

UNESP- UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JULIO DE MESQUITA FILHO”  
LABORATÓRIO DE QUÍMICA ORGÂNICA FINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
MATERIAIS – POSMAT

ESTUDO E TRANSFORMAÇÃO QUÍMICA DE BIOPOLÍMEROS A BASE  
DE QUITINA E QUITOSANA PARA PREPARAÇÃO DE MATERIAIS COM  
DIVERSAS PROPRIEDADES

FERNANDA STUANI PEREIRA

Orientador: Prof. Dr. Eduardo René Pérez González

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
PRESIDENTE PRUDENTE

2012

FERNANDA STUANI PEREIRA

ESTUDO E TRANSFORMAÇÃO QUÍMICA DE BIOPOLÍMEROS A BASE  
DE QUITINA E QUITOSANA PARA PREPARAÇÃO DE MATERIAIS COM  
DIVERSAS PROPRIEDADES

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia de Materiais ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais (POSMAT) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, área de concentração em Química Orgânica sob a orientação do Prof. Dr. Eduardo René Pérez González

Orientador: Prof. Dr. Eduardo René Pérez González.

Presidente Prudente

2012

Pereira, Fernanda Stuani.

Estudo e transformação química de biopolímeros a base de quitina e quitosana para preparação de materiais com diversas propriedades / Fernanda Stuani Pereira, Presidente Prudente, 2012.

95 f.

Orientador: Eduardo René Pérez González

Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente, 2012

1. Quitina-quitosana. 2. *N*-alquilação. 3. Poli-azo-compostos. I. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências e Tecnologia. II. Título.

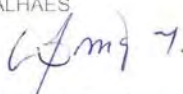
**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado DE FERNANDA STUANI PEREIRA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DO(A) FACULDADE DE CIÊNCIAS DE BAURU.**

Aos 21 dias do mês de agosto do ano de 2012, às 14:00 horas, no(a) Anfiteatro III da Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. EDUARDO RENÉ PEREZ GONZALEZ do(a) Departamento de Física, Química e Biologia / Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente, Prof. Dr. ALVICLER MAGALHAES do(a) Departamento de Química Inorgânica / Universidade Estadual de Campinas, Prof. Dr. LUIZ CARLOS DA SILVA FILHO do(a) Departamento de Química / Faculdade de Ciências de Bauru, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE Mestrado de FERNANDA STUANI PEREIRA, intitulada "ESTUDO E TRANSFORMAÇÃO QUÍMICA DE BIOPOLÍMEROS A BASE DE QUITINA E QUITOSANA PARA PREPARAÇÃO DE MATERIAIS COM DIVERSAS PROPRIEDADES". Após a exposição, a discente foi argüida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: Aprovada. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. EDUARDO RENÉ PEREZ GONZALEZ



Prof. Dr. ALVICLER MAGALHAES



Prof. Dr. LUIZ CARLOS DA SILVA FILHO



## **Agradecimentos**

Primeiramente a Deus que é meu guia e minha fonte de luz, me capacita e me dá forças em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais Maria Regina e Luiz Antônio pelo carinho e amor. Obrigada pelos ensinamentos e por me apoiarem em todos os projetos de vida.

Ao meu irmão Luiz Augusto por estar ao meu lado em todo momento. Por me ensinar tanto sobre o que é ter fé e acreditar que mesmo nos momentos mais difíceis o impossível se torna possível, e ainda mais, eu posso ser capaz de realizá-lo. Você é o meu maior orgulho e meu exemplo de vida.

Ao meu orientador Eduardo por me ensinar e não medir esforços quando precisamos de seu apoio e orientação. Obrigada confiar em mim e principalmente pela grande amizade. Você é um exemplo de profissional para mim.

Ao Prof. Dr. Alviclér Magalhães e seu grupo de Pesquisa do Laboratório de Química Inorgânica do Instituto de Química da UNICAMP pela colaboração com as análises de Ressonância Magnética Nuclear.

Ao Prof. Dr. Marcos Eberlin e seu grupo de Pesquisa, em especial, a Dra. Heliara L. Nascimento do Laboratório ThoMSon de Espectrometria de Massas do Instituto de Química da UNICAMP pelas análises de Espectrometria de Massas.

Ao Prof. Dr. Martin G. Peter pela disposição e colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Deuber L. Agostini pela colaboração com as medidas de análises térmicas.

Aos meus amigos do LQOF, Rafa, Rebeca, Letícia, João, Juliana, Luiza, Dantieli, Laís e Thiago por todo apoio e união durante a realização desse trabalho.

Aos meus grandes amigos Gabi, Caio e Ana Paula Caetano por todos os momentos maravilhosos que sempre passamos juntos.

Ao meu namorado Leo pelo apoio, paciência e todo carinho. Através de você eu pude descobrir o que é o amor e a verdadeira felicidade. Obrigada por fazer parte da minha vida e da minha história.

Ao Programa de Pós-Graduação de Ciência e Tecnologia de Materiais.

A Capes pela bolsa concedida.

*Sábio é o ser humano que tem coragem de ir diante do espelho da sua alma para reconhecer seus erros e fracassos e utilizá-los para plantar as mais belas sementes no terreno de sua inteligência.*

*Augusto Cury*

## Resumo

O presente trabalho descreve modificações estruturais feitas na cadeia lateral do polímero quitina-quitosana mediante a *N*-alquilação com um aldeído aromático, a qual origina a base de Schiff como produto intermediário, seguido de uma redução com cianoborohidreto de sódio (NaBH<sub>3</sub>CN) para a formação do composto *N*-Benzilquitosana. Subsequentemente, reações de acoplamento entre o produto sintetizado e diferentes sais de diazônio foram realizadas para produzir uma nova classe de compostos poli-azóicos a partir deste polímero. Estas modificações são importantes pela síntese de novos derivados com potencial aplicação como materiais orgânicos. Pela técnica de ressonância magnética nuclear de próton em solução, determinou-se o grau de desacetilação do polímero que foi de 68 %. O grau de substituição do derivado *N*-Benzilquitosana também foi determinado por RMN de <sup>1</sup>H e o valor encontrado foi de 46 %. Todos os compostos foram caracterizados por espectroscopia de absorção na região do infravermelho e ressonância magnética nuclear em solução e no estado sólido, que confirmaram a síntese dos derivados poliméricos. Devido ao alto peso molecular do polímero e seus derivados, estes foram hidrolisados e os oligômeros formados foram estudados por espectrometria de massas com ionização por eletrospray. Além de confirmar a formação do composto *N*-Benzilquitosana, constatou-se uma reação de substituição nucleofílica aromática do átomo de bromo e do grupo nitro pelo átomo de cloro promovido pela alta concentração de íons cloretos no meio reacional. Entretanto, a técnica não se mostrou adequada para a caracterização dos poli-azo-compostos, pois a reação de hidrólise ácida leva a uma degradação dos mesmos. A espectroscopia de UV-VIS permitiu identificar as bandas de absorção dos poli-azo-compostos e mostrou que os substituintes influenciam na absorção causando um efeito batocrômico para um maior comprimento de onda. Por fim, estudou-se o comportamento térmico do polímero quitina-quitosana e seus derivados pelas técnicas de termogravimetria e calorimetria explanatória diferencial. As curvas de TG mostraram que os derivados de quitina-quitosana degradam a temperaturas menores que o polímero não modificado, na qual possibilita os compostos a serem estudados como potenciais sensores de temperatura. As curvas DSC concordam com os resultados observados em TG/FTIR.

**Palavras-chave:** Quitina. Quitosana. *N*-alquilação. Poli-azo-compostos.

## Abstract

The present work describes the structural modifications made in the side chain of the polymer chitin-chitosan by *N*-alkylation with an aromatic aldehyde, which forms the Schiff base as an intermediate, followed by reduction with sodium cyanoborohydride (NaBH<sub>3</sub>CN) to form the *N*-Benzyl chitosan compound. Subsequently, coupling reactions between the synthesized product and different diazonium salts were made to produce a new class of poly-azo-compounds from this polymer. These changes are important for the synthesis of new derivatives with potential use as organic materials. By proton nuclear magnetic resonance, it was determined the degree of deacetylation of the polymer, which was 68%. The degree of substitution of *N*-Benzyl chitosan derivative was also determined by <sup>1</sup>H NMR and the value was 48%. All compounds were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance, which confirmed the synthesis of polymeric derivatives. Due to the high polymer molecular weight and its derivatives, they were hydrolysed and the oligomers formed were analyzed by mass spectrometry with electrospray ionization. In addition to confirm the formation of the compound *N*-Benzyl chitosan, there was a nucleophilic aromatic substitution reaction of the bromine atom and the nitro group by chlorine atom promoted by high concentration of chloride ions in the reaction medium. However, the technique was not suitable for the characterization of poly-azo-compounds because the reaction of acid hydrolysis leads to their degradation. The UV-VIS spectroscopy allowed the identification of the absorption bands of poly-azo-compounds and showed that the substituents influence the absorption causing a bathochromic effect to a longer wavelength. Finally, it was studied the thermal behavior of the polymer chitin-chitosan and its derivatives by thermogravimetry and differential calorimetry explanatory. TG curves showed that the chitin-chitosan derivatives degrade at lower temperatures than the unmodified polymer, which allows the compounds to be studied as potential temperature sensors. The DSC curves agree with the results observed in TG / FTIR.

**Keywords:** Chitin. Chitosan. *N*-alkylation. Poly-azo-compounds.



## LISTA DE ABREVIATURAS

- Azo-Cloro = poli-(4-(4-clorofenil)diazenil)-*N*-benzilquitosana  
Azo-Bromo = poli-(4-(4-bromofenil)diazenil)-*N*-benzilquitosana  
Azo-Nitro = poli-(4-(4-nitrofenil)diazenil)-*N*-benzilquitosana  
Azo-Sulfônico = ácido-poli-(4-(4-(glicos-2-ilamino)metil)diazenil)benzenosulfônico  
D<sub>2</sub>O = água deuterada  
DMF = dimetilformamida  
DMSO = dimetilsulfóxido  
DMSO-*d*6 = dimetilsulfóxido deuterado  
DSC = calorimetria exploratória diferencial  
DTG = termogravimetria diferencial  
ESI = ionização por eletrospray  
ESI(+)-MS = espectrometria de massas utilizando ionização por eletrospray em modo positivo  
FT = transformada de Fourier  
g = gramas  
GA = grau de acetilação  
GD = grau de desacetilação  
GlcN = biopolímero quitina-quitosana hidrolisado  
HCl = ácido clorídrico  
HOMO = highest occupied molecular orbital  
LUMO = lowest unoccupied molecular orbital  
 $m/z$  = coeficiente entre massa e carga  
[M+H]<sup>+</sup> = íon precursor  
mg = miligrama  
mL = mililitro  
mmol = milimol  
NaBH<sub>3</sub>CN = cianoborohidreto  
ppm = parte por milhão  
RMN = ressonância magnética nuclear  
SEA = substituição eletrofílica aromática  
S<sub>N</sub>Ar = reação de substituição nucleofílica aromática  
TG = termogravimetria

UV = ultravioleta

V = volts

$\nu$  = comprimento de onda

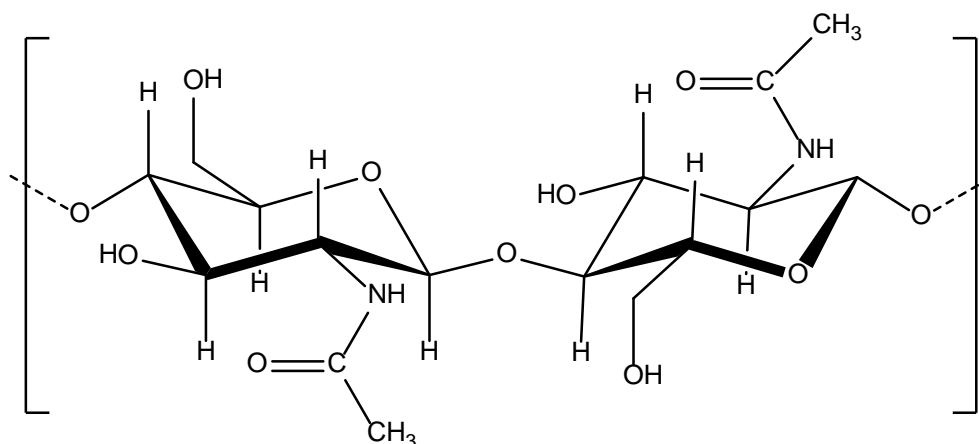
## Sumário

<b>Capítulo 1 - Introdução</b> .....	13
1.1. Quitina .....	13
1.2. Quitosana .....	14
1.3. Aplicações .....	17
1.3.1. Indústria alimentícia .....	17
1.3.2. Atividade antimicrobiana e antifúngica.....	17
1.3.3. Metal quelante .....	18
1.3.4. Antioxidante .....	19
1.3.5. Medicina .....	19
1.4. Formação de derivados de quitina e quitosana.....	20
1.5. Formação de azo compostos de quitina e quitosana.....	22
1.6. Hidrólise dos compostos formados.....	24
1.7. Métodos de caracterização dos compostos formados a partir do polímero quitina- quitosana.....	24
<b>Capítulo 2 - Objetivos</b> .....	25
2.1. Objetivo geral .....	25
2.2. Objetivos específicos.....	25
<b>Capítulo 3 - Parte Experimental</b> .....	26
3.1. Formação da base de Schiff a partir do polímero quitina-quitosana e benzaldeído .....	26
3.2. Redução das bases de Schiff do polímero quitina-quitosana .....	26
3.3. Procedimento geral para diazotação .....	27
3.4. Procedimento para diazotação do ácido sulfanílico .....	27
3.5. Procedimento geral proposto para o acoplamento dos sais de diazônio com compostos benzênicos .....	27
3.6. Procedimento geral proposto para a hidrólise dos derivados de quitina-quitosana .....	28
3.7. Técnicas e instrumentos utilizados.....	28
3.7.1. Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) .....	28
3.7.2. Espectroscopia de RMN de <sup>13</sup> C em estado sólido .....	28
3.7.3. Espectroscopia de RMN de <sup>1</sup> H em solução.....	29
3.7.4. Espectrometria de massas com ionização por eletrospray no modo positivo (ESI(+)-MS) .....	29
3.7.5. Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível.....	29
3.7.6. TG acoplado com infravermelho (TG/FT-IR).....	29
3.7.7. Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	30
<b>Capítulo 4 - Resultados e Discussão</b> .....	31
4.1. Síntese dos derivados poliméricos a partir do biopolímero quitina-quitosana....	31
4.1.1. Reações de <i>N</i> -alquilação.....	31
4.1.2. Reações de diazotação .....	32
4.1.3. Reações de acoplamento.....	33
4.2. Caracterização por espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR).....	35
4.3. Caracterização por RMN de <sup>13</sup> C em estado sólido.....	42

4.4. Caracterização por RMN de $^1\text{H}$ em solução .....	44
4.5. Determinação do grau de acetilação e substituição .....	49
4.6. Caracterização por espectrometria de massas com ionização por eletrospray no modo positivo (ESI(+)-MS) .....	50
4.7. Caracterização por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível	59
4.8. Caracterização por TG acoplado com FT-IR (TG/FT-IR) .....	60
4.9. Caracterização por calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	67
<b>Capítulo 5 - Conclusão .....</b>	<b>70</b>
<b>Perspectivas de trabalhos futuros .....</b>	<b>71</b>
<b>Capítulo 7 - Referências bibliográficas.....</b>	<b>72</b>
<b>Apêndice A.....</b>	<b>76</b>
<b>Apêndice B.....</b>	<b>80</b>
<b>Apêndice C.....</b>	<b>84</b>
<b>Apêndice D.....</b>	<b>86</b>

### 1.1. Quitina

A quitina é um biopolímero linear formado por unidades 2-acetamido-2-deoxi-D-glucopiranosose unidas por ligações glicosídicas  $\beta(1\rightarrow4)$ . Os grupos acetamidos se encontram nas posições C-2 da glucosamina, o que diferem estruturalmente da celulose, pois são substituídos por grupos hidroxilas nessa mesma posição. A Figura 1 mostra a estrutura molecular do biopolímero quitina.



**Figura 1.** Estrutura molecular do biopolímero quitina.

O termo quitina deriva da palavra grega *chiton*, que significa revestimento protetor para invertebrados. A quitina é um importante componente estrutural dos exoesqueletos de crustáceos e moluscos e também é encontrado nas paredes celulares de fungos e algas [1]. As cascas de crustáceos são compostas por cerca de 13 a 42% de quitina.

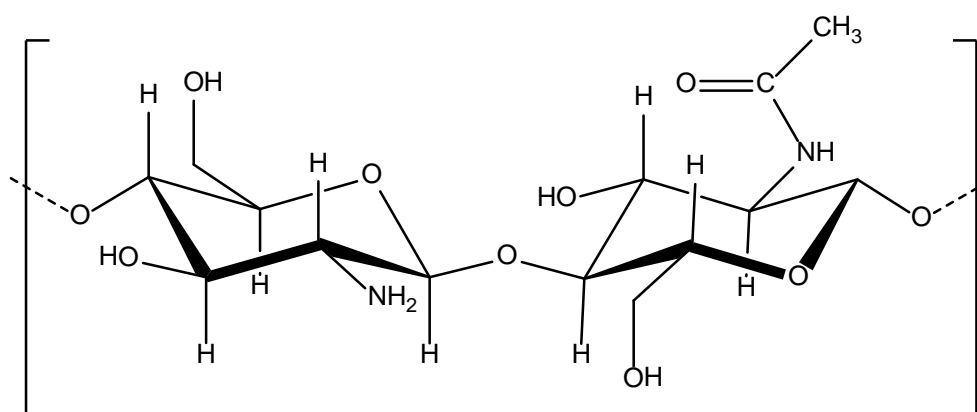
Quando encontrada na natureza, a quitina está associada a matrizes complexas com outros polissacarídeos que são removidos durante o processo de extração [2]. O processo para isolar e purificar a quitina normalmente consiste em três operações

básicas que são a desproteíntização através de um tratamento básico a altas temperaturas, seguido da desmineralização que é feito por tratamento com uma solução ácida aquosa e por fim a despigmentação realizada por lavagens com solventes orgânicos.

A quitina é insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos, o que limita a sua utilização.

## 1.2. Quitosana

A quitosana, formada por unidades 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose unidas por ligações glicosídicas  $\beta(1\rightarrow4)$ , é um polissacarídeo produzido pela desacetilação da quitina através de uma hidrólise alcalina e posteriores tratamentos com soluções ácidas. Como a desacetilação é raramente completa, as cadeias poliméricas da quitosana são descritas como estruturas copoliméricas, pois possuem grupos  $-\text{NH}_2$  acetilados. A quitosana também pode ser encontrada naturalmente na parede celular de fungos, mas em pequenas quantidades. A Figura 2 apresenta a estrutura molecular do biopolímero quitosana.



**Figura 2.** Estrutura molecular do biopolímero quitosana.

Os maiores produtores mundiais de quitosana são o Japão e Os Estados Unidos e em seguida estão Índia, Itália e Polônia. Estima-se que são produzidos dez bilhões de toneladas de quitina por ano no mundo [3]. A produção desse polímero natural tem aumentado muito nos últimos anos em consequência do aumento da sua utilização em diferentes aplicações.

A quitosana tem um variado grau de desacetilação, dependendo das condições de tratamento para sua obtenção. É um polímero de alto peso molecular que varia entre 100.000 e 1.000.000 Da.

O grau de desacetilação é um dos parâmetros mais importantes no estudo do polímero quitina-quitosana, pois conhecendo-se a porcentagem de grupos  $-NH_2$  livres presentes na cadeia polimérica, é possível determinar suas propriedades.

Para determinar o grau de desacetilação (GD) ou grau de acetilação (GA), existem várias técnicas que podem ser utilizadas, como a titulação potenciométrica absorção no infravermelho, ultravioleta, ressonância magnética nuclear, dentre outros [4].

O grau de acetilação do polímero pode ser determinado por ressonância magnética nuclear de prótons em solução (RMN de  $^1H$ ), utilizando-se várias relações baseadas nas áreas dos sinais de prótons. Dentre essas relações, o grau de acetilação pode ser determinado utilizando a área do sinal que corresponde aos núcleos dos prótons da metila do grupo *N*-acetil, na região de 2 ppm, e a área do sinal em 3,06 ppm atribuída ao núcleo do próton na posição 2 do anel glicosamino, que corresponde a unidade desacetilada. Este cálculo pode ser realizado através da fórmula:

$$GA = (A_{H-Ac}/3A_{H-2}) \times 100\% \quad (\text{Equação 1})$$

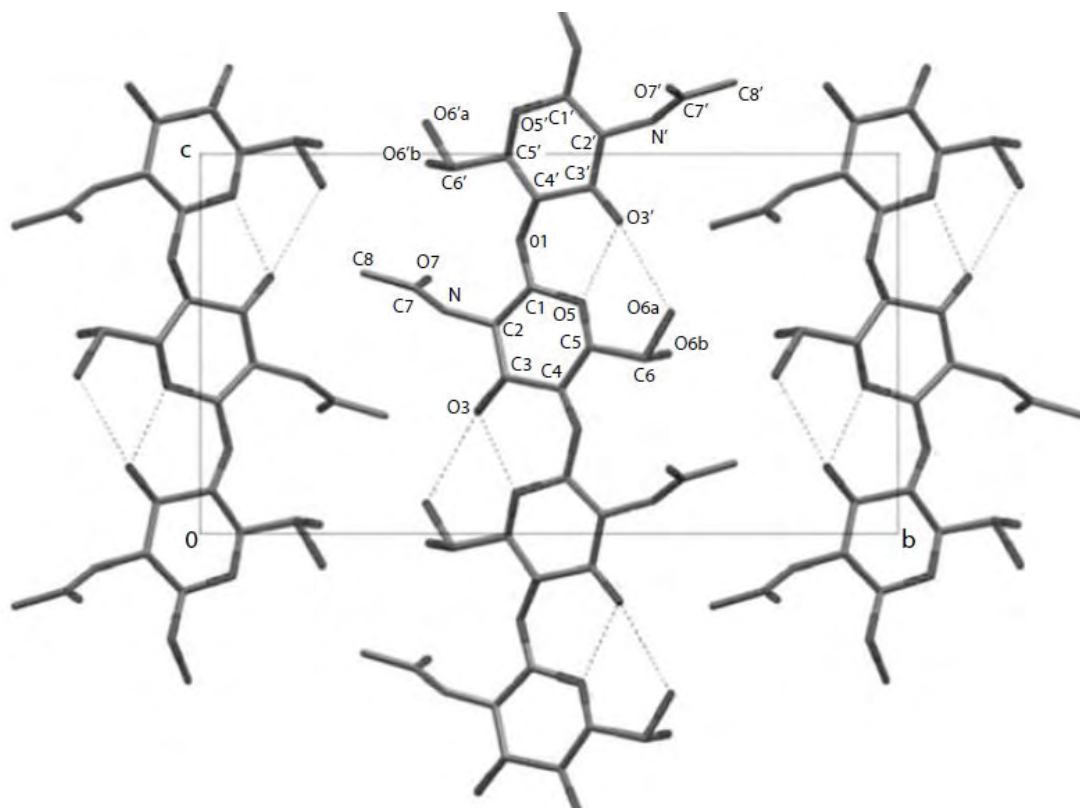
$A_{H-Ac}$  e  $A_{H-2}$  correspondem as áreas dos sinais de prótons da metila do grupo *N*-acetil e a área do sinal de prótons na posição 2 do anel glicosamino, respectivamente [5].

O grupo amino livre na posição C-2 da unidade glucosamina da quitosana permite diversas modificações na estrutura do polímero. Os grupos hidroxilas primário e secundário nas posições C-6 e C-3, respectivamente, também são muito utilizados na preparação de derivados.

Estruturalmente, quitina e quitosana são polímeros que estão fortemente interligados por ligações de hidrogênio, o que faz com que se decomponham a temperaturas de aproximadamente 300 °C e não possuam ponto de fusão [6].

A célula unitária contém duas cadeias poliméricas com conformação helicoidal e orientação antiparalela. As principais ligações de hidrogênio são entre os átomos O3...O5 (intramoleculares) e N2...O6 (intermoleculares) [7]. A Figura 3 mostra o

empacotamento cristalino do polímero quitina. As linhas tracejadas representam as ligações de hidrogênio.



**Figura 3.** Empacotamento cristalino do polímero quitina [8].

O grupo amino tem um pKa na região de 6,2 e 7,0 o que denomina a quitosana um polímero catiônico. Este polieletrólito é insolúvel em solventes orgânicos e solúvel apenas em soluções ácidas. Em pH inferior a 6, ocorre protonação dos grupos  $-NH_2$ , o que favorece uma forte interação eletrostática com diversas moléculas com cargas negativas ou heteroátomos portadores de pares de elétrons livres, como por exemplo, os aldeídos. Em meio ácido, a solução de quitosana torna-se um gel, que apresenta uma viscosidade influenciada por alguns fatores, tais como, grau de desacetilação do polímero, peso molecular, concentração, pH e temperatura.

O biopolímero quitina-quitosana tem excelentes propriedades como biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade. Também apresenta atividades antibacterianas, antifúngicas e habilidade para formação de filmes, o que permite uma variedade de aplicações na área biomédica, agrícola, alimentícia,



biotecnológica, cosmética, farmacêutica, tratamento de efluentes industriais, entre outras.

### **1. 3. Aplicações**

Devido às diversas propriedades anteriormente apresentadas, tem crescido muito, nos últimos anos, o número de estudos considerando as variadas aplicações do biopolímero quitina-quitosana e de seus derivados. Alguma delas serão apresentadas na sequência.

#### **1.3.1. Indústria alimentícia**

Além de vários estudos em relação ao uso de quitosana como suplemento que auxilia na redução de peso, devido à interação de grupos funcionais  $-NH_3^+$  com grupos negativamente carregados como o ácido carboxílico de ácidos graxos [9], o polímero foi aprovado para uso como aditivo na dieta alimentar em alguns países, como Japão, Estados Unidos, Inglaterra, Itália, Portugal e Finlândia [10].

De acordo com o Departamento de Saúde do Japão, a quitosana é considerada um ingrediente importante na alimentação por causa de seus benefícios à saúde como redução dos níveis de colesterol e uma subsequente redução do risco de doenças cardiovasculares [11].

Outra aplicação da quitosana na indústria alimentícia é na produção de filmes biodegradáveis para revestimento de alimentos, com o objetivo de inibir a ação microbiana e conseqüentemente retardar a degradação desses alimentos [12].

#### **1.3.2. Atividade antimicrobiana e antifúngica**

Acredita-se que a quitosana possui ótima atividade antimicrobiana e antifúngica devido à protonação do grupo  $-NH_2$  do monômero de glucosamina em meio ácido que permite a ruptura da membrana das células do microorganismo por causa da interação com grupos aniônicos presentes nestas células [13].

Rabea e colaboradores [14] reportaram a síntese de 24 novos derivados de quitosana, *N*-alquil e *N*-Benzil, por aminação redutiva. As atividades antifúngicas dos

compostos foram investigadas contra as larvas *Spodoptera littoralis* (Boisduval), *Botrytis cinerea* Pers e *Pyricularia grisea* Cavara. Os compostos apresentaram de 77 até 100% de eficiência na morte das larvas. O valor da concentração inibitória mínima (MIC) dos compostos capaz de inibir o crescimento dos microorganismos foi de 5 g.L<sup>-1</sup>. Todos os derivados mostraram maior ação antifúngica do que a quitosana sem modificação química.

Para aumentar a solubilidade do biopolímero, Sajomsang e colaboradores [15] sintetizaram sais quaternários de quitosana e investigaram suas atividades antimicrobianas. Os derivados foram sintetizados por alquilação reductiva com aldeídos aromáticos e sequencialmente quaternizados com cloreto de *N*-(3-cloro-2-hidroxipropil) trimetilamônio (Quat-188). Todos os compostos mostraram atividade antimicrobiana, agindo diretamente na parede das células das bactérias *Escherichia coli* (Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva) devido ao aumento da densidade de carga positiva na estrutura do polímero. Os valores de MIC para os compostos sintetizados variaram entre 8 e 64 µg/mL.

### 1.3.3. Metal quelante

Quitosana e seus derivados têm sido reportados na literatura como materiais com alto potencial de adsorver íons metálicos pela formação de complexos no tratamento de águas residuais de indústrias que contém excessivas quantidades de Mn(II), Co(II), Cd(II), Hg(II), Pb(II), Cu(II) e Zn(II) [16].

A quitosana possui alta afinidade por íons metálicos devido aos grupos amino (-NH<sub>2</sub>) e hidroxilas (-OH) que servem como sítios de coordenação e interação eletrostática, respectivamente. A quitosana é muito utilizada como adsorvente de cátions, devido à presença do par de elétrons livres sobre o átomo de nitrogênio dos grupos amino, contudo, a protonação desses grupos também pode ser efetiva na remoção de espécies aniônicas [17].

Gamage e Shahidi investigaram [18] a eficiência da quitosana na remoção de íons metálicos em amostras de águas da mineração de zinco em Buchans, Canadá. Os resultados mostraram que a quitosana removeu mais de 98% de Ni(II), Cd(II), Cu(II) e Ag(I).

A síntese de *N*-(*O*-carboxybenziliden)quitosana e *N*-(*O*-carboxybenzil)quitosana com ácido ftalaldeídico foi reportada por Muzzarelli e colaboradores [19] com o objetivo de investigar o comportamento de adsorção de íons metálicos desses compostos. Observou-se que a adsorção de íons depende das concentrações dos compostos quelantes e dos íons assim como também do pH do meio. No caso dos íons dos metais Cr, Cu, Zn, Hg e Pb a máxima adsorção foi observada em pH neutro, enquanto para os íons metálicos provenientes de Co e Ni, a adsorção máxima ocorre em pH 8.5. Os melhores resultados foram coletados para adsorção dos íons dos metais Cr, Co, Ni, Cu, Cd, Pb e U quando a concentração dos quelantes sintetizados foi próxima de 2 mol.L<sup>-1</sup>.

A inserção de grupos sulfônicos na cadeia do polímero quitosana e sua aplicação na remoção de íons metálicos foram investigadas por Weltrowski e colaboradores [20]. Derivados de quitosana mono e disulfonados foram sintetizados por condensação com aldeídos aromáticos sulfonados e testados na sorção dos cátions Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Ph<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> e Cr<sup>3+</sup>. Esses derivados são recomendados para o uso no tratamento de efluentes industriais ácidos. Derivados de quitosana que contém o grupo sulfônico, -SO<sub>3</sub>H, também são importantes pela presença desse grupo o qual aumenta a solubilidade dos compostos e facilita subseqüentes reações.

#### **1.3.4. Antioxidante**

Espécies de oxigênio reativas e radicais livres são naturalmente gerados no corpo durante o metabolismo aeróbico e pode causar oxidação de lipídios, proteínas, açúcares, esteróis e ácidos nucleicos [21]. Durante o processo de envelhecimento, os sistemas de defesa antioxidante se enfraquecem, resultando na acumulação dessas espécies reativas e radicais livres.

Nos últimos anos, o interesse por antioxidantes naturais que protejam o corpo humano contra radicais livres e retardem o progresso de doenças crônicas tem aumentado gradativamente. Assim, a quitosana tem sido estudada por possuir propriedades antioxidantes, pois o polímero pode quelar íons metálicos que catalisam as reações oxidativas [22].

#### **1.3.5. Medicina**

Os biopolímeros de quitina e quitosana têm despertado um grande interesse no que se refere a aplicações médicas e farmacêuticas devido as suas diversas propriedades biológicas, como por exemplo, sua degradação no corpo humano. Encontram-se na literatura atual diversos estudos que abordam tanto o uso dos polímeros quitina e quitosana como seus derivados na preparação de membranas, sistemas de liberação de fármacos [23], regeneração tecidual [24,25], reconstrução óssea [26], efeitos analgésicos [27] e efeitos coagulantes [28].

#### **1.4. Formação de derivados de quitina e quitosana**

Modificações químicas na estrutura do polímero quitina, em geral, são dificultadas em razão de que o polissacarídeo possui fortes interações entre os hidrogênios intra- e intermoleculares de sua estrutura [29]. No entanto, a quitosana pode ser modificada por processos químicos com o objetivo de melhorar suas propriedades.

Dentre as modificações químicas realizadas na quitosana, a reação de *N*-alquilação redutiva tem despertado interesse pelo potencial de aplicação em várias áreas.

A estrutura da quitosana, a qual apresenta grupos aminos (-NH<sub>2</sub>) livres, pode ser transformada em *N*-Benzilquitosana a partir da reação com aldeídos aromáticos, a qual origina as bases de Schiff como produtos intermediários, seguido de uma redução com cianoborohidreto (NaBH<sub>3</sub>CN) de sódio para a formação dos produtos alquilados, ou seja, a amina secundária .

Os derivados de quitosana preparados pela formação de bases de Schiff são importantes não apenas por causa de suas propriedades físicas e químicas, mas também pela sua variedade de aplicações [30,31,32]. Estes derivados se caracterizam pela presença do agrupamento azometino ou imina (-C=N-).

Devido à baixa solubilidade da quitina e quitosana em solventes orgânicos, a reação de alquilação ocorre com a solubilização do polímero em uma solução de ácido acético. O agente redutor cianoborohidreto de sódio é largamente usado na alquilação redutiva por causa de sua alta reatividade e seletividade quando comparado a outros agentes redutores [33].

Muzzarelli e colaboradores [34] relataram inicialmente a síntese e diversas aplicações para a quitosana e seus derivados, como por exemplo a produção de *N*-carboxibutilquitosana mediante a utilização do ácido levulínico.

Kurita e colaboradores [35] reportaram a introdução de grupos alquílicos na cadeia da quitina. As iminas formadas a partir dos grupos aminos da quitosana e aldeídos foram reduzidas com  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ . Os compostos de quitosana *N*-alquiladas foram transformados em *N*-alquilquitina por acetilação com anidrido acético dos grupos  $-\text{NH}$ -alquil. O grau de substituição foi determinado por análise elementar pela relação C/N e aumentou com o aumento da quantidade de aldeído utilizado. Os autores também estudaram as propriedades desses compostos e constataram que todos apresentam menor cristalinidade do que a quitina e uma maior afinidade por solventes orgânicos.

Sajomsang e colaboradores [36] estudaram as propriedades térmicas e a modificação química na estrutura da quitosana com diferentes aldeídos pela redução de Bases de Schiff com cianoborohidreto de sódio. Os autores relataram a influência dos grupos doadores e retiradores de elétrons ligados ao anel aromático dos aldeídos no grau de substituição na cadeia polimérica e na solubilidade dos compostos sintetizados. Os aldeídos com substituintes doadores de elétrons resultaram num menor grau de substituição, ou seja, num menor rendimento das bases de Schiff correspondentes, devido a sua menor reatividade.

Desbrieres [37] modificou quimicamente a quitosana por aminação redutiva pela ligação de cadeias alquílicas a estrutura polimérica. A síntese dos derivados anfífilicos possibilitou alterar as propriedades físico-químicas da quitosana devido às interações hidrofóbicas entre as cadeias alquílicas. Essas propriedades foram estudadas em função do comportamento reológico apresentado pelos derivados, na qual são influenciadas pela concentração do polímero e temperatura de reação.

Donati e colaboradores [38] investigaram a síntese do derivado polimérico por *N*-alquilação a partir do grupo aldeído da lactose e o amino grupo da quitosana. Os derivados foram obtidos com grau de substituição de 9% e 64%, com proporções molares de 0,8 e 2,5 de lactose e 2 e 6 de  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ , respectivamente, por unidade repetitiva de quitosana. Ambos os derivados apresentaram alta solubilidade e um potencial para aplicação na reparação de cartilagem articular.

Yang e colaboradores [39] reportaram a *N*-alquilação da quitosana a partir de diferentes monossacarídeos e dissacarídeos. Os derivados que apresentam maiores quantidades de açúcares mostraram maior solubilidade e maior grau de substituição com o aumento do tempo de reação. Os autores constataram que a viscosidade e pseudoplasticidade das soluções dos derivados de quitosana diminuíram com o aumento do grau de substituição.

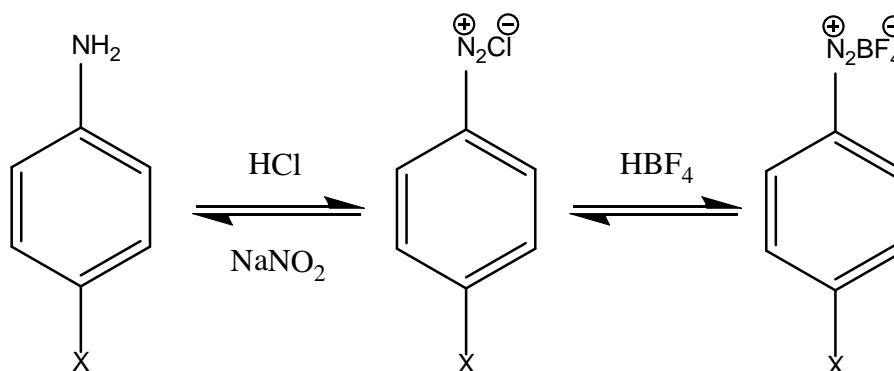
Rabea e colaboradores [40] investigaram a atividade antimicrobiana, *in vitro*, de derivados da quitosana sintetizados por *N*-benzilação. Os resultados demonstraram que a modificação química na estrutura da quitosana com aldeídos aromáticos favoreceram uma eficiência de 90% de inibição bacteriana, evidenciando uma atividade biológica maior do que o biopolímero puro.

A ligação de novos grupos a cadeia lateral do polímero pode alterar diversas propriedades como solubilidade [41] e flexibilidade do polímero [35].

### 1.5. Formação de azo-compostos de quitina e quitosana

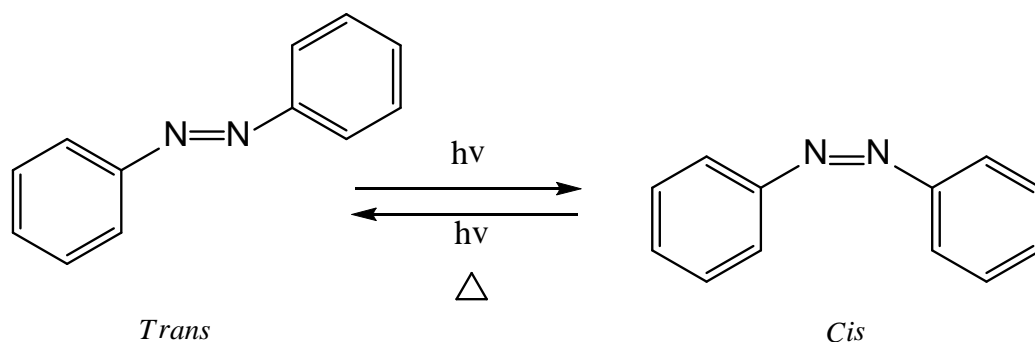
Os azo-compostos são produtos que contém o grupo funcional R-N=N-R'. No caso do presente trabalho o interesse centra-se nos grupos R aromáticos. Com a absorção de radiação na faixa da luz visível devido à conjugação da nuvem de elétrons- $\pi$  dos anéis aromáticos com a ligação -N=N- é que muitos azo-compostos possuem uma coloração típica, sendo, então, usados como tinturas e corantes.

Sais de diazônio acoplam com diversos compostos aromáticos dando origem aos azo-compostos. A diazotação de uma amina aromática primária, representado pela Figura 4, ocorre pela sua dissolução ou suspensão em uma solução aquosa de um ácido mineral com nitrito de sódio a baixas temperaturas. Os sais de diazônio formados com o ânion tetrafluoroborato são mais estáveis e podem ser isolados a temperatura ambiente. Subsequentemente, as reações de copulação se processam por meio de uma reação de substituição eletrofílica aromática entre o sal de diazônio e um anel aromático ativado em meio fracamente ácido.



**Figura 4.** Diazotação de uma amina primária utilizando ácido tetrafluorobórico.

O azobenzeno é um composto químico formado por dois anéis fenila ligados pela agrupamento -N=N-. Estes compostos têm duas conformações isoméricas, sendo elas a conformação *cis* e a conformação *trans*, que é mais estável à luz e temperatura ambiente [42]. Uma das características dos azobenzenos é a sua capacidade de fotoisomerização. Para a maioria dos azobenzenos, a molécula pode ser opticamente isomerizada da conformação *trans* para *cis* na presença de luz, através da absorção de um fóton pelo cromóforo azo e após uma subsequente relaxação térmica a molécula volta ao estado *trans*. Esse processo está representado pela figura 5. O isômero *trans* é aproximadamente 50 kJ/mol mais estável e a barreira para a fotoisomerização é aproximadamente 200 kJ/mol [43].



**Figura 5.** Isomerização de azobenzenos na presença de luz ( $h\nu$ ) e por aquecimento ( $\Delta$ ). (Figura adaptada de Knoll 2004 [44])

Os azobenzenos também exibem uma banda  $n-\pi^*$  de baixa intensidade na região do visível e uma banda  $\pi-\pi^*$  mais intensa na região UV.

A presença de substituintes no anel benzênico pode mudar suas características espectroscópicas. Se colocado um grupo doador de elétrons, por exemplo, um grupo amino ( $-\text{NH}_2$ ) na posição *orto* ou *para*, as bandas  $n-\pi^*$  e  $\pi-\pi^*$  serão mais próximas e algumas vezes, essas bandas podem estar sobrepostas na região do UV-VIS. Isso ocorre devido ao aumento da energia do orbital  $\pi$  e uma diminuição da energia do orbital  $\pi^*$ . Substituintes doadores e aceptores (aceitadores) de elétrons nas posições 4 e 4' dos dois anéis azo, por exemplo  $-\text{NH}_2$  e  $-\text{NO}_2$ , leva a uma forte distribuição assimétrica de

elétrons. Isso muda a absorção  $\pi$ - $\pi^*$  para uma menor energia do que a banda  $n$ - $\pi^*$ , e, portanto, assumem uma ordem reversa [45].

Essas características são importantes para estudos de azo-polímeros como materiais promissores para aplicações tecnológicas, como armazenamento óptico [46].

Azo-compostos são largamente utilizados como corantes em indústrias têxteis, impressão digital e fotografia [47], dispositivos eletrônicos [48], processamento de sinais ópticos, armazenamento de dados, alimentos e cosméticos.

Alguns desses compostos também têm sido usados na área biomédica [49] e no tratamento de águas residuais, como remoção de metais por grupos sulfônicos, por exemplo, que se ionizam e reagem com cátions metálicos [50].

## **1.6. Hidrólise dos compostos formados**

Devido ao alto peso molecular da quitina e quitosana, a caracterização e a determinação de algumas propriedades desses polímeros e seus derivados são limitados. Por isso, a produção de oligômeros é de grande importância para esses fins.

A quitosana pode ser quimicamente despolimerizada por diferentes mecanismos. A hidrólise ácida da quitosana resulta em ruptura das ligações glicosídicas diminuindo assim o grau da polimerização do polímero [51]. Esta redução de peso molecular pode ser observada pela mudança na viscosidade e aumento da solubilidade do produto.

## **1.7. Métodos de caracterização dos compostos formados a partir do polímero quitina-quitosana**

Para caracterizar os compostos sintetizados nesse trabalho, foram utilizadas as técnicas de espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier, ressonância magnética nuclear em solução e no estado sólido, espectrometria de massas com ionização por eletrospray, espectrometria de absorção molecular no ultravioleta-visível, termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial.



# Capítulo 2

---

## Objetivos

### 2.1. Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho consiste no estudo da utilização de biopolímeros do tipo quitina-quitosana como produto de partida para síntese de novos derivados com potencial aplicação como materiais orgânicos poliméricos.

### 2.2. Objetivos específicos

- Modificação das estruturas moleculares do biopolímero quitina-quitosana com a transformação dos grupos amino livres (-NH<sub>2</sub>) a partir da reação de *N*-alquilação (formação de iminas, seguido de redução) com um aldeído aromático.
- Acoplamento do composto produzido com diferentes sais de diazônio sintéticos para a formação de poli-azo-compostos de quitina e quitosana.
- Caracterização dos produtos sintetizados por diversas técnicas, tais como a espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup>C no estado sólido (RMN de <sup>13</sup>C) e de prótons (RMN de <sup>1</sup>H) em solução, espectrometria de massas com ionização por eletrospray no modo positivo (ESI(+))MS) e espectrometria de absorção molecular no ultravioleta-visível (UV-VIS).
- Estudo do comportamento térmico dos produtos sintetizados com o uso de técnicas tais como termogravimetria acoplada a detector de infravermelho TG/FT-IR, termogravimetria/termogravimetria diferencial (TG/DTG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC).

# Capítulo 3

---

## *Parte Experimental*

### **3.1. Formação da base de Schiff a partir do polímero quitina-quitosana e benzaldeído (Procedimento adaptado a partir do método reportado na literatura [52])**

Para a formação da base de Schiff, 0,5 g de quitosana (PM = 75-160 KDa) é dissolvida em 15 mL de ácido acético 1%. A suspensão é mantida sob agitação contínua com o auxílio de um agitador mecânico por 30 minutos, observando-se a formação de um gel. O pH da reação foi mantido entre 4-5. Em seguida, são adicionados 2 mmols (0,3 mL) de benzaldeído diluído em 10 mL de etanol (99%) e a solução resultante é mantida sob agitação à 60 °C. Após 8 horas, o solvente é evaporado sob pressão reduzida e o produto lava-se com etanol para remover o excesso de benzaldeído. O produto sólido de coloração bege é seco a 60 °C por 1 hora em estufa. Finalmente, o material seco é triturado em almofariz, resultando em um pó de coloração amarela.

### **3.2. Redução das bases de Schiff do polímero quitina-quitosana**

O procedimento experimental utilizado para a redução da base de Schiff foi previamente descrito na literatura. A base de Schiff formada é reduzida por adição de 2 mmols (0,12 g) de cianoboroidreto de sódio (NaBH<sub>3</sub>CN) dissolvidos em 10 mL de etanol (99%) e a mistura é agitada por 24 horas, a temperatura ambiente. Em seguida, o produto é filtrado e purificado através de lavagens sucessivas com água, seguido de etanol [33]. O produto sólido obtido é seco a 60 °C por 1 hora em estufa resultando em um pó branco. Em seguida, o material seco é triturado suavemente em almofariz para facilitar a melhor separação de resíduos de solvente e aumentar a área de contato visando à realização de reações na sequência.

*Obs: Para manipulação do agente redutor é necessário utilizar luvas e óculos de proteção e evitar liberação para o ambiente utilizando-o apenas em capela.*

### **3.3. Procedimento geral para diazotação [45]**

2 mmols de anilina p-substituída são dissolvidos no volume necessário de uma solução de HCl 6 Mol.L<sup>-1</sup> (deve haver um excesso de HCl). A mistura é mantida a uma temperatura entre 0 e 5 °C. Adiciona-se lentamente, sob agitação magnética, uma solução aquosa gelada contendo 2 mmols (0,13 g) de nitrito de sódio. Após 5-10 minutos, observa-se a formação de um precipitado sólido de cor característica (amarelo claro a escuro). A seguir adicionam-se 12 mmols (1 mL) de ácido tetrafluorobórico com agitação magnética e temperatura de 0 a 5 °C. Finalmente, o produto é filtrado e guardado a uma temperatura de 5 °C para reações subsequentes [53].

### **3.4. Procedimento para diazotação do ácido sulfanílico [45]**

A uma solução aquosa de carbonato de sódio (2 mmols, 0,21 g), adicionam-se 3 mmols (0,51 g) do ácido p-aminobenzenosulfônico (ácido sulfanílico). Após a completa dissolução do ácido sulfanílico, adicionam-se 3 mmols (0,20 g) de nitrito de sódio mantendo a mistura resultante a uma temperatura entre 0 e 5 °C. Em seguida, adicionam-se sob agitação magnética 0,62 mL de uma solução de HCl 10 Mol.L<sup>-1</sup> (8 mmols) e imediatamente, observa-se a formação de um precipitado branco. Passados 10 minutos, adicionam-se 12 mmols (1 mL) de ácido tetrafluorobórico. Finalmente, o produto é filtrado e mantido a 5 °C.

### **3.5. Procedimento geral proposto para o acoplamento dos sais de diazônio com compostos benzênicos [45]**

Para a reação de acoplamento, 2 mmols do sal de diazônio são solubilizados em N,N-dimetilformamida (DMF), e adiciona-se, lentamente, o produto derivado do polímero quitina-quitosana (*N*-Benzilquitosana). A reação é mantida sob agitação por 10 minutos a uma temperatura entre 0 e 5 °C. O sólido formado é filtrado e lavado com etanol.

### **3.6. Procedimento geral proposto para a hidrólise dos derivados de quitina- quitosana [54]**

Para a hidrólise dos compostos formados a partir do polímero quitina-quitosana, utiliza-se a solução de HCl 10 Mol.L<sup>-1</sup> (mols, 50 mL de HCl) a qual é adicionada sobre 1 g do substrato de polímero quitina-quitosana modificado num balão de fundo redondo e mantidos sob agitação por 4 horas a uma temperatura de 70 °C, seguindo o procedimento relatado na literatura. Em seguida, adiciona-se 50 mL de água destilada. O solvente é evaporado sob pressão reduzida e obtém-se um produto sólido marrom.

### **3.7. Técnicas e instrumentos utilizados**

#### **3.7.1. Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)**

As medidas de FT-IR foram conduzidas na forma de pastilhas de KBr. O KBr foi previamente seco em estufa à 100 °C por 24h. Para a fabricação da pastilha, utiliza-se 1 mg de amostra para 20 mg de KBr, os sólidos foram homogeneizados e a mistura foi prensada. Os espectros foram obtidos num espectrômetro Bruker, modelo Vector 22, e coletados a temperatura ambiente (23 °C) com resolução espectral de 16 cm<sup>-1</sup> e 120 scans.

#### **3.7.2. Espectrometria de RMN de <sup>13</sup>C em estado sólido**

Os espectros de RMN de <sup>13</sup>C em estado sólido foram obtidos em um espectrômetro de RMN AVANCE III, operando na frequência de 400 MHz com sonda dupla de 4 mm. Utilizou-se a técnica CP/MAS em rotação ao redor do ângulo mágico de 10 KHz.

### **3.7.3. Espectrometria de RMN de $^1\text{H}$ em solução**

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram obtidos a 400 MHz em um espectrômetro de RMN AVANCE III com sonda BBI a 25 °C. Os deslocamentos químicos para os RMN de  $^1\text{H}$  foram referenciados utilizando trimetil silano (TMS). As análises foram realizadas em solução de DCI 0,1 M para o polímero quitina-quitosana e em DMSO-*d*<sub>6</sub> para os seus derivados.

### **3.7.4. Espectrometria de massas com ionização por eletrospray no modo positivo (ESI(+)-MS)**

Os espectros de ESI(+)-MS foram obtidos usando um espectrômetro de massas de alta resolução Synapt HDMS (Waters Corporation, Manchester, UK), com analisador de massas do tipo *Time of Flight* (TOF), equipado com fonte *Electrospray* (ESI). A solução foi diretamente inserida dentro da fonte de ESI por meio de uma seringa a uma razão de fluxo de 15  $\mu\text{L}/\text{min}$ . ESI(+)-MS foi adquiridos usando modo iônico positivo proveniente de uma solução de H<sub>2</sub>O-MeOH 1:1 com adição de alguns microlitros de ácido fórmico. As condições de operação foram: voltagens do cone selecionado para 2800 V e do capilar 30 V; temperatura de dessolvatação de 200 °C.

### **3.7.5. Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível**

As medidas de absorção na região do ultravioleta-visível foram realizadas em cubeta de quartzo, num espectrofotômetro Varian modelo Cary 50 de feixe simples de 190 a 800 nm. Para as análises, 5 mg das amostras de poli-azo-compostos foram solubilizadas em 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Utilizou-se o solvente DMSO como referência.

### **3.7.6. TG acoplado com infravermelho (TG/FT-IR)**

A técnica TG foi executada utilizando equipamento Netzsch modelo 209 na faixa de temperatura ambiente ( $\sim 25^{\circ}\text{C}$ ) até  $700^{\circ}\text{C}$ . 5 mg da amostra foi inserida no cadinho ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) em atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de 25 mL/min. A razão de aquecimento foi de  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

Os espectros de FT-IR foram registrados num espectrômetro da Bruker modelo Vektor 22 com número de onda que percorre o intervalo de  $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$  com  $4 \text{ cm}^{-1}$  de resolução espectral, e um detector MCT.

### **3.7.7. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

Os compostos foram caracterizados por calorimetria exploratória diferencial (DSC), marca Netzsch, modelo DSC 204 – Phoenix. Para as medidas foi utilizado cadinho de alumínio com tampa furada no centro. A razão de aquecimento foi de  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  num intervalo de temperatura de  $-100^{\circ}\text{C}$  a  $500^{\circ}\text{C}$  em atmosfera inerte de  $\text{N}_2$  com fluxo normal e vazão de 15 mL/min. Para as medidas de DSC foi utilizada uma massa de aproximadamente 5 mg.

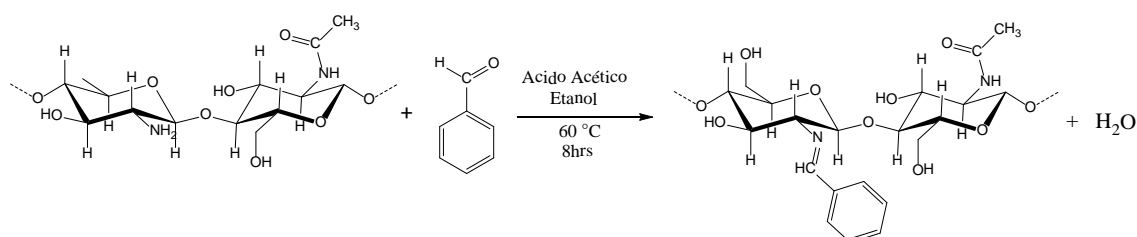
# Capítulo 4

## Resultados e Discussão

### 4.1. Síntese dos derivados poliméricos a partir do biopolímero quitina-quitosana

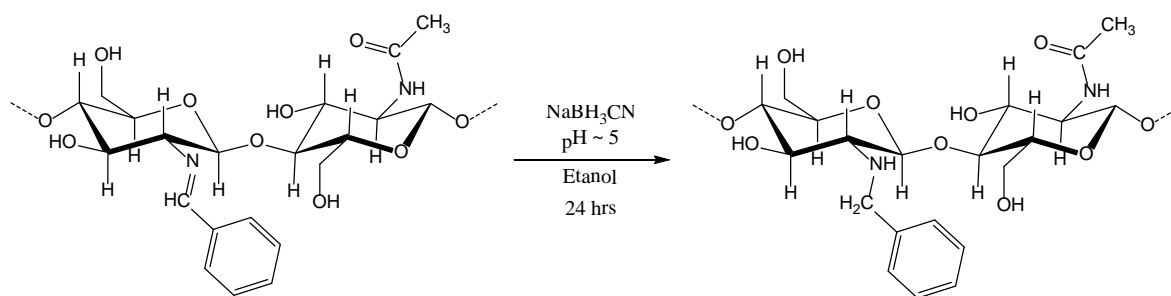
#### 4.1.1. Reações de *N*-alquilação

A reação de adição acontece por ataque nucleofílico do átomo de nitrogênio do agrupamento amino livre do anel glicosamino ao átomo de carbono do grupo carbonila do aldeído, que resulta na formação da imina intermediária *N*-Benzilidenquitosana. O Esquema 1 ilustra a síntese da base de Schiff *N*-Benzilidenquitosana.



**Esquema 1.** Síntese do composto intermediário *N*-Benzilidenquitosana.

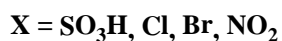
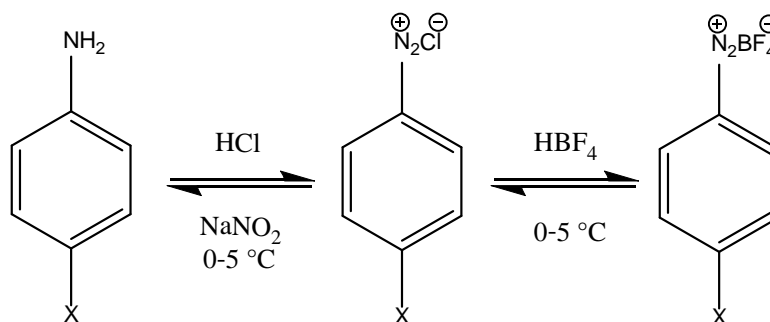
O Esquema 2 mostra a formação do composto *N*-Benzilquitosana pela redução da base de Schiff. O agente redutor, NaBH<sub>3</sub>CN, utilizado para este procedimento mostrou maior reatividade quando comparado ao agente redutor boroidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>). A reatividade deste agente redutor também aumentou quando a reação de redução ocorreu em pH entre 4 e 5 [55]. O produto apresentou baixa solubilidade em solventes orgânicos.



**Esquema 2.** Síntese do composto *N*-Benzilquitosana.

#### 4.1.2. Reações de diazotação

A diazotação de aminas aromáticas tem recebido maior relevância quando comparado a aminas alifáticas por causa de sua maior estabilidade e maior variedade de aplicações [45]. Devido à baixa estabilidade e sendo muitos sais de diazônio perigosos explosivos em fase sólida, sais de tetrafluoroboratosarildiazônios são produzidos, pois apresentam maior estabilidade térmica, quando comparado aos outros sais (cloretos, sulfatos, etc.) [53]. Assim, estes sais podem ser isolados para posteriores reações de acoplamento. Pela dificuldade em solubilizar o ácido sulfanílico em soluções aquosas ácidas devido ao seu comportamento zwitteriônico, a reação de diazotização ocorreu com a solubilização do ácido sulfanílico em solução básica de carbonato de sódio. Em seguida, foi adicionado  $\text{NaNO}_2$  e subsequentemente a solução foi acidificada para a precipitação do sal a ser formado. O esquema 3 apresenta a síntese dos sais de tetrafluoroborato de arildiazônio ( $[\text{ArN}_2^+]\text{BF}_4^-$ ).

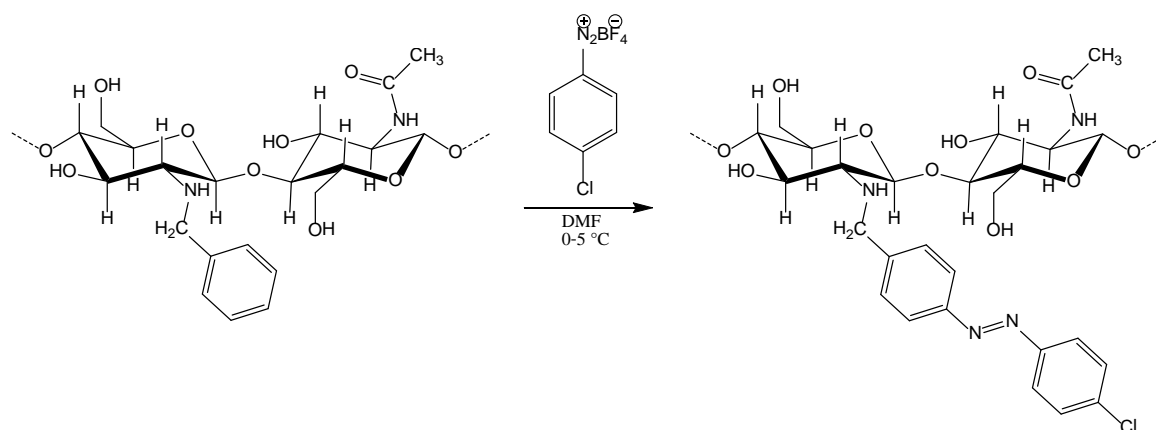


**Esquema 3.** Síntese de tetrafluoroboratos de arildiazônio.



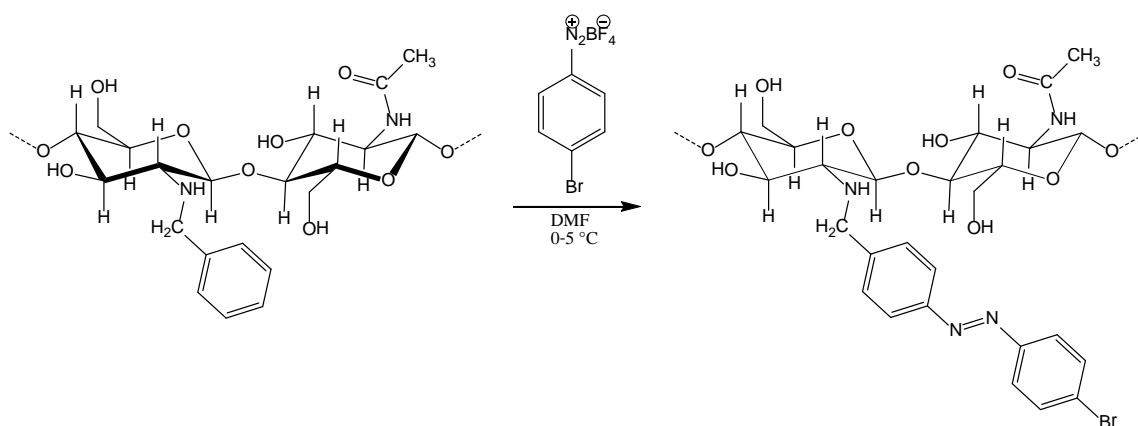
### 4.1.3. Reações de acoplamento

As reações de acoplamento se realizam por meio de um ataque eletrofílico do cátion arildiazônio ao anel benzênico. A reação de substituição eletrofílica aromática (SEA) ocorre na posição *para* em relação ao grupo substituinte ligado no anel aromático. Após cinco minutos de agitação do composto sólido *N*-Benzilquitosana com o sal de diazônio a temperaturas entre 0 e 5 °C, observa-se a aparição de coloração característica. O Esquema 4 apresenta a síntese do composto poli-(4-(4-clorofenil)diazenil)-*N*-benzilquitosana (Azo-Cloro). O produto apresentou uma cor amarelo escuro e textura gelatinosa.



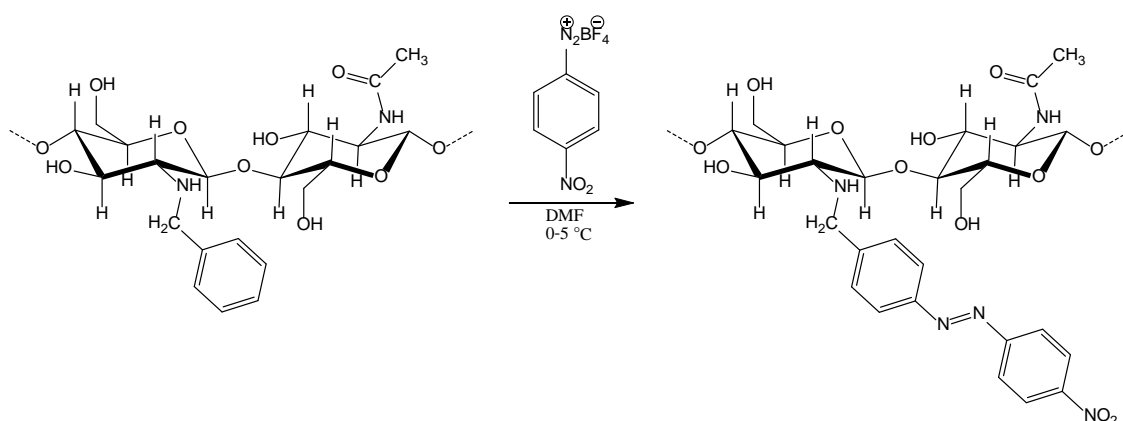
**Esquema 4.** Síntese do composto poli-(4-(4-clorofenil)diazenil)-*N*-benzilquitosana (Azo-Cloro).

O Esquema 5 mostra a síntese do composto poli-(4-(4-bromofenil)diazenil)-*N*-benzilquitosana (Azo-Bromo). O produto também apresentou uma cor amarela escura e textura gelatinosa.



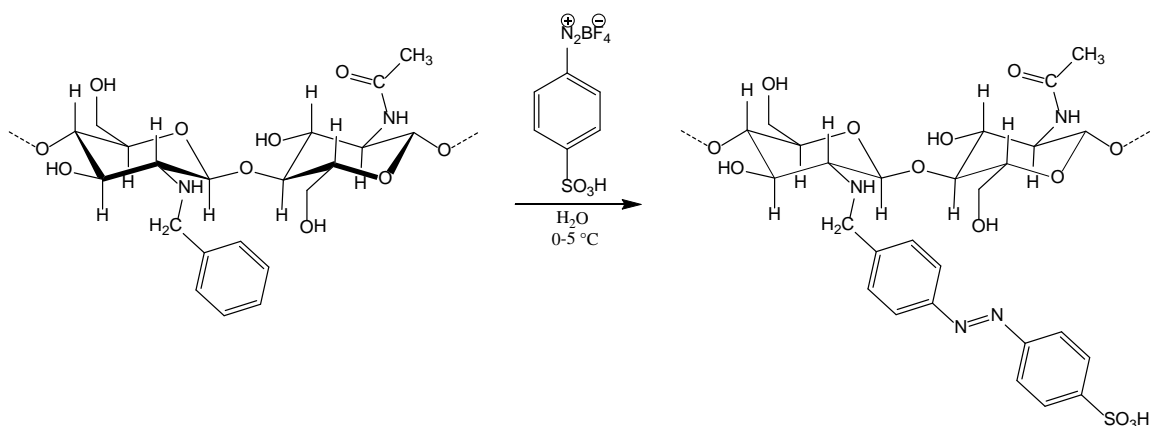
**Esquema 5.** Síntese do composto poli-(4-(4-bromofenil)diazenil)-*N*-benzilquitosana (Azo-Bromo).

O Esquema 6 mostra a síntese do composto poli-(4-(4-nitrofenil)diazenil)-*N*-benzilquitosana (Azo-Nitro). O produto apresentou uma cor vermelha e textura gelatinosa.



**Esquema 6.** Síntese do composto poli-(4-(4-nitrofenil)diazenil)-*N*-benzilquitosana (Azo-Nitro).

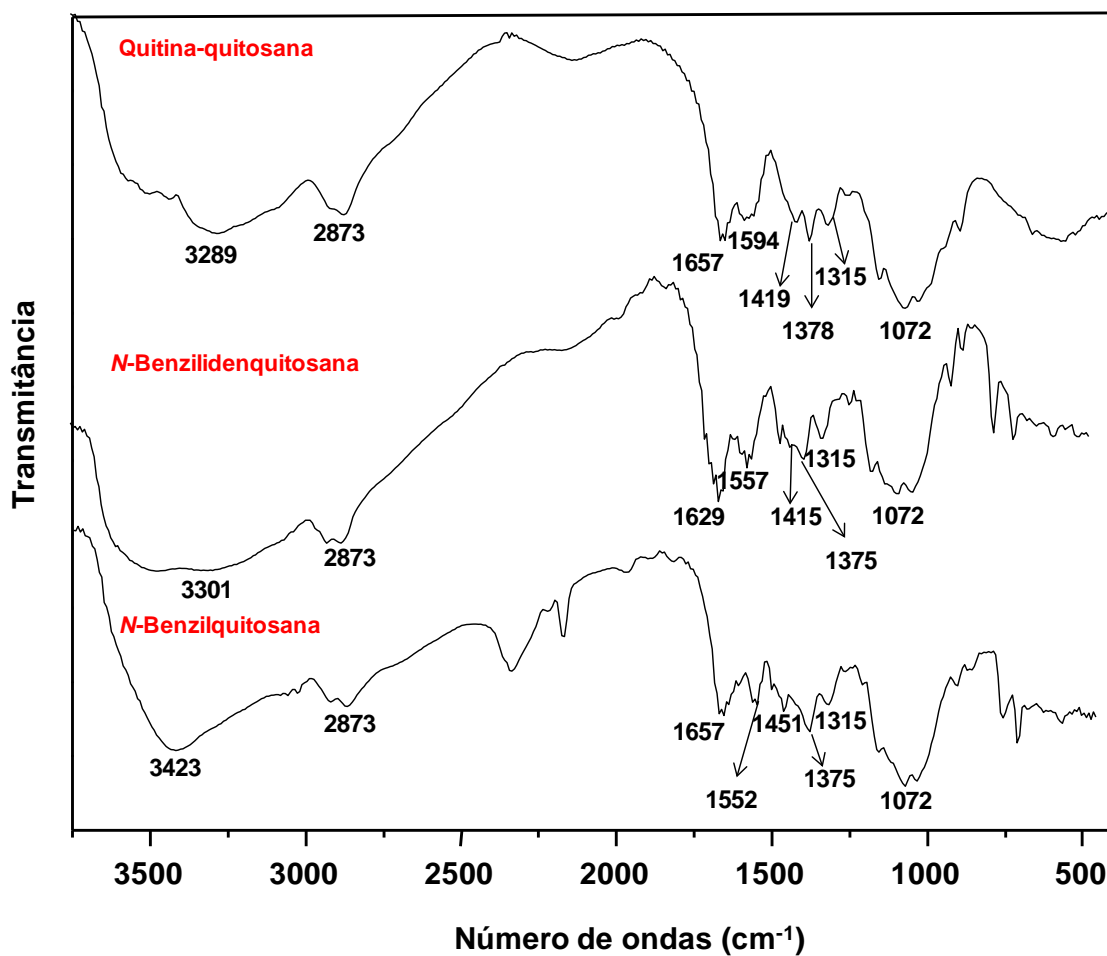
O Esquema 7 ilustra a síntese do sólido alaranjado ácido-poli-(4-(4-(glicos-2-ilamino)metil)diazenil)benzenosulfônico (Azo-Sulfônico).



**Esquema 7.** Síntese do composto ácido-poli-(4-(4-(glicos-2-il-amino) metil) diazenil) benzenosulfônico (Azo-Sulfônico).

#### 4.2. Caracterização por espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)

Os espectros de absorção obtidos por FT-IR do polímero quitina-quitosana, do composto intermediário *N*-Benzilidenquitosana e o derivado *N*-Benzilquitosana são mostrados na Figura 6.



**Figura 6.** Espectros de infravermelho de quitina-quitosana, *N*-Benzilidenquitosana e *N*-Benzilquitosana. Espectro obtido na região de 400 a 4000 cm<sup>-1</sup>.

As principais bandas características do polímero quitina-quitosana observadas no espectro são mostradas na Tabela 1. A atribuição foi feita com base na literatura [56].

**Tabela 1.** Atribuição das bandas de absorção do polímero quitina-quitosana.

<b>Bandas de absorção (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Atribuições</b>
<b>3289</b>	Estiramento axial de OH sobreposta à banda de estiramento de N-H
<b>2873</b>	Estiramento C-H
<b>1657</b>	Deformação axial de C=O da amida
<b>1594</b>	Deformação angular de N-H
<b>1419</b>	Deformação de C-H
<b>1378</b>	Deformação axial de C-N do grupo amida
<b>1315</b>	Deformação axial de C-N do grupo amino
<b>1072</b>	Estiramento C-O-C da ligação glicosídica

A Tabela 2 apresenta as principais bandas observadas para o composto intermediário *N*-Benzilidenquitosana. A banda característica desse composto pode ser observada em 1629 cm<sup>-1</sup> referente ao estiramento da ligação do grupo imino  $\nu(-C=N-)$ , o que indica a formação da base de Schiff. Observa-se também uma mudança nessa região pelo deslocamento da banda de 1594 cm<sup>-1</sup> para 1557 cm<sup>-1</sup>. Isto é devido à sobreposição da banda de absorção associada à frequência da ligação  $\nu(-C=C-)$  do anel benzênico presente na estrutura polimérica e da banda característica do grupo amino, pois ainda há grupos  $-NH_2$  livres que não sofreram modificação química provavelmente devido ao envelhecimento do polímero.

**Tabela 2.** Atribuição das bandas de absorção da *N*-Benzilidenquitosana.

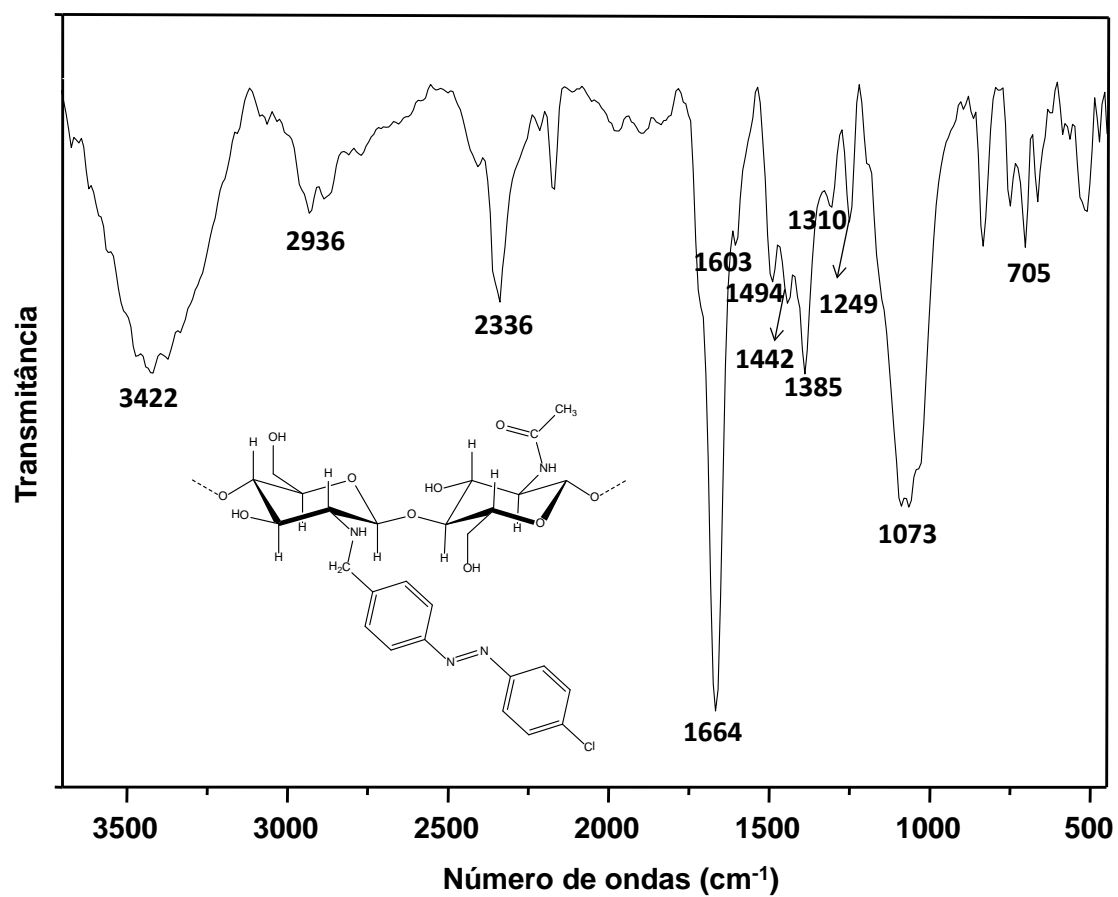
<b>Bandas de absorção (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Atribuições</b>
<b>3301</b>	Estiramento axial de OH sobreposta à banda de estiramento de N-H
<b>2873-2926</b>	Estiramento C-H
<b>1629</b>	Estiramento C=N
<b>1557</b>	Deformação angular de N-H e C=C
<b>1415</b>	Deformação de C-H
<b>1375</b>	Deformação axial de C-N do grupo amida
<b>1315</b>	Deformação axial de C-N do grupo amino
<b>1072</b>	Estiramento C-O-C da ligação glicosídica

A Tabela 3 mostra as bandas de absorção do composto *N*-Benzilquitosana. Como pode ser observado, há um deslocamento da banda 3301 cm<sup>-1</sup> correspondente ao estiramento axial de  $\nu(\text{O-H})$  sobreposta ao estiramento de  $\nu(\text{N-H})$ . Observa-se também a banda de absorção em 1552 cm<sup>-1</sup> atribuída à ligação  $\nu(\text{N-H})$  presente na posição C-2 do anel piranosídico sobreposta à banda de absorção associada à frequência da ligação  $\nu(\text{C=C})$  do anel aromático. Além disso, observa-se a banda em 1657 cm<sup>-1</sup> característica da deformação axial de  $\nu(\text{C=O})$  da amida e o desaparecimento da banda em 1629 cm<sup>-1</sup> atribuída frequência do estiramento da ligação do grupo imino  $\nu(\text{C=N})$ . Isto confirma a redução dos agrupamentos azometino.

**Tabela 3.** Atribuição das bandas de absorção do composto *N*-Benzilquitosana.

<b>Bandas de absorção (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Atribuições</b>
<b>3423</b>	Estiramento axial de OH sobreposta à banda de estiramento de N-H
<b>2873-2926</b>	Estiramento C-H
<b>1657</b>	Deformação axial de C=O da amida
<b>1552</b>	A deformação angular de N-H e C=C
<b>1451</b>	Deformação de C-H
<b>1375</b>	Deformação axial de C-N do grupo amida
<b>1315</b>	Deformação axial de C-N do grupo amino
<b>1072</b>	Estiramento C-O-C da ligação glicosídica

O espectro de absorção por FT-IR do composto Azo-Cloro está mostrado na Figura 7. Pode ser observada pelo espectro a banda em 3422 cm<sup>-1</sup> atribuída à presença de grupos  $\nu(\text{O-H})$  sobreposta à banda de estiramento  $\nu(\text{N-H})$  e a banda em 2936 cm<sup>-1</sup> que corresponde ao estiramento  $\nu(\text{C-H})$  do anel piranosídico e dos anéis aromáticos ligados a cadeia polimérica. Observa-se em 1664 cm<sup>-1</sup> a banda que corresponde à deformação axial de  $\nu(\text{C=O})$  da amida, a banda em 1603 cm<sup>-1</sup> devido à deformação angular de  $\nu(\text{N-H})$ , em 1494 cm<sup>-1</sup> que corresponde ao grupo azo  $\nu(\text{N=N})$  presente no composto e a banda em 705 cm<sup>-1</sup> devido à presença do grupo funcional  $\nu(\text{-C-Cl})$ . As bandas apresentadas comprovam a formação do azo-composto. Na Tabela 4 são mostradas as possíveis atribuições das principais bandas observadas para o composto Azo-Cloro.



**Figura 7.** Espectro de FT-IR do composto Azo-Cloro. Espectro obtido na região de 400 a 4000 cm<sup>-1</sup>.



**Tabela 4.** Atribuição das bandas de absorção do composto Azo-Cloro.

Bandas de absorção (cm <sup>-1</sup> )	Atribuições
3422	Estiramento axial de OH
2936	Estiramento C-H
1664	Deformação axial de C=O da amida
1603	Deformação angular de N-H
1494	Estiramento do grupo azo N=N
1442	Deformação da banda C-H
1385	Deformação axial de C-N do grupo amida
1310	Deformação axial de C-N do grupo amino
1073	Estiramento C-O-C da ligação glicosídica
705	Grupo funcional C-Cl

As principais bandas de absorção observadas para os azo-compostos Azo-Bromo, Azo-Nitro e Azo-Sulfônico são apresentadas na Tabela 5. Os espectros de FT-IR desses compostos podem ser encontrados no Apêndice A.

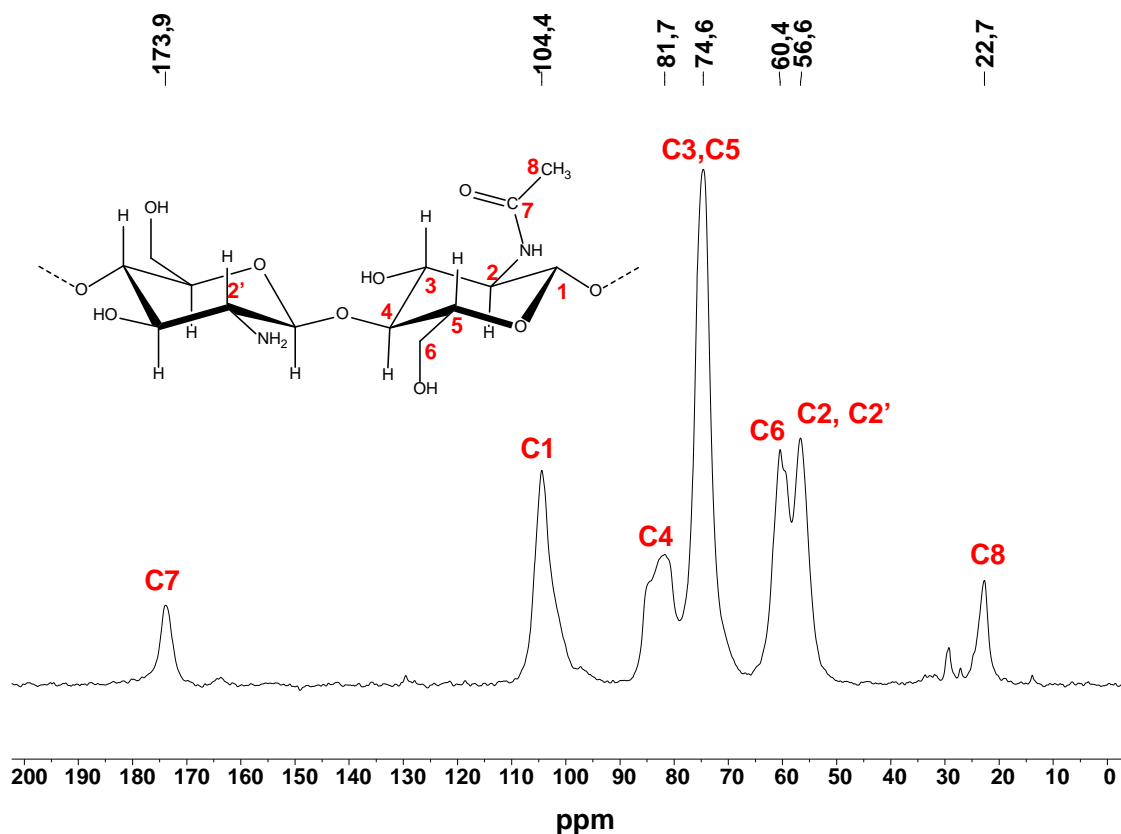
**Tabela 5.** Atribuição das bandas de absorção dos azo-compostos Azo-Bromo, Azo-Nitro e Azo-Sulfônico.

Composto	$\nu(\text{C=O})$	$\nu(\text{N-H})$ (amina)	$\nu(\text{N=N})$	$\nu(\text{C-Br})$	$\nu(\text{NO}_2)$	$\nu(\text{SO}_3\text{H})$
Azo-Bromo	1664	1594	1488	701	-	-
Azo-Nitro	1664	1599	1496	-	1449	-
Azo-Sulfônico	1638	1557	1436	-	-	1211,643

A espectroscopia na região de infravermelho é importante na caracterização de polímeros, pois fornece informações sobre as modificações químicas realizadas a partir da funcionalização dos agrupamentos -NH<sub>2</sub> livres na cadeia polimérica.

### 4.3. Caracterização por RMN de $^{13}\text{C}$ em estado sólido

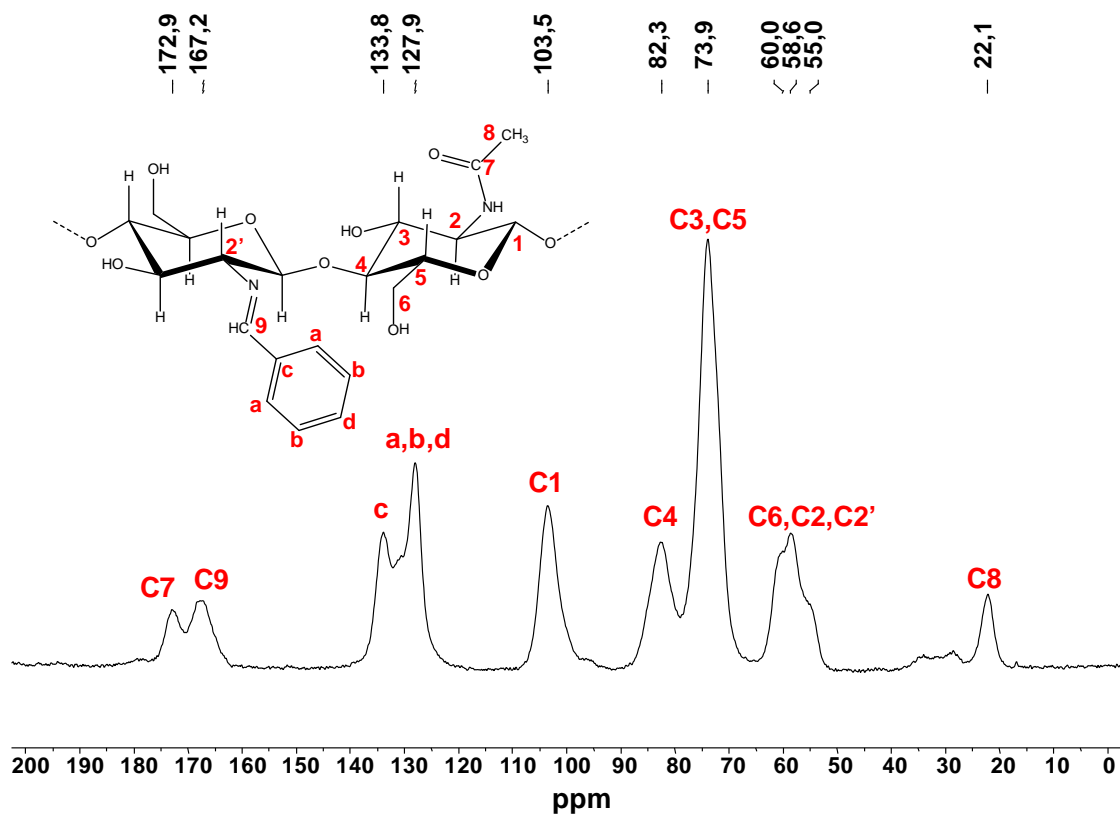
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  em estado sólido do polímero quitina-quitosana está representado pela Figura 8. Observam-se no espectro os sinais em 56,6 ppm (C2 e C2'); 60,4 ppm (C6); 74,6 ppm (C3 e C5); 81,7 ppm (C4) e 104,4 ppm (C1) que se referem aos carbonos do anel glicosamino. No espectro do polímero quitina-quitosana também se observam os sinais em 22,7 e 173,9 ppm, que são atribuídos aos grupos metila (C8) e acetila (C7) do grupo acetamido. Estes sinais permanecem no espectro em consequência da incompleta desacetilação da quitina. Os sinais do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do polímero foram atribuídos com base na literatura [57].



**Figura 8.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  no estado sólido do polímero quitina-quitosana.

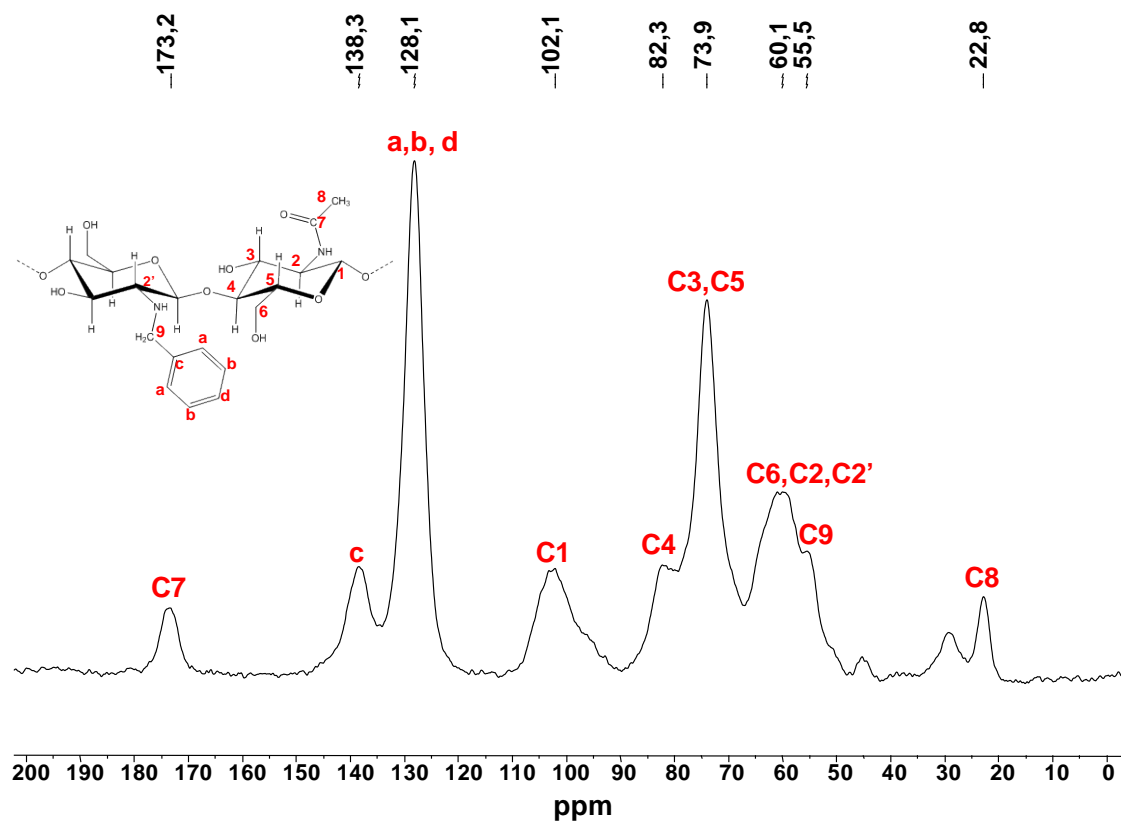
A partir do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  no estado sólido do composto intermediário *N*-Benzilidenquitosana, mostrado pela Figura 9, foram observados os sinais característicos da estrutura polimérica e também o surgimento de um novo sinal em 167,2 ppm atribuído ao carbono 9 do grupo imino ( $-\text{HC}=\text{N}-$ ), o que confirma a

modificação química do polímero pela formação da base de Schiff. O espectro também apresenta os sinais em 127,9 e 133,8 ppm atribuídos aos carbonos do anel aromático ligado a estrutura polimérica.



**Figura 9.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  no estado sólido do composto *N*-Benzilidenquitosana.

A Figura 10 apresenta o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  no estado sólido para o composto reduzido *N*-Benzilquitosana. Além dos sinais característicos da estrutura polissacarídea, pode ser observado pelo sinal em 55,5 ppm, referente ao carbono metilênico C9. Portanto, confirma-se a redução da base de Schiff, pois o sinal em 167,2 ppm, característico da ligação imina  $-\text{HC}=\text{N}-$ , desaparece. O espectro também apresenta os sinais em 128,1 e 138,3 ppm atribuídos aos carbonos do anel aromático ligado na estrutura polimérica.



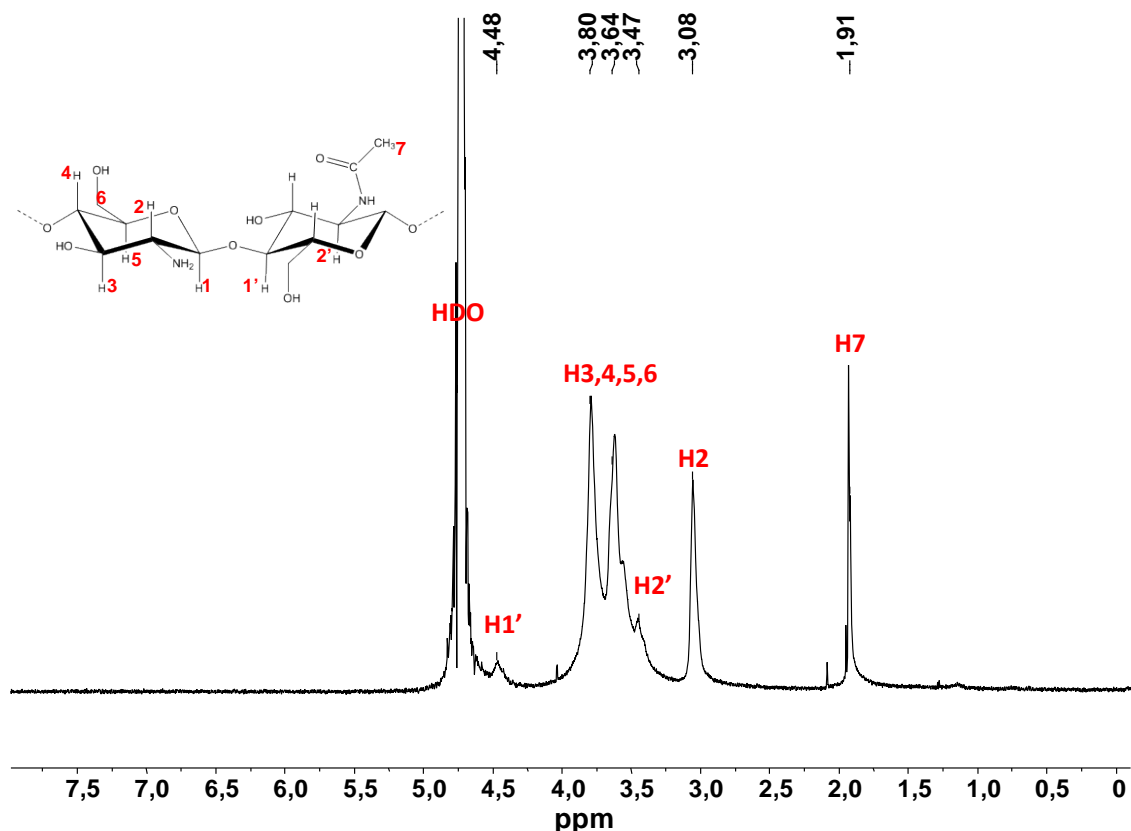
**Figura 10.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  no estado sólido do composto *N*-Benzilquitosana.

Foram caracterizados por RMN de  $^{13}\text{C}$  em estado sólido apenas o biopolímero e seus derivados *N*-Benzilidenquitosana e *N*-Benzilquitosana. Não foi possível caracterizar os azo-compostos por essa técnica, pois os corantes não possuem a textura sólida suficiente.

#### 4.4. Caracterização por RMN de $^1\text{H}$ em solução

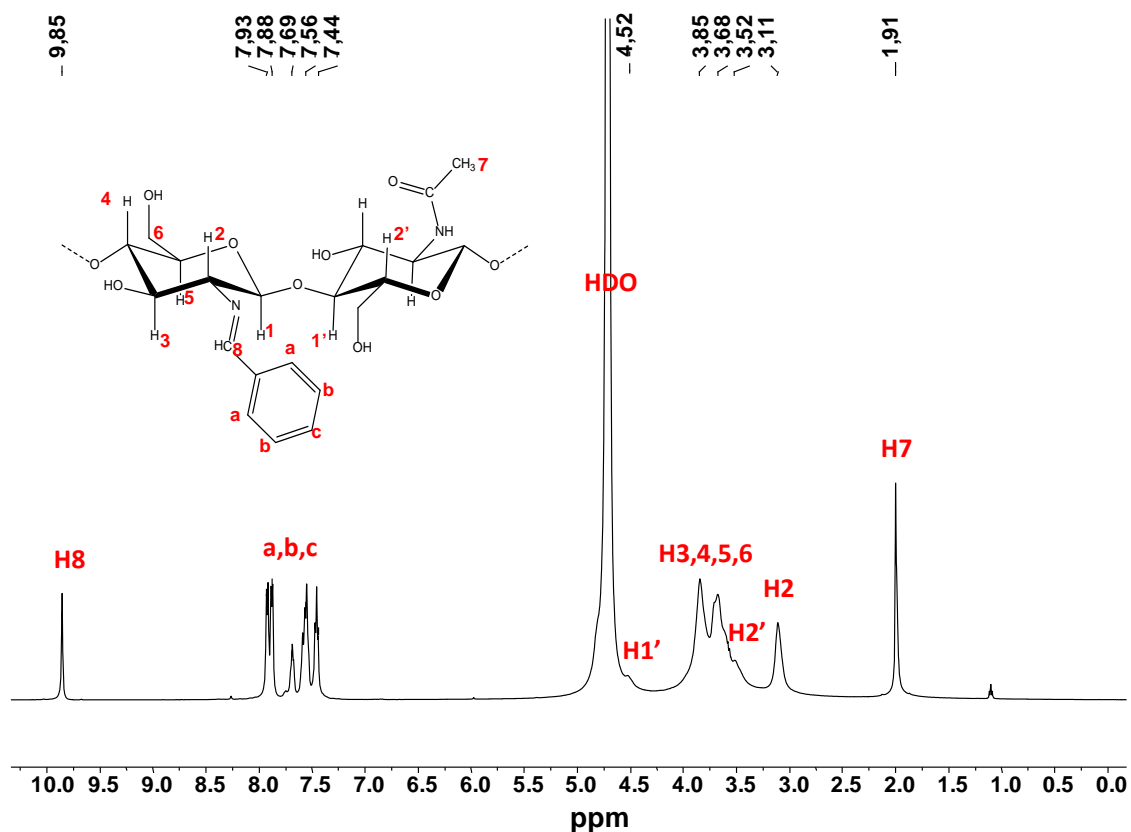
No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do polímero quitina-quitosana, representado pela Figura 11, observa-se o sinal em 1,91 ppm que corresponde aos prótons metílicos do grupo acetamida ( $-\text{COCH}_3$ ) e em 3,08 ppm o atribuído ao próton localizado na posição 2 (H2) do anel glicosamínico. O próton (H2') do grupo acetamida ressona em 3,47 ppm. Os sinais observados na região de 3,64 a 3,80 ppm são atribuídos aos prótons ligados aos carbonos H3, H4, H5 e H6 do anel de glicosamina. O sinal mais deslocado em 4,48 ppm é referente ao próton (H1'), ligado ao carbono C4. Na região de 4,70 ppm pode ser observado o sinal do próton anomérico (H1) do anel glicosamínico que está sobreposto ao sinal do solvente. Este próton está mais desblindado devido às ligações do átomo C1

com dois átomos de oxigênio segundo se observa na estrutura. Não observam-se no espectro os sinais da ligação -OH presente na estrutura polimérica devido a rápida troca de H por D do solvente utilizado para a análise. Os sinais do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do polímero foram atribuídos com base na literatura [57].



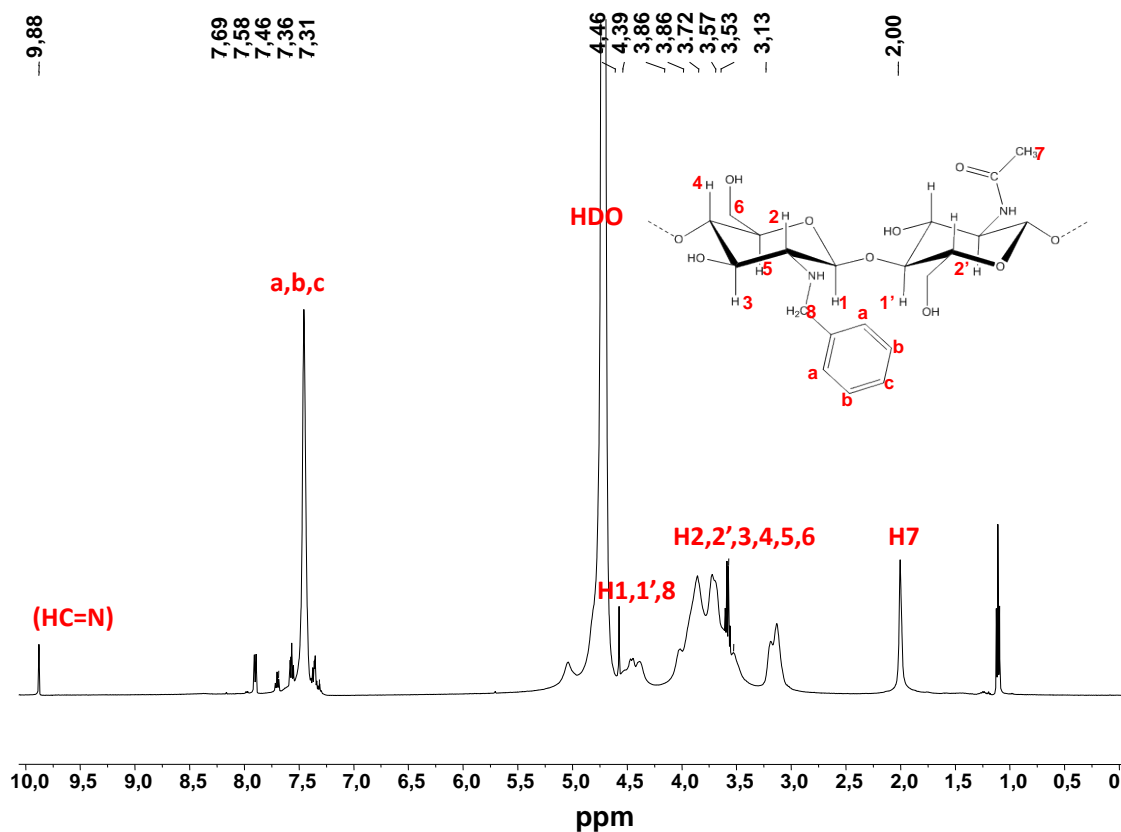
**Figura 11.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do polímero quitina-quitosana em  $\text{DCl}/\text{D}_2\text{O}$  ( $0,1 \text{ Mol.L}^{-1}$ ).

A Figura 12 apresenta o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto intermediário *N*-Benzilidenquitosana. Observaram-se os sinais característicos do polímero quitina-quitosana e o surgimento de novos sinais que confirmam a modificação química realizada sobre a cadeia polimérica. Os prótons H1, H1', H2, H2', H3, H4, H5, H6 e H7 ressonam na região de 1,91 a 4,52 ppm. O próton correspondente ao grupo imino ( $\text{HC}=\text{N}$ ), característico de bases de Schiff, foi observado em 9,85 ppm. Os sinais na região de 7,44 e 7,93 ppm foram atribuídos aos prótons do anel aromático (a,b,c) ligado a estrutura do bipolímero.



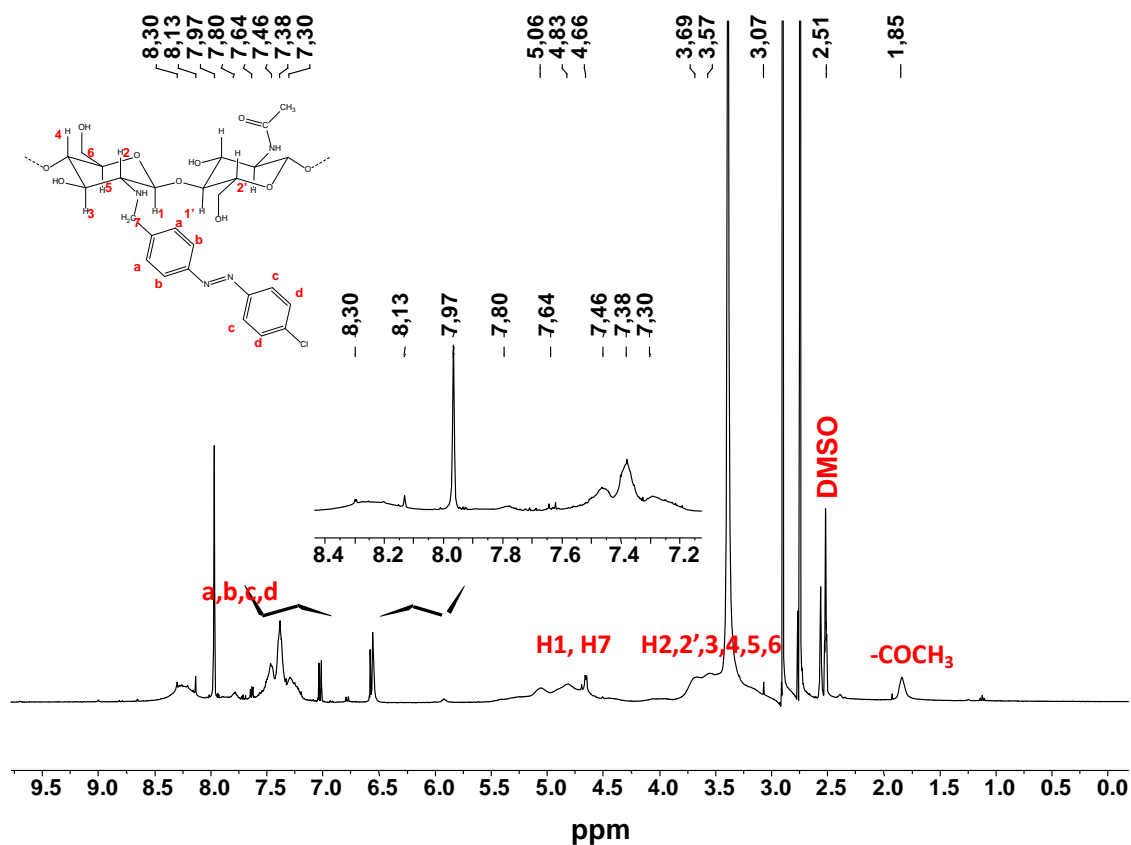
**Figura 12.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do composto *N*-Benzilidenoquitosana em DCl/D<sub>2</sub>O (0,1 Mol.L<sup>-1</sup>).

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H do composto *N*-Benzilquitosana, Figura 13, mostra os sinais na região de 3,13 e 3,86 ppm referente aos prótons do anel piranosídico (H2, H2', H3, H4, H5, H6). Os sinais de deslocamento químico entre 4,39 e 4,46 ppm foram atribuídos aos prótons metilênicos (H8), ao próton H1' e ao próton anomérico (H1). Na região de 7,31-7,69 ppm (a,b,c) observam-se os sinais que correspondem aos prótons aromáticos do anel benzênico. Em 9,88 ppm, ainda é possível observar o sinal que corresponde ao próton do grupo imino (HC=N), o que sugere que nem todos os grupos azometinos foram reduzidos.



**Figura 13.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto *N*-Benzilquitosana em  $\text{DCl}/\text{D}_2\text{O}$  ( $0,1 \text{ Mol.L}^{-1}$ ).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto Azo-Cloro está representado na Figura 14. Apresenta-se uma ampliação da região entre 7,30 a 8,30 ppm (a,b,c,d). Observa-se um aumento de sinais nessa região, o que sugere a presença de mais um anel benzênico ligado à estrutura da cadeia polimérica modificada. Observam-se também no espectro os sinais atribuídos aos prótons cadeia polimérica do biopolímero quitina-quitosana em 1,85 ppm e na região de 3,07 a 5,06 ppm.



**Figura 14.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto Azo-Cloro em  $\text{DMSO-d}_6$ . Ampliação da região 7,30 a 8,30 ppm.

As espectroscopias de FT-IR e RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  foram eficientes na caracterização do biopolímero e seus derivados para confirmar as modificações químicas realizadas na cadeia polimérica.

Os deslocamentos químicos das regiões aromáticas dos azo-compostos Azo-Bromo, Azo-Nitro e Azo-Sulfônico são apresentadas na Tabela 6. Os espectros podem ser consultados no Apêndice B.

**Tabela 6.** Sinais da região aromática (ppm) dos compostos Azo-Bromo, Azo-Nitro e Azo-Sulfônico.

Composto	Sinais da região aromática (ppm)
Azo-Bromo	7,29-8,29
Azo-Nitro	7,23-8,25
Azo-Sulfônico	7,27-8,26



#### 4.5. Determinação do grau de acetilação (GA) e substituição (GS)

O grau de acetilação do polímero foi determinado pela técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons em Solução (RMN de  $^1\text{H}$ ), através da equação 1:

$$\text{GA} = (A_{\text{H-Ac}}/3A_{\text{H-2}}) \times 100\% \quad (\text{Equação 1})$$

Utiliza-se o valor da área do sinal que corresponde aos núcleos dos prótons da metila do grupo *N*-acetil ( $A_{\text{H-Ac}}$ ), na região de 2 ppm, e o valor da área do sinal em 3,06 ppm atribuída ao núcleo do próton na posição 2 do anel glicosamino ( $A_{\text{H-2}}$ ), que corresponde a unidade desacetilada [5].

O GA experimental calculado para o polímero foi de 32 %, portanto, o polímero possui 68 % de grupos  $-\text{NH}_2$  livres. O grau de desacetilação (GD) comercial do polímero (apresentado pelos fornecedores) é de 75 %.

O grau de substituição dos compostos *N*-Benzilidenquitosana e *N*-Benzilquitosana em relação à porcentagem de grupos  $-\text{NH}_2$  livres também foi determinado por RMN de  $^1\text{H}$  [5], através da equação 2:

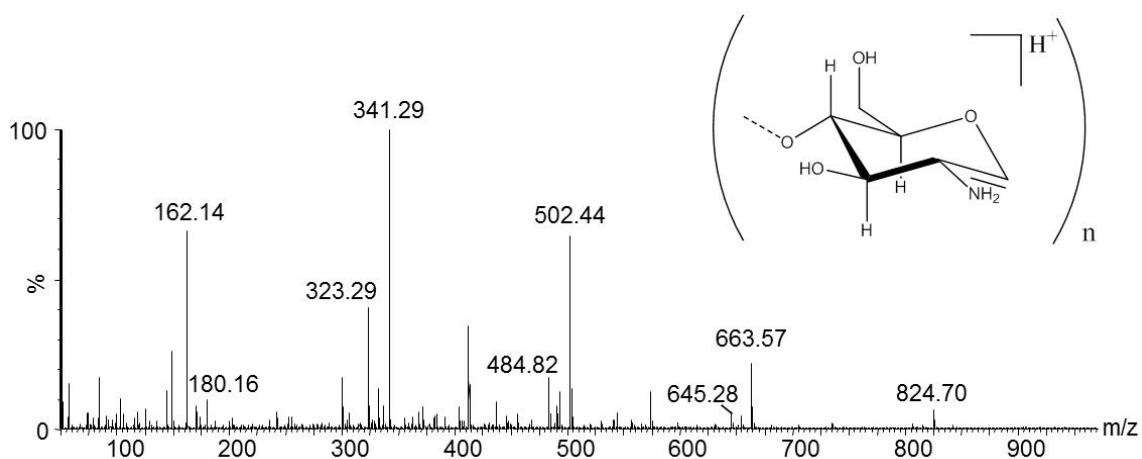
$$\text{GS} = (A_{\text{H-8}}/A_{\text{H-2}}) \times 100\% \quad (\text{Equação 2})$$

Os valores de  $A_{\text{H-8}}$  e  $A_{\text{H-2}}$  correspondem à área do sinal referente ao próton do grupo imino da Base de Schiff (H-8) e à área dos prótons da posição 2 da unidade desacetilada (H-2).

Através dos cálculos o grau de substituição obtido foi de 48 % para o composto *N*-Benzilidenquitosana. Posteriormente, a equação 2 também foi utilizada para o composto *N*-Benzilquitosana, pois ainda observou-se o sinal do próton referente ao grupo imino ( $\text{HC}=\text{N}$ ). Determinou-se que a porcentagem de grupos  $\text{HC}=\text{N}$  ainda presentes nesse composto foi de 2 %, ou seja, o grau de substituição de *N*-Benzilquitosana foi de 46% após a redução.

#### 4.6. Caracterização por espectrometria de massas com ionização por eletrospray no modo positivo (ESI(+)-MS)

O biopolímero quitina-quitosana e seus derivados precisaram ser hidrolisados para formar oligômeros de massas moleculares menores e serem caracterizados por espectrometria de massas utilizando ionização por eletrospray em modo positivo (ESI(+)-MS). A aquisição dos espectros foi realizada pela protonação dos oligômeros formados pela hidrólise ácida do biopolímero e de seus derivados. A Figura 15 mostra o espectro de massas do biopolímero quitina-quitosana hidrolisado (GlcN).

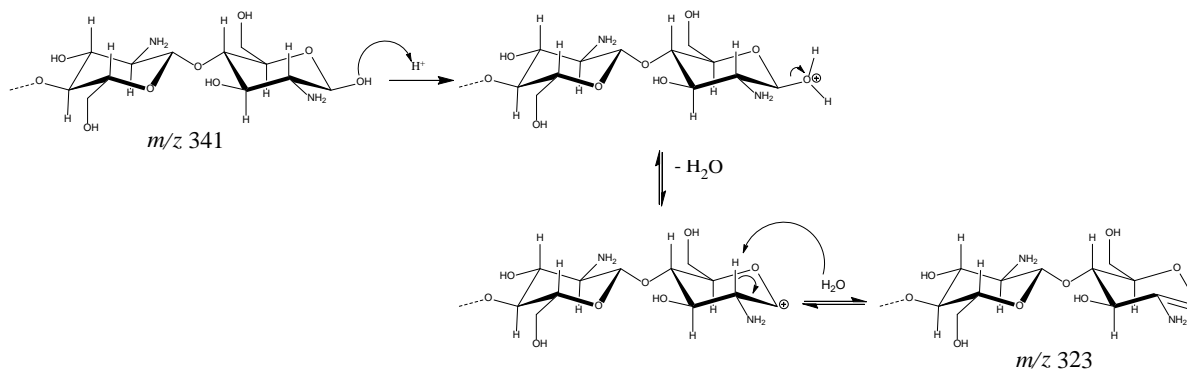


**Figura 15.** Espectro de ESI(+)-MS do biopolímero quitina-quitosana hidrolisado.

A Tabela 7 mostra os valores  $m/z$  e os respectivos oligômeros formados como produtos de hidrólise protonados [58] que foram observados no espectro da Figura 14. Para os hidrolisados do biopolímero, observou-se a presença de oligômeros de até cinco unidades repetitivas ( $\text{GlcN}_5$ ) além de fragmentos gerados pela perda de água de alguns desses oligômeros durante o processo de hidrólise, como representado pelo Esquema 8.

**Tabela 7.** Oligômeros formados durante a hidrólise do polímero quitina-quitosana e seus respectivos valores de  $m/z$  e fragmentos de desidratação observados no espectro de ESI(+)-MS.

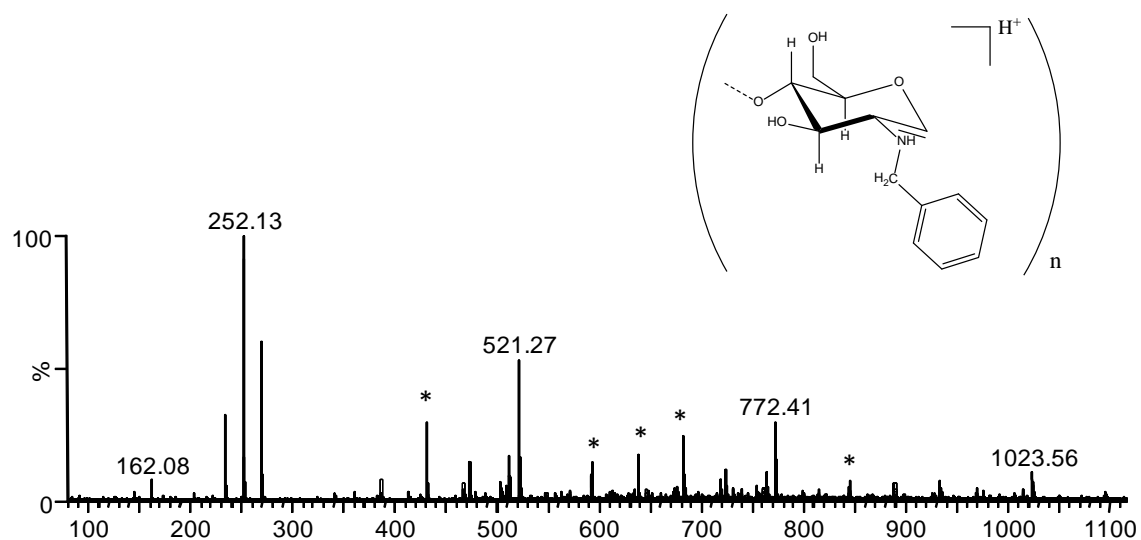
Oligômeros	$[M + H]^+$	$[M-H_2O + H]^+$
GlcN	180.16	162.14
GlcN <sub>2</sub>	341.29	323.29
GlcN <sub>3</sub>	502.82	484.82
GlcN <sub>4</sub>	663.57	645.28
GlcN <sub>5</sub>	824.70	



**Esquema 8.** Processo de desidratação dos oligômeros (Mecanismo E1) para a formação do produto  $[M-H_2O + H]^+$

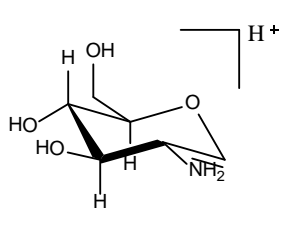
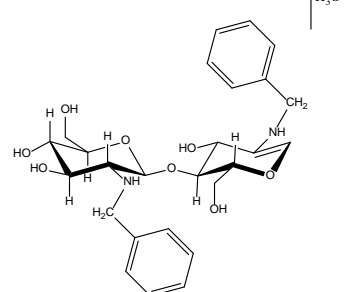
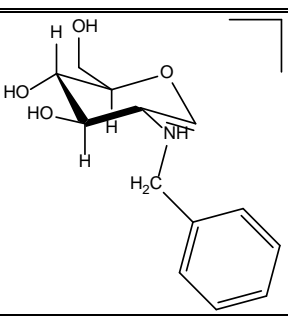
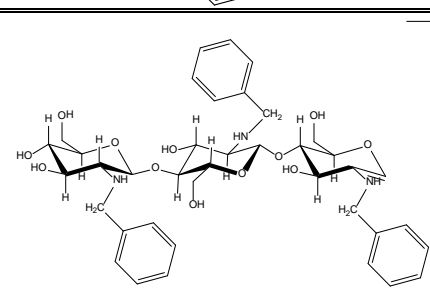
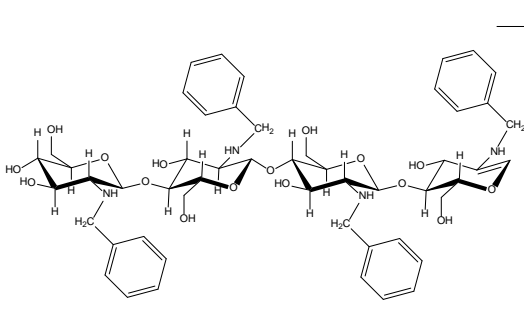
A Figura 16 apresenta o espectro de ESI(+)-MS do derivado *N*-Benzilquitosana hidrolisado. A reação de *N*-alquilação foi comprovada pelo aumento de  $m/z$  múltiplos de 90 em relação aos respectivos valores de  $m/z$  dos oligômeros não funcionalizados. Esse acréscimo de 90 nos valores de  $m/z$  dos derivados corresponde ao grupo benzila ( $m/z$  91) ligado à cadeia polimérica. Observa-se também no espectro íons que correspondem aos oligômeros sodiados  $[M + Na]^+$  e potassidados  $[M + K]^+$ , pois durante a ionização por eletrospray no modo positivo é possível obter-se moléculas protonadas e moléculas cationizadas, que são formadas pela adição de outros íons como  $Na^+$  e  $K^+$ . A formação dessas moléculas cationizadas ocorre no interior do capilar durante a análise da amostra. Os íons sodiados e potassidados estão representados no espectro por (\*). As estruturas

dos oligômeros formados durante a reação de hidrólise e os respectivos valores de  $m/z$  do composto *N*-Benzilquitosana observados no espectro de ESI(+)-MS da Figura 15 estão mostrados na Tabela 8.



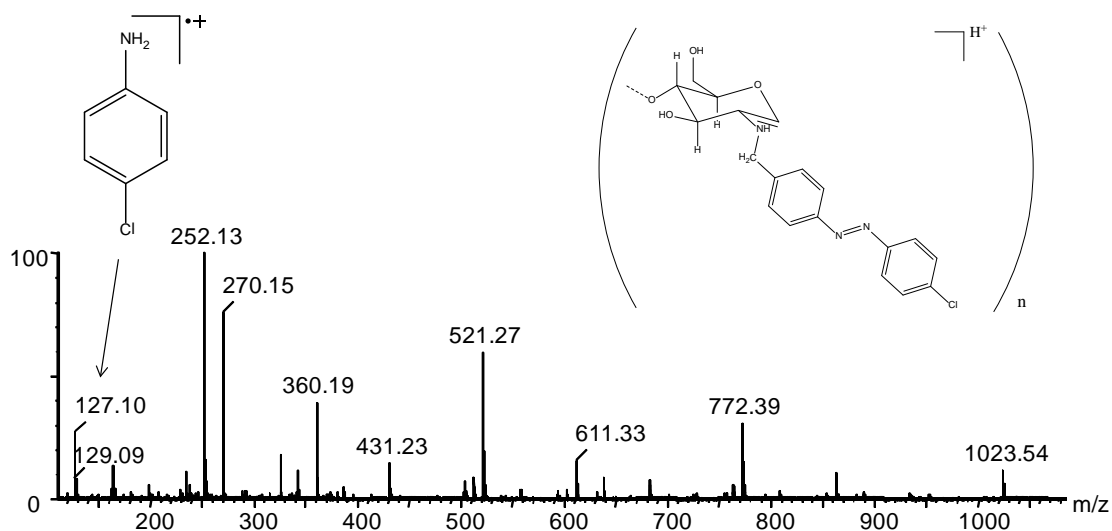
**Figura 16.** Espectro de ESI(+)-MS do composto *N*-Benzilquitosana hidrolisado. Os íons sodiados e potassiados estão representados por (\*).

**Tabela 8.** Valores de  $m/z$  e respectivas estruturas dos produtos de hidrólise de *N*-Benzilquitosana.

$m/z$	$[M + H]^+$	$m/z$	$[M + H]^+$
162.08		521.27	
252.13		772.39	
1023.54			

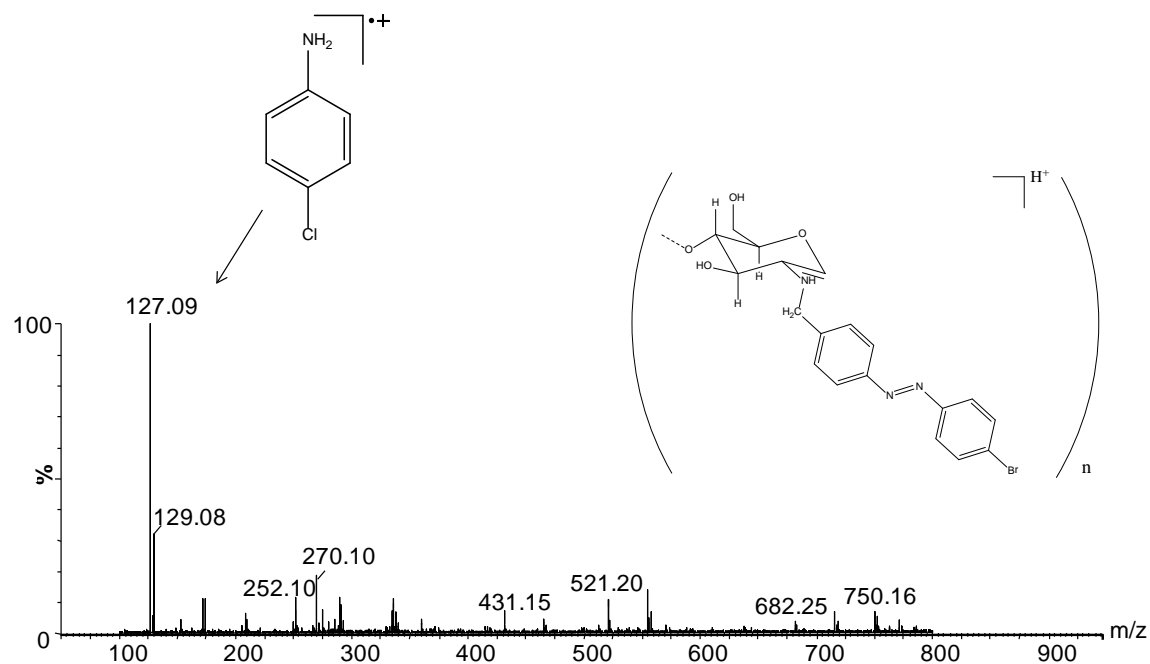
A espectrometria de massas mostrou-se uma técnica eficiente para comprovar a formação do composto *N*-Benzilquitosana. Porém, pela análise de ESI(+)-MS dos poliazocompostos hidrolisados, não foi possível comprovar o sucesso da reação de diazoacoplamento, pois o espectro de MS apresentou os mesmos sinais dos oligômeros *N*-Benzilquitosana usado como precursor, sugerindo que a reação não ocorreu. Entretanto, os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  apresentaram sinais na região aromática (além dos sinais dos hidrogênios do anel benzílico observados anteriormente) e os espectros de absorção no infravermelho apresentaram a banda de absorção característica do grupamento azo ( $-\text{N}=\text{N}-$ ) (ver as seções RMN de  $^1\text{H}$  e FT-IR) indicando a formação do derivado. Considerando que a caracterização por RMN de  $^1\text{H}$  e FT-IR podem ser realizadas sem a necessidade de hidrolisar o derivado, enquanto que para a análise por MS é necessário

realizar a hidrólise ácida, concluímos a partir dos resultados apresentados que os poli-azo-derivados foram formados, e que a hidrólise ácida decompõe estes compostos devido à elevada acidez do meio reacional. Por consequência dessa decomposição, não foram observados os sinais esperados por MS. A Figura 17 apresenta o espectro dos produtos formados pela reação de hidrólise do composto Azo-Cloro.

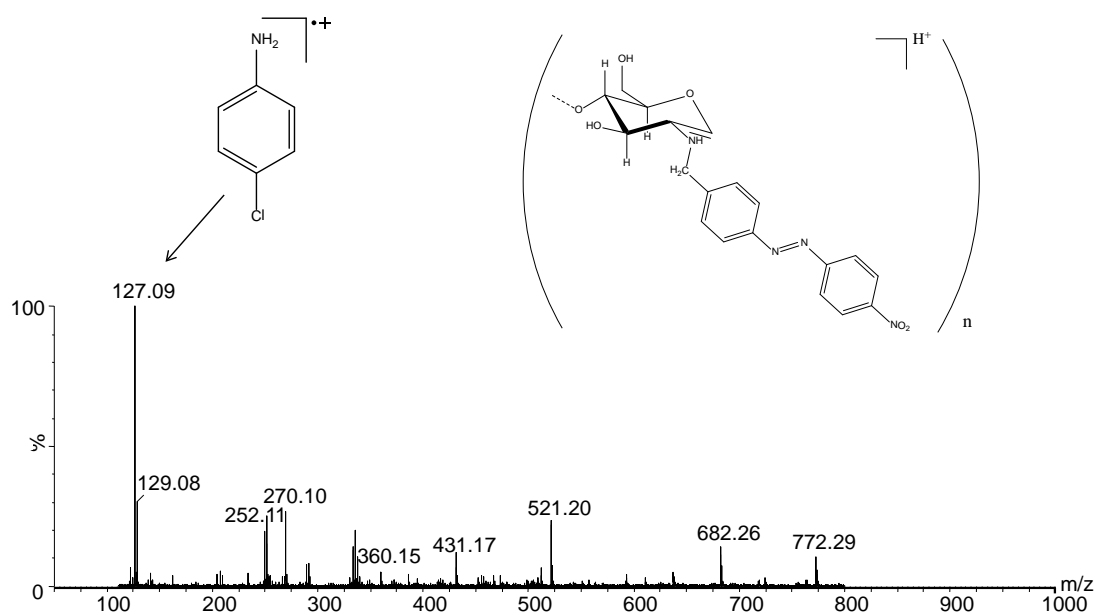


**Figura 17.** Espectro de ESI(+)-MS dos produtos de hidrólise do composto Azo-Cloro.

Além dos valores de  $m/z$  dos oligômeros de *N*-Benzilquitosana, os espectros de MS também apresentaram o  $[M+H]^+$  que corresponderia a respectiva anilina *p*-substituída utilizada como reagente precursor do sal de diazônio para formação dos poli-azo-compostos. As anilinas *p*-substituídas observadas são produtos da decomposição durante a hidrólise ácida do poli-azo-derivado, pois a alta concentração de íons  $H^+$  facilita a protonação dos átomos de nitrogênio do grupo azo [59]. Para o composto Azo-Bromo, Figura 18, observou-se o íon-produto de  $m/z$  127 com o padrão isotópico característico do átomo de cloro (1:3  $m/z$  129/127). Este íon corresponde a *p*-cloroanilina. Isto sugere que ocorreu uma reação de substituição nucleofílica aromática ( $S_NAr$ ) do átomo de bromo do composto Azo-Bromo pelo átomo de cloro. A reação de substituição se dá pela alta concentração de íons cloretos presentes na solução. O mesmo comportamento foi observado para o composto Azo-Nitro, Figura 19.



**Figura 18.** Espectro de ESI(+)-MS dos produtos de hidrólise do composto Azo-Bromo.

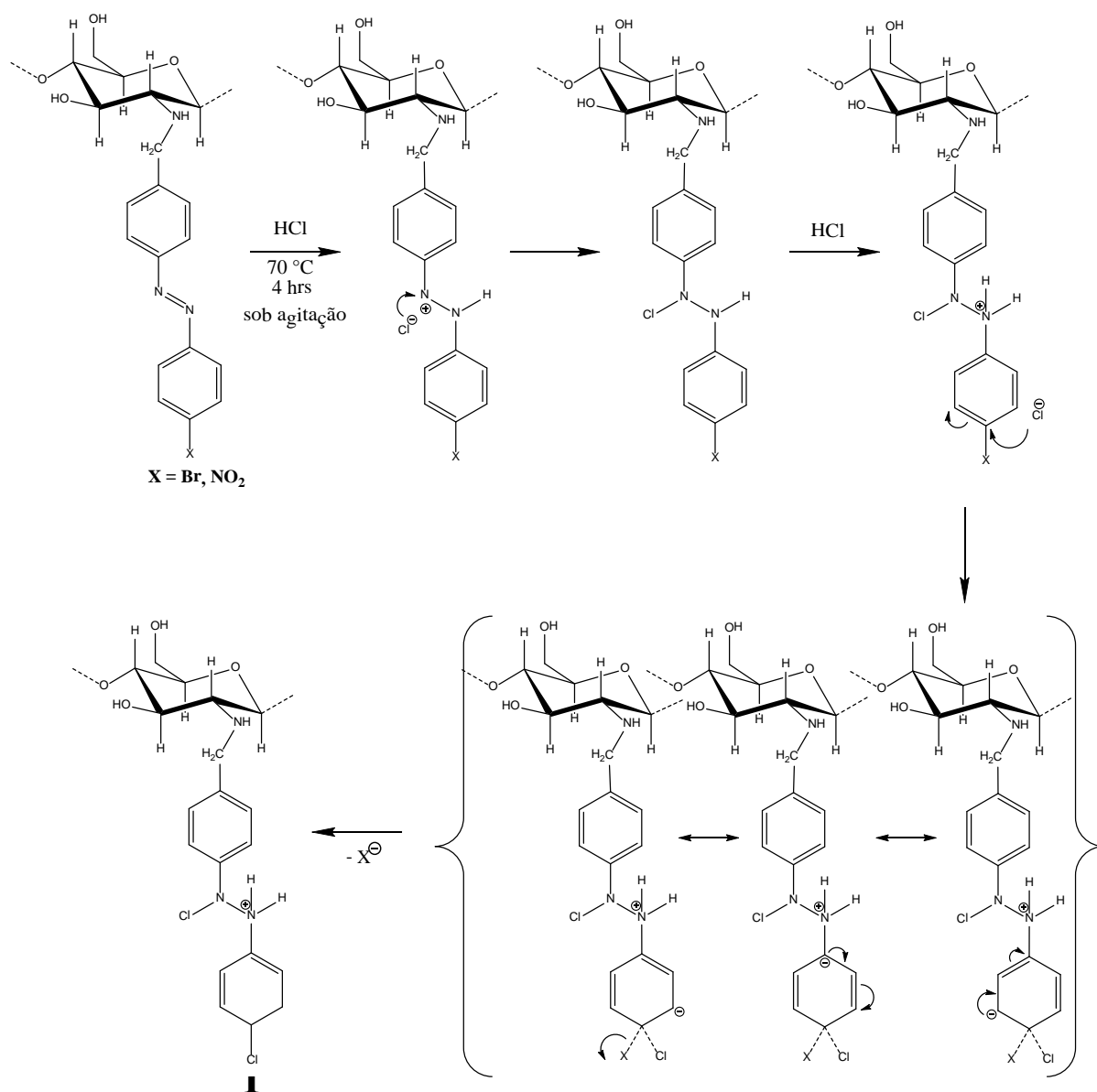


**Figura 19.** Espectro de ESI(+)-MS dos produtos de hidrólise do composto Azo-Nitro.

Podemos supor que os íons 127 e 129 não estão associados a impurezas do reagente *p*-cloro anilina, pois este não foi utilizado como precursor da síntese do sal de diazônio, mas sim, os reagentes *p*-bromo anilina e *p*-nitro anilina para a formação dos

compostos Azo-Bromo e azo-Nitro, respectivamente. Estes produtos foram purificados por lavagem antes da hidrólise.

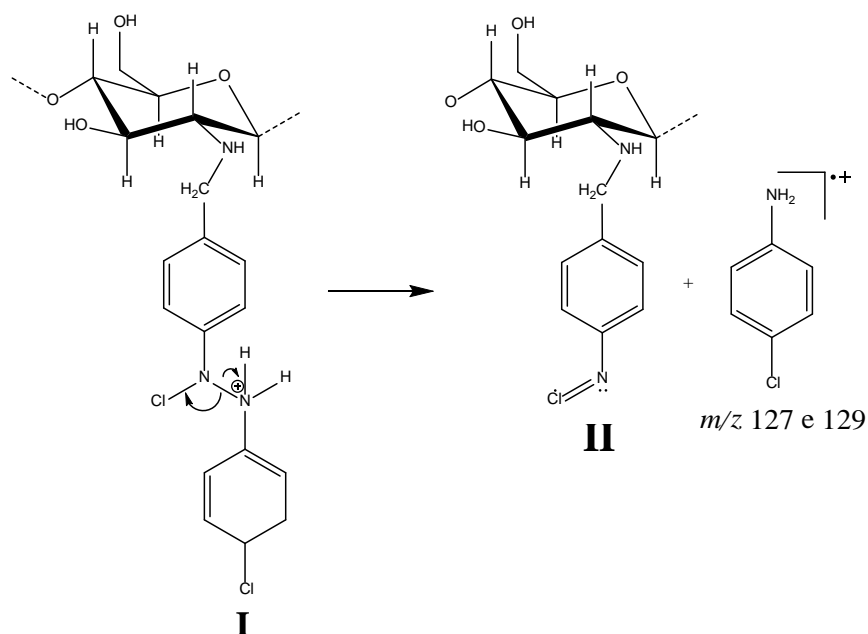
Como uma proposta para a formação do íon  $m/z$  127 e 129 observado nos espectros das Figuras 18 e 19, o Esquema 9 mostra a formação do intermediário **I** durante a reação de hidrólise pela protonação do grupo azo dos compostos Azo-Bromo e Azo-Nitro e subsequente substituição do átomo de bromo e grupo nitro [60] pelo átomo de cloro (Reação de  $S_NAr$ ).



**Esquema 9.** Proposta de um possível mecanismo para formação do intermediário **I** durante o processo de hidrólise do biopolímero modificado.

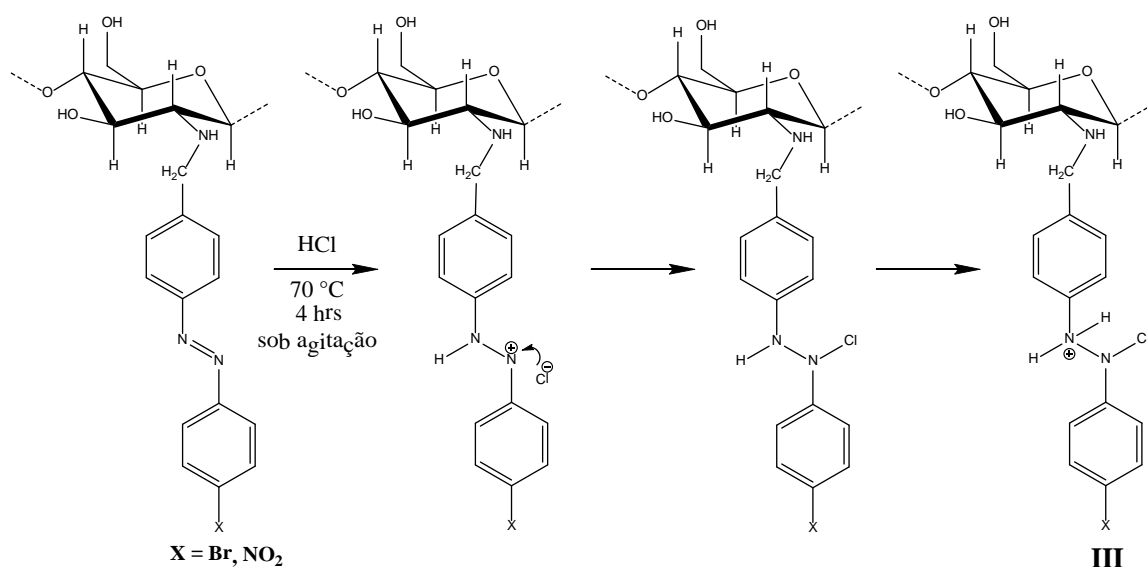


A reação proposta para explicar a decomposição do intermediário clorado **I** (Esquema 9), que também ocorre durante a reação de hidrólise, é mostrada a seguir no Esquema 10. Observa-se a formação dos íons-produtos  $m/z$  127 e 129 e a espécie neutra **II** após a quebra homolítica da ligação do grupo azo.



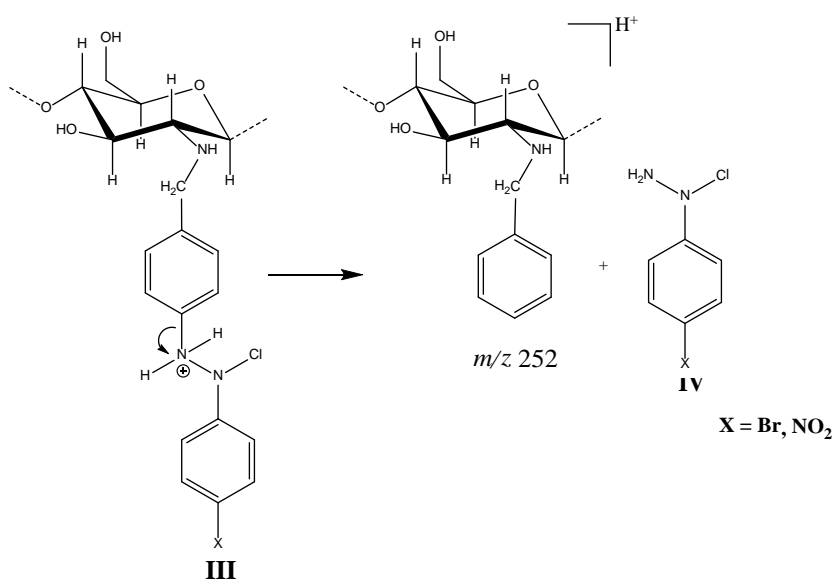
**Esquema 10.** Proposta de um mecanismo para a decomposição do intermediário **I** durante o processo de hidrólise para a formação dos íons-produtos  $m/z$  127 e 129 e da espécie neutra **II** no meio reacional.

Outro íon importante também observado é o  $m/z$  252 proveniente da decomposição de um segundo intermediário **III** também formado durante a reação de hidrólise dos poli-azo-compostos. O Esquema 11 mostra o mecanismo para a formação do segundo intermediário **III** a partir dos compostos Azo-Bromo e Azo-Nitro que ocorre pela protonação do nitrogênio, presente no grupo azo, ligado ao primeiro anel benzênico da cadeia polimérica.



**Esquema 11.** Proposta de uma rota para a formação do intermediário **III** durante a reação de hidrólise.

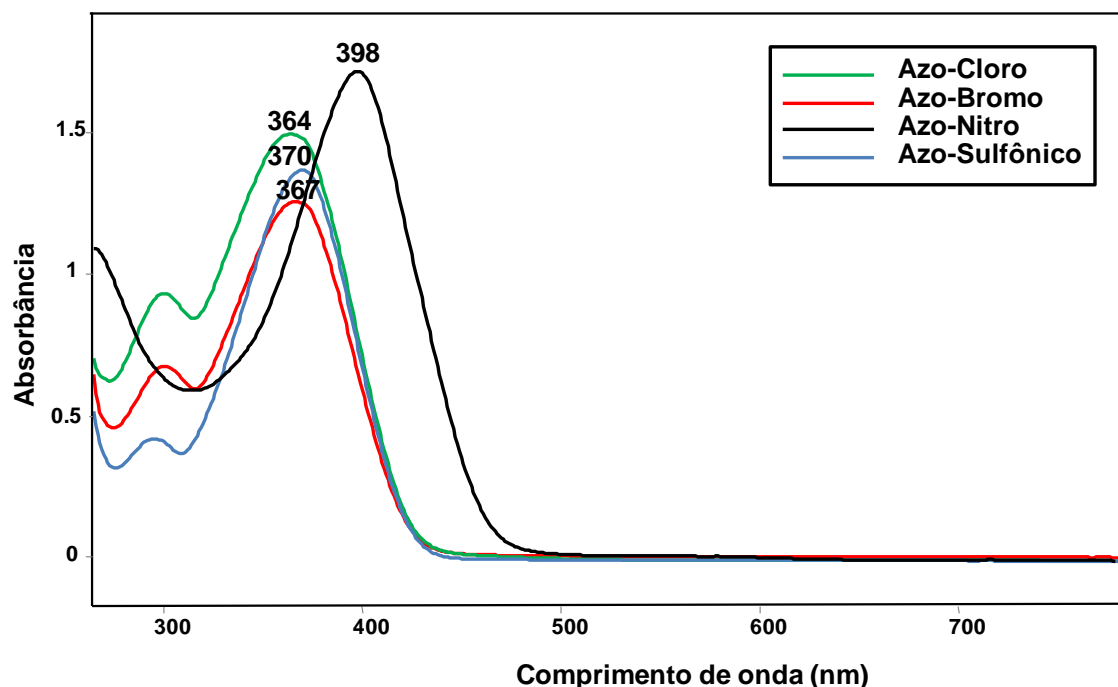
O Esquema 12 apresenta a reação de decomposição do intermediário **III** que também ocorre durante a hidrólise ácida. Este intermediário é proveniente da hidrólise dos compostos Azo-Bromo e Azo-Nitro (Esquema 11) com a formação do íon-produto de  $m/z$  252 e da molécula neutra representada por **IV**.



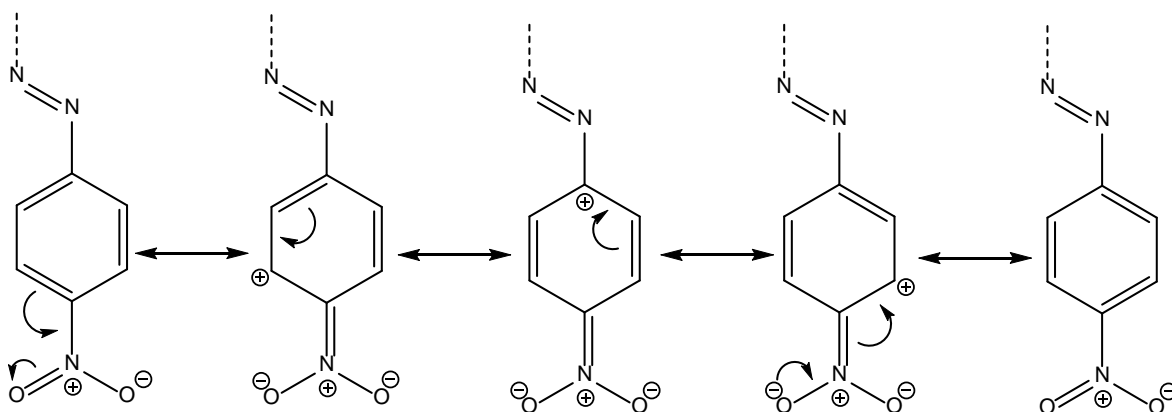
**Esquema 12.** Proposta de uma rota de decomposição para a formação do íon-produto de  $m/z$  252 e da molécula neutra **IV** durante a reação de hidrólise.

#### 4.7. Caracterização por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível

A Figura 20 apresenta o espectro de absorção em função do comprimento de onda para as soluções dos compostos Azo-Cloro, Azo-Nitro, Azo-Bromo e Azo-Sulfônico. O espectro mostra que bandas intensas na região de 364 a 398 nm. Esta banda é devida à transição  $\pi-\pi^*$  do grupo azo presente nesses compostos [45]. A banda de absorção do composto Azo-Nitro apresenta o seu máximo de absorção mais deslocado para um maior comprimento de onda. Isto é devido à presença do grupo  $-\text{NO}_2$  que é o retirador de elétrons mais forte da serie. Este agrupamento contribui efetivamente a formação do orbital antiligante  $\pi^*$  (LUMO) e diminui a sua energia ao mesmo tempo em que reduz a diferença de energia HOMO-LUMO e consequentemente a energia da transição  $\pi-\pi^*$  [61]. Assim, a banda de absorção se desloca batocromicamente para um maior comprimento de onda. O Esquema 13 ilustra as estruturas ressonantes para a contribuição do grupo nitro a formação do orbital antiligante  $\pi^*$  (LUMO).



**Figura 20.** Espectro de absorção na região visível do UV das soluções de Azo-Cloro, Azo-Nitro, Azo-Bromo e Azo-Sulfônico.



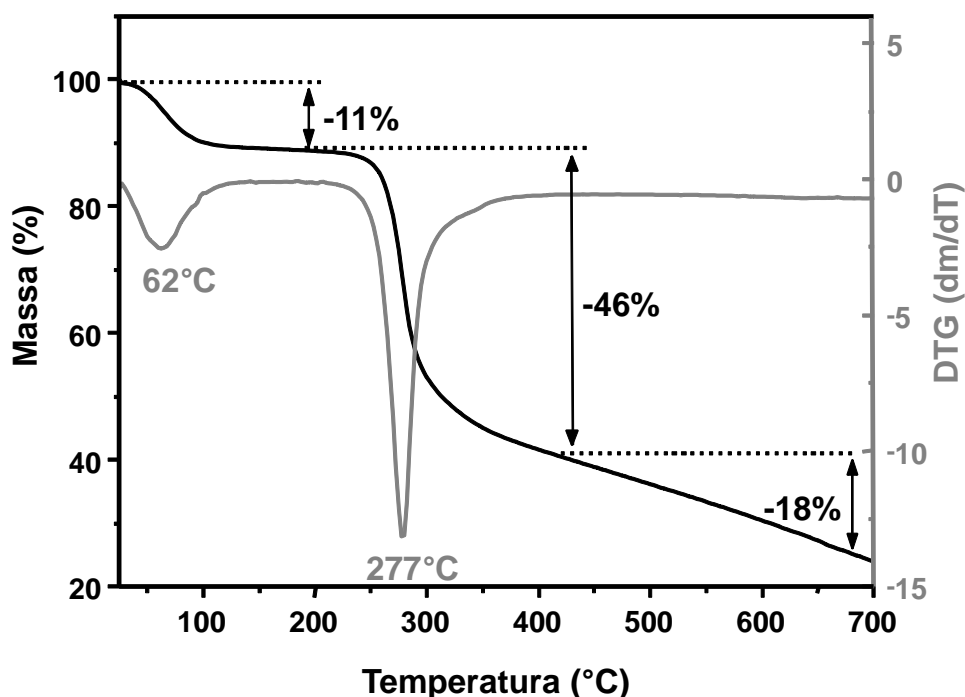
**Esquema 13.** Estruturas ressonantes mostrando a contribuição do grupo nitro à conjugação do sistema  $\pi$ -aromático (efeito mesomérico).

#### 4.8. Caracterização por TG acoplado com FT-IR (TG/FT-IR)

As análises termogravimétricas foram utilizadas nesse trabalho para conhecer a estabilidade térmica do polímero quitina-quitosana e seus derivados. Medidas de FT-IR dos produtos de decomposição na fase gasosa foram realizadas simultaneamente com a análise de TG com o objetivo de investigar a natureza dos produtos liberados durante a degradação térmica.

A Figura 21 apresenta as curvas de TG, juntamente com a derivada (DTG) do polímero quitina-quitosana sem modificações químicas. Pode-se observar um evento térmico a 62 °C, com perda de 11% de massa, sendo atribuída a perda de água presente na estrutura polimérica e início da degradação da cadeia. A temperatura que corresponde à desidratação é menor que 100 °C, o que implica na possibilidade da molécula de água ser adsorvida e/ou fracamente ligada à cadeia polimérica [62]. Além disso, à temperatura de 277 °C observou-se uma perda de massa de 46% que corresponde à degradação do polímero. Isto pode ser suportado pelo trabalho de Pawlak e Mucha [63] que observaram a formação de um radical intermediário formado durante a degradação do polímero, que por sua vez, se rearranja espontaneamente resultando na formação de ligações cruzadas (cross-linking). Em adição, a decomposição desse material não se completa mesmo acima de 700 °C, pois acima desta temperatura

observa-se uma massa residual que corresponde a 25% da massa inicial do material.

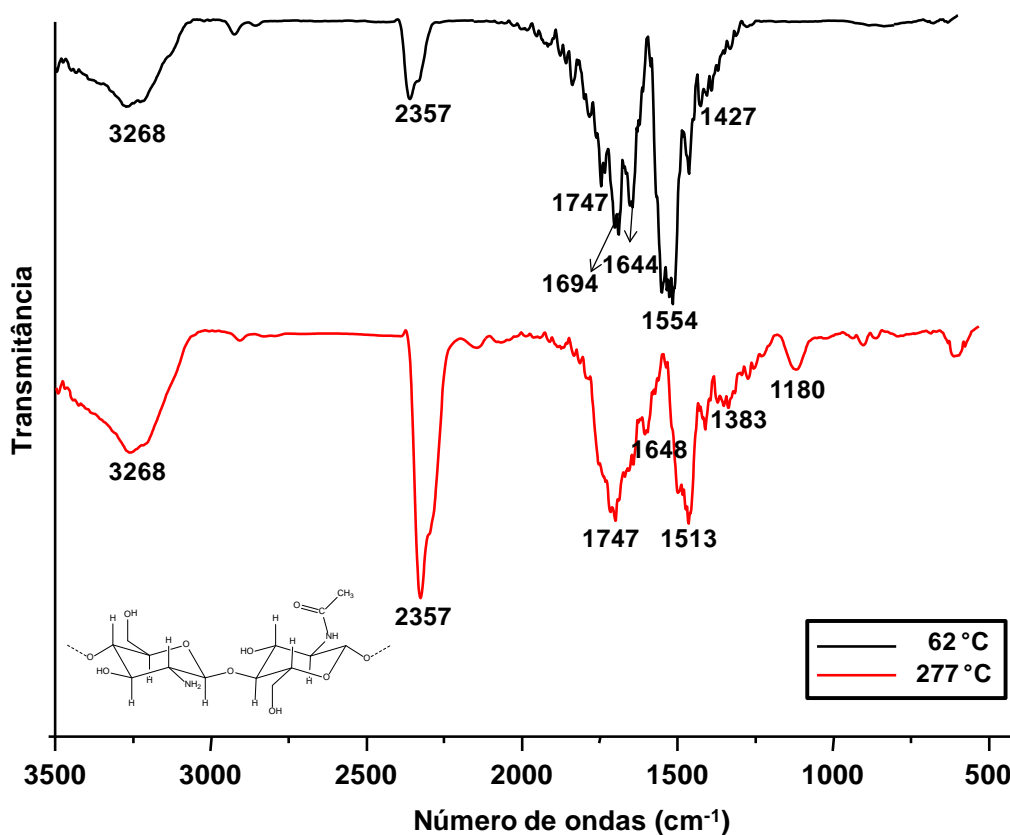


**Figura 21.** Curvas de TG/DTG do polímero quitina-quitosana.

Na Figura 22 apresentam-se as curvas FT-IR correspondentes à temperatura de pico máximo (DTG) obtido para o polímero quitina-quitosana com o objetivo de investigar os gases provenientes da degradação durante as medidas de TG a partir das bandas que aparecem no espectro de FT-IR.

Pelo espectro de TG/FT-IR do polímero quitina-quitosana, a 62 °C observa-se a perda do grupo amina, provavelmente na forma de amônia ou de uma amina volátil, cuja banda corresponde a  $1554\text{ cm}^{-1}$ , e do grupo acetamida pelas bandas em  $1694\text{ cm}^{-1}$  e  $1644\text{ cm}^{-1}$ , atribuídas às vibrações de frequência dos tipos amida I e amida II, respectivamente.

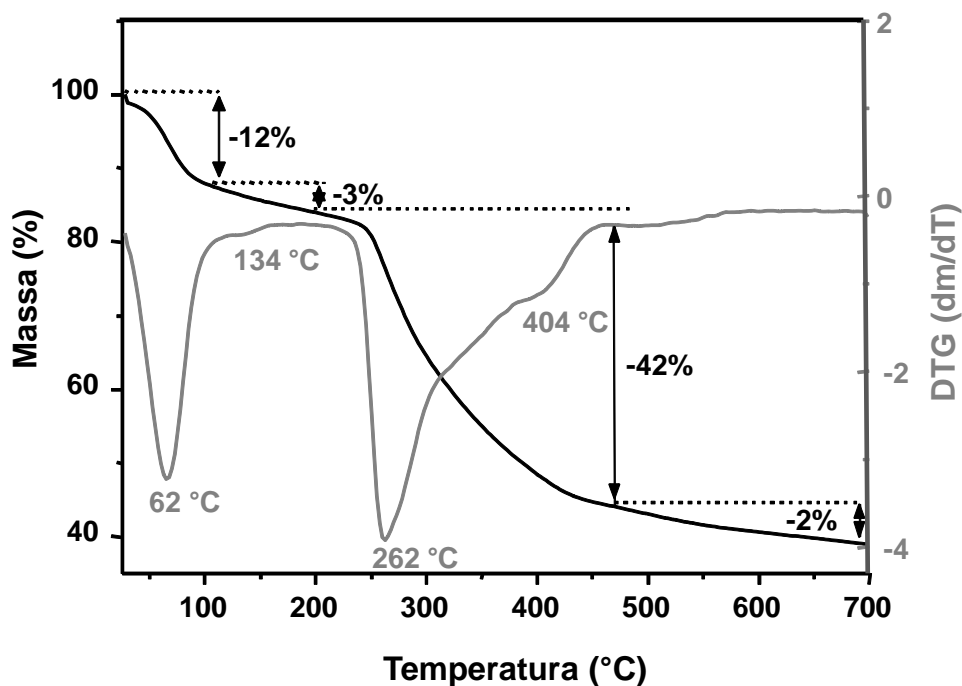
O espectro de FT-IR do polímero a temperatura de 277 °C mostra a banda em  $1180\text{ cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento C-O-C da ligação glicosídica. Durante a degradação térmica observa-se um aumento na intensidade da banda em  $1747\text{ cm}^{-1}$  que corresponde ao estiramento do grupo carbonila de aldeído que se forma como produto da degradação. [64,65]



**Figura 21.** Espectros extraídos da análise TG/FT-IR do polímero quitina-quitosana a diferentes temperaturas do termograma.

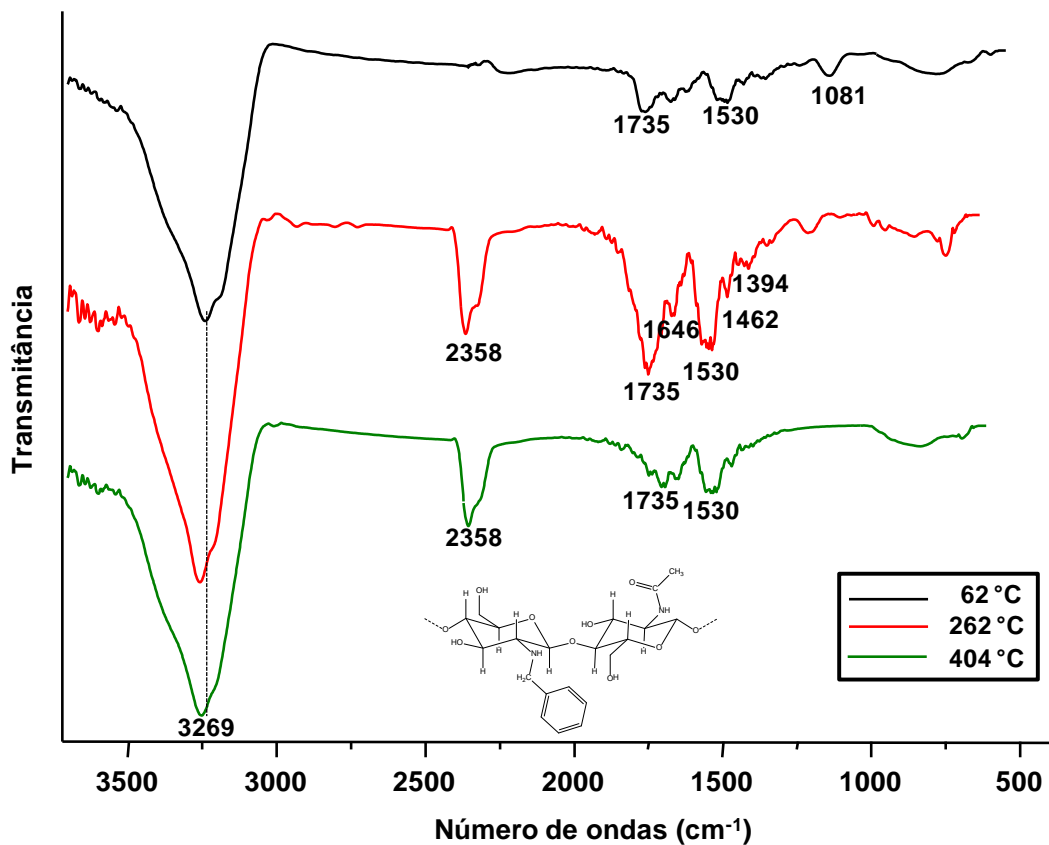
As curvas termogravimétricas do composto *N*-Benzilquitosana são mostradas na Figura 23. No espectro de FT-IR, verificou-se uma perda de massa de 12% a uma temperatura de 62 °C, que corresponde à perda de moléculas de água adsorvidas e/ou fracamente ligadas ao polímero, bem como uma perda de massa de 3% a 134 °C devida à evaporação de água que está fortemente ligada a cadeia polimérica [62].

Este derivado também apresentou duas perdas de massa de 42 e 2 % a 262 e 404 °C, respectivamente, devido à degradação dos substituintes ligados a cadeia polimérica e a degradação do próprio polímero. Aparentemente, o composto *N*-Benzilquitosana mostrou maior capacidade de se ligar a moléculas de água quando comparado ao polímero quitina-quitosana. O composto também mostrou menor estabilidade térmica em relação ao polímero sem modificações químicas. Isto se deve a diminuição da cristalinidade do material pela presença de grupos hidrofóbicos na cadeia polimérica que impedem os grupos -NH<sub>2</sub> a fazerem ligações de hidrogênio [66]. A porcentagem de massa residual observada para esse composto foi de 41%.



**Figura 23.** Curvas de TG/DTG do composto *N*-Benzilquitosana.

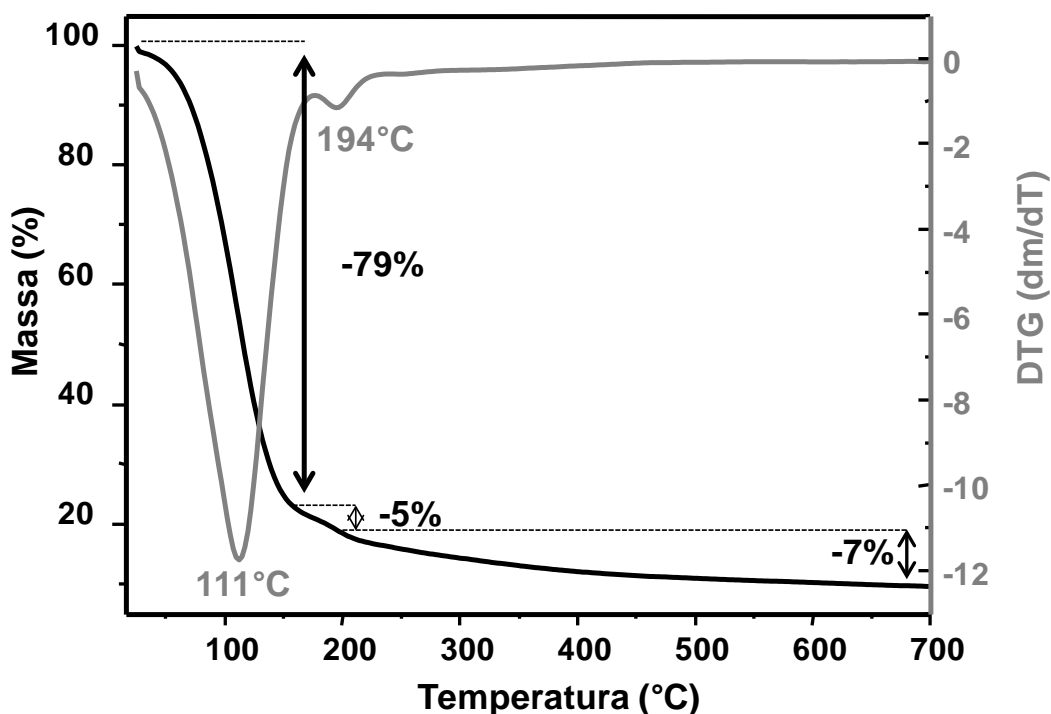
As curvas FT-IR correspondentes à temperatura de pico máximo (DTG) de *N*-Benzilquitosana, representadas pela Figura 24, mostra a perda de água ligada ao polímero ( $3269\text{ cm}^{-1}$ ) e início da degradação da cadeia polimérica a  $62\text{ °C}$ . A banda em  $1081\text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento C-O-C das ligações glicosídicas e a banda em  $1530\text{ cm}^{-1}$  esta associada à deformação angular de N-H do grupo amino. Além do mais, a  $262\text{ °C}$  observa-se uma maior degradação do composto pelas bandas de absorção em  $1394\text{ cm}^{-1}$  e  $1646\text{ cm}^{-1}$  relacionado à deformação axial de C-N e estiramento C=N do grupo amida, respectivamente. A banda de absorção em  $1530\text{ cm}^{-1}$  é atribuída à deformação angular de N-H presente nas unidades desacetiladas e a banda em  $1735\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento do grupo carbonila de aldeído formado durante a degradação. Vale destacar a banda de absorção em  $2358\text{ cm}^{-1}$  que se refere ao desprendimento do gás de  $\text{CO}_2$  provavelmente devido a oxidação dos fragmentos de aldeído decorrentes da degradação térmica da cadeia polimérica. A  $404\text{ °C}$  observa-se apenas as bandas em  $1530\text{ cm}^{-1}$  relacionado a deformação angular de N-H,  $1735\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento do grupo carbonila aldeídico,  $2358\text{ cm}^{-1}$  devido ao desprendimento do gás de  $\text{CO}_2$  e  $3269\text{ cm}^{-1}$  atribuído ao estiramento axial de OH.



**Figura 24.** Espectros de FT-IR correspondentes as temperaturas dos picos máximos (DTG) para composto *N*-Benzilquitosana.

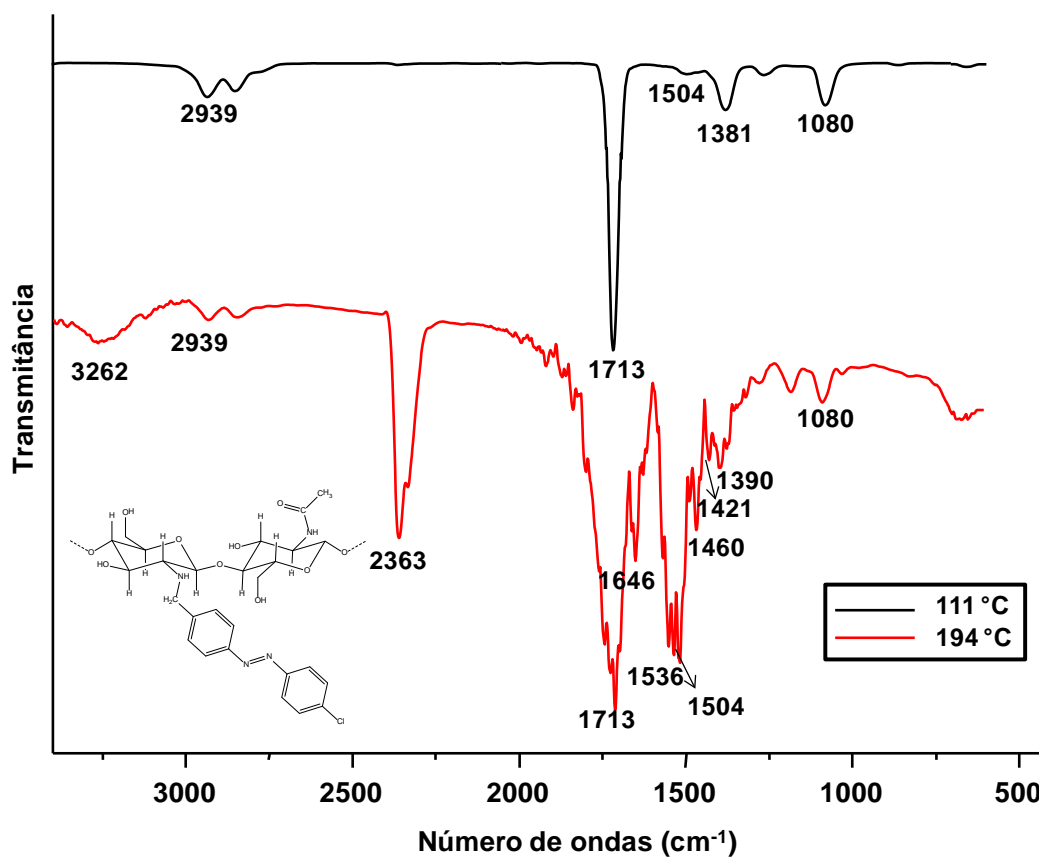
A Figura 25 apresenta as curvas térmicas para o composto Azo-Cloro. O primeiro evento térmico é observado a 111 °C com perda de massa de 79 %, que corresponde ao início da degradação do polímero. Adicionalmente, o segundo evento térmico, com perdas de 5 e 7% de massa, ocorre a 194 °C devido a degradação térmica do grupo azo, bem como da cadeia polimérica, resultando uma massa residual de 9 %.





**Figura 25.** Curva de TG/DTG do composto Azo-Cloro.

O espectro representado pela Figura 26 correspondente as curvas FT-IR das temperaturas de pico máximo (DTG) obtidas para composto Azo-Cloro. Observa-se a 111 °C a banda de absorção em  $1080\text{ cm}^{-1}$  que corresponde ao estiramento C-O-C da ligação glicosídica. Em adição, verifica-se também a banda em  $1713\text{ cm}^{-1}$  proveniente da abertura do anel piranosídico para formação de aldeídos [64,65]. A 194 °C observa-se as bandas em  $3262\text{ cm}^{-1}$  devido ao estiramento axial da ligação O-H, em  $1646\text{ cm}^{-1}$  referente a deformação axial de C-N do grupo amida presente nas unidades acetiladas e em  $1504\text{ cm}^{-1}$  proveniente da deformação angular de N-H das unidades desacetiladas. Além disso, é possível analisar também no espectro de FT-IR, a essa temperatura, as bandas em  $1460\text{ cm}^{-1}$  e  $1421\text{ cm}^{-1}$  atribuídas ao estiramento do grupo azo e deformação das ligações C-H e C=C dos anéis aromáticos, respectivamente.



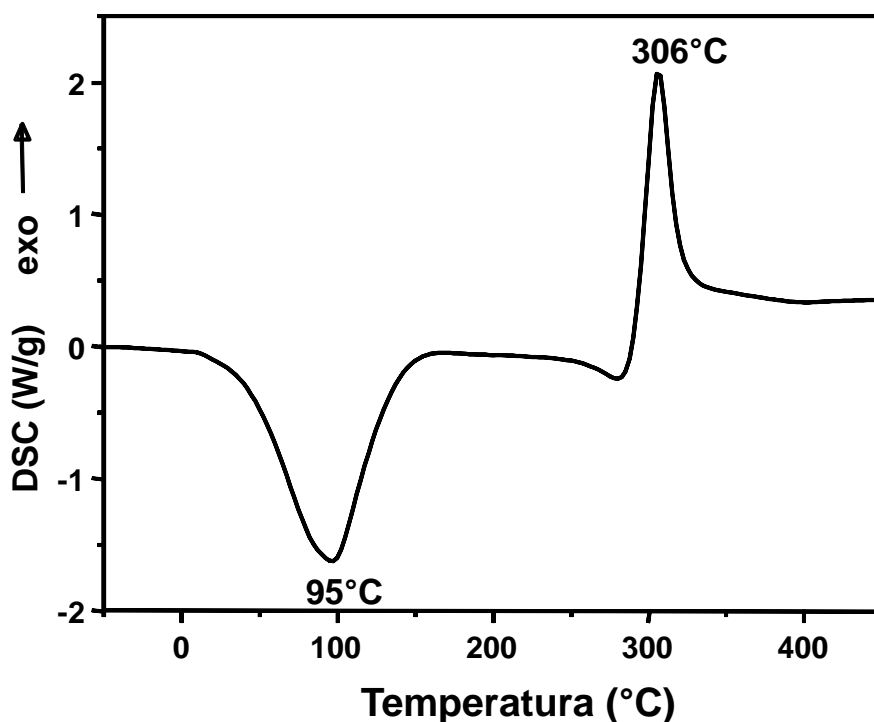
**Figura 26.** Espectros de FT-IR correspondentes as temperaturas dos picos máximos (DTG) para o composto Azo-Cloro.

Ao analisar as curvas TG/DTG do poli-azo-composto, podemos observar que este se apresenta menos estável que o polímero e o derivado *N*-Benzilquitosana. Isso se deve ao fato de as novas ligações formadas desestabilizarem a cadeia polimérica e influenciarem na degradação do polímero a temperaturas mais baixas quando comparado ao composto inicial [67]. As atribuições das bandas de absorção no infravermelho observadas nos espectros dos compostos podem ser vistas na seção 4.2. Os espectros de TG e de FT-IR correspondentes as temperaturas dos picos máximos (DTG) dos demais poli-azo-compostos podem ser observados no Apêndice D.

#### 4.9. Caracterização por calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A análise DSC foi empregada nesse estudo no intuito de verificar as transições físicas e/ou químicas ocorridas durante o processo de decomposição do biopolímero e seus derivados.

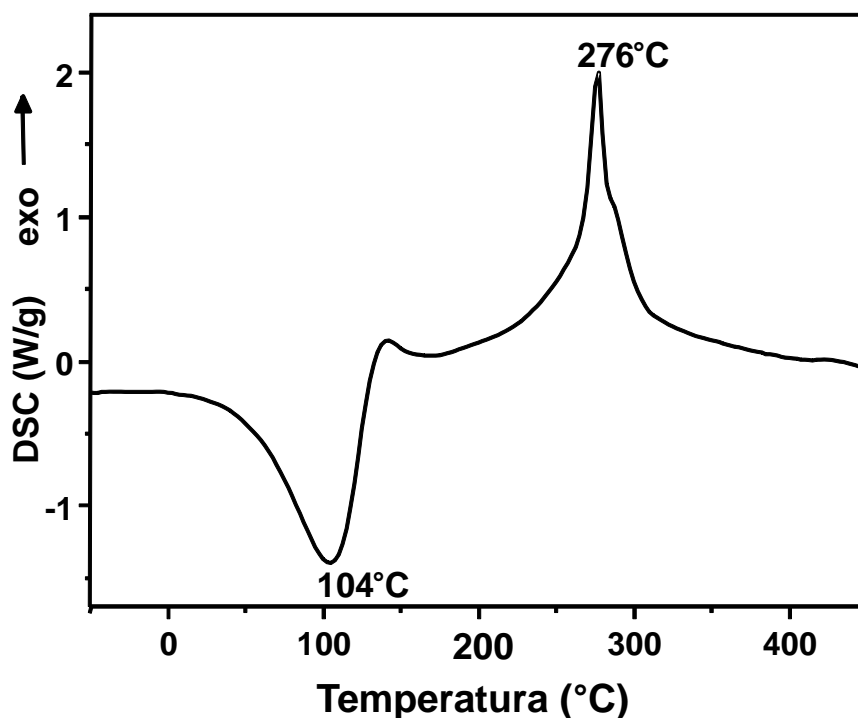
A Figura 27 apresenta o termograma de DSC do polímero quitina-quitosana sem modificação química. Através do espectro se pôde observar dois picos, sendo o primeiro endotérmico correspondente ao processo de desidratação e o segundo, exotérmico, equivalente ao processo de decomposição [68]. Em suma, pode-se dizer que estes dois processos estão coerentes com os eventos observados nas curvas TG/DTG, mostrados pela Figura 21.



**Figura 27.** Curva DSC do polímero quitina-quitosana.

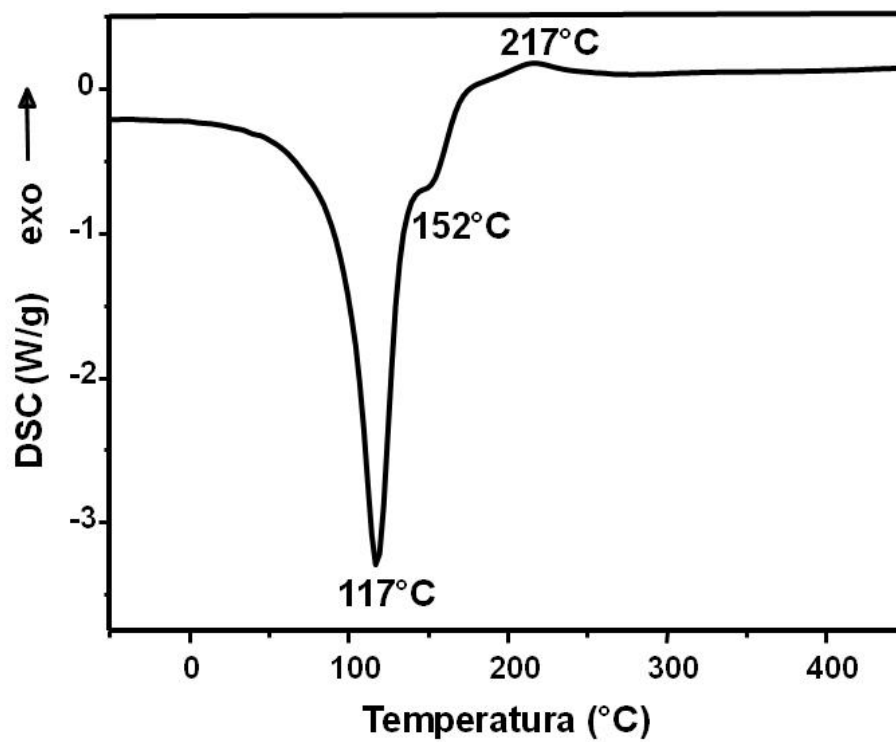
As curvas de DSC do composto *N*-Benzilquitosana são apresentadas pela Figura 28. Os picos, endotérmico e exotérmico, encontram-se as temperaturas de 104 e 276 °C, respectivamente. O pico endotérmico é proveniente da água contida no material polimérico, na qual se indica um processo de desidratação, enquanto que o pico exotérmico pode ser atribuído à decomposição térmica do polímero. Este segundo evento térmico ocorre a uma temperatura menor quando comparado ao pico exotérmico

da quitina-quitosana. Isto se deve a desestabilização térmica do composto polimérico devido à inserção dos grupos substituintes na cadeia do polímero.



**Figura 28.** Curva DSC do composto *N*-Benzilquitosana.

A Figura 29 apresenta as curvas DSC do composto Azo-Cloro. É possível observar dois picos endotérmicos a 117 e 152 °C provenientes da degradação dos grupos ligados à cadeia do polímero e a evaporação de compostos voláteis. Entretanto, o pico exotérmico observado a 217 °C corresponde à degradação da cadeia polimérica.



**Figura 29.** Curva DSC do composto Azo-Cloro.

As curvas de DSC dos demais poli-azo-compostos são encontrados no Apêndice D.

# Capítulo 5

---

## Conclusão

Foram sintetizados os poli-azo-compostos a partir da modificação das estruturas moleculares do biopolímero quitina-quitosana com a transformação dos grupos amino livres (-NH<sub>2</sub>) a partir da reação de *N*-alquilação com o aldeído aromático e subsequente reação de acoplamento com diferentes sais de diazônio. Estes compostos não encontram-se reportados na literatura e são potenciais materiais orgânicos.

As modificações feitas na cadeia polimérica foram confirmadas pelas técnicas FT-IR, RMN de <sup>1</sup>H em solução e RMN de <sup>13</sup>C em estado sólido.

A espectrometria de RMN de <sup>1</sup>H se mostrou eficiente para a determinação do grau de acetilação (GA) do polímero quitina-quitosana e do grau de substituição (GS) dos derivados *N*-Benzilidenquitosana e *N*-Benzilquitosana. O valor obtido para o polímero foi de 68 % de desacetilação. O valor calculado para o composto *N*-Benzilidenquitosana foi de 48 % e para o composto *N*-Benzilquitosana foi de 46 % de substituição.

A espectrometria de massas foi importante para estudar os produtos da hidrólise do polímero e de seus derivados. A técnica permitiu verificar a formação de oligômeros do polímero quitina-quitosana e do composto *N*-Benzilquitosana produzidos pela hidrólise ácida e se mostrou importante para a caracterização dos mesmos. Além disso, constatou-se uma reação de substituição nucleofílica aromática do átomo de bromo e do grupo nitro pelo átomo de cloro proveniente da alta concentração de íons cloretos no meio reacional. No entanto, esta técnica não é adequada para confirmar a síntese dos poli-azo-compostos, pois leva a uma degradação dos mesmos. Esta reação de SNAr não está reportada para derivados aromáticos de quitina-quitosana.

A espectroscopia UV-VIS permitiu identificar bandas de absorção dos poli-azo-compostos, o que confirma a formação dos mesmos, pois o polímero não apresenta bandas de absorção. A técnica também mostrou que os substituintes influenciam na absorção causando um efeito batocrômico para um maior comprimento de onda.

O estudo do comportamento térmico do biopolímero e de seus derivados sintetizados foi possível com o uso das técnicas de termogravimetria acoplada a detector

de infravermelho TG/FT-IR, termogravimetria/termogravimetria diferencial (TG/DTG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). Observou-se que os derivados de quitina-quitosana degradam a temperaturas menores que o polímero não modificado. Assim, poderiam ser estudados como potenciais sensores de temperatura.

### **Perspectivas de trabalhos futuros**

Como perspectiva para o curso de doutorado pretende-se aprofundar os estudos na parte teórica e experimental dos compostos sintetizados através:

- Da investigação da capacidade de complexação do polímero quitina-quitosana e seus derivados sintetizados com diversos íons metálicos;
- Do estudo da preparação de filmes nanoestruturados para investigar a interação desses compostos com fosfolipídios;
- Do estudo da morfologia dos filmes obtidos por diversas técnicas espectroscópicas;
- Do estudo das propriedades elétricas dos compostos sintetizados.
- Da síntese de carbamatos e carbonatos através da captura e fixação de CO<sub>2</sub> pelos grupos amino e hidroxilas, respectivamente, presentes na cadeia do polímero e de seus derivados sintetizados.

# Capítulo 6

---

## *Referências bibliográficas*

1. Rasmussen, R.S.; Morrissey, M.T. 2007. **Advances in Food Nutrition and Research**, v. 52, p. 237–292, 2007.
2. Agullo, E.; Rodriguez, M.S.; Ramos, V.; Albertengo, L. **Macromolecular Bioscience**, v. 3, p. 521–530, 2003.
3. Sturm K.; Hesse, K. **Ocean Challenge**, v. 10, No.1, 2000.
4. Alvarenga, E. S. **Biotechnology of Biopolymers**, v. 5, p. 91-108, 2011.
5. Santos, J. E.; Dockal, E. R.; Cavalheiro, E. T. G. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p. 277-282, 2005.
6. Kumar, G. Development and characterization of novel organic coatings based on biopolymer chitosan. Tese (Doutorado em Filosofia) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia dos materiais, The Ohio State University, Ohio, EUA, 2006.
7. Yui, T.; Kobayashi, H.; Kitamura, S.; Imada, K. **Biopolymers**, v. 34, p 203–208, 1994.
8. Maniukiewicz, W. **X-Ray Diffraction Studies of Chitin, Chitosan, and Their Derivatives. Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives, Biological Activities and Applications**, EUA, cap. 8, 2011.
9. Pittler, M. H.; Abbot, N. C.; Harkness, E. F.; Ernst, E. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, p. 379–381, 1999.
10. Subasinghe, S. **Infofish International**, v. 3, p. 58–65, 1999.
11. Ylitalo, R. et al. **Arzneimittel-Forschung**, v. 52, p. 1–7, 2002.
12. Roller, S. **Advances in Chitin Science**, v. 6, p. 43, 2006.
13. Liu, H.; Du, Y.; Wang, X.; Sun, L. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, p. 147–155, 2004.
14. Rabea, E. I. et al. **Pest Management Science**, v. 61, p. 951–960, 2005.
15. Sajomsang, W. et al. **Carbohydrate Research**, v. 344, p. 2502–2511, 2009.
16. Canadian Water Quality Guidelines. Canadian council of ministers of the environment, p. 1–8, Winnipeg, MB, Canada, 1999.



17. Wu, F. C.; Tseng, R. L.; Juang, R. S. **Water Research**, v. 35, p. 613–618, 2001.
18. Gamage, A.; Shahidi, F. **Food Chemistry**, v. 104, p. 989–996, 2007.
19. Muzzarelli, R. A. A.; Tanfani, F.; Mariotti, S.; Emanuelli, M. **Carbohydrate Polymers**, v. 2, p. 145-157, 1982.
20. Weltrowski, M.; Martel, B.; Morcellet, M. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 59, p. 647-654, 1996.
21. Lee, J.; Koo, N.; Min, D. B. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 3, p. 21–33, 2004.
22. Xing, R. Et al. **Bioorganic and Medical Chemistry**, v. 13, p. 573–1577, 2005.
23. Riva, R. et al. **Advance in Polymer Science**, v. 244, p. 19–44, 2001.
24. Okamoto Y. et al. **Journal of Veterinay Medical Science**, v. 55, p. 739–42, 93.
25. Kweon, D. K.; Song, S. B.; Park, Y. Y. **Biomaterials**, v. 24, p. 1595–601, 2003
26. Lee J. Y. et al. **Journal of Controlled Release**, v. 78, p. 187-97, 2002.
27. Okamoto, Y. et al. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, p. 249, 2002.
28. Okamoto, Y. et al. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, p. 337, 2003.
29. Sashiwa, H.; Shigemasa, Y.; **Carbohydrate Polymers**, v. 39, p. 137-243, 1997.
30. Santos, J.; Dockal, E.; Cavalheiro, E. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p. 277–282, 2005.
31. Jiao, T. et al. **Iranian Polymer Journal**, v. 20, p. 123-136, 2011.
32. Guo, Z. et al. **Carbohydrate Research**, v. 342, p. 1329–1332, 2007.
33. Borch, R. F.; Bernstein, M. D.; Durst, H. D. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, p. 2897–904, 1971.
34. Muzzarelli, R.; Wecky, M.; Filippini, O.; Lough, C.; **Carbohydrate Polymers**, v. 11, p. 307, 1989.
35. Kurita, K.; Mori, S.; Nishiyama, Y.; Harata, M. **Polymer Bulletin**, v. 48, p. 159-166, 2002.
36. Sajomsang, W. et al. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, p. 79–87, 2008.
37. Desbrieres, J.; Martinez, C.; Rinaudo, M. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 19, p. 21-28, 1996.
38. Donati, I. et al. **Biomaterials**, V. 26, p. 987-998, 2005.
39. Yang, T.; Chou, C.; Li, C. **Food Research International**, v. 35, p. 707–713, 2001.

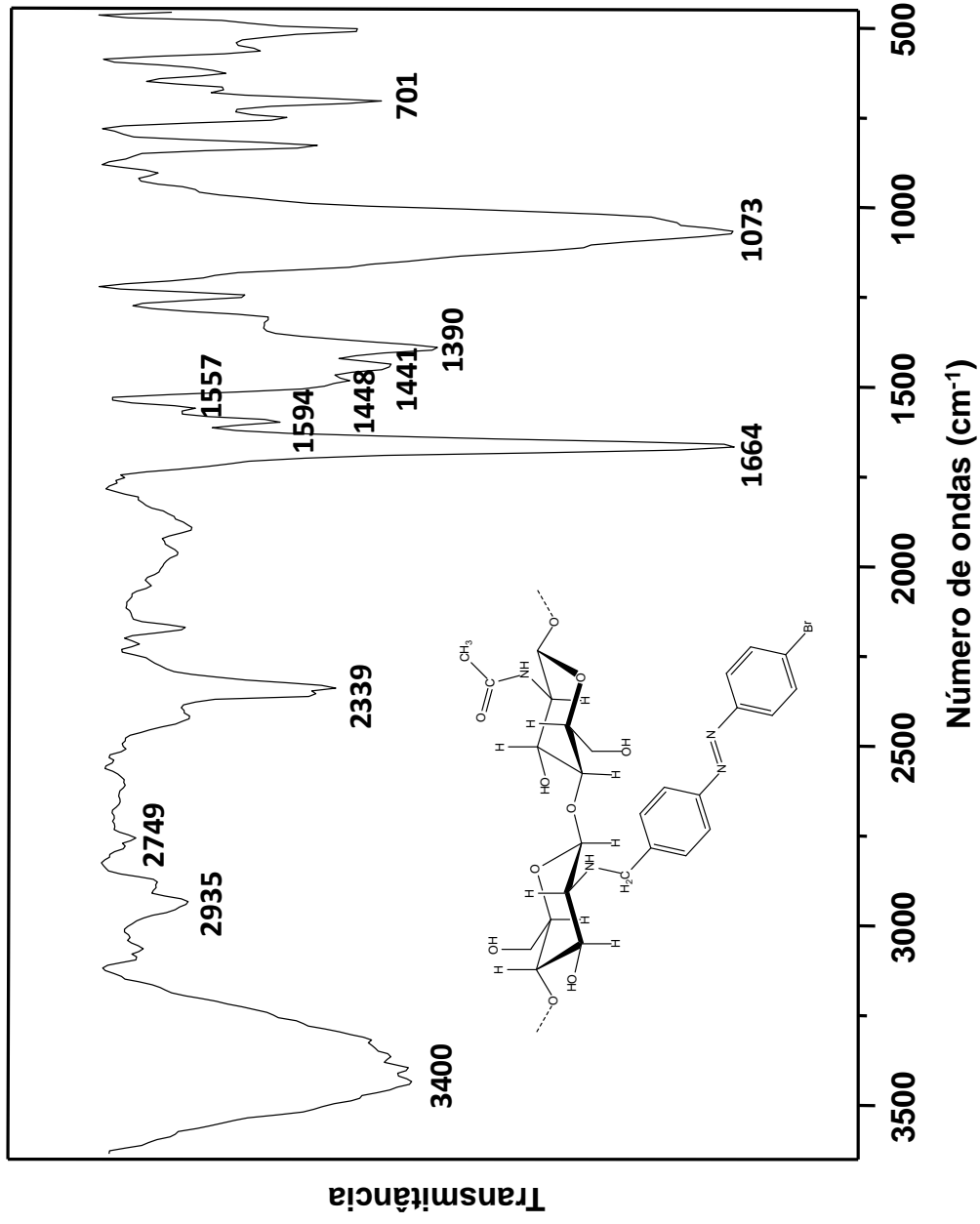
40. Rabea, E. I.; Badaway, M. E. I.; Steurbaut, W.; Stevens, C. V. **European Polymer Journal**, v. 45, p. 237–245, 2009.
41. Alves, K.; Vidal, R.; Balaban, R. **Materials Science and Engineering**, v. 29, p. 641–646, 2009.
42. Tbak, D. The cis-trans isomerization in solution of polyamides containing azobenzene residues in chain backbone. Tese (Doutorado), Polytechnic Institute of Brooklyn, University of Buffalo, Nova Iorque, EUA, 1975
43. Rau, H. **Azo Compounds in Photochromism - Molecules and Systems**, Elsevier, EUA, 1990.
44. Knoll, H. **Photoisomerism of azobenzenes. Handbook of organic photochemistry and photobiology**, 2a edição, cap 89, 2004.
45. Zollinger, H. **Colour Chemistry. Syntheses, Properties, and Applications of organic dyes and pigments**. VCH Verlagsgesellschaft mbH, 3a. ed, Weinheim, 2003.
46. Natansohn, A.; Rochon, P.; Gosselin, J.; Xie, S. **Macromolecules**, v. 25, p. 2268-2273, 1992.
47. Gregory P., **High technology applications of organic colorants**. New York: Plenum, p. 175-205, 1991.
48. Hong, Y. G.; Gu, J. D. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 88, p. 637–643, 2010.
49. Tatsuta M, Kitao T. JP No. 01 207 247, 1989.
50. Slokar, Y. M.; Le, M. A. M. **Dyes and Pigments**, v. 37, p. 335–56, 1998.
51. Varum, K. M.; Ottoy, M. H.; Smidsrod, O. **Carbohydrate Polymers**, v. 46, p. 89–98, 2001.
52. Kurita, K.; Mori, S.; Nishiyama, Y.; Harata, M. **Polymer Bulletin**, v. 48, p. 159-166, 2002.
53. Recnik, S.; Svete, J.; Stanovnik, B. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 59, p. 380-385, 2004.
54. Cabrera, J. C.; Cutsem, P. V. **Biochemical Engineering Journal**, v. 25, p. 165–172, 2005.
55. Lane, F. C. **Synthesis**, Aldrich-Boranes, Inc., p. 135-146, 1975.
56. Brugnerotto, J. *et al.* **Polymer**, v. 42, p. 3569–3580, 2001.
57. Mohammad, R. K. **The Use of Various Types of NMR and IR Spectroscopy for Structural Characterization of Chitin and Chitosan. Chitin, Chitosan,**

- Oligosaccharides and Their Derivatives, Biological Activities and Applications**, EUA, cap. 12, 2011.
58. Peter, M. G.; Eberlin, M. N. **Applications of Mass Spectrometry to Analyse Structure and Bioactivity of Chitoologosaccharides. Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives, Biological Activities and Applications**, EUA, cap. 11, 2011.
59. (a) Oakes, J.; Gratton, P. **Journal of Chemical Society**, v. 2, p. 2563–2568, 1998. (b) Mielczarski, J. A.; Atenas, G. M.; Mielczarski, E. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 56, p. 289–303, 2005.
60. (a) Tjosaas, F.; Fiksdahl, A. *Molecules*, v. 11, p. 130-133, 2006. (b) Vlasov, V. M. **Russian Chemical Reviews**, v. 72, p. 681-703, 2003.
61. Casado, J. et al. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, p. 2524-2534, 2003.
62. Zawadzki, J.; Kaczmarek, H. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 394-400, 2010.
63. Pawlak, A.; Mucha, M. **Thermochimica Acta**, v. 409, p. 95-97, 2003.
64. Zeng, L. et al. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1553–1557, 2011.
65. Koll, P.; Borchers, G.; Metzger, J. O. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 19, p. 119-129, 1991.
66. Wan, Y.; Creber, K. A. M.; Peppley, B.; Bui, V. T. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 204, p. 850–858, 2004.
67. Sajomsang W. et al. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, p. 79-87, 2008.
68. Guinesi, L. S.; Cavalheiro, E. T. G. **Thermochimica Acta**, v. 444, p. 128-133, 2006.

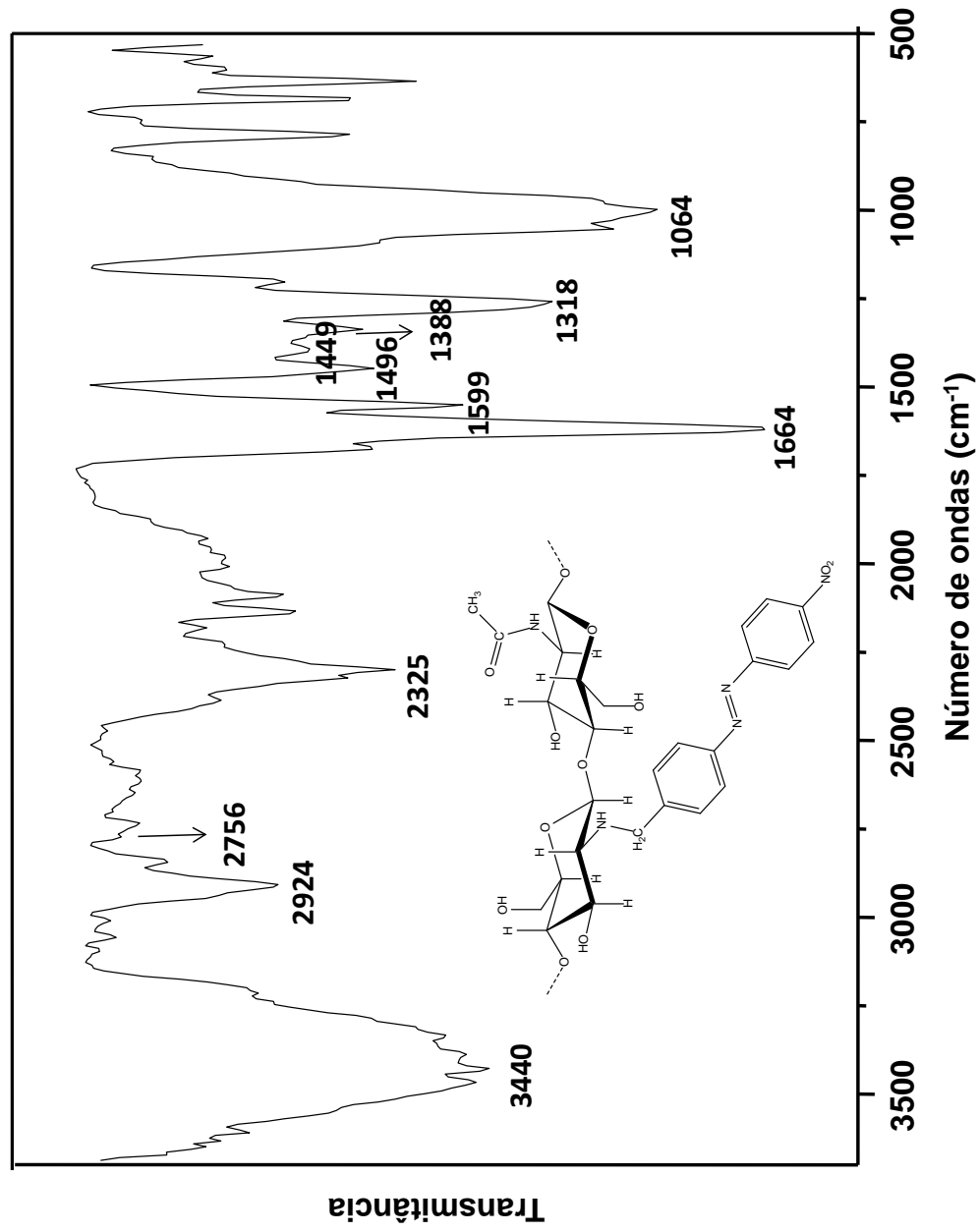
---

## *Apêndice A*

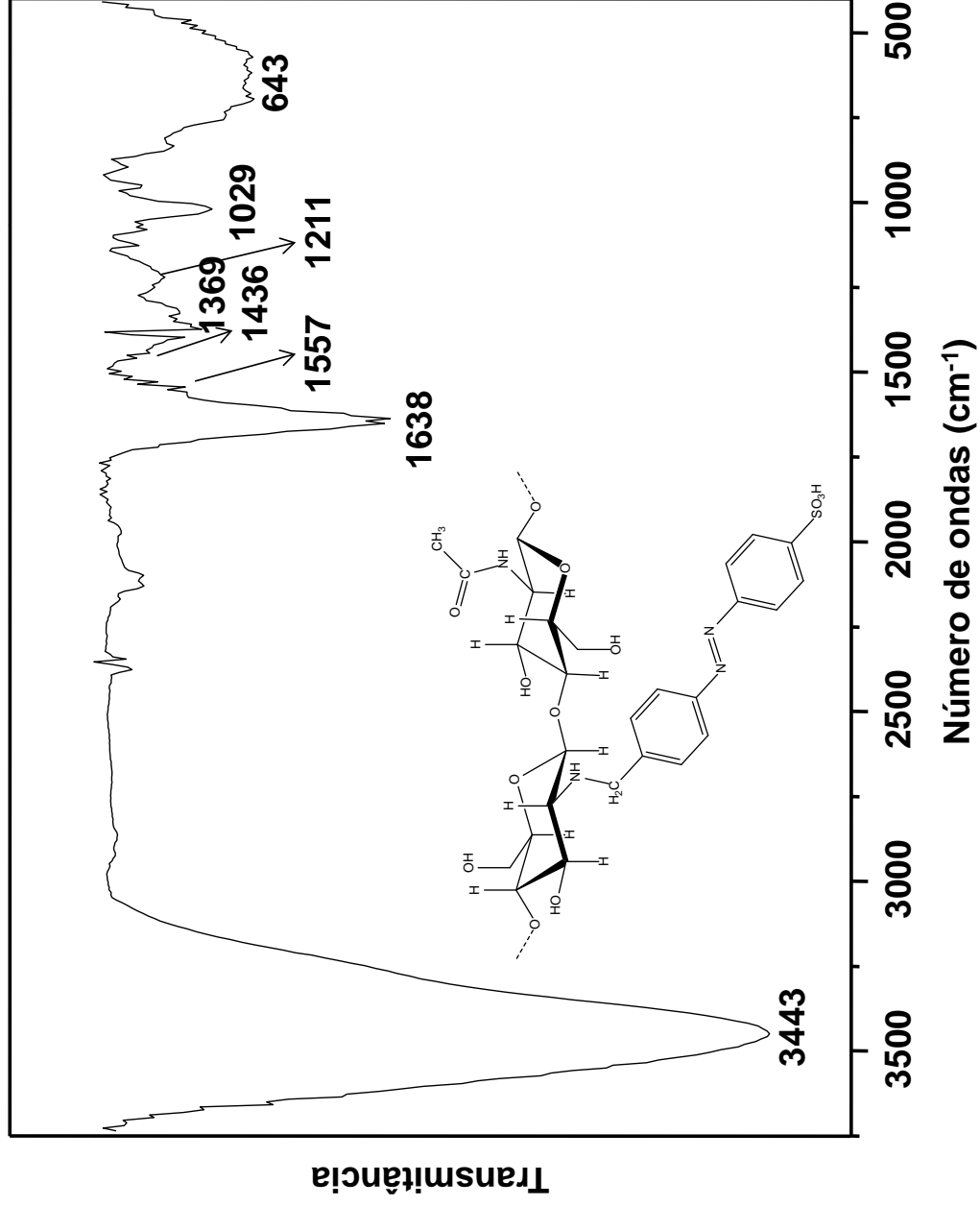
# Espectro de FT-IR do composto Azo-Bromo



### Espectro de FT-IR do composto Azo-Nitro



# Espectro de FT-IR do composto Azo-Sulfônico

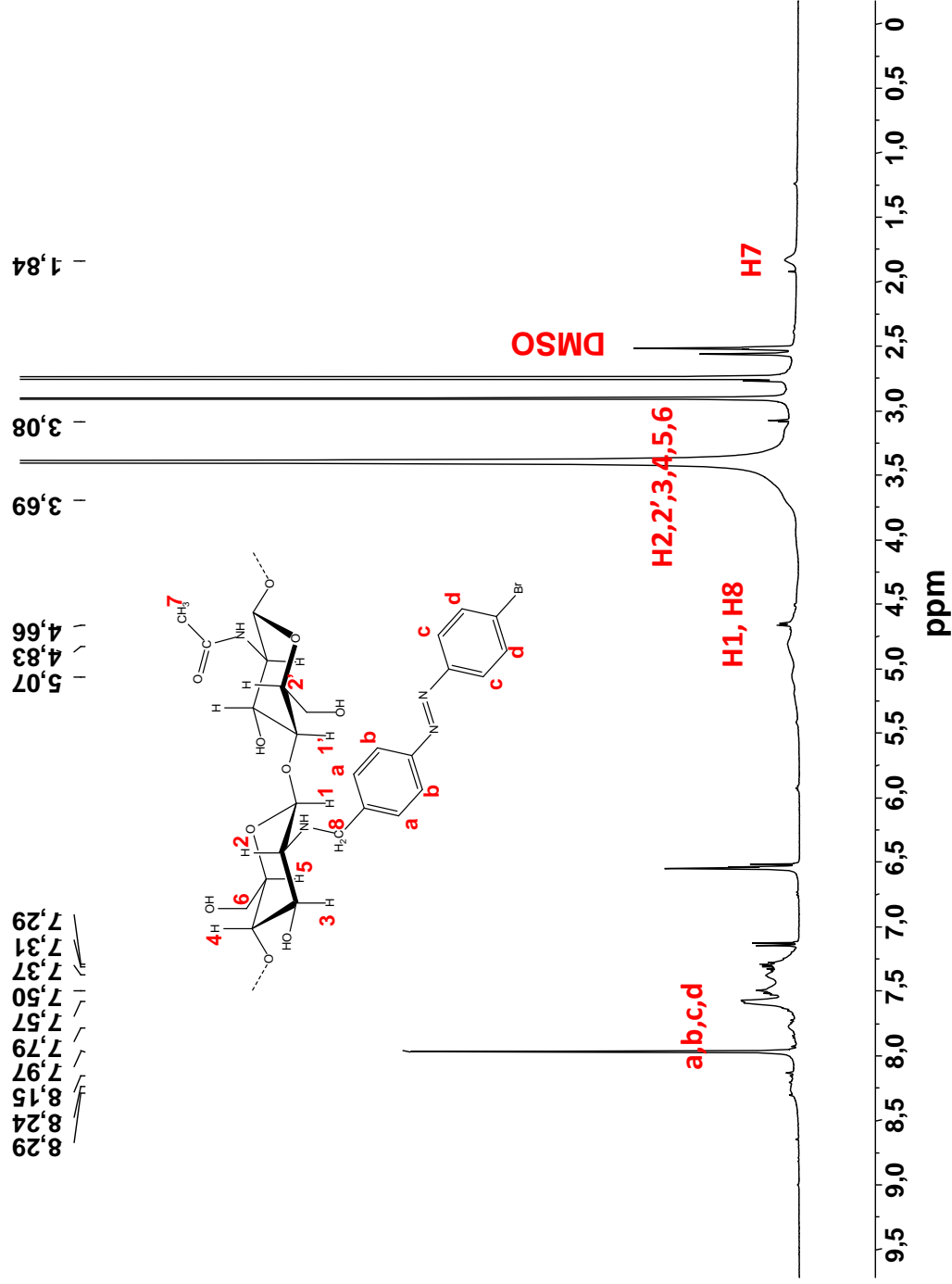


---

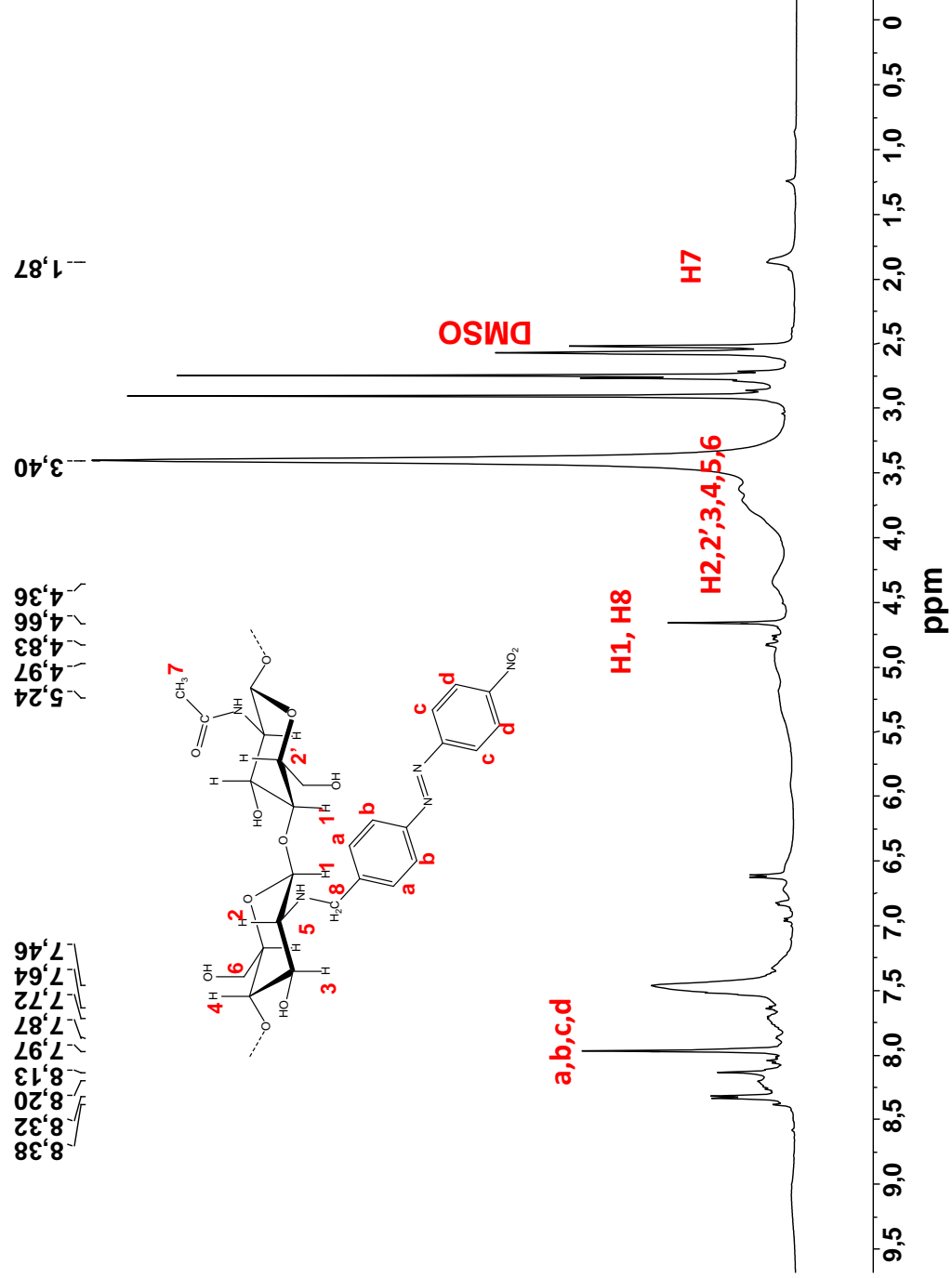
## *Apêndice B*



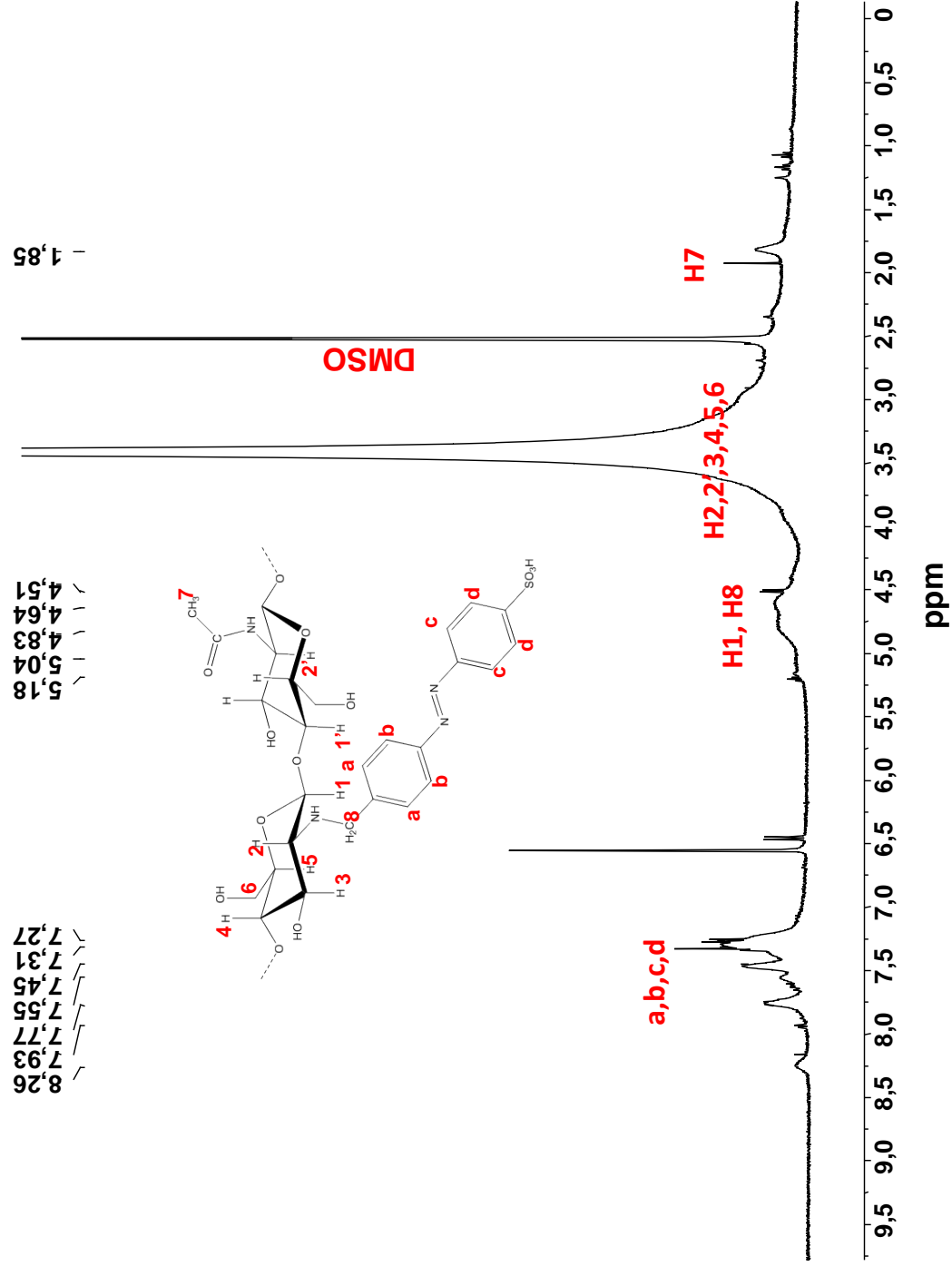
# Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto Azo-Bromo



# Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto Azo-Nitro



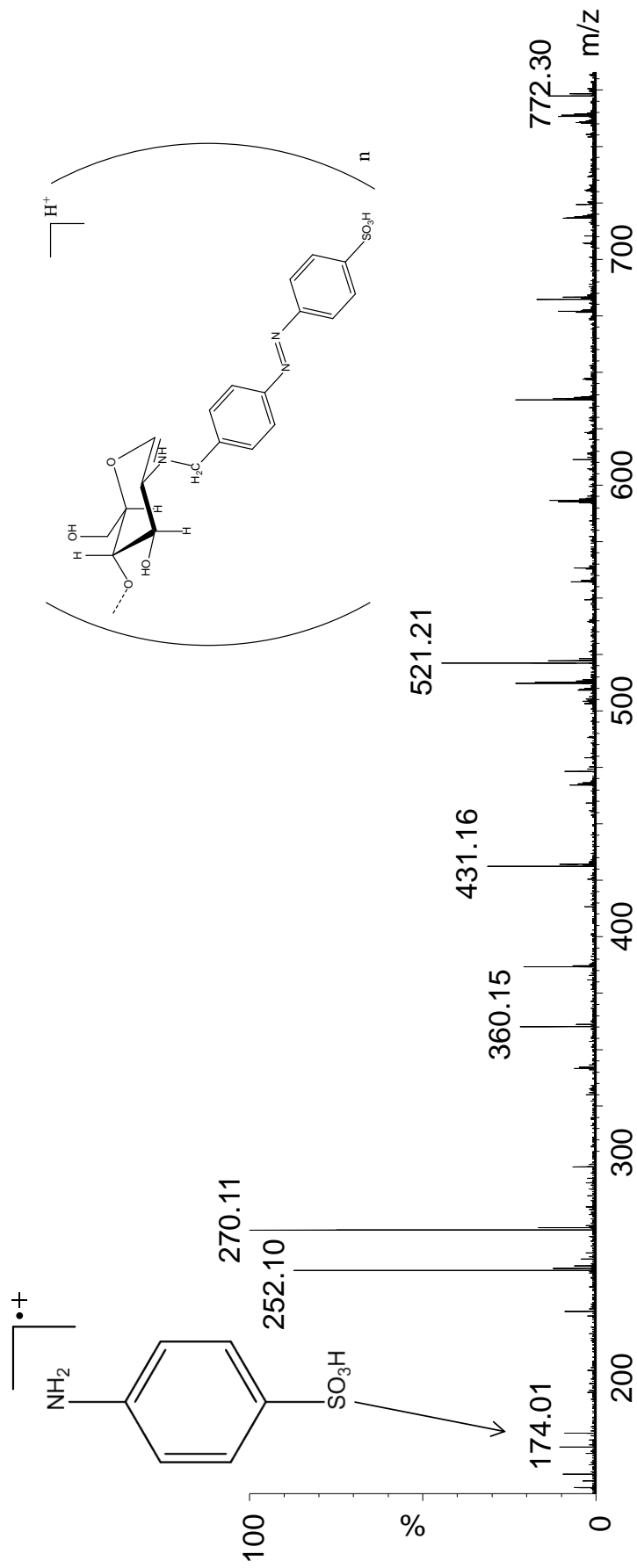
# Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto Azo-Sulfônico



---

## *Apêndice C*

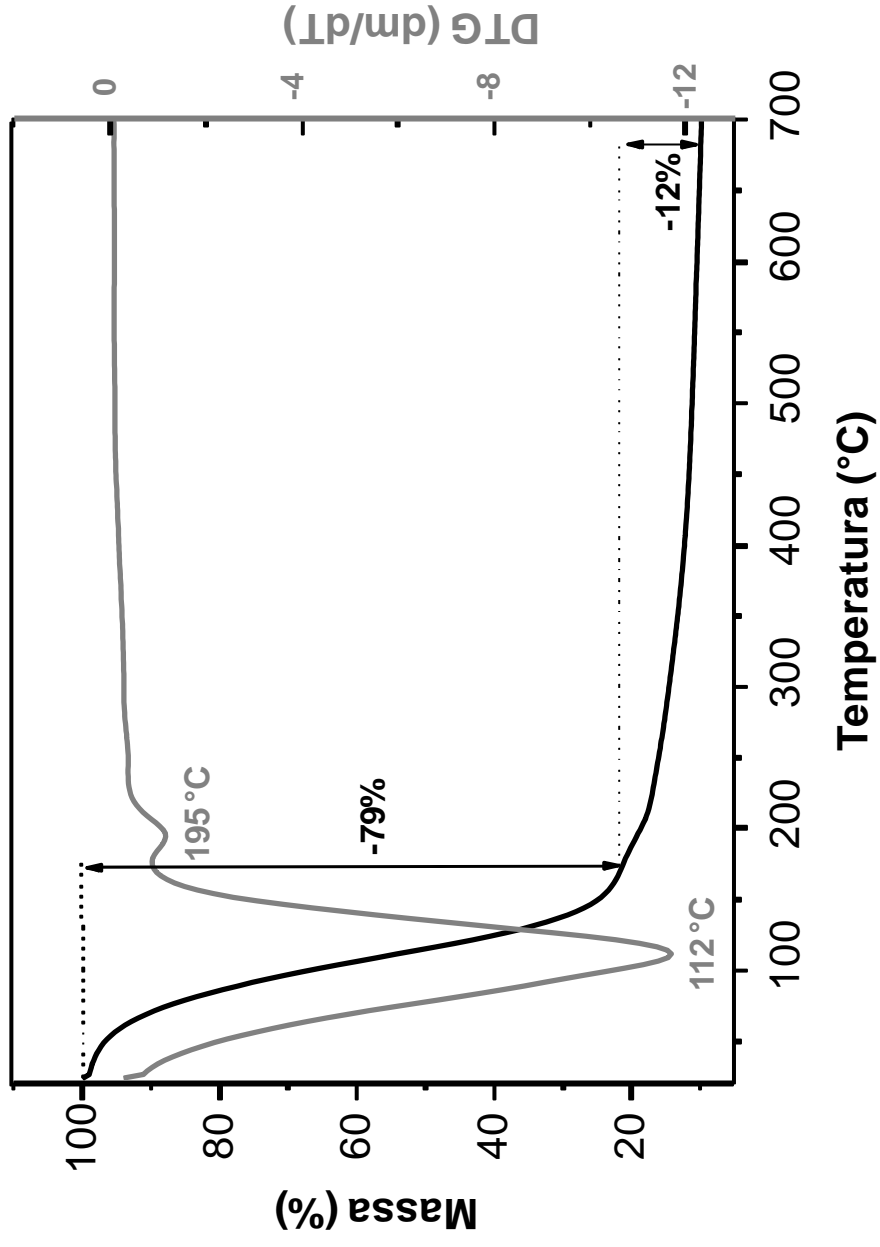
# Espectro de ESI(+)-MS do composto Azo-Sulfônico



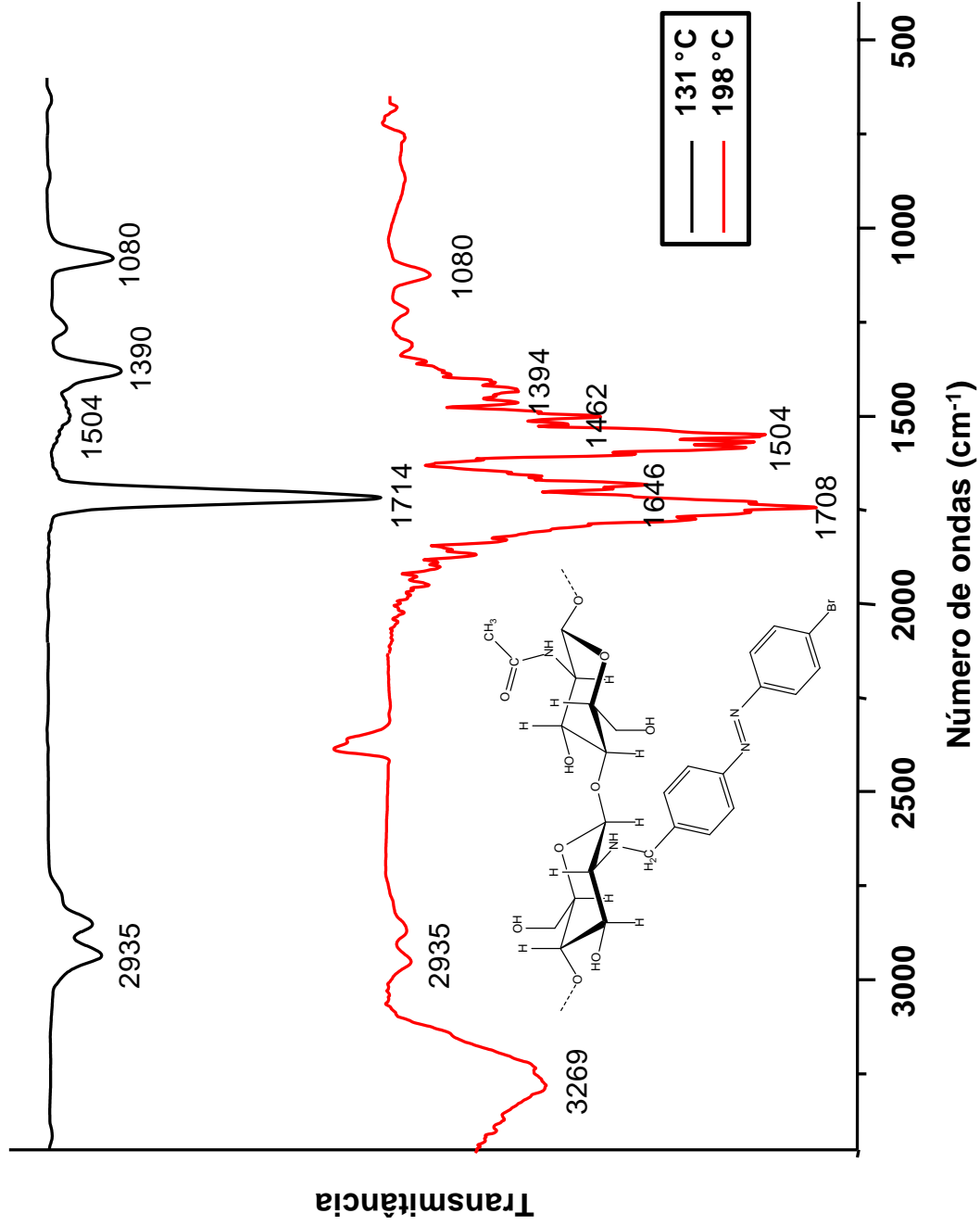
---

## *Apêndice D*

Curvas de TG/DTG do composto Azo-Bromo

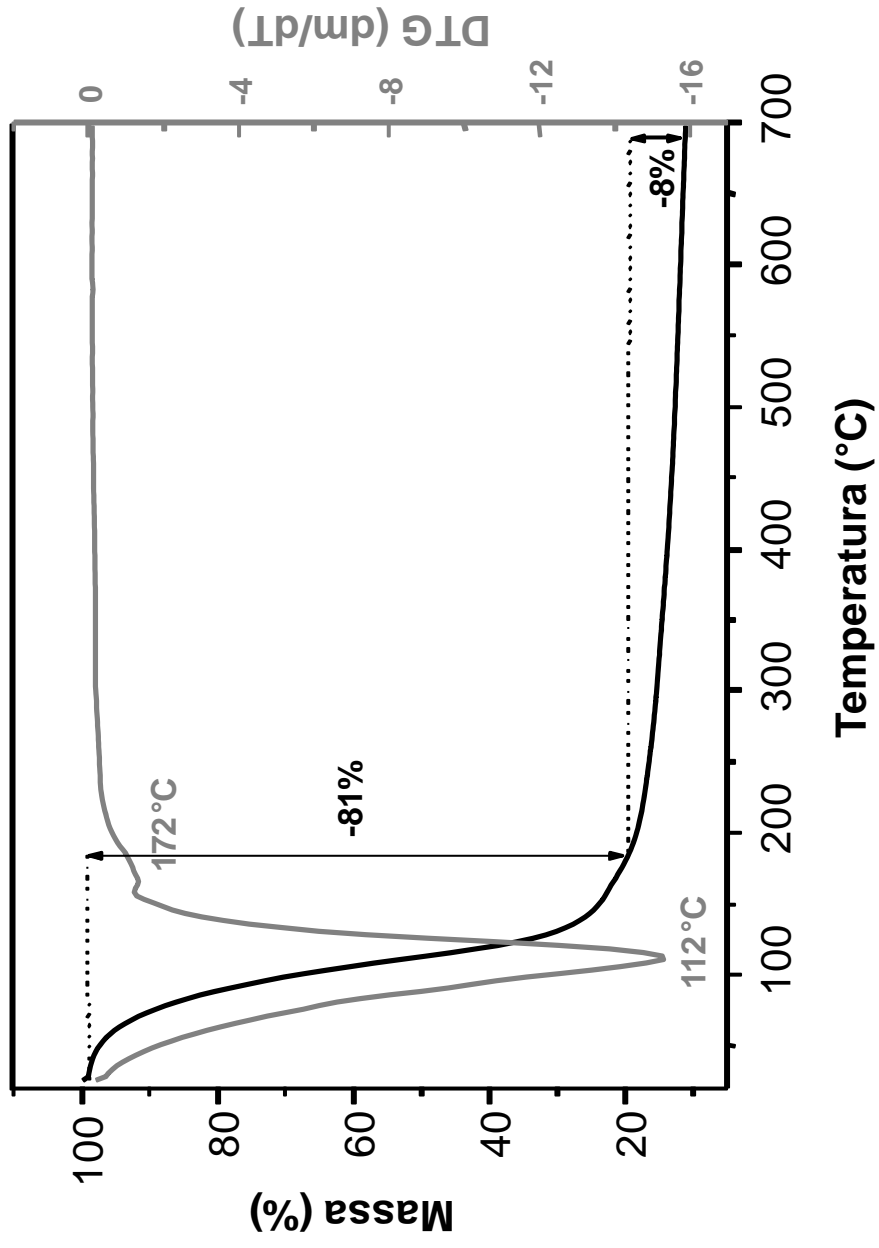


# Espectros extraídos da análise TG/FT-IR do composto Azo-Bromo

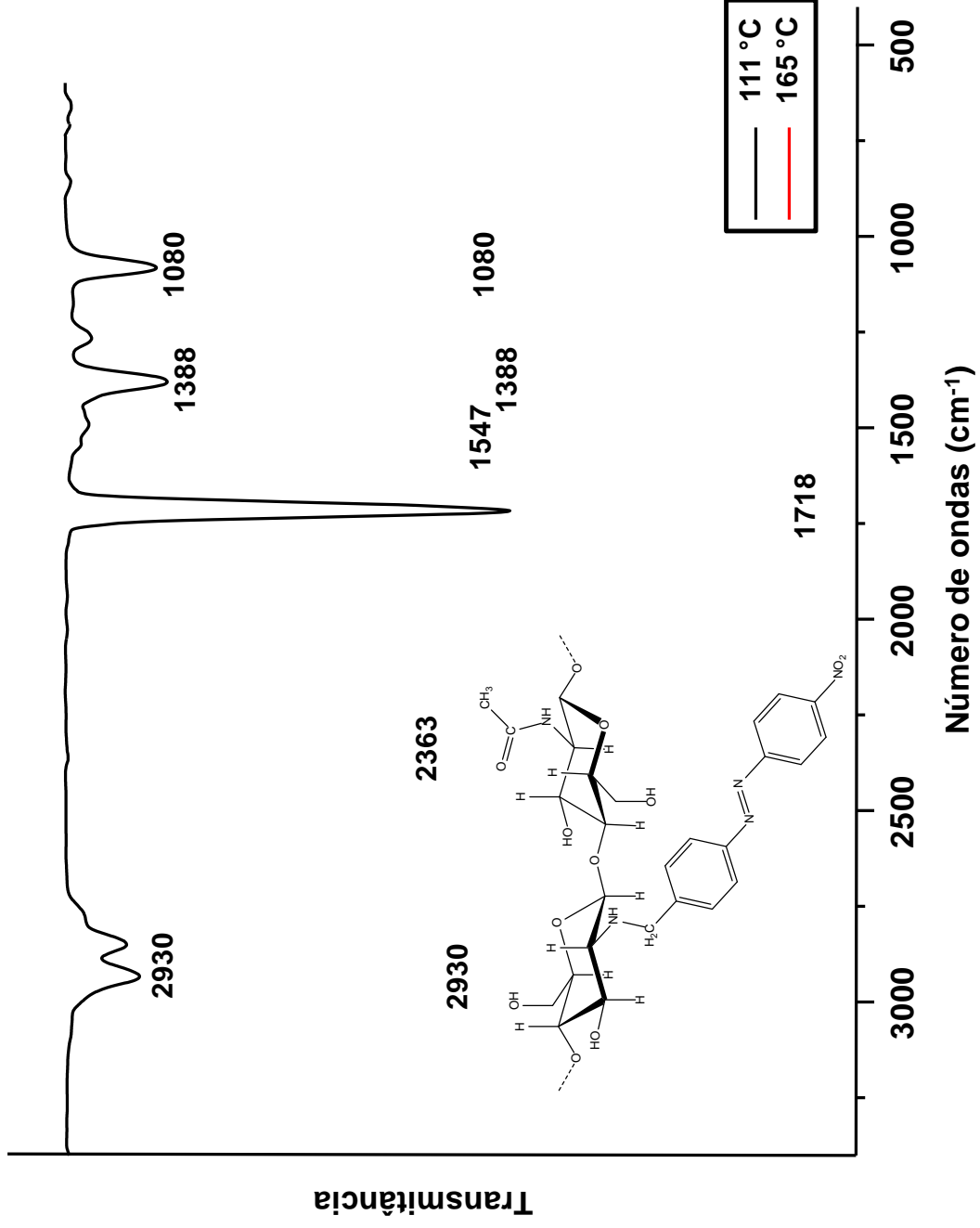




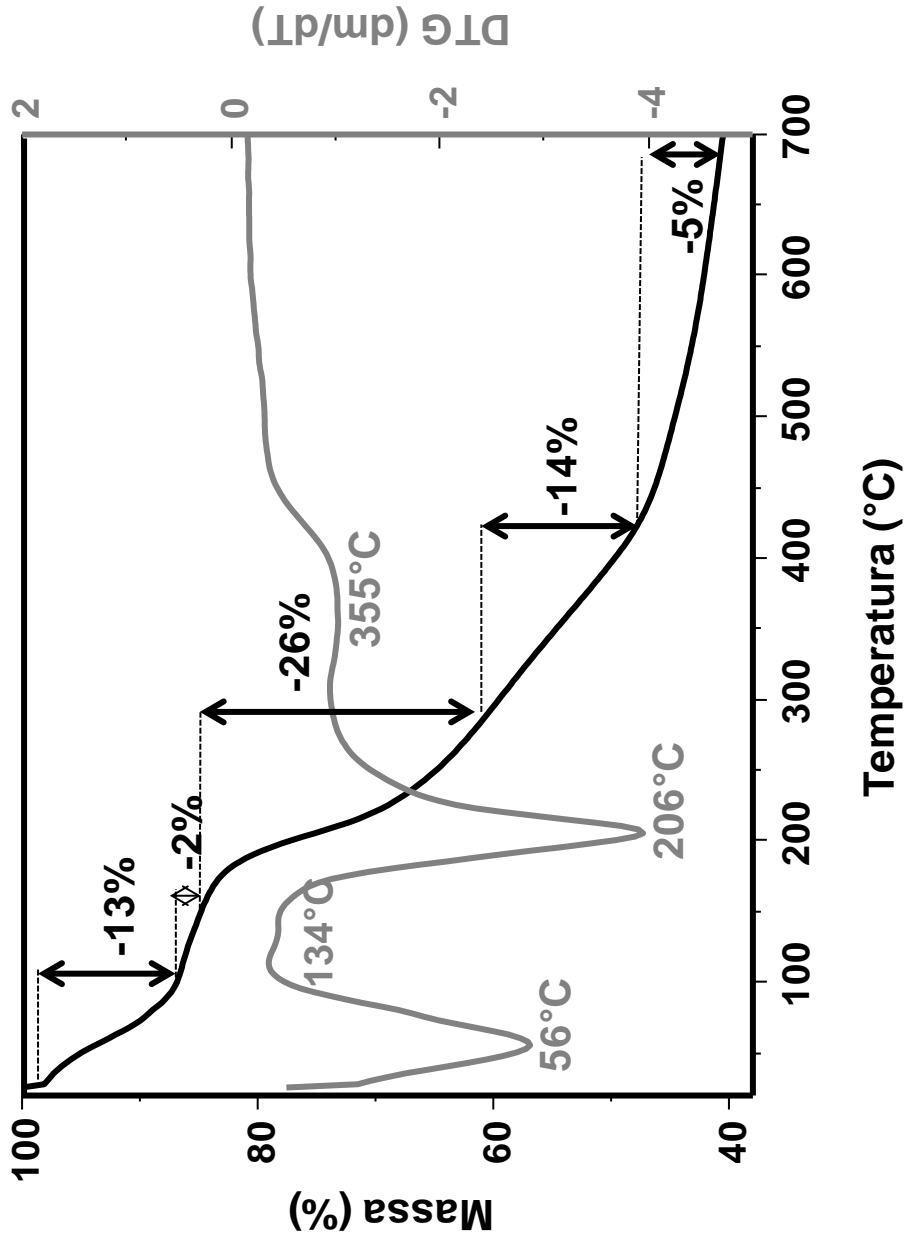
Curvas de TG/DTG do composto Azo-Nitro



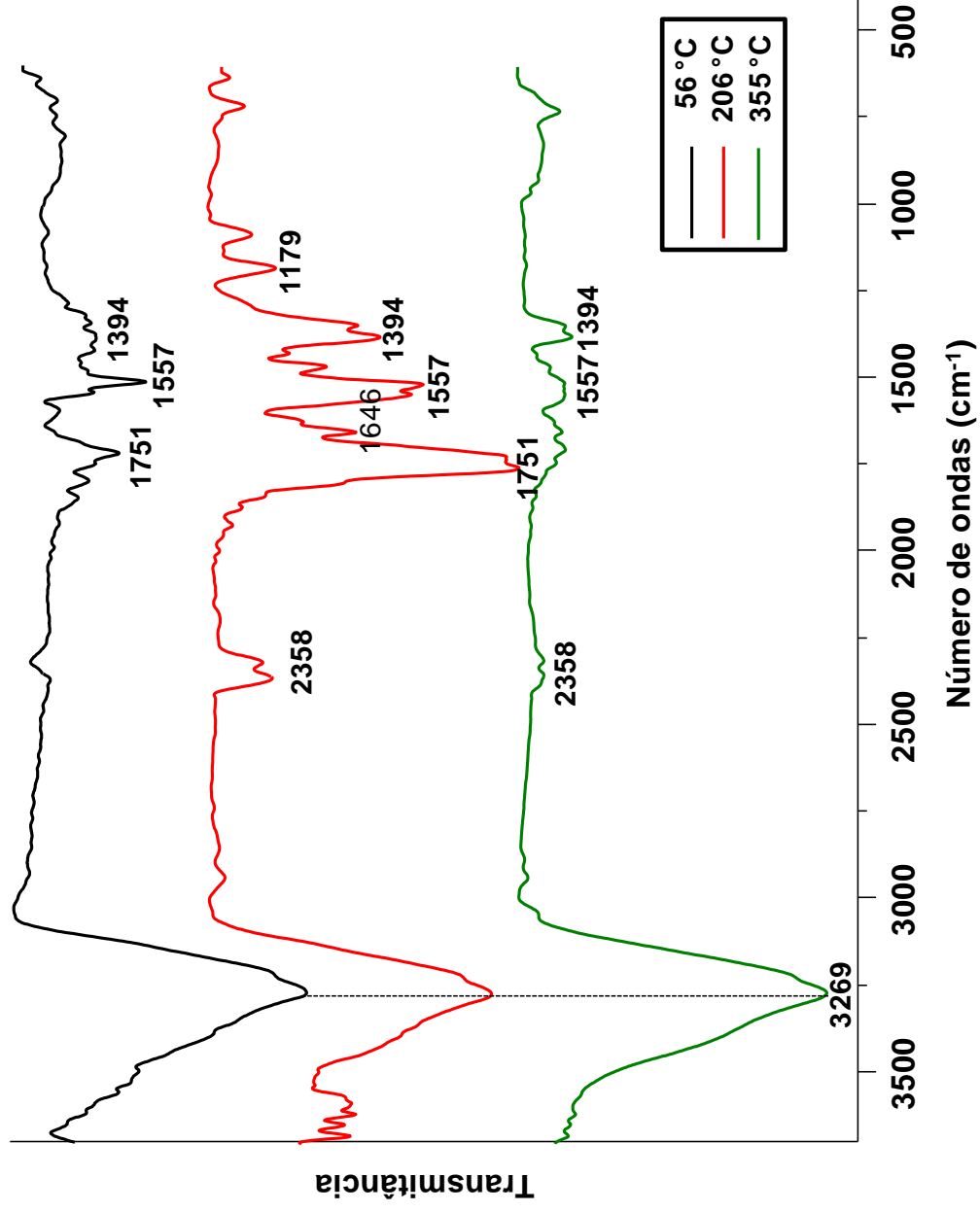
# Espectros extraídos da análise TG/FT-IR do composto Azo-Nitro



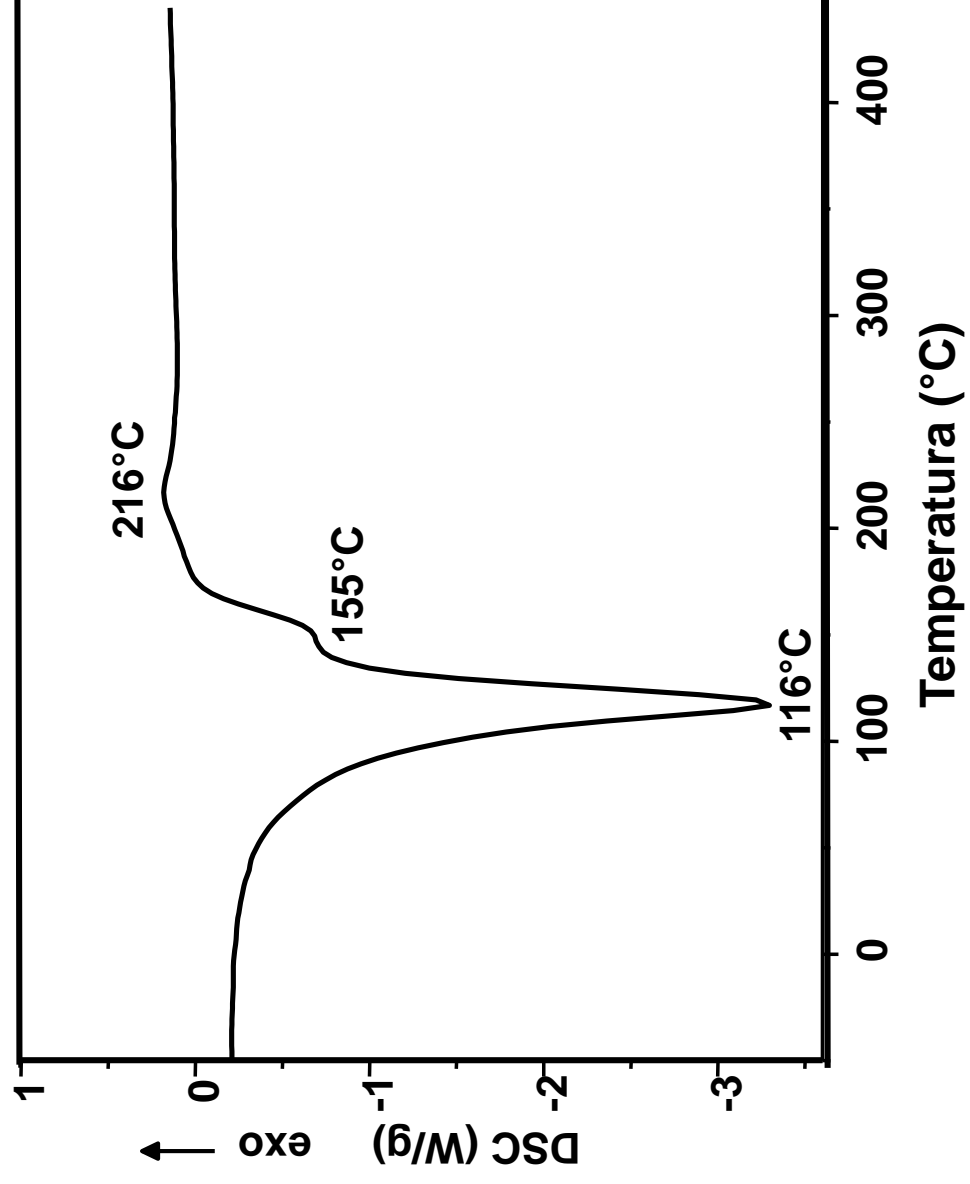
Curvas de TG/DTG do composto Azo-Sulfônico



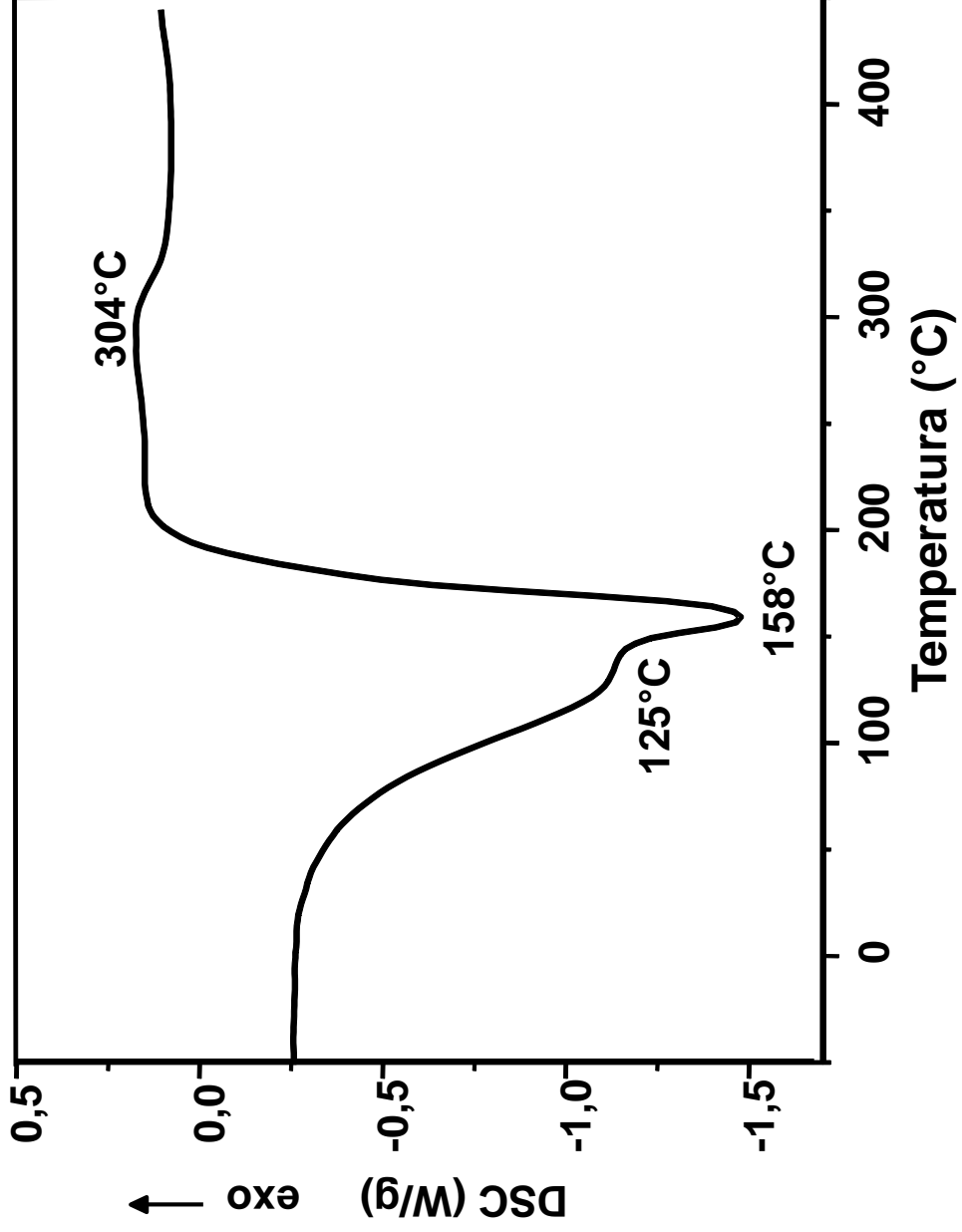
### Espectros extraídos da análise TG/FT-IR do composto Azo-Sulfônico



Curvas DSC do composto Azo-Bromo



Curvas DSC do composto Azo-Nitro



Curvas DSC do composto Azo-Sulfônico

