandado para análise.



**Figura 4.** Esquema de preparação da QTSS.

## **4.2.2 Caracterizações QTSS**

### **4.2.2.1. Espectroscopia no Infravermelho (IV)**

A espectroscopia no infravermelho corresponde à parte do espectro situada entre as regiões do visível e das microondas. Fundamenta-se no fato de uma radiação, que quando absorvida por uma molécula, converte-se em energia de vibração molecular, não envolvendo nenhuma alteração na posição do centro de gravidade da molécula. Dessa forma, como cada ligação corresponde a um nível vibracional específico, grupos funcionais distintos apresentarão absorção com intensidade em regiões diferentes do espectro.<sup>25</sup>

Para a obtenção dos espectros no infravermelho as amostras de QTS e QTSS foram maceradas e posteriormente analisadas no espectrômetro de infravermelho ABB-Bomem, modelo FTLA 2000 (Central de análises – Departamento de Química UFSC) na região de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com pastilhas de KBr.

### **4.2.2.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV-EDX)**

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica que fornece informações detalhadas de um material, devido a sua alta capacidade de ampliação (até 300.000 vezes). A imagem eletrônica de varredura é formada pela incidência de um feixe de elétrons na amostra, sob condições de vácuo. Juntamente com o MEV, um detector de energia dispersiva de raios-X (*Energy Dispersive x-ray Spectrometer* - EDS ou EDX) pode ser acoplado, sendo de grande importância, pois enquanto o MEV proporciona nítidas imagens, o EDX permite sua imediata identificação através do mapeamento da distribuição e proporção entre os elementos químicos, podendo determinar a composição química pontual das amostras analisadas.<sup>26</sup>

Para as análises de morfologia utilizou-se um microscópio eletrônico de varredura acoplado ao (EDX) energia dispersiva de raios-X, marca Phillips, modelo XL 30 (LabMat – Departamento de Engenharia Mecânica, UFSC). As amostras foram maceradas e recobertas com uma fina camada de ouro em um metalizador.

#### **4.2.2.3. Análise Termogravimétrica (TG)**

A TG é uma técnica que consiste em determinar a faixa de temperatura em que um material inicia a decomposição, permitindo obter informações relacionadas à composição e estabilidade térmica de compostos. Durante o processo, a temperatura é aumentada, podendo a taxa de variação da mesma ser mantida constante.<sup>27</sup>

Os termogramas foram obtidos no aparelho Shimadzu TGA 50 (Central de Análises - Departamento de Química UFSC), usando uma taxa de aquecimento constante 10 °C/min. sob um fluxo de 50 mL de nitrogênio, em uma faixa de temperatura de 25°C a 600°C.

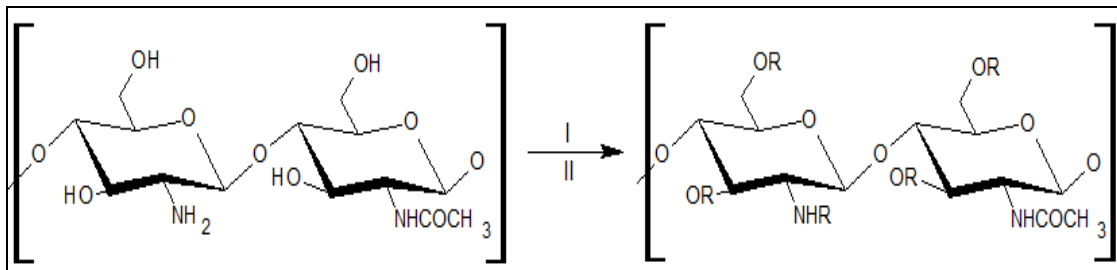
#### **4.2.2.4. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)**

A calorimetria diferencial de varredura (DSC) é uma técnica que consiste em verificar transformações físicas ou químicas de um material, que são acompanhadas pelo ganho ou perda de calor referente ao aquecimento fornecido a substância. Essas transformações envolvem absorção (processo endotérmico) ou evolução de calor (processo exotérmico). O DSC é utilizado para caracterizar uma série de materiais, inclusive materiais poliméricos fornecendo informações relacionadas ao comportamento de fusão, cristalização, transição sólido-sólido e reações químicas.<sup>27</sup>

Os termogramas foram obtidos no aparelho Shimadzu – DSC 50 (Central de Análises - Departamento de Química UFSC), usando uma taxa de aquecimento constante 10 °C/min. sob um fluxo de 50 mL de nitrogênio, em uma faixa de temperatura de 25 °C a 250 °C.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A QTS foi sulfatada de acordo com a metodologia descrita no *item 4.2.1*.



(1) Quitosana; (2) Quitosana sulfatada; (I)  $\text{HClSO}_3/\text{DMF}$ ; (II) 6h (80-90 °C)

Onde  $\text{R} = \text{SO}_3^- \text{Na}^+$

**Figura 5.** Esquema da reação de sulfatação da QTS.

O uso de ácido clorossulfônico é utilizado como agente sulfatante, podendo apresentar algumas desvantagens, como dificuldade de manuseá-lo por ser um reagente tóxico e cáustico. Além disso, a umidade deve ser evitada de forma que o ácido clorossulfônico torna-se inativo ao reagir com água. A DMF tem como função aumentar a dissolução do polissacarídeo, permanecendo inerte ao meio reacional.<sup>12</sup>

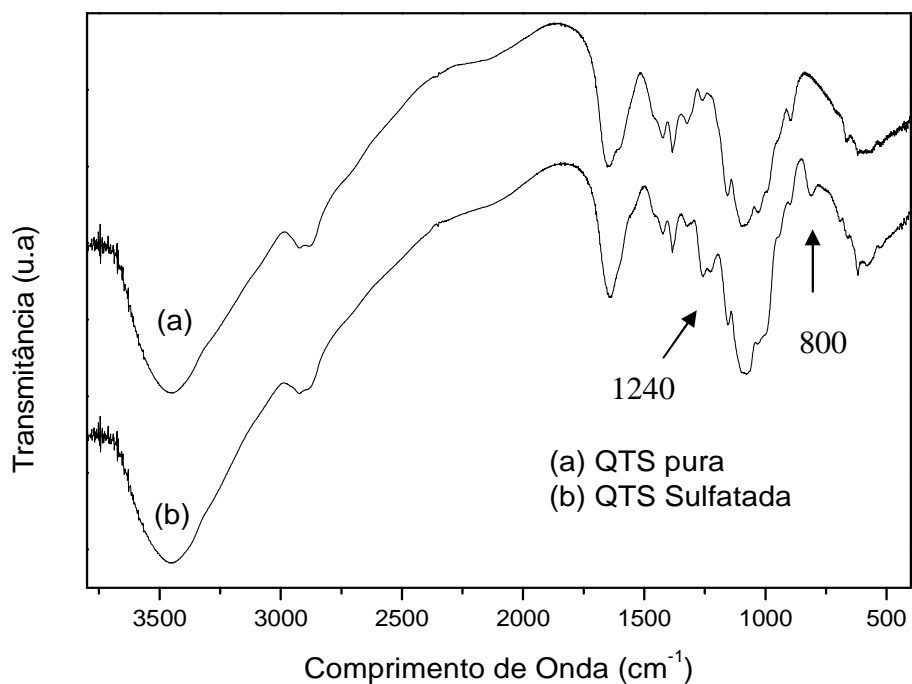
Para a atividade anticoagulante e antiviral é interessante aumentar o grau de sulfatação tornando a estrutura do polissacarídeo semelhante a da heparina, uma vez que esses grupos são um dos fatores responsáveis para a atividade anticoagulante. Esse aumento pode estar relacionado com a quantidade de ácido clorossulfônico no meio reacional e também com o aumento da temperatura durante a reação, porém o aumento da temperatura pode causar a degradação do polímero e conseqüentemente a perda de suas propriedades.<sup>12</sup> A reação de sulfatação apresentou uma massa recuperada após a reação de 53%, sendo essa massa satisfatória.

### 5.1. Espectroscopia no infravermelho (IV)

As unidades desacetiladas da QTS apresentam três grupos funcionais característicos, sendo eles uma amina primária no C- 2, uma hidroxila primária no C-3 e uma hidroxila secundária no C-6. As unidades acetiladas de QTS apresentam grupos acetoamidos no C-2, referentes à QT.

No espectro da QTS (Figura 6 (a)), observa-se a banda na região de  $3450\text{ cm}^{-1}$  muito intensa referente às vibrações do estiramento -OH e N-H de aminas, enquanto em  $2920$  e  $2880\text{ cm}^{-1}$  correspondem às vibrações do estiramento C-H. As bandas em  $1655$  e  $1080\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas ao estiramento C=O de amida secundária originadas da QT e as vibrações do estiramento C-O de álcool primário.<sup>28</sup>

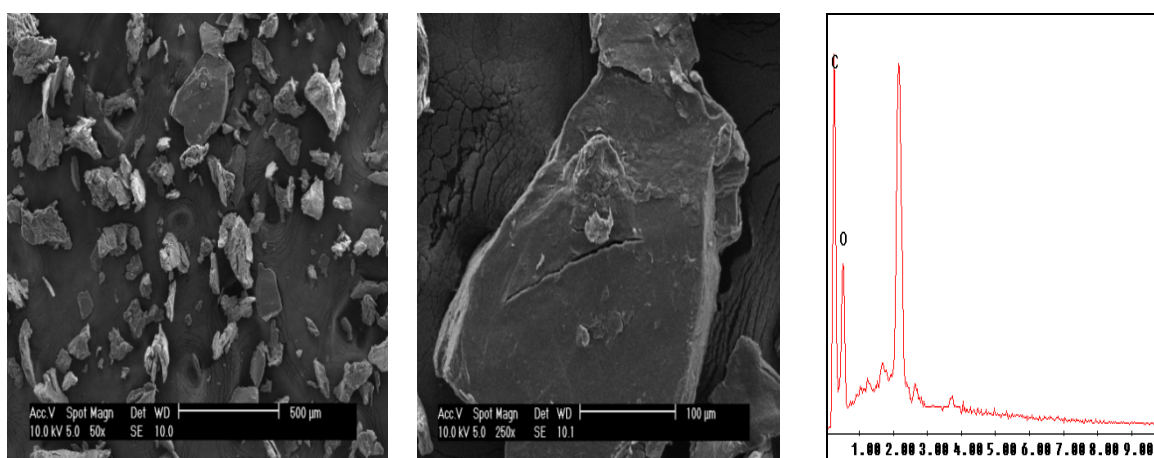
Para a QTSS (Figura 6 (b)), observam-se as mesmas bandas observadas na QTS com exceção do aparecimento das bandas em  $1240$  e  $800\text{ cm}^{-1}$ , que podem ser atribuídas aos estiramentos C-O-S e S=O respectivamente. Desta forma, sugere-se que a QTS foi sulfatada, como reportado no estudo de Preeyant Vongchan e col.<sup>19</sup>



**Figura 6.** Espectro no infravermelho: a) QTS e b) QTSS.

## 5.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV-EDX)

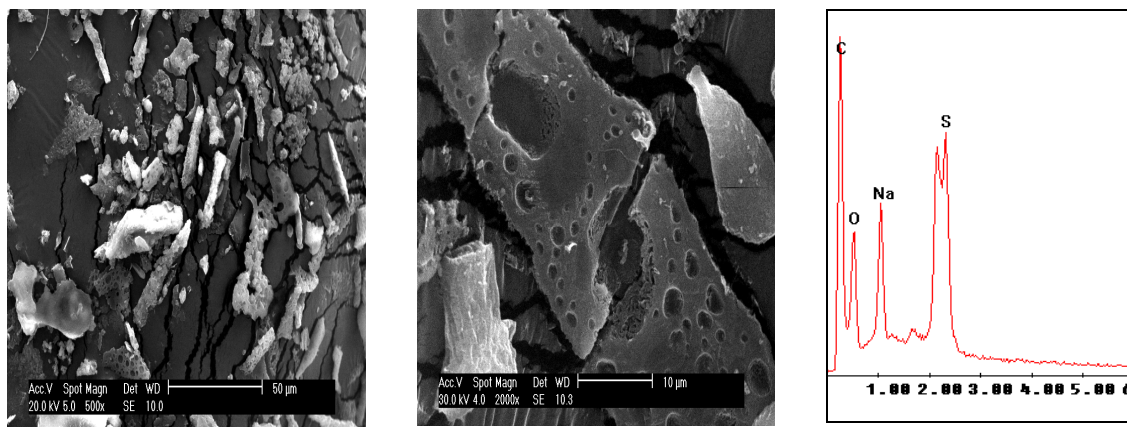
Nas fotomicrografias das partículas do pó de QTS (Figura 7), observou-se uma morfologia com aglomerados compactos e irregulares, amplamente distribuídos e ausência de poros. A partir da análise quantitativa de (MEV-EDX) verificou-se a presença dos elementos C e O presentes na estrutura de QTS.



**Figura 7.** Fotomicrografias da QTS e sua respectiva EDX.

A Figura 8 ilustra as fotomicrografias da QTSS, a qual apresentou uma morfologia com aglomerados na forma de bastonetes amplamente distribuídos além de uma superfície porosa. Na análise quantitativa (MEV-EDX) da QTSS verificou-se picos referentes à presença de enxofre e sódio, sugerindo que ocorreu a sulfatação da QTS. Verificou-se também, que na diálise, a eliminação do cloreto de sódio formado durante a etapa de neutralização do meio foi eficaz, uma vez que, no EDX não apresentou a presença do cloro. O pico referente ao sódio sugere sua presença na estrutura da QTSS, de forma que o polissacarídeo sulfatado apresentou-se na forma sódica.

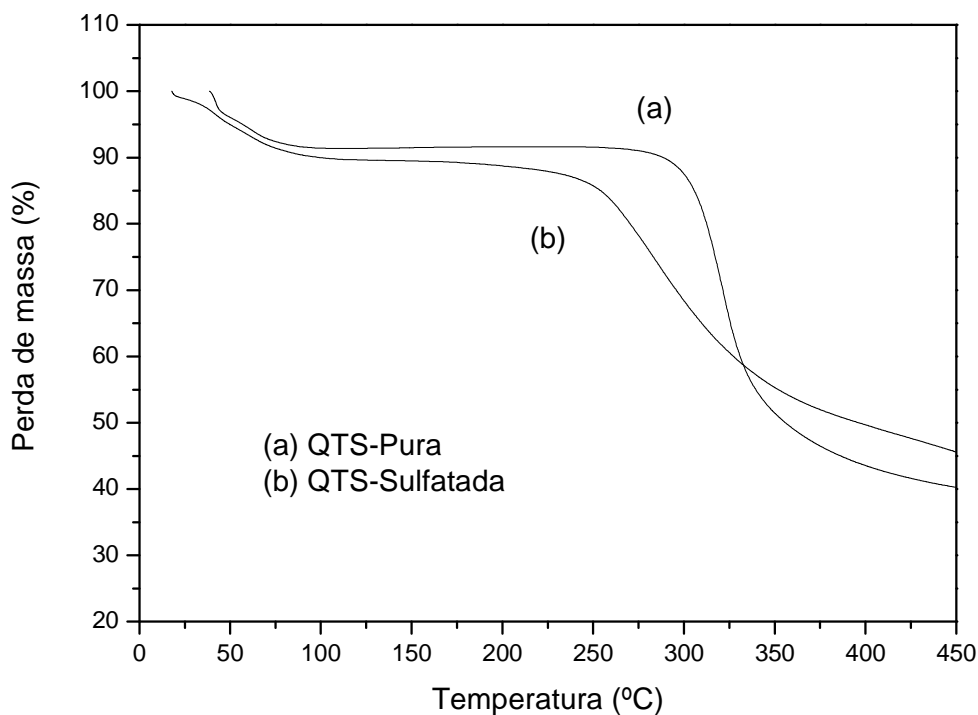




**Figura 8.** Fotomicrografias da QTSS e EDX.

### **5.3. Análise Termogravimétrica (TG)**

Nos termogramas foi possível acompanhar a perda de massa da amostra durante certo período de tempo enquanto se varia a temperatura de forma controlada. Os termogramas obtidos são mostrados na Figura 9, e neles verificou-se a perda de massa em dois estágios. No primeiro estágio observa-se que as amostras de QTS e QTSS apresentam perda de massa entre 50 e 100 °C, atribuída à desidratação da amostra. Já o segundo estágio refere-se à temperatura de decomposição da cadeia principal da QTS e QTSS. Para a QTS (Figura 8a) a temperatura de decomposição foi entre 240 e 330 °C, resultando numa perda de massa de aproximadamente 51%, enquanto, a temperatura de degradação para a QTSS foi entre 180 e 330 °C e a perda de massa foi aproximadamente 39% (Figura 8b) evidenciando uma menor estabilidade térmica da QTSS.

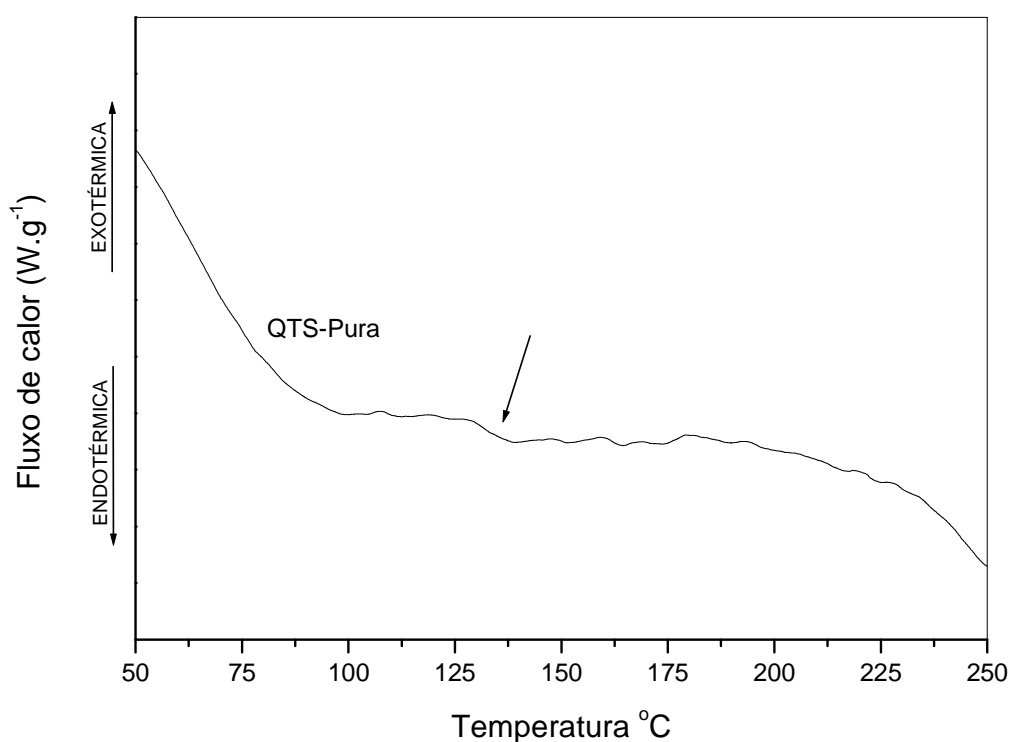


**Figura 9.** Análise de TGA para: a) QTS e b) QTSS.

A partir destes dados verificou-se que a temperatura de decomposição da QTSS é menor que a temperatura de decomposição da QTS, o que sugere que a sulfatação modificou a estabilidade da QTS, tornando-a menos estável termicamente. A diminuição da estabilidade térmica da QTSS pode estar atribuída à interação iônica entre o grupo  $\text{NH}_3^+$  presente na QTS e o íon  $\text{SO}_4^{2-}$  adicionado durante a reação. A presença de grupos  $\text{SO}_4^{2-}$  entre as cadeias de QTS pode contribuir para aumentar o volume livre entre as cadeias, permitindo a penetração de maior intensidade de energia, resultando numa menor estabilidade térmica.

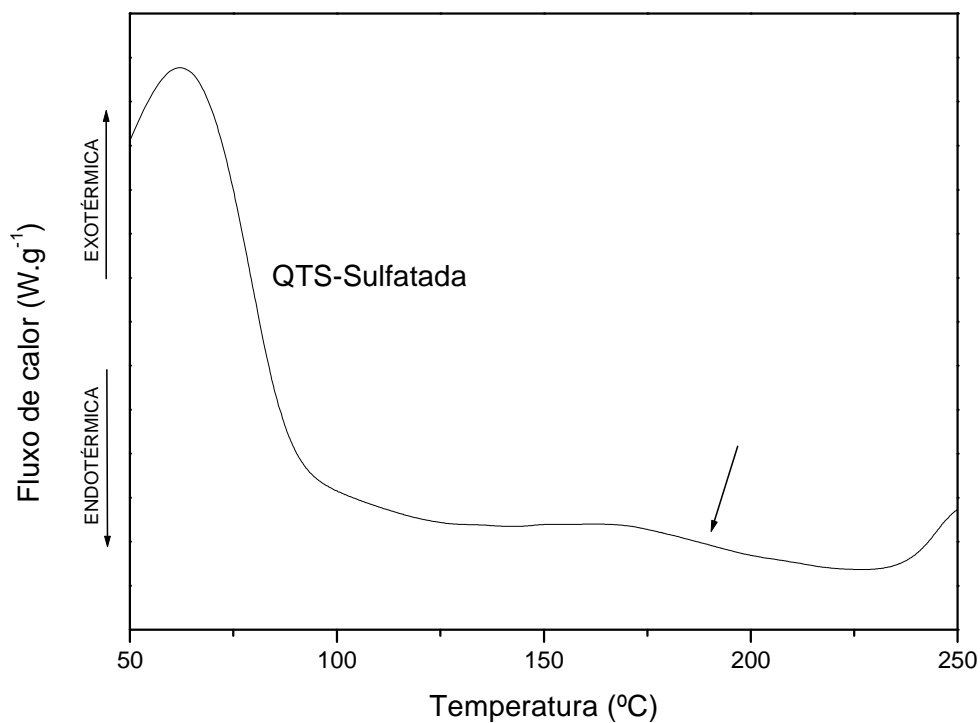
#### 5.4. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A análise de DSC foi usada para acompanhar as transições de fase por observação da perda ou absorção de calor. Estas transições podem ser utilizadas para caracterizar a alteração da temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), para o estado maleável, ou seja, na temperatura em que as cadeias poliméricas adquirem mobilidade. Na Figura 10 observou-se o termograma de DSC para a QTS a qual apresentou uma  $T_g$  em aproximadamente 133 °C.



**Figura 10.** Análise de DSC para a QTS.

Na Figura 11 está representado o termograma de DSC para a QTSS, a qual apresentou uma  $T_g$  de aproximadamente 188 °C.



**Figura 11.** Análise de DSC para a QTSS.

Nos termogramas de DSC verificou-se um aumento no valor da Tg da QTSS, conferindo um caráter mais rígido, quando comparada com a QTS. Sugere-se que esse aumento de rigidez está relacionado com o aumento do número de grupos polares, e também devido as ligações iônicas entre os íons sulfato e sódio, adicionados na reação de sulfatação. Esses grupos polares tentem a aproximar mais fortemente as cadeias entre si, aumentando a rigidez.

## 6. CONCLUSÃO

A modificação química da superfície da QTS, através da reação de sulfatação semi-heterogênea, foi evidenciada a partir dos resultados das análises de IV, MEV-EDX e análises térmicas. Desta forma, foi possível concluir que:

- A modificação química da QTS foi realizada e as caracterizações sugerem que o produto esperado foi obtido, apresentando uma massa recuperada de 53%. , sendo essa massa satisfatória.

- Os espectros no infravermelho indicaram o aparecimento de duas bandas 1240 e 800  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas aos estiramentos C-O-S e S=O respectivamente, sugerindo a modificação da QTS.

- A modificação da superfície da QTS foi evidenciada na análise morfológica. A QTSS apresentou uma morfologia com aglomerados na forma de bastonetes amplamente distribuídos além de uma superfície porosa. Na análise qualitativa, EDX, observou-se a presença dos elementos enxofre e sódio, que comprovam a sulfatação.

- Nos termogramas de TG foi evidenciada a diminuição da estabilidade térmica da QTSS e relação à QTS. No DSC observou-se um aumento da Tg da QTSS devido ao aumento de grupos polares.

### PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectivas para continuação desse trabalho propõem-se a caracterização da QTSS por análise elementar CHNS, para possível identificação do grau de sulfatação, uma vez que a atividade anticoagulante e antiviral está relacionada com o grau de substituição. Além disso, propõe-se otimizar a metodologia experimental, alterando a quantidade de ácido clorossulfônico, com o objetivo de aumentar a quantidade de massa recuperada após a reação, pois o mesmo pode ser um limitante da reação de sulfatação. E finalmente realizar um teste *in vivo* em camarões marinhos para comprovar se esse produto é um bom antiviral contra o vírus da mancha branca.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MUZZARELLI, R. A. A.; **Chitin**. Oxford, England: Pergamon Press Ltda, 1978.
2. ROCHA, H. A. O.; FARIAS, E. H. C.; BEZERRA, L. C. L. M.; ALBUQUERQUE, I. R. L.; MEDEIROS, V. P.; QUEIROZ, K. C. S.; LEITE, E. L. *Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas com atividade anticoagulante*. **Infarma**, v. 16, nº 1-2, p. 82-86, 2004.
3. ARAUJO, G. S.; **Efeito imunoestimulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Gracilaria caudata* na reversão sexual de tilapia do Nilo**. **Engenharia de Pesca**. 2006. 43.f, Tese (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Ceará.
4. PIRES, L.; GORIN, P. A. J.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M. R. *Na active heparinoid obtained by sulphation of a galactoglucomanna extracted from the endosperm of *Senna macranthera* seeds*. **Carbohydr. Polymers.**, v. 46, p. 165-169, 2001.
5. MARQUES, J. S. **Contribuição para o monitoramento do Vírus da Síndrome da Mancha Branca na piscicultura de Santa Catarina**. Aqüicultura. 2008. 10.f, Tese (Mestrado em Aqüicultura) – Curso de Pós-Graduação em Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
6. CANELLA, K. N. C.; GARCIA, R. B.; *Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel – influência do método de preparação e do solvente*. **Quim. Nova**, v.24, Nº 1, p. 13-17, 2001.
7. NASCIMENTO, R. F.; DIAS, F. S.; QUEIROZ, D. C.; LIMA, M.B. *Um sistema simples para preparação de microesferas de quitosana*. **Quim. Nova**, v.31, Nº 1, p. 160-163, 2008.
8. VONGCHAN, P.; SAJOMSANG, W.; KASINRERK, W.; SUBYEN, D.; KONGTAWELERT, P. *Anticoagulant activities of the chitosan polysulfate synthesized from marine crab shell by semi-heterogeneous conditions*. **ScienceAsia**, v. 29. p. 115-120, 2003.
9. BODE, V.; FRANZ, G. *Physiological activity of new heparinoids derived from plant polysaccharides*. **Arch. Pharm.**, Athens, v. 324, p. 363-365, 1991.
10. MATHUR, N. K.; NARANG, C. K. *Chitin and Chitosan, versatile polysaccharides from marine animals*. **Journal of Chemical Education**, v. 67, Nº 11, p. 940-942, 1990.

11. GARCIA, R. B.; da SILVA, D. L. P.; COSTA, M.; RAFFIN, F. N.; RUIZ, N. M. S. *Avaliação de géis obtidos a partir da acetilação da quitosana em meio heterogêneo*. **Quim. Nova**, v. 31, Nº 3, p. 486-492, 2008.
12. O'NEILL, A. N. *Sulphated derivatives of laminarin*. **Can. J. Chem.**, v. 33, p.1097-1101, 1955.
13. <[http://perflin.com/livro/download/Fdm\\_CEC\\_cap\\_14.pdf](http://perflin.com/livro/download/Fdm_CEC_cap_14.pdf)>. Acesso em 20 out. 2009.
14. SPRINGER, G. F.; WURZEL, H. A.; Mc NEAL, G. M.; ANSELL, N. J.; DOUGHTY, M. F. *Isolation of anticoagulant fractions from crude fucoidin*. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 94, p. 404-409, 1957.
15. ZOYSA, D. M.; NIKAPITYA, C.; JEON, Y. J.; JEE, Y.; LEE, J. *Anticoagulant activity of sulfated polysaccharide isolated from fermented brown seaweed *Sargassum fulvellum**. **J Appl Phycol**, v. 20, p. 67-74, 2008.
16. FARIAS, W. R. L.; VALENTE, A-P.; PEREIRA, S. P.; MOURÃO P. A. S. *Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans*. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 38, p. 29299-29307, 2000.
17. DROZD, N. N.; MAKAROV, V. A.; BASHKOV, G. V.; GAL'BRAIKH, L. S.; VIKHOVERA, G. A.; GORBACHEVA, I. N. *The effect of the joint administration of heparin and chitosan sulfate ether on hemostatic function*. **Eksp Klin Farmakol**, v. 59, 1996.
18. ZOYSA, D. M.; NIKAPITYA, C.; JEON, Y. J.; JEE, Y.; LEE, J. *Anticoagulant activity of sulfated polysaccharide isolated from fermented brown seaweed *Sargassum fulvellum**. **J Appl Phycol**, v. 20, p. 67-74, 2008.
19. VONGCHAN, P.; SAJAMSANG, W.; SUBYEN, D.; KONGTAWELERT, P. *Anticoagulant activity of a sulfated chitosan*. **Carbohydrate polymers**, v. 337, p. 1239-1242, 2002.
20. MOHSEN, M.S.; ASKER; MOHAMED, S. F.; ALI, F.M.; EL-SAYED, O. *Chemical Structure and Antiviral Activity of Water-soluble Sulfated polysaccharides from *Sargassum latifolium**. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 10, p. 1178-1185, 2007.
21. ZHANG, H. J.; MAO, W. J.; FANG, F.; LI, H. Y.; SUN, H. H.; CHEN, Y.; QI, X. H. *Chemical characteristics and anticoagulant activities of a sulfated polysaccharide and its fragments from *Monostroma latissimum**. **Carbohydrate polymers**, v. 71, p. 428-434, 2008.
22. MESTECHKINA, N. M.; SHCHERBUKHIN, BANNIKOVA, G. E.; VARLAMOV, V. P.; DROZD, N. N.; TOLSTENKOV, A. S.; MAKAROV, A.; TIKHONOV, V. E. *Anticoagulant Activity of Low-molecular-weight Sulfated Derivatives of Galactomannan from *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Seeds*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, Nº 1, p. 98-103, 2008

23. ZHAO, X.; YU, G.; GUAN, H.; YUE, N.; ZHANG, Z.; LI, H. *Preparation of low-molecular-weight polyguluronate sulfate and its anticoagulant and anti-inflammatory activities. Carbohydrate polymers*, v. 69, p. 272-279, 2007.
24. MILLET J.; JOUAULF, S. C.; MAURAY, S.; THEVENIAUX, J.; STERNBERG C.; VIDAL C. B.; FISCHER A. M.; *Antithrombotic and anticoagulant activities of a low molecular weight fucoidan by the subcutaneous route. Thrombosis and haemostasis*, v. 81, p. 391-395, 1996.
25. SILVERSTEIN, R.M.; CLAYTON, G.; MORRILL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**; Rio de Janeiro: Guanabara koogan S.A. (1994)
26. <<http://www.degeo.ufop.br/laboratorios/microlab/mev.htm>>. Acesso em 20 out. 2008.
27. VALGAS, S. **Desenvolvimento de um novo sistema de liberação controlada do fármaco enrofloxacin a partir de microesferas de malonilquitosana a ser aplicado em medicina veterinária. Química**. 2008. 63, 64.f, Tese (Doutorado em Química) – Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
28. ALBAN, S.; KRAUS, J.; FRANZ, G. *Syntesis of laminarin sulfates with anticoagulant activity. Drug Res.*, v.42(II), n. 8, p. 1005-1008, 1992.
29. COSTA, E. S.; MANSUR, H. S.; *Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. Quim. Nova*, v. 31, N° 6, S1-S4, 2008.