

1 - INTRODUÇÃO

O uso de polímeros naturais para aplicações diversificadas têm sido de vital importância para os avanços das ciências e apresentam várias vantagens quando comparadas aos polímeros sintéticos pois são de fácil obtenção, são biocompatíveis e biodegradáveis. Os polissacarídeos, como uma classe de macromoléculas naturais, têm sua propensão extremamente bioativa, e são geralmente derivados de produtos agrícolas ou de crustáceos (PRASHANTH, 2007).

Nos últimos anos, os biopolímeros que têm despertado maior interesse são os polissacarídeos como a celulose, que provém de várias fontes, e a quitina, proveniente de crustáceos, moluscos, insetos, cogumelos e outros organismos (AIROLD, 2008), sendo um dos principais constituintes das cascas de crustáceos, dos exoesqueletos de insetos e das paredes celulares de fungos, onde sua função é enrijecê-las e dar estabilidade (KRAJEWSKA, 2004).

A presença de vários grupos funcionais reativos ao longo da cadeia polimérica dos polissacarídeos favorecem interações com outras espécies moleculares, tanto dissolvidas quanto dispersas, podendo ocorrer ligação, quelação, complexação, microencapsulação, emulsificação, floculação, estabilização ou suspensão. Os polissacarídeos também podem atuar como adsorventes, carreadores, suportes hidrofílicos, agentes trocadores de íons, formadores de filmes e de géis (GARCIA, 2008).

Materiais poliméricos como peptídeos, polissacarídeos e outros produtos naturais tem recentemente atraído a atenção como transportadores biodegradáveis de drogas. Eles podem otimizar a aplicação de medicamentos clínicos, minimizar suas propriedades indesejáveis e melhorar a eficiência da droga. Eles são utilizados para o armazenamento e liberação lenta dos componentes eficazes, para melhorar a permeabilidade da membrana, solubilidade e segmentação sitio específica (VINSOVA, 2008).

A quitina e a quitosana, seu derivado desacetilado, são de interesse comercial devido a elevada percentagem de nitrogênio em sua composição (6,89%), o que as tornam úteis como agente quelante. A maioria dos polímeros sintéticos possuem biocompatibilidade e biodegradabilidade muito mais limitadas do que as

de polímeros naturais como a celulose, quitina, quitosana e seus derivados (KUMAR, 2000).

A quitosana é um polissacarídeo com tal perspectiva, que tem mostrado inúmeras funções em diversas áreas, incluindo medicamentos biológicos, farmacêuticos, conservantes, microbianos e outros (VINSOVA, 2008).

Outra classe de substâncias de grande interesse são os antibióticos aminoglicosídeos, que comumente consistem estruturalmente de um núcleo aminocitol ligado com um ou dois carboidratos, como por exemplo a estreptamicina. Normalmente, os antibióticos aminoglicosídeos são utilizados no tratamento de infecções bacterianas. Devido à seu amplo espectro de atividades, essa classe de substâncias tem atraído a atenção para as suas aplicações como antiviral, por interagir com moléculas do RNA do vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV) e do vírus da hepatite delta humana (HDV) (HUI, 2002).

Recentemente, estudos têm mostrado que a neomicina B e outros antibióticos aminoglicosídeos impedem a replicação do vírus HIV, impedindo a ligação da proteína Rev, uma estrutura protéica rica em arginina que facilita a replicação do vírus HIV. A proteína Rev se liga a um receptor importante para a replicação do RNA do vírus HIV, chamado RRE. Foi descoberto que antibióticos aminoglicosídicos bloqueiam competitivamente esse receptor. No entanto, estas moléculas são tóxicas e não são seletivas para o RNA do HIV e, portanto, novos compostos com ligação seletiva para o sitio RRE devem ser melhor desenvolvidos e sintetizados. A conversão dos aminoglicosídeos para seus derivados totalmente guanidinilados (guanidinoglicosídeos) aumenta em aproximadamente 100 vezes a afinidade e seletividade destes compostos para o RRE do HIV-1 em comparação com os aminoglicosídeos ativos (BAKER, 2000).

Açúcares contendo grupos guanidina tem uma vasta gama de utilizações biologicamente importantes como, inibição da sinalização mitogênica inadequada, terapia para infecções bacterianas, tratamento de diabéticos insulino-dependentes, e inibição de enzimas, incluindo a trombina, glicosidases e óxido nítrico sintases (BAKER, 2000).

Muitos produtos farmacêuticos, produtos naturais e sintéticos contém o grupo funcional guanidina, que muitas vezes desempenham um papel essencial na sua atividade biológicas. Por conseguinte, há uma série de

reagentes guanilantes na literatura disponíveis comercialmente, para inserir o grupo guanidina em diversos tipos de moléculas (WU, 2002).

Neste contexto, a atividade antimicrobiana de compostos poli-hidroxilados como a neomicina, quitosana e seus derivados guanilados contra diferentes tipos de microrganismos têm recebido considerável atenção. No presente trabalho estão descritos desenvolvimentos relativos à síntese de guanidinas com substâncias poli-hidroxilados.

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1. GUANIDINAS

As guanidinas são bases fortes que se destacam entre as mais importantes bases nitrogenadas empregadas em síntese orgânica e tem sido extensivamente estudadas na últimas décadas por inúmeros autores (XAVIER, 1997).

A guanidina (1) (figura 1) foi isolada por Strecker em 1861, como um produto de degradação da guanina (2) (figura 1), uma das bases purínicas constituintes do ácido ribonucléico (RNA). Também é encontrada de maneira natural na urina como um produto normal do metabolismo das proteínas (XAVIER, 1997).

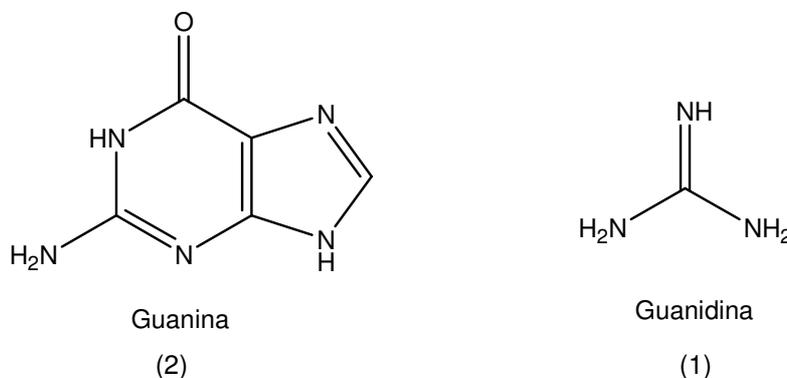


Figura 1 – Estrutura da guanina e seu produto de degradação, a guanidina.

Os sais e derivados da guanidina possuem fórmula genérica $(R_1R_2N)(R_3R_4N)C=N-R_5$ mostrada na figura 2.

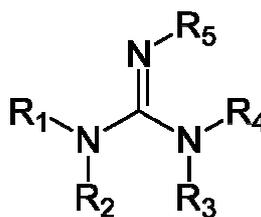


Figura 2 – Estrutura base dos derivados da guanidina

Embora a guanidina e seus sais ocorram na natureza na forma de traços, muitos de seus derivados são importantes constituintes de organismos vivos, como a creatina (3) e a arginina (4) (figura 3, pág. 5), este último um importante aminoácido presente nos seres vivos (ALLINGER, 1978).

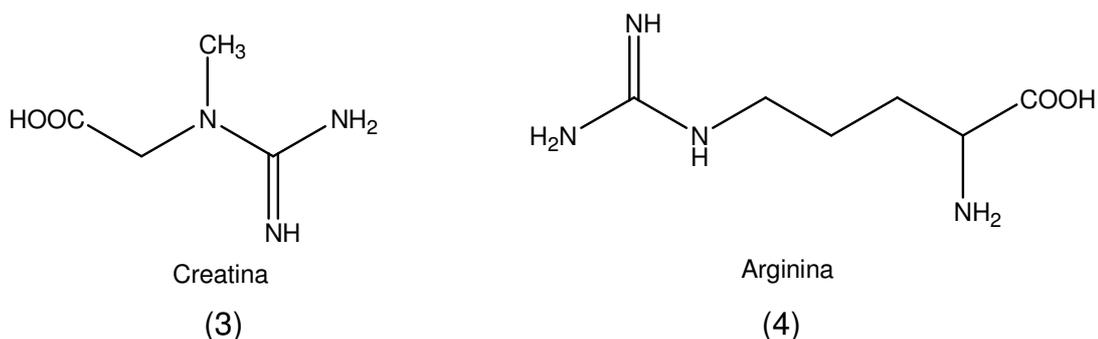


Figura 3 – Derivados da guanidina: creatina e arginina

Resíduos de arginina em peptídeos e proteínas são conhecidas por serem crucialmente envolvidos em processos de reconhecimento molecular, mas os grupos guanidinas também são componentes essenciais na estrutura dos mais diversos metabólitos primários e secundários de organismos vivos e de muitas drogas sintéticas (MORODER, 2001). A porção guanidina está presente em muitos medicamentos cardiovasculares, anti-histamínicos, anti-influenza, antidiabéticos e agentes antibactericidas (GHOSH, 2001).

Um número crescente de compostos biologicamente e farmacologicamente relevantes tem incorporado o grupo funcional guanidina. Substâncias contendo o núcleo guanidina tem sido isolados de muitas espécies como as algas, esponjas, e outros microorganismos marinhos e de água doce. Além disso, guanidinas sintéticas têm encontrado ampla aplicação na engenharia, em dispositivos, sensores, materiais orgânicos, e usado como agente de transferência de fase em catálise (PORCHEDDU, 2004).

Os organismos marinhos são uma fonte de produtos naturais bioativos. Diversas atividades biológicas foram relatadas para produtos naturais marinhos: antibiótica, antifúngica, tóxica, citotóxica, neurotóxica, antimitótica e antiviral, dentre outras. A tubastrina (5) (figura 4) foi isolada pela primeira vez em 1987 do coral *Tubastrea aurea*, coletado em Okinawa, Japão, e apresentou moderada atividade antiviral contra o vírus *Herpes simplex* do tipo 1 e o vírus causador da estomatite vesicular. Um derivado da tubastrina foi isolado da esponja *Spongosorites* spp., o antibiótico 3- desidroxitubastrina (6) (figura 4), solúvel em água, que apresentou modestas atividades inibitórias do crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Serratia* spp. e *Escherichia coli*. Outros dois derivados da tubastrina foram isolados da esponja marinha *Petrosia* cf. *contignata*, coletada

em Papua, Nova Guiné: a 7,8-desidrotubastrina (7) (figura 4) e a 4-desidroxi-7,8-desidrotubastrina (8) (figura 4) (SANTOS, 2007).

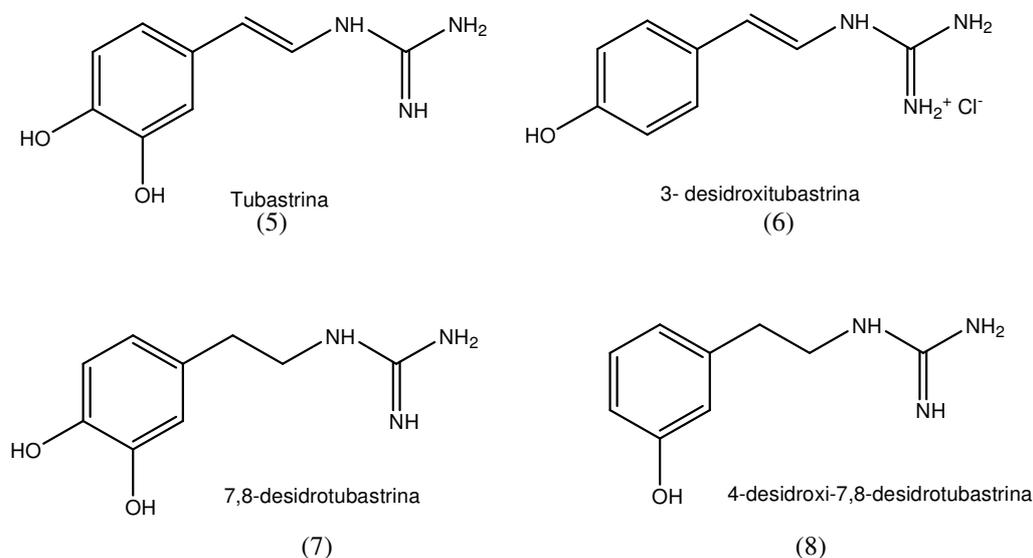


Figura 4 – Estrutura da tubastrina e derivados

2.1.1– PROPRIEDADES QUÍMICAS E FÍSICAS DAS GUANIDINAS

A guanidina é um sólido branco muito higroscópico, solúvel em água, metanol, etanol e dimetilformamida, a qual pode ser isolada a partir de seu sal (por exemplo seu cloridrato), através da reação com hidróxidos ou metóxidos de metais alcalinos. A guanidina e as alquilguanidinas são muito básicas, formando sais altamente estáveis. Na formação do sal de guanidínio, o próton é adicionado ao nitrogênio do grupo imina, dando origem ao cátion guanidínio (9) altamente estabilizado pela deslocalização dos elétrons π nas estruturas de ressonância (10 e 11), representados na figura 5 (CLAYDEN, 2001).

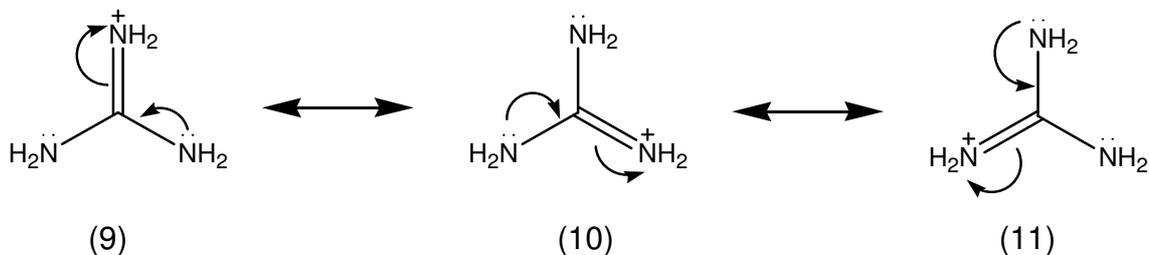


Figura 5 – Formas mesoméricas do cátion guanidínio.

A síntese de substâncias apresentando o grupo funcional guanidina é dificultada porque apresentam caráter fortemente básico (pK_a guanidina $\sim 13,5$).

Devido a essa característica, os derivados guanidínicos são solúveis em solventes polares. A solubilidade em solventes orgânicos apolares pode ser incrementada se o grupo guanidínico estiver substituído com dois ou mais grupos alquil (12, figura 6), ou protegido por grupos retiradores de elétrons, apolares e facilmente removíveis, como *tert*-butoxicarbonil (Boc) (13), trifluorometanossulfonil (Tf) (14) ou benziloxicarbonil (Cbz) (15), mostrados na figura 6. Compostos guanidínicos são geralmente muito estáveis à oxidação, degradação térmica ou condições ácidas (SANTOS, 2007).

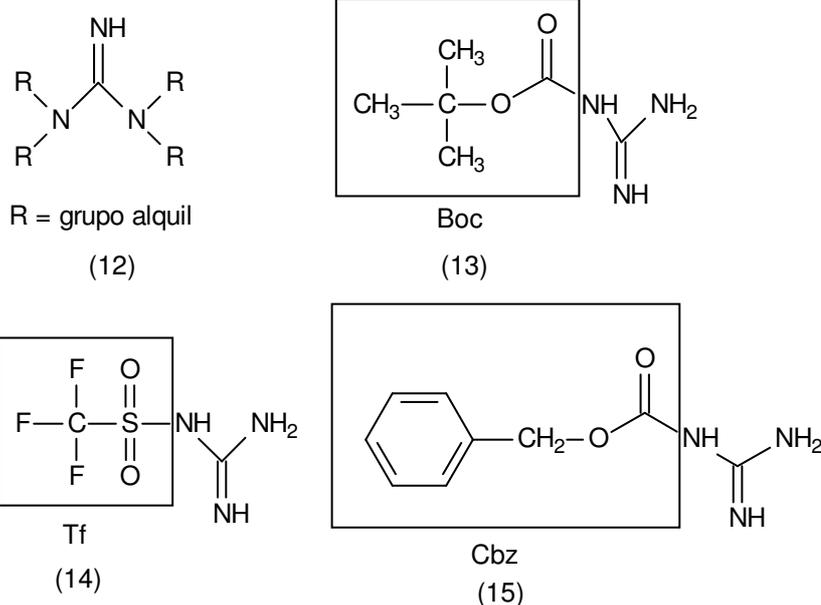


Figura 6 – Grupos utilizados para proteger guanidinas.

2.1.2 - APLICAÇÕES DOS DERIVADOS DE GUANIDINAS

A química de guanidinas tem motivado grupos de pesquisa, tanto pelo largo espectro de atividades biológicas quanto pela sua ocorrência em produtos naturais (CUNHA, 2001). São bases fortes e esta basicidade está relacionada à estabilidade de seu ácido conjugado. Essa característica dá a essa classe de moléculas uma flexibilidade estereo-eletrônica capaz de gerar diferentes modos de coordenação quando ligadas a um íon metálico (PLACE, 1998). Além do que, os grupos N,N',N''-substituídos permitirem o *design* de fragmentos metal-guanidine passíveis de serem conectados entre si, podendo formar polímeros de coordenação, com grande interesse em materiais funcionais com propriedades físicas, como: fotoluminescência, óptica não-linear, magnetos-moleculares (LIN, 2000). Nesses

polímeros, cadeias unidimensionais são a base da sua construção e interações intermoleculares podem exercer um papel importante na organização estrutural desses complexos (CHEN, 2006).

A guanidina, obtida a partir de seus sais (nitrato, sulfato, cloridrato ou carbonato), é utilizada como intermediário na síntese de fármacos como a sulfaguanidina (16, figura 7) e compostos relacionados, bem como na obtenção de derivados purínicos, como o ácido fólico (18, figura 7). Os cloridratos e tiocianatos de guanidinas estão entre os mais potentes desnaturantes de proteínas e possibilitam o isolamento de substâncias como o interferon (NOZAKI, 1970).

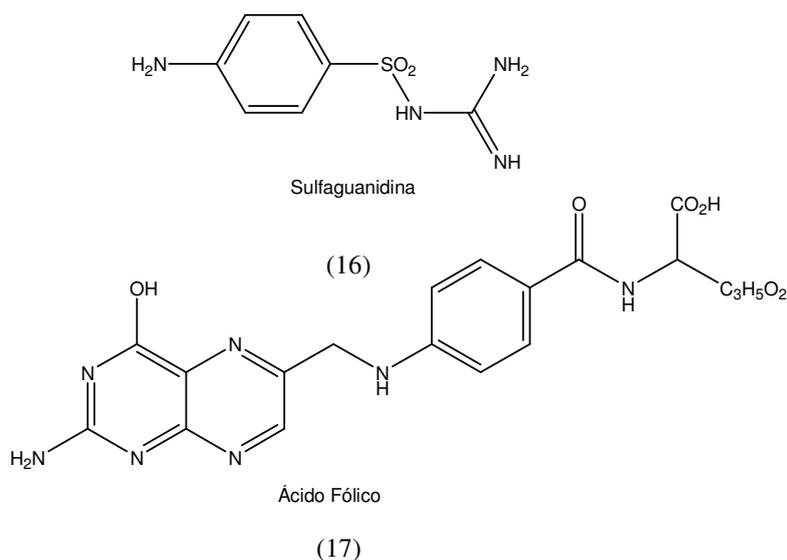


Figura 7 – Substância sintetizada a partir de guanidinas: sulfaguanidina e ácido fólico.

Os derivados heterocíclicos da aminoguanidina, como o Amitol (3-amino-1,2,4-triazol) (18, figura 8, pág. 9) e de mono e dialquilguanidinas, tais como as 5-alquilamino-4-hidroxi-6-metilpiridinas (19, figura 8), obtidas a partir da reação entre aminoguanidinas e β -cetoésteres, são utilizados como herbicidas e fungicidas (XAVIER, 1997).

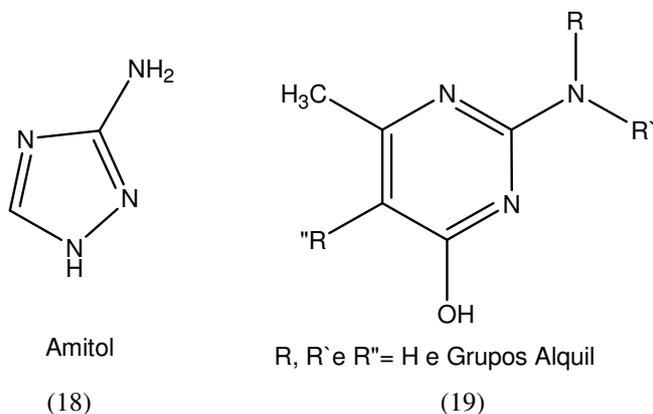


Figura 8 – Derivados de guanidina utilizados no setor agrícola: Amitol e pirimidinas.

Os carbonatos de guanidina são empregados industrialmente como componentes de xampus e produtos utilizados no tratamento de cabelos que sofreram tingimento. Os cloridratos de guanidinas são empregados no tratamento de fibras têxteis para atuarem como agentes antiestáticos, alguns derivados heterocíclicos, tais como os amino-1,2,4-triazóis são precursores na preparação de corantes como Vermelho Básico e Amarelo Básico aplicados em fibras poliacrilonitrílicas (XAVIER, 1997).

Uma série de polímeros contendo grupos guanidina são conhecidos como polications solúveis em água e tem sido usados principalmente como um agentes antimicrobianos devido a seu amplo espectro de atividade antagonista sobre bactérias Gram positivas e Gram negativas e baixa toxicidade para mamíferos. Esses polímeros podem ser sintetizados por condensação de um sal de guanidina com uma diamina (GUAN, 2007). Entre os vários tipos de polímeros guanidínicos, aqueles obtidos a partir da síntese entre o hexametileno e sais de guanidina tem sido mais extensamente investigados. Um exemplo destas reações é a policondensação descrita por Zhang e colaboradores em 1999, onde foram utilizadas porções equimolares do 1,6-hexametilenodiamina (20) e hidrocloreto de guanidina (21) sob aquecimento a 120 ° C durante 2 horas, formando o correspondente polímero guanidínico (22), mostrado na figura 9, na página 10 (ZHANG, 1999).

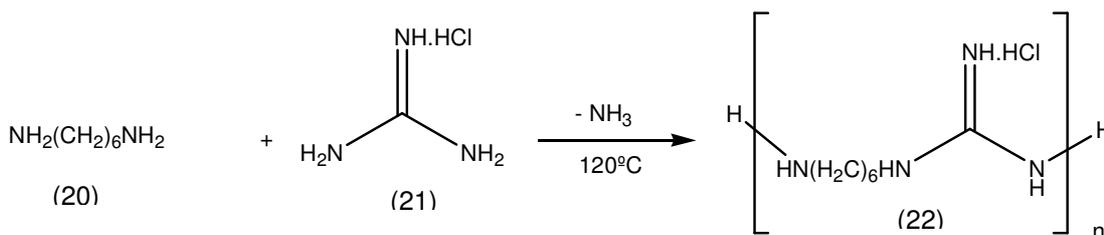


Figura 9 – Reação de policondensação.

Devido a sua alta solubilidade da água, amplo espectro de atividade antimicrobiana, excelente eficiência biocida e não-toxicidade, polímeros guanidínicos tem sido usado na medicina, fibras têxteis, plásticos, etc. Os polímeros guanidínicos também podem reagir com outros produtos químicos devido aos grupos amino ($-\text{NH}_2$) ativos ao longo de sua cadeia. Estas reações produzem mais derivados de polímeros guanidínicos, e também amplia suas aplicações como agentes antimicrobianos (QIAN, 2008).

2.1.3 - DERIVADOS DE GUANIDINAS BIOATIVAS

Dentre os exemplos de guanidinas sintéticas bioativas podem ser citadas as dicetopiperazinas 23 e 24 (figura 10) que possuem ação inibidória sobre as enzimas triptase e tripsina (BERLINCK, 2008).

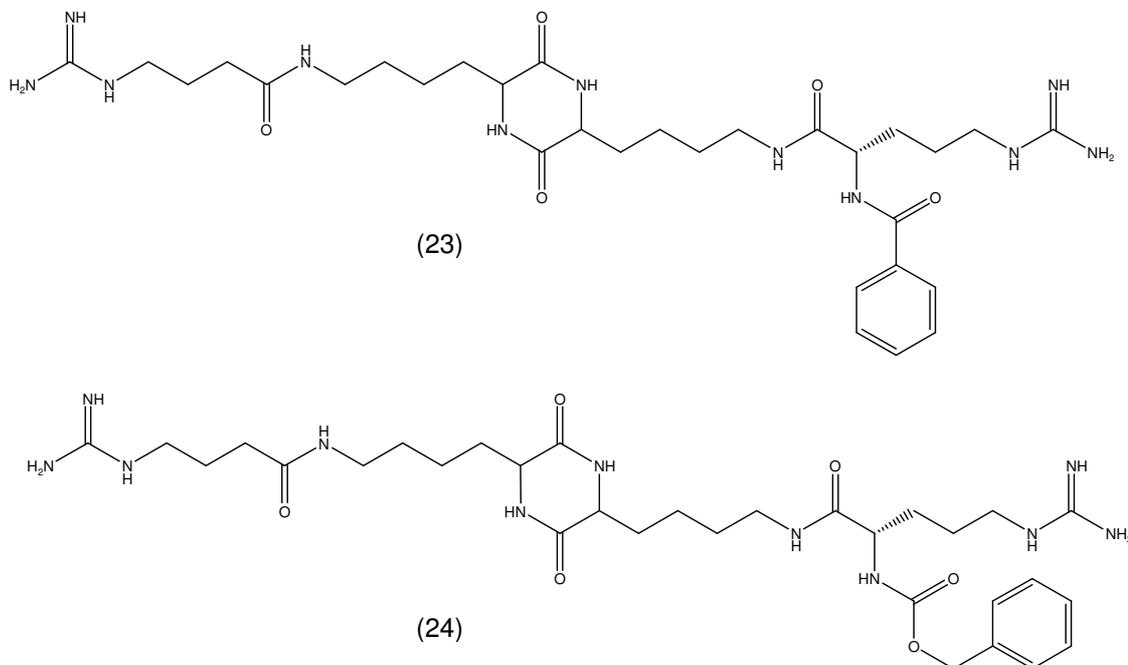


Figura 10 – Diketopiperazinas inibidores de triptase/tripsina.

Jayasekera e colaboradores desenvolveram uma série de peptídeos contendo guanidinas que atuam como agente antibacteriano. Das substâncias sintetizadas pelo autor, a mais potente é a 25 (figura 11), com atividade inibitória da tradução *in vitro* com IC_{50} de 14 μ M (BERLINCK, 2008).

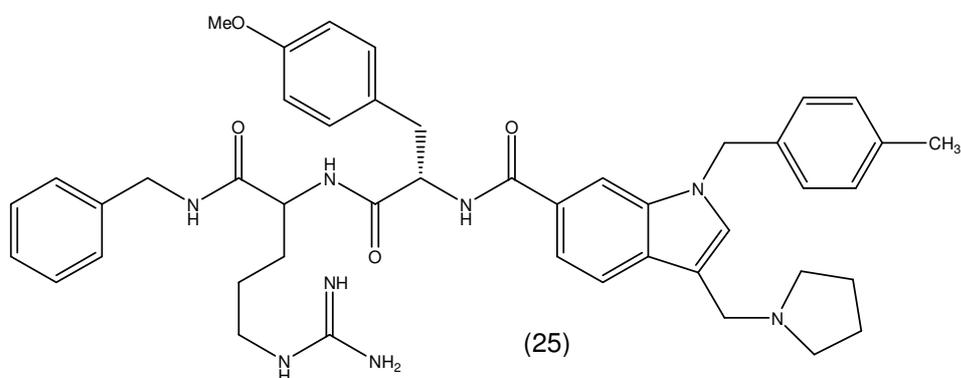


Figura 11 – Antibacteriano.

Alguns agentes tripanomicidas possuem a função guanidina, como exemplo, pode ser citada a guanidina 26 (figura 12), que inibe seletivamente a glutatona redutase do tripanossoma com IC₅₀ de 0,09 mM (BERLINCK, 2008).

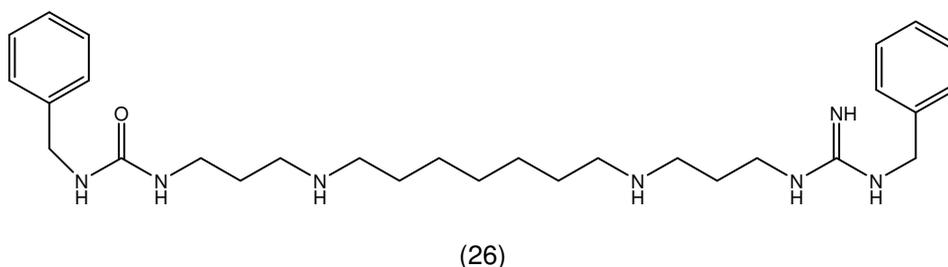


Figura 12 – Agente tripanomicida.

Diamidines dicationicas lineares podem ligar-se fortemente ao DNA e possuem significativa atividade antiprotozoário. Um exemplo desse tipo de molécula com atividade antimicrobiana considerável é a substância patenteada como CGP40215A (27) (figura 13). Uma série de guanidinas triaril e guanidinas N- substituídas foram sintetizados e avaliados como agentes antiprotozoários (ARAFA,2008).

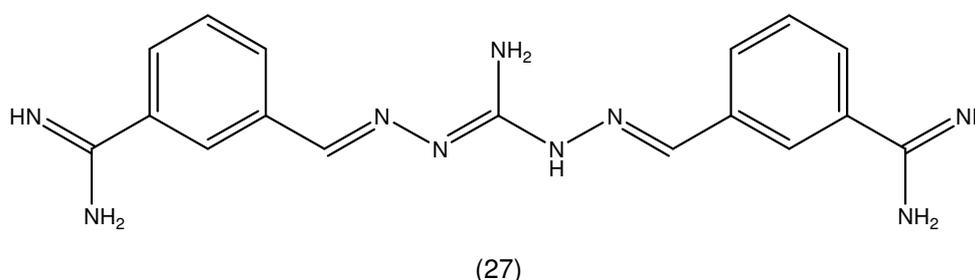


Figura 13 – Agentes antiprotozoário CGP40215A.

Alguns dos antidepressivos recentemente desenvolvidos que mostraram efetiva atividade antidepressiva por bloqueio dos receptores noradrenérgicos (α_2 -AR), foram os dois novos derivados antagonistas (α_2 -AR) 28 e 29 (figura 14, pág 12), obtidos a partir do mianserin e mirtazapina (figura 14, pág 12). Foram sintetizados uma série derivados bis-guanidinas e bis-2-aminoimidazolina com grupos fenil e difenil substituídos (30, figura 14, pág 12) contendo diferentes heteroátomos na posição *para* em relação a esses grupos. (RODRIGUEZ, 2008).

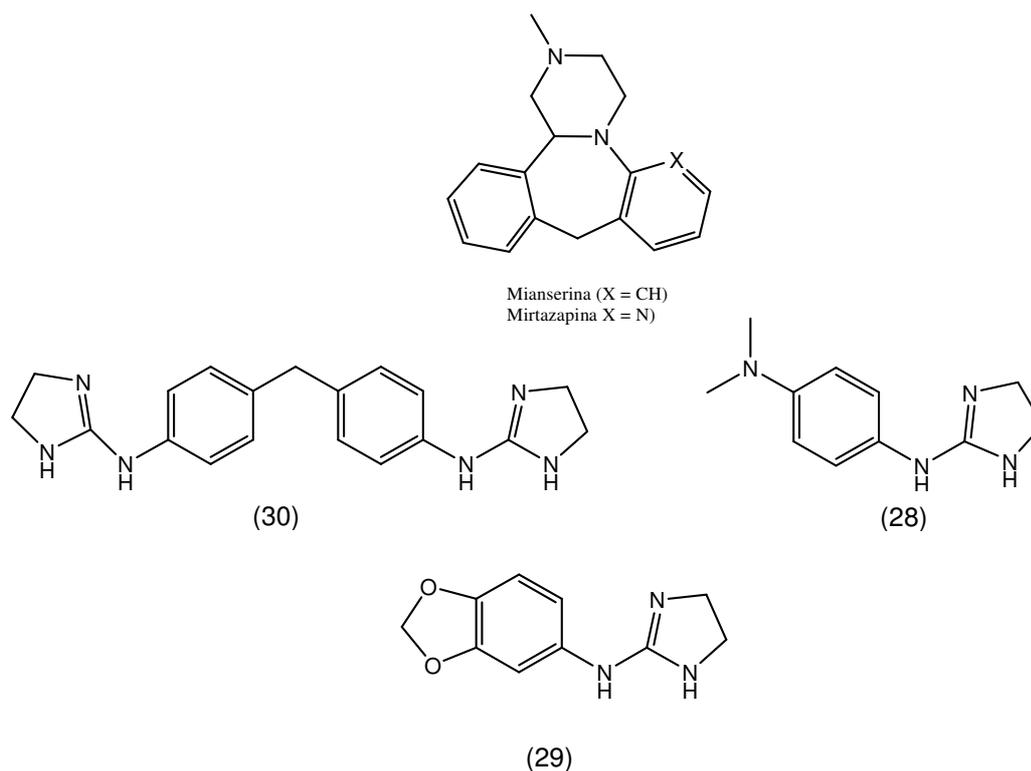


Figura 14 – Estrutura dos antidepressivos α_2 -noradrenocéptores, sua conhecida alta afinidade α_2 -AR, antagonistas α_2 -AR 28 e 29 e a bis guanidina 30.

Alguns derivados de uréia tem exibido atividades como anti-hipertensivo ou antiarrítmicos. Arilaminoguanidinas, como o hidrocloreto de β -(2,6-diclorofenil)-etilaminoguanidina (31, figura 15) e o hidrocloreto de γ -fenilpropilaminoguanidina (32, figura 15) foram relatados como promissores agentes anti-hipertensivos (BREAM, 1970).

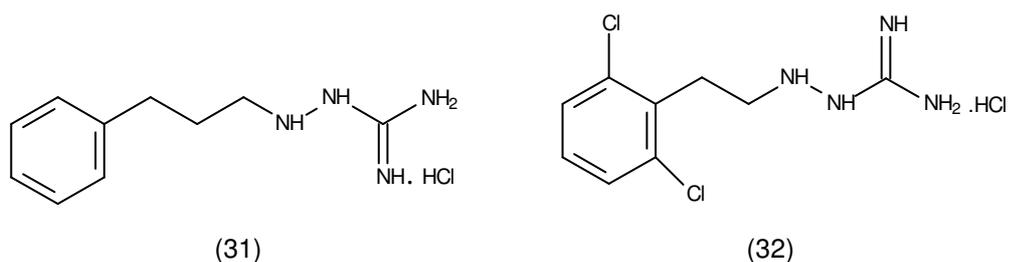


Figura 15 – Estrutura dos anti-hipertensivos hidrocloreto de β -(2,6-diclorofenil)-etilaminoguanidina (31) e o hidrocloreto de γ -fenilpropilaminoguanidina (32).

O hidrazinotiadiazol (33, figura 16, pág. 13) é um potente vasodilatador, com o objetivo de manter essa atividade vasodilatadora mas minimizar os efeitos tóxicos, foi inserido o grupo guanidina em sua estrutura. Compostos contendo grupos guanidina tem sido frequentemente usados para produzir efeito anti-hipertensivo, em outras séries de compostos, por diferentes modos de ação

incluindo bloqueio adrenérgico, vasodilatação, agonista α_2 -adrenoreceptor, entre outros mecanismos de ação. As tiadiazolilguanidinas, como o 2-aryl-5-guanidino-1,3,4-tiadiazol (34, figura 16), são mais potentes como vasodilatador que o hidrazinotiadiazol (TURNER, 1987).

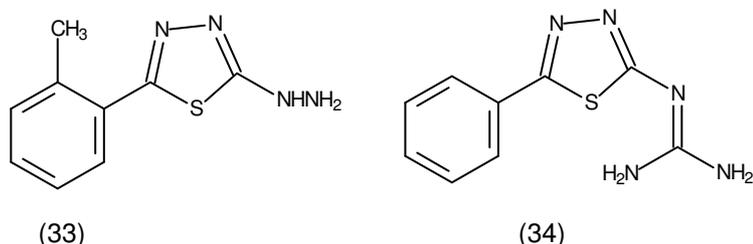


Figura 16 – Estrutura dos agentes vasodilatadores e anti-hipertensivos.

Tem sido relatado que piperazino-guanidinas e aminoguanidinas são promissores antiarrítmicos. Entre os agentes antiarrítmico e anti-hipertensivo derivados de guanidina pode ser citado o pinacidil (35, figura 17) (CHALINA, 1998).

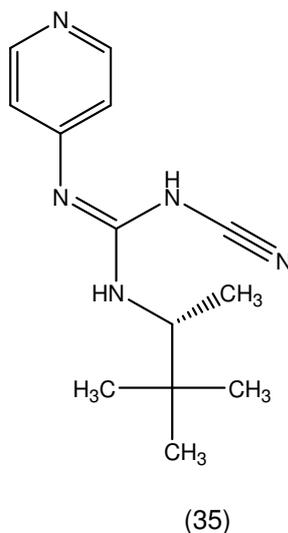


Figura 17 – Estrutura dos Pinacidil, um antiarrítmico.

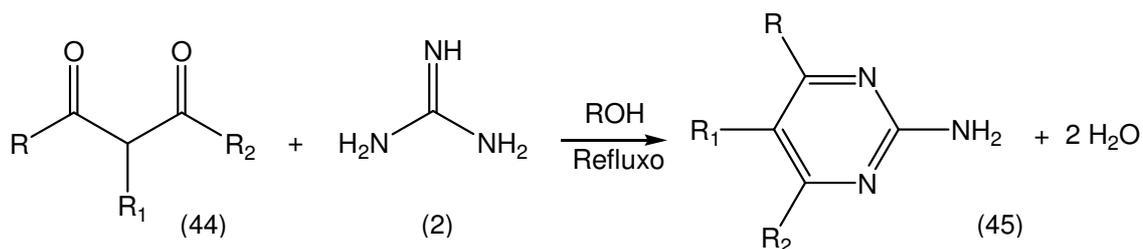
2.1.4 - REAÇÕES COM GUANIDINAS

As guanidinas, como outras aminas, podem sofrer alquilação, acilação e condensação, esta última de grande importância em síntese orgânica, uma vez que permite a formação de compostos heterocíclicos como pirimidinas e imidazóis (XAVIER, 1997).



Figura 20 – Obtenção de derivados acilados de aminoguanidinas.

As guanidinas também podem sofrer reações de condensação com compostos bifuncionais como dicetonas ou acetoésteres (44), levando a formação de compostos heterocíclicos (45) (figura 21) (XAVIER, 1997).



R= Alquil, R₁= H, Alquil, R₂= Alquil, OCH₃, OC₂H₅

Figura 21 – Obtenção de compostos do tipo 2-aminoheterocíclicos.

Em 1992 estudos realizados por Bernatowicz e colaboradores, mostraram que os reagentes guanilantes como a cianamida (46, figura 22), o hidrogênio sulfato de o-metilisouréia (47, figura 22) e o nitrato de 3,5-dimetilpirazol 1-carboxamidina (48, figura 22) não possuem reatividade suficiente para a prática e generalizada utilização da síntese de peptídeos em fase sólida (BERNATOWICZ,1992).

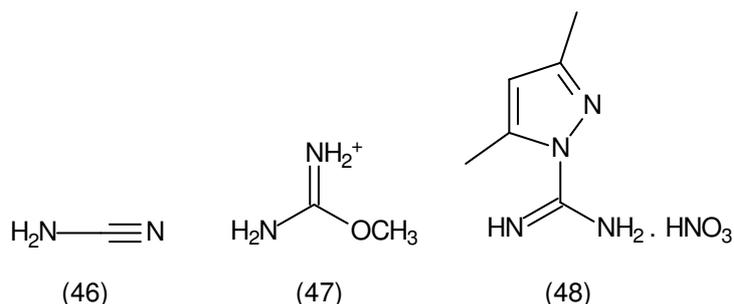
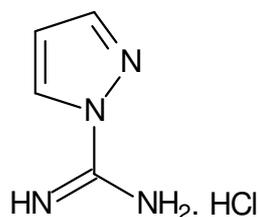


Figura 22 – Reagentes guanilantes pouco eficientes na conversão de aminas em guanidinas.

Na busca de um reagente mais adequados para a conversão de aminas em guanidinas, foi desenvolvido e caracterizado, o hidrocloreto de 1H-pirazol-1-carboxamidina (49) (figura 23, pág. 16) que mostrou-se um atrativo reagente para

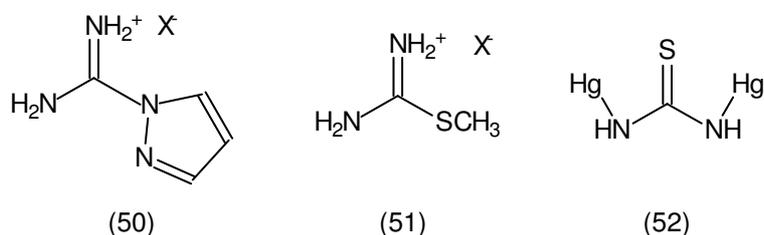
a guanidilação de aminas e aplicação em síntese de peptídeos (BERNATOWICZ,1992).



(49)

Figura 23 – Reagente guanilante hidrocloreto de 1H-pirazol-1-carboxamidina.

Outros reagentes guanilantes comumente usados em reações de guanidilação são os derivados de pirazol – 1 – carboxamidina (50, figura 24), S-alquiltioureias como o sal de S-Metilisotiurônio (51, figura 24) e derivados de tiouréia protegidos (52, figura 24) usados com sais de mercúrio ou reagente de Mukayama (PORCHEDDU, 2004). Também são utilizados derivados de N-trifilguanidinas e tiouréias di-boc ativadas com cloreto de mercúrio II (HgCl_2) ou reagente de Mukayama (GHOSH, 2001).



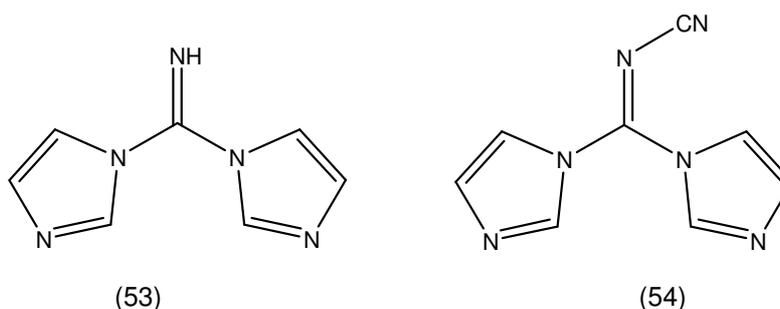
(50)

(51)

(52)

Figura 24 – Reagentes guanilantes mais usados.

A síntese direta de guanidinas também pode ser feita com os reagentes guanidinilantes di-(imidazol-1-il)-metanimina (53, figura 25) e di-(imidazol-1-il)-cianometanimina (54, figura 25) (WU,2002).



(53)

(54)

Figura 25 – Reagentes guanilantes di-(imidazol-1-il)metanimina e di-(imidazol-1-il)-cianometanimina.

Diferentes reagentes já foram propostos e usados para sintetizar guanidinas protegidas e desprotegidas. No entanto, novos métodos de síntese para este importante grupo funcional, continuam a surgir, manifestando a necessidade de alternativas de reagentes mais potentes que podem ser eficientemente aplicados até mesmo para a química em suporte sólido (MORODER, 2001).

2.2– QUITOSANA

A quitosana é um heteropolissacarídeo constituído por resíduos de N-acetil-D-glucosamina (55, figura 26) e D-glucosamina (56, figura 26) ou 2-amino-2-deoxi-D glicose, unidos entre si por ligações β (1 \rightarrow 4) (KUMAR, 2000).

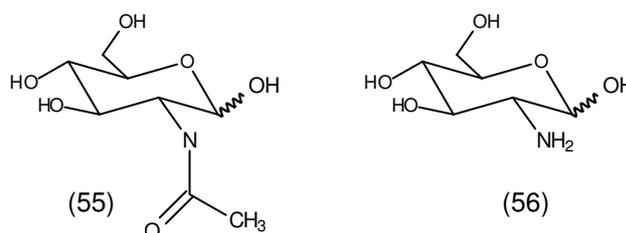


Figura 26 - Estrutura dos monômeros N-acetil-D-glucosamina (55) e D-glucosamina (56).

A quitosana (57, figura 27) é um polímero derivado da quitina. A quitina (58, figura 27) é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose (59, figura 27). A quitina é encontrada principalmente no exoesqueleto de insetos e nas carapaças de crustáceos, também pode ser encontrado na parede celular de algumas espécies de fungos (KUBOTA, 2000). As estruturas da celulose, quitina e quitosana diferem apenas no grupo diretamente ligado ao carbono anomérico. A celulose possui um grupo hidroxila (-OH) na posição C-2, que pode ser substituído por um grupo acetamida (-NCOCH₃) formando a quitina ou por um grupamento amino (-NH₂) na forma de quitosana.

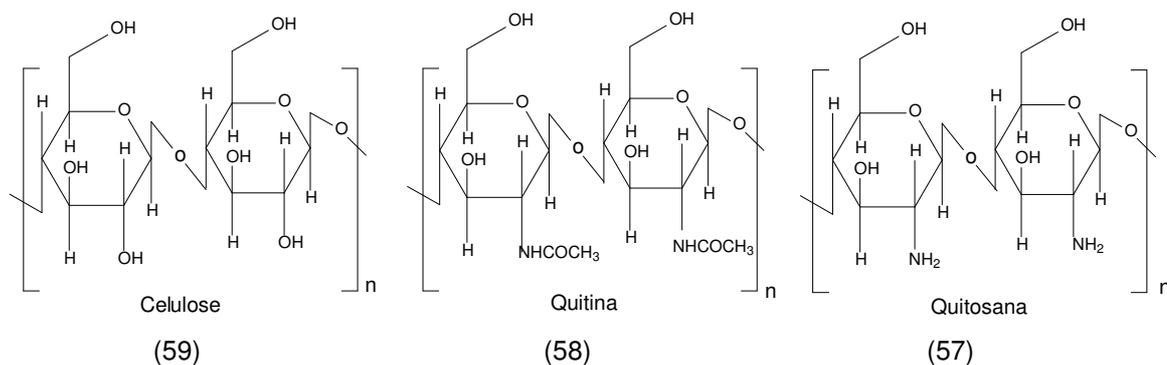


Figura 27 - Estrutura da celulose, quitina e quitosana.

A quitina e a quitosana são copolímeros constituídos por unidades *N*-acetil-*D*-glicosamina e *D*-glicosamina em proporções variáveis, sendo que o primeiro tipo dessas unidades predomina no caso de quitina, enquanto quitosana é composta predominantemente, por unidades *D*-glicosamina (KUBOTA, 2000).

A maior fonte de obtenção da quitosana é através da desacetilação com álcalis da quitina, podendo estar naturalmente presente em alguns fungos, como aqueles pertencentes aos gêneros *Mucor* e *Zygomycetes*. Características como massa molar, grau de acetilação e distribuição deste grupo ao longo da cadeia polimérica podem influenciar na biodegradabilidade do mesmo, principalmente na acessibilidade enzimática, influenciando a hidrólise do polissacarídeo (COSTA SILVA, 2006).

Comercialmente, quitina e quitosana são obtidas a partir de conchas de moluscos (sobretudo caranguejos, camarões, lagostas) e de resíduos oriundos da indústria de processamento de mariscos, a um custo relativamente baixo. As cascas secas de crustáceos possuem 15-20% de quitina, 25-40% de proteína e 40-55% de carbonato de cálcio, além de pigmentos e lipídeos em pequena quantidade. A partir dessa matéria-prima, refugo abundante e relativamente barato da indústria de alimentos marinhos, é produzida a α -quitina. Os gládios de lulas, moluscos que também são processados industrialmente, contêm 35-40% de β -quitina, 60-65% de proteínas e uma quantidade mínima de sais inorgânicos, constituindo-se em uma fonte potencialmente importante para a produção industrial de quitina em futuro próximo (CAMPANA-FILHO, 2007).

2.2.1 – OBTENÇÃO DA QUITOSANA

Basicamente, o processo de obtenção da quitosana a partir da quitina consiste na deproteinação do material bruto (casca) com solução diluída de hidróxido de sódio (NaOH) e da descalcificação com uma solução de ácido clorídrico (HCl) diluída (KRAJEWSKA, 2004). As soluções aquosas de diferentes ácidos, como HCl, HNO₃, H₂SO₃, HCOOH, H₃CCOOH, podem ser empregadas na desmineralização, etapa na qual são eliminados os sais minerais, principalmente carbonato e fosfato de cálcio. O tratamento pode ser executado em diferentes condições – a temperatura e o tempo do tratamento podem variar entre 0 e 100 °C e de 30 min até 48 h, respectivamente – mas as condições vigorosas devem

ser evitadas, pois provocam severa despolimerização e a conseqüente degradação das propriedades ligadas ao caráter macromolecular da quitina. O tratamento com soluções de EDTA é muito mais brando, mas também muito menos eficiente que o tratamento com ácido diluído. O tratamento com soluções diluídas de HCl por tempos curtos e à temperatura ambiente assegura a completa remoção dos sais minerais sem promover a degradação das cadeias, mas a otimização do processo deve levar em conta a determinação prévia do teor de minerais da matéria-prima (CAMPANA-FILHO, 2007).

Para resultar em quitosana (57, figura 28), a quitina (58, figura 28) obtida é submetida a N-desacetilação por tratamento com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 40-45%, seguido de procedimentos purificação (KRAJEWSKA, 2004). As proteínas podem ser eliminadas por tratamento com soluções aquosas de diferentes bases, como NaOH, Na₂CO₃, NaHCO₃, KOH, K₂CO₃, Ca(OH)₂, mas o emprego de NaOH (1-10%) e de temperaturas relativamente elevadas (65-100 °C) é a prática mais comum. Entretanto, as condições reacionais devem ser brandas para evitar, ou minimizar, a ocorrência de hidrólise dos grupos acetamida presentes na quitina e também sua despolimerização. Os tratamentos enzimáticos - pepsina, tripsina, alcalases e outras proteases nãoquinolíticas podem ser empregadas - são mais brandos e menos eficientes que o tratamento químico e, embora ainda não sejam empregados em larga escala, propiciam o aproveitamento potencial do hidrolisado proteico pela indústria alimentícia (CAMPANA-FILHO, 2007).

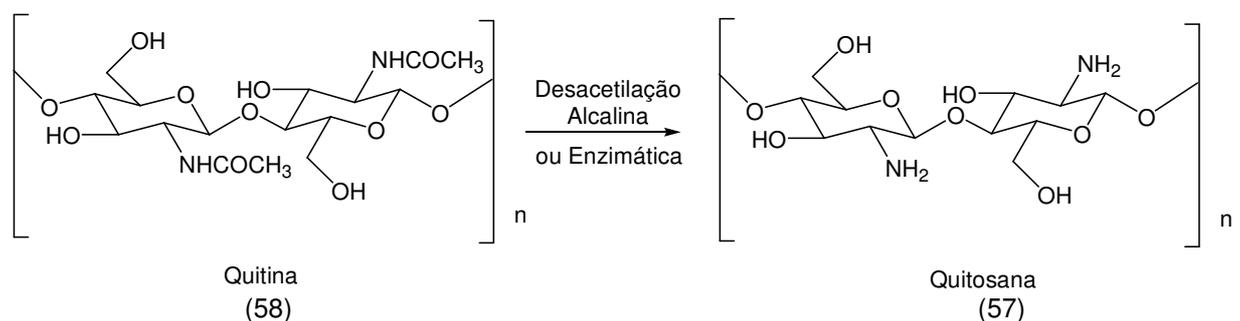


Figura 28 - Estrutura de quitina e quitosana.

A remoção dos pigmentos, quando presentes, pode ser realizada por extração com solventes, sendo que etanol e acetona são os mais empregados, ou por branqueamento, com KMnO₄, NaOCl ou H₂O₂. O aproveitamento de astaxantina, pigmento mais abundante nos exoesqueletos de crustáceos, na

indústria alimentícia é possível se a extração por solvente for adotada (CAMPANA-FILHO, 2007). Assim, a produção e a utilização da quitosana constitui um meio economicamente atraente de eliminação dos resíduos de carapaças de crustáceos (KRAJEWSKA, 2004).

Embora a hidrólise alcalina dos grupos acetamido presentes na quitina, que levam à obtenção da quitosana, seja uma reação relativamente simples, esta não ocorre de maneira homogênea e completa ao longo de todas as cadeias, pois a quitina é um polímero semicristalino e a acessibilidade aos sítios reativos contidos nos domínios cristalinos é limitada. Além disso, é comum a ocorrência concomitante de despolimerização e de outras reações colaterais. Como consequência desses fatos a desacetilação de quitina, como é geralmente executada nos laboratórios de pesquisa e em escala industrial, leva à produção de copolímeros de composição e massa molar variáveis em função das condições e da extensão da reação. Dessa forma, a reprodutibilidade de características e de propriedades nem sempre se verifica, mesmo quando condições reacionais semelhantes são empregadas na desacetilação de quitina visando a preparação de quitosana (CAMPANA-FILHO, 2007). Geralmente, em condições heterogêneas, a reatividade deste polissacarídeo tende a aumentar com o decréscimo do grau de cristalinidade e a reação pode se processar mais rapidamente em regiões amorfas que em regiões cristalinas. Além disto, os produtos obtidos em condições heterogêneas podem ter difícil controle do grau de substituição, bem como da solubilidade e de outras propriedades (SHIGEMASA, 1999).

A cinética da desacetilação heterogênea alcalina da quitina tem sido estudada por diversos autores, sendo relatada como uma pseudo reação primeira ordem. A quitosana pode ser quimicamente despolimerizada por diferentes mecanismos (hidrólise ácida, oxidação-redução e despolimerização por ácido nitroso). Assim como outros polissacarídeos, é suscetível a uma grande variedade de mecanismos de degradação, incluindo despolimerização oxidativa-redutora de radicais livres e ácidos e hidrólise alcalinas catalisada por enzimas. A degradação desses polissacarídeos ocorre pela clivagem das ligações glicosídicas. O controle da despolimerização da quitosana é importante, a fim de ajustar propriedades como viscosidade, solubilidade e atividade biológica (GALED, 2005).

De fato, a completa desacetilação da quitina raramente é realizada, pois são necessárias muitas reações consecutivas, que também favorecem a sua progressiva despolimerização. Assim, o termo quitosana abrange o conjunto de copolímeros que contém ao menos 50-60% de unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose. O grau médio de acetilação (GA) ou o grau de desacetilação definem a porcentagem de unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose presentes, em média, nas cadeias do polímero. Não há limites bem definidos em termos dos conteúdos de unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose e 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose para a distinção de quitina e quitosana mas, em função de suas composições distintas os polímeros exibem propriedades bem diferentes. Do ponto de vista prático é a solubilidade que permite a distinção mais simples e rápida, pois quitosanas são solúveis em soluções aquosas diluídas de vários ácidos – as soluções de ácido acético e clorídrico são as mais comumente empregadas - mas quitina não é solúvel nesses meios, sendo dissolvida apenas em poucos sistemas solventes (CAMPANA-FILHO, 2007).

2.2.2 – PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS DA QUITOSANA

Os dois parâmetros mais importantes que determinam as propriedades estruturais da quitina e quitosana são o grau de acetilação ou desacetilação, que interfere na identidade do biopolímero como quitina ou quitosana e o peso molecular que determina a viscosidade e a velocidade de degradação do polímero. Estes parâmetros tem influência direta nas atividades antibacterianas, antitumoral e imuno-adjuvante, bem nas propriedades mecânicas da quitosana, este valor também determina o limite de solubilidade do polímero, reatividade química, biodegradabilidade e conseqüentemente em suas aplicações.

Muitos métodos tem sido utilizados para determinar o grau de acetilação incluindo espectroscopia de infravermelho, cromatografia líquida de alta performance (HPLC), dicroísmo circular, espectroscopia de ultravioleta, cromatografia gasosa, análise térmica e espectroscopia de ressonância magnética nuclear. Cada método tem suas próprias vantagens e limitações no que se refere às preocupações tais como a exigência de solubilidade da amostra, custo e disponibilidade de instrumentação e eficiência da técnica (KHOR,2001).

A proteína residual, umidade, cinzas, lipídeos, teor de metais pesados, teor de impureza e cor são outras propriedades mais freqüentemente relatados. Deve-se ter em mente que, assim como outros polímeros, as propriedades da quitina e da quitosana são uma média da contribuição da proporção entre as subunidades N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina na amostra de polímero. A heterogeneidade proveniente das fontes variadas, no entanto, pode complicar o somatório dessas contribuições. O objetivo de ter os métodos de caracterização adequadamente definidos para a quitina e para a quitosana consiste em poder relatar de forma confiável, o comportamento do biopolímero, relacionando a massa e suas propriedades. Isso é necessário para definir as expectativas adequadas e coerentes para as propriedades destes biopolímeros (KHOR, 2001).

Sua solubilidade depende de vários parâmetros, tais como grau de acetilação (GA), massa molar, concentração do ácido e do biopolímero e da força iônica. O valor do pH muda significativamente o grau de protonação da quitosana, podendo ser maior ou menor dependendo do tipo e concentração de cada ácido. Logo, o grau de protonação depende do pK_a do ácido utilizado para solubilizar a quitosana (RINAUDO, 1999). Dependendo da fonte e preparação procedimento, o seu peso molecular pode variar entre 300 a mais de 1000 kD com um grau de desacetilação de 30% para 95% (CHO, 2008).

A solubilidade da quitosana está relacionada com a quantidade de grupos protonados ($-NH_3^+$) positivamente da cadeia polimérica. Esta importante propriedade do polímero quitosana, a capacidade de se protonar em soluções ácidas, é devido à presença de aminas na molécula que se ligam a prótons como mostrado na equação : $Quitosana - NH_2 + H_3O^+ \rightarrow Quitosana - NH_3^+ + H_2O$.

O valor de pK_a de quitosana é de aproximadamente 6,3. A quitosana se solubiliza quando mais que 50% dos grupos amino estejam protonados, desta maneira a solubilidade de quitosana diminui agudamente quando o pH aumenta acima de 6,0 a 6,5 .Quanto maior a repulsão eletrostática entre as cadeias, maior a solvatação. A protonação dos grupos amino da quitosana ocorre completamente em pH aproximadamente 3, permitindo a solubilidade da cadeia polimérica, formando soluções viscosas. O aumento na solubilidade da quitosana pode facilitar a ocorrência das reações devido a uma maior interação do polímero com os reagentes em meio aquoso, ampliando a possibilidade de reações com

conseqüente formação de novos produtos como polímeros mistos (RINALDO, 1999).

Os grupos amino fazem da quitosana um polieletrólito catiônico ($pK_a \approx 6,5$), um dos poucos encontrados na natureza. Esta basicidade confere a quitosana propriedades singulares: a quitosana é solúvel em meio ácido aquoso a $pH < 6,5$ e quando dissolvido possui uma carga positiva sobre os grupos amino ($-NH_3^+$), ele adere a superfícies carregadas negativamente, agrega-se a compostos polianiónicos, e forma quelatos com íons metálicos. Tanto a solubilizada em soluções ácidas como agregada com poliânions, a quitosana apresenta excelentes propriedades formadoras de gel (KRAJEWSKA, 2004). Devido à sua natureza policatiônica, quando a quitosana entra em contato com soluções ácidas é possível a sua moldabilidade nas mais diversas formas como membranas, esferas, gel, microesferas, etc, modificações estruturais podem alterar as diversas formas de interação química e resistência mecânica (TORRES, 2005).

Embora a quitosana seja solúvel em pH ácido, foi relatado por Muzzarelli e colaboradores em 2003, a dissolução da quitosana em soluções com valores elevados de pH, em torno de pH 9.6. O polissacarídeo é tratado com solução saturada de NH_4HCO_3 durante 5 dias a $20\text{ }^\circ\text{C}$, obtendo-se o produto na forma de N-glicosilcarbonatos, a uma razão de 1,5 a 1 molar/ de $-NH_2$ e $-NHCOO^-NH_4^+$ para uma determinada quantidade do polissacarídeo utilizada. Esta solubilidade é alcançada devido à formação do íon carbonato após adição do NH_4HCO_3 , como mostra a reação na figura 29 (MUZZARELLI, 2003).

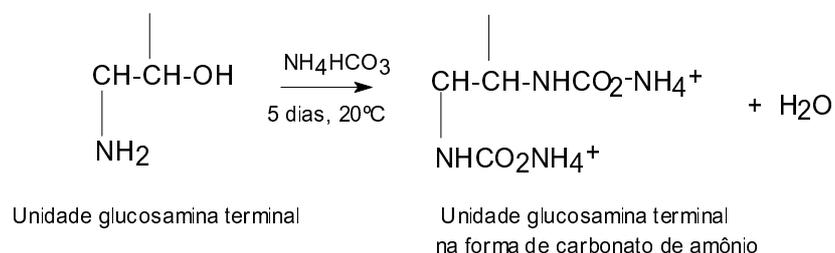


Figura 29 – Solubilização da quitosana em meio básico.

Xie e colaboradores em 2001 conseguiram inserir o ácido maléico em hidroxipropilquitosana e carboximetilquitosana e produzir derivados hidrossolúveis. Esses derivados da quitosana (GA = 3% e MM = 880.000 Da) são dotados de propriedades antioxidantes (XIE, 2001).

Muzzarelli e colaboradores demonstraram que a N-carboximetilação poderia ser obtida por primeira reação do grupo amino na quitosana (57) com ácido glicóxico para formar a aldimina intermediária (60). Conseqüente sua redução resulta na N-carboximetil quitosana (61), que é facilmente solúvel em água para toda a faixa de pH (figura 30).

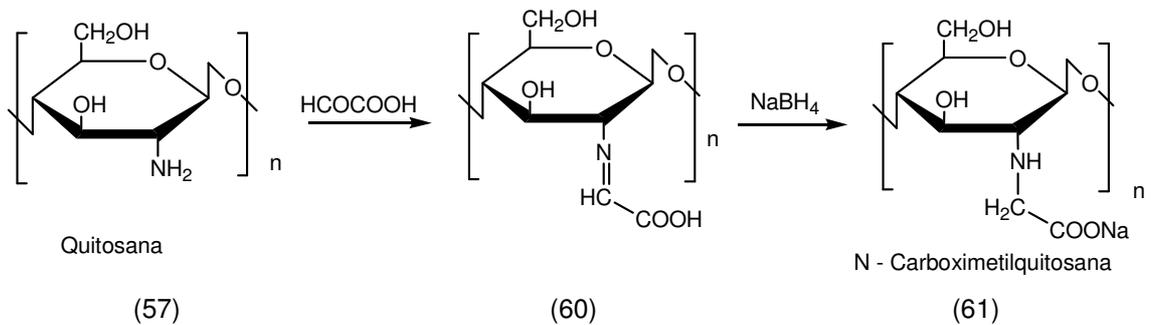


Figura 30 – Reação de N-carboximetilação da quitosana.

Em trabalhos posteriores, foi demonstrado que o excesso de ácido glicóxico resultaria em uma dupla carboximetilação no átomo de nitrogênio. A determinação da estrutura e sua solubilidade mostrou que houve a formação de quitosanas N-mono e N, N-di-carboximetiladas. Polímeros mistos de N, O-Carboximetil-quitosanas (62, figura 31) também podem ser obtido pela reação da quitosana suspensa em solução de NaOH a 42% com monocloroacetato, seguida da reação com ácido glicóxico e borohidreto de sódio, sucessivamente, a reação é representada na figura 31 (KHOR, 2001).

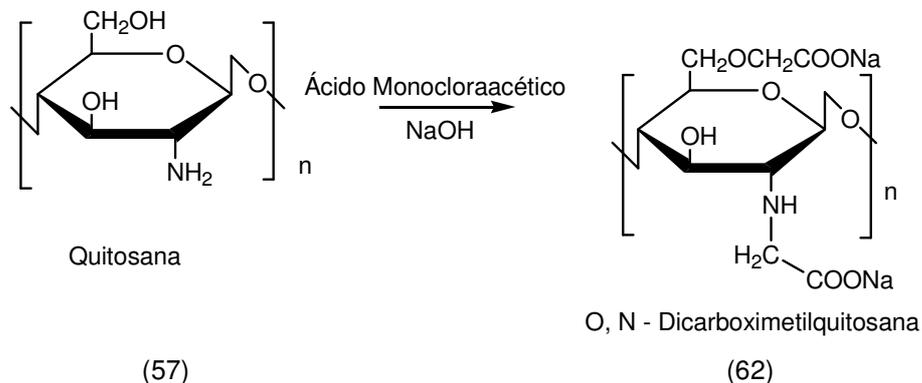


Figura 31 – Reação de N, O-carboximetilação da quitosana.

Sashiwa e Shigemasa em 1999 prepararam diversos derivados de quitosana hidrossolúveis. Estes incluem derivados do tipo N-alkil e N-acil-quitosana, como N-Acilsuccinilquitosana (63, figura 32, pág. 25) e N-acilmaleilquitosana (64, figura

32, pág. 25). Os derivados obtidos não são solúveis em toda a faixa de pH, cada um possui uma solubilidade particular. A N-acilsuccinilquitosana apresentou solubilidade em dois intervalos de pH distintos, sendo a primeira numa faixa de pH entre 1,0-3,5 e a segunda na faixa de pH entre 7,0-13. A solubilidade em condições ácidas é explicada pela protonação do grupo amino livre, característico na quitosana *in natura*, que passa de NH_2 a NH_3^+ , enquanto que em meio alcalino, a hidrossolubilidade se deve à formação do carboxilato, a partir do grupo carboxílico introduzido (SASHIWA, 1999).

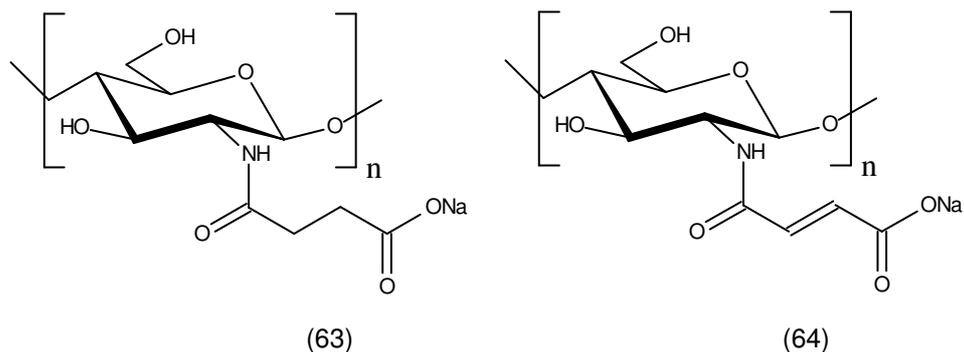


Figura 32 – Derivados hidrossolúveis da quitosana: N-acilmaleilquitosana e N-acilsuccinilquitosana.

Muitos dos estudos realizados com a quitosana levam em consideração a sua capacidade de interagir com uma variada gama de substâncias, tais como proteínas, lipídeos, pesticidas, corantes, íons metálicos e radioisótopos. O fato da quitosana ser um polieletrólito linear com alta densidade de carga positiva e com a capacidade de aderir a superfícies carregadas negativamente resulta que o polímero é um excelente agente floculante, liga-se as superfícies celulares, forma géis com poliânions e tem a capacidade de formar filmes e membranas (DELEZUK, 2009).

A quitosana possui propriedades adsorventes empregada em processos de recuperação e/ou de purificação de bioprodutos de alto valor agregado, como as proteínas. Todas essas propriedades fazem com que a quitosana ofereça um potencial extraordinário e um amplo espectro de aplicações (TORRES, 2005).

2.2.3 – PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DA QUITOSANA E SEUS DERIVADOS

Dentre as propriedades biológicas da quitosana, podemos destacar a biocompatibilidade, a biodegradabilidade formando produtos inofensivos, não

toxicidade, ser fisiologicamente inerte, possuir notável afinidade por proteínas, hemostático, fungistático, atividade antitumoral e antimutagênica, efeito imuno estimulante, além de apresentar propriedades anticolesterêmicas (KIM, 2008)

A quitosana tem sido amplamente utilizada na indústria, principalmente como um floculante na clarificação de águas residuais, como um agente quelante de metais prejudiciais para a desintoxicação de resíduos perigosos, para a clarificação de bebidas, como sucos de frutas e cervejas, e para fins agrícolas, tais como fungicidas. Além disso, a quitosana é usada na indústria de cosméticos, na indústria odontológica, em produtos para cuidado de cabelo, para aplicações oftálmicas, como para revestimentos de lentes de contato ou para o material da lente de contato em si. Tem sido amplamente utilizado como biomaterial devido à suas atividades imunoestimuladoras, propriedades anticoagulantes, ação antibacteriana e antifúngica, e também como promotor da cicatrização de feridas no campo da cirurgia (DUMITRIU, 2001).

Esses polímeros provocam a inibição do crescimento de microrganismos, como *E. coli*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Helminthosporium*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *S. pyogenes*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. faecalis*, *Shigella dysenteriae*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Coliforms*, *Vibrio*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Corynebacterium michiganense*, *Erwinia sp.*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Xanthomonas campestris*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Drechslera sorokiniana*, *Micronectriella nivalis*, *Procularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Tricophyton equinum* e *Candida*. Alguns pesquisadores explicam a atividade antimicrobiana da quitosana por seus grupos amínicos que, uma vez em contato com os fluidos fisiológicos, provavelmente são protonados e se ligam a grupos aniônicos desses microrganismos, resultando na aglutinação das células microbianas e inibição do crescimento. Estudos mais recentes, entretanto, revelam que o mecanismo da atividade antimicrobiana da quitosana está intimamente relacionado às propriedades físico-químicas do polímero e às características da membrana do microrganismo (COSTA SILVA, 2006).

A introdução de asparagina no oligossacarídeo quitosana aumentando significativamente a atividade antibactericida, isso provavelmente indica que quanto maior o número de grupos amino, maior será a atividade antimicrobiana (JEON & KIM, 2001).

A maioria dos antibióticos comuns interferem no metabolismo da bactéria. Entretanto, um grande número de espécies de bactérias apresentam resistência a esses antibióticos e causam sérios problemas de saúde. Uma promissora possibilidade para converter essa dificuldade é desenvolver um composto para inibir a ação bacteriana baseado nas interações físicas. Tem sido provado que agentes químicos com grupos positivamente carregados, como amônio quaternário ou fosfônio podem matar a bactéria sob contato. Policátions são uma alternativa para desinfetantes comuns não tóxicos ou aditivos empregados para uso humano (GUAN, 2007).

2.2.4 – APLICAÇÕES PARA QUITOSANA E SEUS DERIVADOS

Alguns fatores limitam suas aplicações como solubilidade, alto peso molecular e conseqüentemente alta viscosidade. Por outro lado, a despolimerização da quitosana leva a formação de produtos de baixo peso molecular e quitoligómeros que ultrapassam estas limitações podendo portanto encontrar aplicações mais amplas e, em campos diversificados. É relatado que quitosanas de baixo peso molecular, com peso molecular variando entre 5 e 10 kDa apresentaram uma forte ação bactericida, fungicida, hipolipidêmica, bem como efeitos hipocolesterolemicos. Podem ser utilizadas na preservação do leite e na higiene bucal. De acordo com Kondo *et al.*, quitosanas com 20-kDa impedem a progressão de diabetes mellitus e exibem maior afinidade para lipopolissacarídeos que quitosanas com 140-kDa (THARANATHAN, 2004).

Recentemente Artursson e colaboradores, Schipper e colaboradores relataram que as propriedades estruturais das quitosanas, como o grau de acetilação e peso molecular, são muito importante para a sua valorização absorção de hidrofílica drogas,. Eles descobriram que um baixo grau de acetilação e / ou um alto peso molecular parece ser necessário para quitosanas para aumentar a permeabilidade epitelial. Ingestão de quitosana efetivamente reduz o colesterol sérico. Oligossacarídeos de comprimento inferior a cadeia cinco resíduos são ineficazes. Quitosana administrada por via oral liga-se a absorção de gordura no intestino, bloqueando-a, e tem sido eficaz para reduzir o colesterol do sangue em animais e humanos. Como resultado, foi proposto que a suplementação dietética com a quitosana pode inibir a formação de placa

artereosclerótica. Os animais foram alimentados durante 20 semanas com uma dieta contendo quitosana a 5% ou em uma dieta controle. Os níveis de colesterol no sangue foram significativamente menores nos animais alimentados com quitosana ao longo do estudo, e após 20 semanas os níveis de controle foram de 64%. Este estudo mostra uma correlação direta entre a redução do colesterol sérico com a quitosana e inibição da arterogênese, e sugere que o agente poderia ser usado para inibir o desenvolvimento de aterosclerose em indivíduos com hipercolesterolemia (DUMITRIU, 2001).

Os efeitos da quitosana foram investigados em pacientes com insuficiência renal submetidos a hemodiálise a longo prazo estável tratamento. Os pacientes foram testados após um período de tratamento de controle de uma semana. Metade dos pacientes foram alimentados com comprimidos de quitosana (45 mg de quitosana por comprimido) três vezes por dia. A ingestão da quitosana efetivamente reduziu os níveis de colesterol sérico total (de 10,14- 4,40 para 5,82-2,19 mM) e aumentou os níveis séricos de hemoglobina (de 58,2 -12,1 para 68-9,0 g L⁻¹). Reduções significativas na uréia e creatinina nos níveis séricos foram observadas após 4 semanas de ingestão de quitosana. Durante o período de tratamento, sintomas clinicamente problemáticos não foram observados. Estes dados sugerem que a quitosana pode ser ineficiente para o tratamento de pacientes com insuficiência renal, embora o mecanismo do efeito deve ser mais investigado (DUMITRIU, 2001).

Experimentalmente, a quitosana mostrou que pode reduzir a taxa de infecção de osteomielite induzida por *Staphylococcus aureus* em coelhos. A natureza catiônica da quitosana devido ao grupo amino interagem com ânions sobre a parede celular bacteriana, essa interação leva à fuga de constituintes intracelulares do microorganismo. A ligação da quitosana com o DNA e a inibição da síntese do RNA ocorre através da penetração da quitosana para dentro do núcleo do microorganismo, interferindo assim com a síntese do RNA e proteínas. Devido a esta propriedade antibacteriana, a quitosana tem sido misturada com outros polímeros (THARANATHAN, 2004).

As quitosanas são altamente utilizadas no tratamento de águas, atuando na remoção dos íons metálicos e como agente flocculante eliminando substâncias tais como proteínas e lipídios. A indústria papelreira utiliza a quitosana para o tratamento da superfície do papel com a finalidade de aumentar a sua resistência

sem afetar o brilho. Devido a sua propriedade de formar filmes, a quitosana é utilizada na formulação de cremes e loções que tem por finalidade a hidratação da pele, e a indústria têxtil vê a quitosana como uma grande aliada no desenvolvimento de novos tecidos mais resistentes e biodegradáveis (DELEZUK, 2009).

A tabela 1 apresenta as diversas aplicações da quitina, quitosana e derivados em várias áreas.

Tabela 1 – Áreas de emprego de quitina e quitosana (KUMAR, 2000)

Área de atuação	Aplicação
Alimentos e Nutrição	Conservação de alimentos Purificação da água Suplemento alimentar Hipocolesterêmico Antioxidante Pré-biótico
Ciência de materiais	Hidrocolóide Biosensores Cosméticos Embalagens de filmes Acabamentos têxtil
Ciência médica: Fármacos e medicamentos	Hemostasia Controle da liberação de drogas Higiene oral Anticoagulante Antitumoral Cicatrizante Lentes de contato
Microbiologia	Membranas poliméricas Antibactericida
Imunologia	Fungicida Modificador de resposta biológica Terapia genética Andaimes poliméricos (para cultura celular) Potenciador imunológico
Diversos	Agricultura (enriquecimento de solo) Produtos de degradação Alimentação animal Agente floculante Nanopartículas poliméricas

A estrutura porosa característica da quitosana (figura 33, pág. 30) a torna promissora para o desenvolvimento e otimização de uma grande variedade de

tecidos andaimos que auxiliam na regeneração dos tecidos. A estrutura de poros-interconectada é muito importante, de modo que numerosas células podem ser semeadas, migrar para o seu interior, aumentar o número de células que requerem uma quantidade suficiente de nutrientes (KIM, 2008).

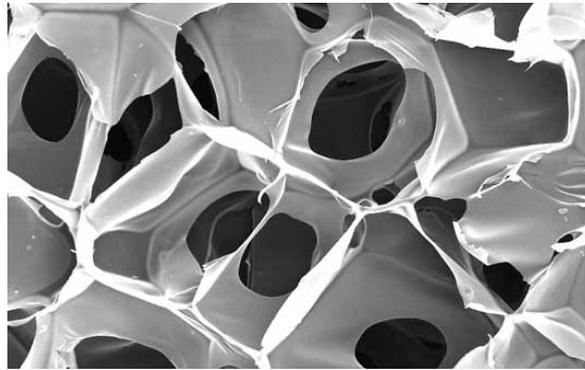


Figura 33 – Estrutura porosa da quitosana.

2.2.5 – REAÇÕES COM QUITOSANA

Os grupos amino livres na quitosana oferecem grande potencial para formação de novos derivados. Uma série de reações químicas como acetilação, alquilação, eterificação, copolimerização e outras mudanças funcionais têm sido empregadas para modificar a estrutura destes polímeros (ZHAO, 2008).

Um grande número de modificações químicas através de rotas homogênea e heterogênea pode ser realizado no anel glicopiranosídeo da quitina e quitosana, conferindo aplicabilidades aos novos biopolímeros. Na rota homogênea é imprescindível solubilizar a quitina e a quitosana com soluções de cloreto de lítio em N,N'-dimetilacetamida e ácido acético $1,70 \text{ mol dm}^{-3}$, respectivamente, o que a rota heterogênea não requer (LIMA, 2006).

A modificação química da quitosana com anidridos orgânicos conduz à acetilação do grupo amino, ligado ao carbono 2 do anel glicopiranosídeo, em um processo denominado de N-acetilação. Porém, quando ocorre uma reação de regioseletividade, com ataque no substituinte ligado ao carbono 6, a reação é chamada de O-acilação, podendo ser empregado, neste caso, como material de partida tanto a quitina como a quitosana (LIMA, 2006).

Uma das reações com quitosana mais demonstradas tem sido a conversão do grupo amino de um grupo acetil por N-acilação da quitosana (57) com anidrido acético em ácido acético diluído misturado em metanol para formar a quitina

regenerada (65) (figura 34). As N-acil-quitosanas são, no entanto, gelatinosas e insolúveis na maioria dos solventes (KHOR, 2001). As modificações químicas da quitosana podem ocorrer de forma concomitante através dos carbonos 2 e 6, enquanto que em etapas a reação é direcionada primeiramente ao carbono 2, seguido do carbono 6, cujas modificações são denominadas de N-acetilação (LIMA, 2006).

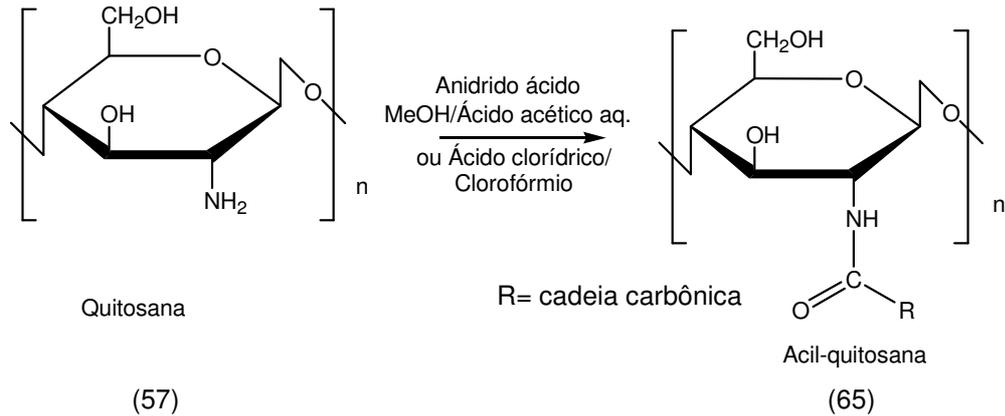


Figura 34 – N-acilação da quitosana: regeneração da quitina.

Do ponto de vista operacional existe certa facilidade no uso da rota homogênea em realizar reações do tipo N,O-acetilações de forma simultânea nas posições 3 e 6 para a quitina e 2, 3 e 6 para a quitosana. Algumas possibilidades de obtenção de novos materiais a partir das rotas descritas podem ser melhores visualizadas na figura 35 (pág. 32). Em se tratando de reatividade, os grupos pendentes ligados aos carbonos do anel obedecem à ordem decrescente C2 > C6 > C3, referentes ao grupo amino (-NH₂) da quitosana, ao grupo hidroxil primário de caráter mais instável e ao grupo hidroxil (-OH) secundário, respectivamente. Nesse último centro reativo é requerido um agente desprotonante para torná-lo pré-disponível à reação subsequente (LIMA, 2006).

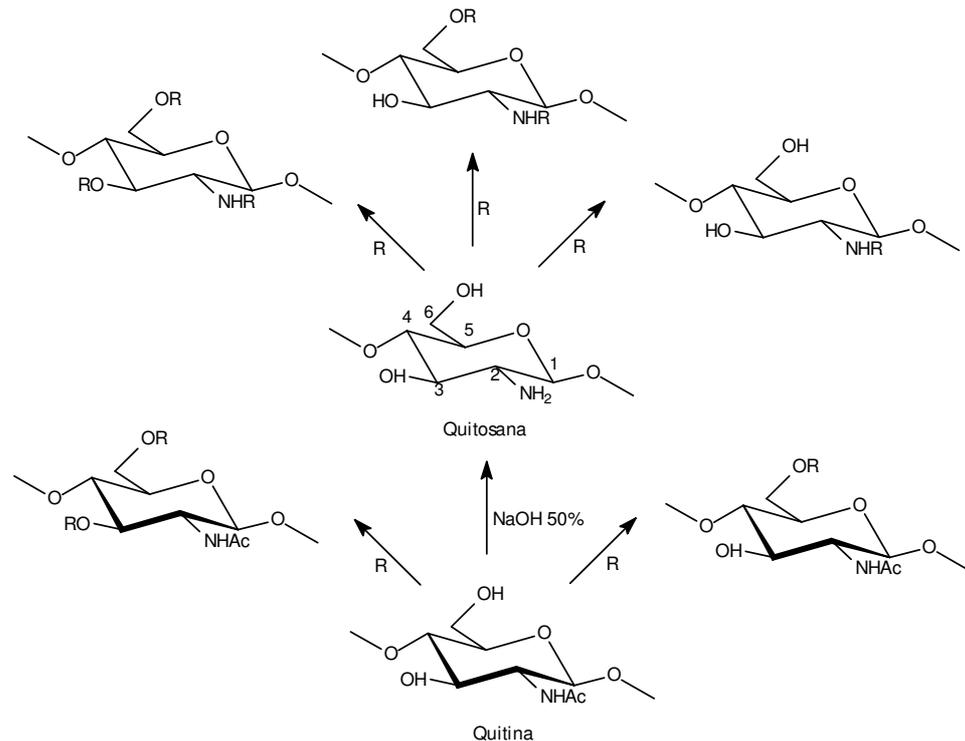


Figura 35 - Tipos de modificações químicas nos polissacarídeos quitina e quitosana, sendo R um radical orgânico ou inorgânico.

Reações de modificação química da quitosana, como desacetilação, N-acetilação, acilação, O-acetilação, O- e N-ftalação, O-carboximetilação, oxidação, entre outras, têm sido estudadas, de forma a preparar produtos com características específicas para determinadas aplicações. De acordo com várias estratégias químicas, um grande número de pesquisas tem sido realizado, principalmente na área farmacêutica, visando o desenvolvimento de diversas formulações (LIMA, 2006).

Khor e colaboradores sintetizaram uma série de alquilquitosanas empregando aminação redutiva. A quitosana (57) foi dissolvida em ácido acético e tratada com aldeído, formando imina (66). Posterior reação de redução da função imina com NaBH₄ leva a formação de alquilquitosanas (67). Esta abordagem direta também tem sido muito bem sucedida em produzir uma ampla gama de derivados de quitosana a partir do respectivo anidrido carboxílico para dar as correspondente quitosanas N-alquil e benzoil substituídas (figura 36, pág. 33) (KHOR, 2001).

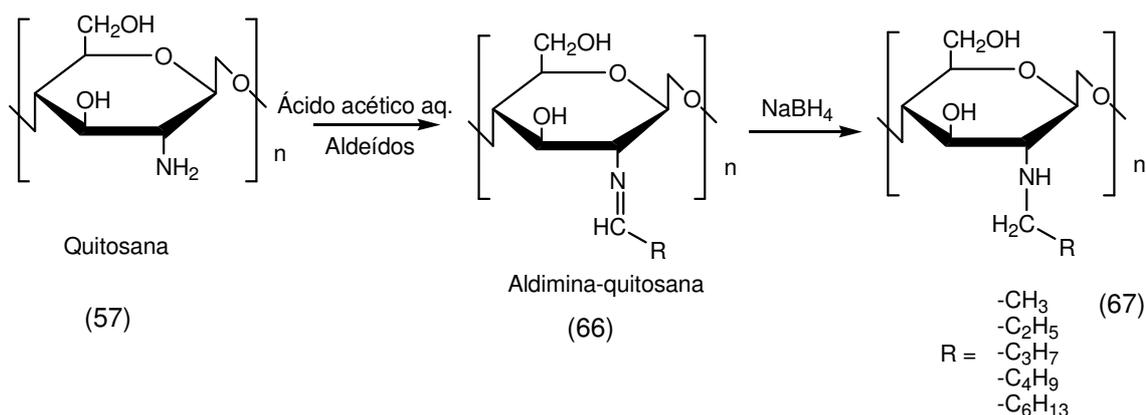


Figura 36 – Reação de formação de N-alquil-quitosanas.

Portanto, é evidente que, enquanto a quitosana prontamente participa de reações homogêneas, a utilidade dos derivados depende de suas propriedades resultantes especialmente no que diz respeito à solubilidade. Vários exemplos das reações da quitosana incluem a reação de dispersão da quitosana com butirrolactona em dimetilsulfóxido para produzir N-hidroxiacil-quitosana que mostrou ser insolúvel, mas poderia inchar em solventes polares. Quitosanas N-benzil sulfonadas também têm sido preparadas com o grupo aldeído utilizando a funcionalidade de amina da quitosana na reação. (KHOR, 2001).

Kurita e colaboradores desenvolveram reações com N-fitaloilação como um precursor conveniente para produzir os derivados fitaloil-quitosana (68) e tritil-fitaloil-quitosana (69) pela reação da quitosana com cloreto fitaloil. A *o*-tritilação seguida pela *o*-acetilação e detritilação com ácido dicloroacético (figura 37).

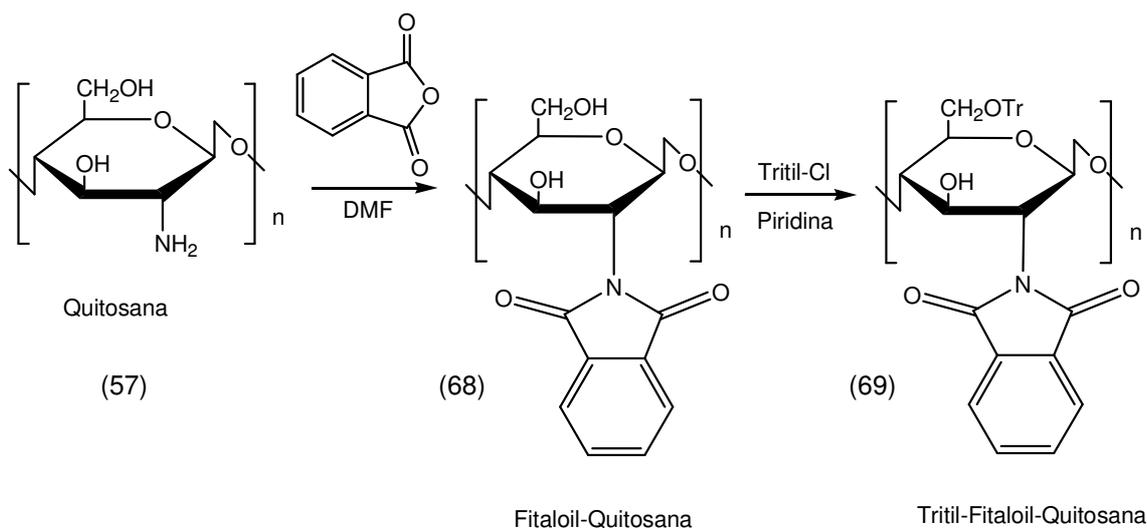


Figura 37 - N-fitaloilação da quitosanas.

A Sulfatação e ramificação da cadeia de também tem sido demonstradas em uma série de reações desenvolvidas. Estes derivados N-fitaloilquitosanas tem se mostrado ser mais reativo em relação a quitosana de partida. Os intermediários tritol-quitosanas também tem sido utilizados para desenvolver quitosanas sulfatadas que têm sido investigados por por apresentar boa atividades anti-HIV, como mostra a reação na figura 38 (KHOR, 2001).

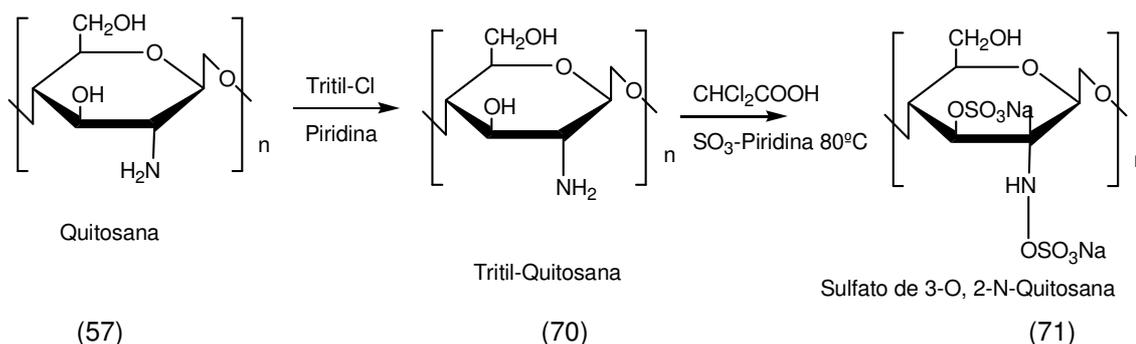


Figura 38 - N,O-Sulfatação da quitosanas.

Nos últimos anos, alguns autores têm demonstrado a aplicação de quitina, quitosana ou seus derivados como catalisadores em reações orgânicas. Em 2006, Xu e colaboradores sintetizaram um complexo quitosana-imina paladaciclo (73), pela formação de uma base de Schiff entre quitosana e salicilaldeído, formando a imina intermediária (72) seguido pela reação com Li_2PdCl_4 em metanol (figura 39). O complexo foi utilizado como um eficiente catalisador reciclável em reações do tipo Heck (XU, 2006).

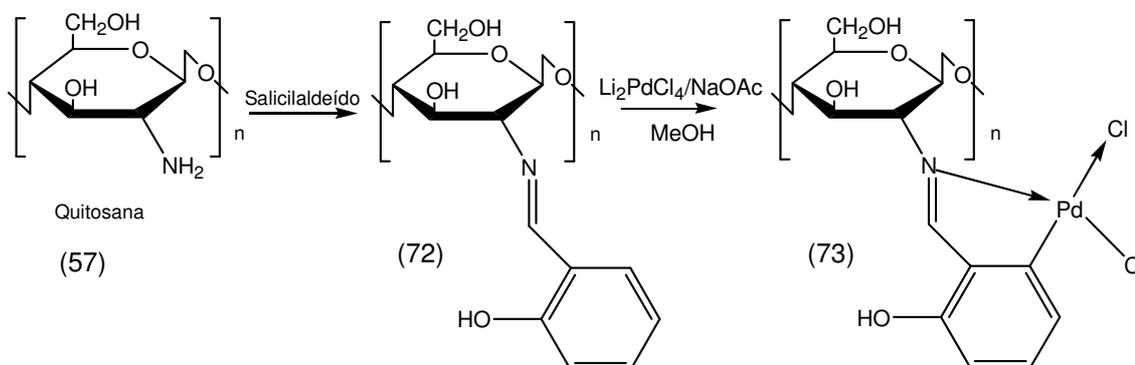
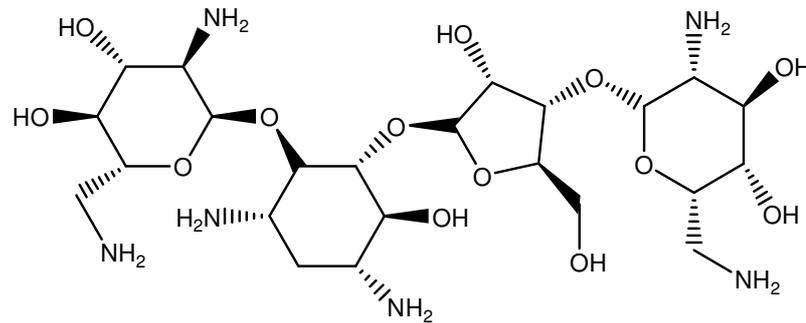


Figura 39 - Síntese do complexo quitosana-imina paladaciclo.

2.3 - NEOMICINA

A neomicina (74) (figura 40), é um antibiótico aminoglicosídeo derivado do *Streptomyces fradiae*, foi descoberta por Waksman e L.echevalier em 1949. Resistente à ação de ácidos (até pH-2) e à fervura em água, apresenta um largo espectro de ação contra bactérias os Gram-positivas e Gram-negativas, principalmente em *Proteus vulgaris* (www.rborl.org.br/conteudo/acervo, acesso em 10/04/2010).



(74)

Figura 40 – Molécula de neomicina.

Aminoglicosídeos são uma classe de substâncias constituídas por dois ou mais aminoaçúcares unidos por ligação glicosídica à hexose ou aminociclitol, que habitualmente está em posição central. Os aminoglicosídeos têm peso molecular que varia de 445 a 600 daltons, são altamente solúveis em água, estáveis em pH 6 a 8 e possuem estrutura polar catiônica, o que impede a sua absorção oral e dificulta sua penetração no espaço intracelular ou através da barreira hematoencefálica. Sua atividade antimicrobiana ocorre principalmente em meio aeróbio e em pH alcalino, pois necessita de oxigênio para transporte ativo nas células microbianas e é mais ativo em meio alcalino do que ácido (OLIVEIRA, 2006).

A neomicina é um antibiótico aminoglicosídico de amplo espectro. Em geral, os microorganismos sensíveis são inibidos por concentrações de 5 a 10 µg/mL ou menos. As espécies Gram-negativas altamente sensíveis incluem *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus vulgaris*. Os microorganismos Gram-positivos que são inibidos incluem *Staphylococcus*

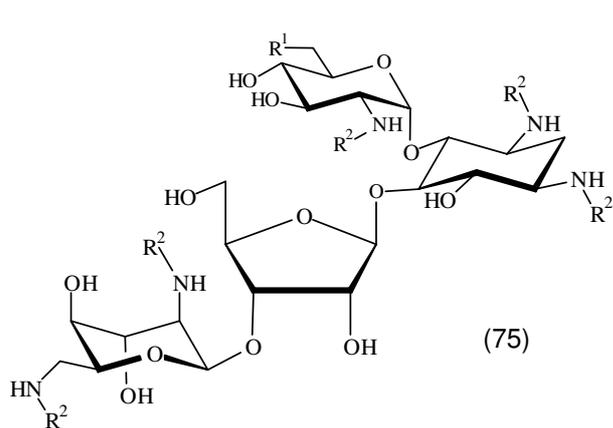
aureus e *Enterococcus faecalis* e *M.tuberculosis*. Cepas de *Pseud. Aeruginosa*. Mostraram-se resistentes a neomicina (GOODMAN E GILMAN, 1987).

Todos os aminoglicosídeos agem pelo mesmo mecanismo da ação, exercendo seu efeito bactericida ao se ligarem ao ribossomo bacteriano. Desta forma, é necessário que penetrem no interior da célula bacteriana para que possam agir. Isto ocorre por meio da interação do aminoglicosídeo com a superfície celular, o seu transporte por meio da membrana e, finalmente, o acoplamento com o ribossomo (OLIVEIRA, 2006).

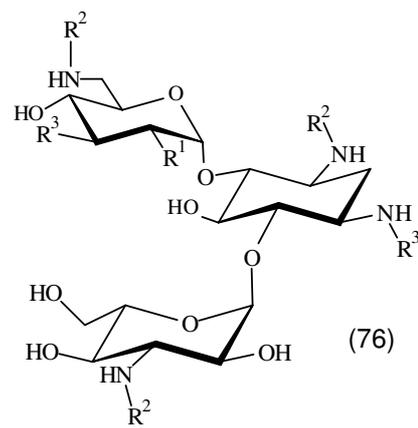
Dentre as drogas nefrotóxicas precursoras da insuficiência renal aguda temos os aminoglicosídeos (gentamicina, tobramicina, neomicina, amicacina, netilmicina), com elevada incidência, atingindo aproximadamente 20% dos pacientes submetidos a essa terapêutica, podendo chegar a níveis alarmantes de 50% em terapias instituídas por mais de duas semanas (OLIVEIRA, 2001).

Os aminoglicosídeos podem causar deficiência auditiva, podendo ser tanto cocleotóxicos como vestibulotóxicos. A estreptomicina, o primeiro aminoglicosídeo usado clinicamente, foi reconhecido muito cedo como sendo um agente vestibulotóxico. Devido a estes efeitos adversos, um análogo clínico foi desenvolvido, a dihidroestreptomicina. Infelizmente, este antibiótico mostrou-se significativamente cocleotóxico e pouco depois foi retirado do uso clínico. Mais tarde, a neomicina foi desenvolvida, no entanto, este aminoglicosídeo também provou ser cocleotóxico (MATZ, 2004).

Recentemente Tor e colaboradores sintetizaram guanidinoglicosídeos a partir da transformação de grupos aminoácido de vários aminoglicosídeos disponíveis (75) comercialmente em grupos guanidina (76) (figura 41, pág. 37). Os aminoglicosídeos incorporados a função guanidina apresentaram atividade anti-HIV-1 superior do que os seus homólogos não modificados (HUI,2002). O método proposto tem como desvantagem o fato de envolver diversas etapas para introduzir o grupo guanidina nos aminoglicosídeos.



$R^1 = \text{OH}$, $R^2 = (\text{C}=\text{NH})\text{NH}_2$, Guanidino-paramomicina
 $R^1 = \text{NH}(\text{C}=\text{NH})\text{NH}_2$, $R^2 = (\text{C}=\text{NH})\text{NH}_2$, Guanidino-neomicina B



$R^1 = \text{OH}$, $R^2 = (\text{C}=\text{NH})\text{NH}_2$, $R^3 = \text{OH}$, Guanidino-kanamicina A
 $R^1 = \text{NH}(\text{C}=\text{NH})\text{NH}_2$, $R^2 = (\text{C}=\text{NH})\text{NH}_2$, $R^3 = \text{OH}$, Guanidino-kanamicina B
 $R^1 = \text{NH}(\text{C}=\text{NH})\text{NH}_2$, $R^2 = (\text{C}=\text{NH})\text{NH}_2$, $R^3 = \text{H}$, Guanidino-tobramicina

Figura 41– Aminoglicosídeos guanilados.

3 - OBJETIVOS

3.1 – OBJETIVOS GERAIS

- Modificar a estrutura dos compostos poli-hidroxilados de interesse: quitosana, quitosana com sal de amônio quaternário, cloridrato de glicosamina, neomicina, e glicina, visando aplicação de reações clássicas da síntese orgânica como substituição nucleofílica, desacetilação e guanidilação.

3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar reações de guanidilação em moléculas contendo grupos e amino (-NH₂) como: quitosana, quitosana com sal de amônio quaternário, cloridrato de glicosamina, neomicina, e glicina.
- Testar a eficiência do reagente guanilante monoclórato de 1-H-1,2,4 triazol-carboxamida frente a compostos poli-hidroxilados.
- Caracterizar os materiais de partida e os derivados guanilados por espectroscopia na região do infravermelho e por ressonância magnética nuclear ¹³C e ¹H.

3.3 - JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

- A proposta do presente trabalho é realizar modificações estruturais em compostos poli-hidroxilados que apresentam grupos amino reativos (-NH₂) como a quitosana, seus derivados contendo sal de amônio quaternário e neomicina. Estas substâncias serão modificadas pela introdução de grupos guanidínicos no lugar dos grupos amino livres.
- A justificativa de introduzir grupos guanidínicos nos compostos poli-hidroxilados se deve ao fato do agrupamento guanidina estar presente em muitos compostos biologicamente ativos, onde desempenha um papel principal na bioquímica de reconhecimento e catalise. A introdução do grupo guanidina na quitosana provavelmente aumentará a solubilidade, incrementando sua atividade biológica.

4 - SEÇÃO EXPERIMENTAL

4.1 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1 - PROCEDIMENTO GERAL

A agitação do meio reacional foi efetuada através de barra magnética recoberta com teflon.

A remoção dos solventes foi realizada em evaporador rotativo Fisatom, submetendo-se o material resultante a um sistema acoplado à bomba de alto vácuo para remoção do solvente residual.

4.1.2 - REAGENTES E SOLVENTES

A maioria dos reagentes e solventes de grau P. A. foi utilizada sem prévia purificação.

O material de partida utilizado no trabalho foi a quitosana de baixo peso molecular da Sigma-Aldrich.

O reagente guanidinilante utilizado foi o monoclórídrico de 1-H-1,2,4-Triazol-1-carboxamida da Fluka, com grau de pureza de 98%.

Os solventes utilizados para solubilizar as amostras submetidas a técnica de ressonância magnética nuclear foi uma solução a 2% de D₂O/DCl, preparada a partir do óxido de deutério da Cambridge Isotope Laboratories e Cloreto de deutério, 35% da Sigma-Aldrich.

4.1.3 - DADOS FÍSICOS

Os espectros de infravermelho (IV) foram obtidos em Espectômetro da SHIMADZU utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr), os valores para as absorções foram referidos em número de onda, utilizando como unidade o centímetro recíproco (cm⁻¹).

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos em espectômetro JEOL Eclipse+ de 9,4T e com radio frequência de 400 MHz para o RMN de ¹H e 100 MHz ¹³C. As amostras foram solubilizadas em D₂O e solução a 2% de D₂O/DCl. Os deslocamentos químicos (δ) foram apresentados em parte por milhão (ppm).

4.2- OBTENÇÃO DOS MATERIAIS DE PARTIDA

4.2.1 - ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DA QUITINA

A casca do camarão-sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) foi obtida junto a processadores destes crustáceos na região de Campos dos Goytacazes. As cascas foram lavadas em água corrente, e secas ao sol durante uma semana. Em seguida, foram moídas e peneiradas. A fração em pó foi utilizada no processo de extração que envolveu um tratamento com ácido clorídrico, para desmineralização, um tratamento com hidróxido de sódio, para promover a desproteínização, seguido do tratamento com peróxido de hidrogênio para remoção de pigmentos (CANELLA; GARCIA, 2001).

- Desmineralização – A casca do camarão foi tratada com solução de ácido clorídrico (HCl) 1,5 mol/L, em um bécker, sob agitação por 2 horas à temperatura ambiente. A relação sólido-líquido utilizada foi de 1:15 (m/v); A casca desmineralizada obtida foi filtrada à vácuo em funil de placa sinterizada e lavada com água destilada em abundância.
- Desproteínização – Às cascas desmineralizadas foram transferidas para um balão de fundo redondo e adicionado solução de hidróxido de sódio (NaOH) 4% a uma relação sólido-líquido 1:10 (m/v). O sistema foi mantido sob agitação e refluxo a 80°C em atmosfera inerte por 2 horas. A quitina obtida foi filtrada à vácuo em funil de placa sinterizada e lavada com água destilada.
- Despigmentação - A quitina obtida foi despigmentada com solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 0.5-3% até total suspensão da mesma, a temperatura ambiente, sob agitação durante 24 horas.

4.2.2- OBTENÇÃO DO CLORIDRATO DE GLICOSAMINA

Efetuuou-se a hidrólise ácida de 9,8 g de quitina (58) por tratamento com 50 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado (12 mol/L) (figura 42, pág. 41). A reação foi mantida sob refluxo em banho de óleo a temperatura de 100 °C, durante 1 hora. Após o refluxo adicionou-se uma pequena quantidade de água destilada e carvão ativo. A reação permaneceu em agitação por mais 1 hora a temperatura

de 60 °C. Efetuou-se a filtração, e o filtrado foi concentrado. Os cristais obtidos foram lavados com álcool absoluto 94 %.

O produto obtido (77) foi caracterizado por espectroscopia na região do infravermelho e por ressonância magnética nuclear ^{13}C e ^1H .

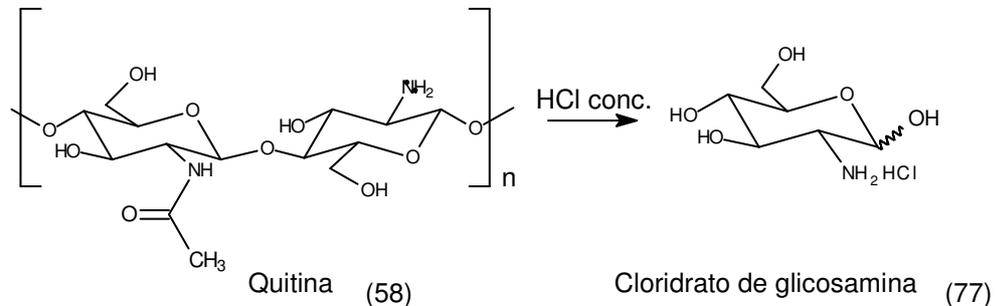


Figura 42 – Obtenção do cloridrato de glicosamina.

4.2.3 – OBTENÇÃO DA QUITOSANA

Em um balão de fundo redondo adaptado a um condensador de refluxo, tratou-se 10 g de quitina (58) com 1,07 g de borohidreto de sódio (NaBH_4) e 80 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 50%, o sistema foi mantido sob agitação constante, durante 1 hora a temperatura ambiente (figura 43). Durante as 4 horas seguintes, a reação foi aquecida em banho de óleo à temperatura de 120 °C, em atmosfera de argônio. Ao final deste tempo, o produto obtido foi resfriado, lavado com água destilada e filtrado a vácuo. O sólido foi seco em estufa a 100 °C por 24 horas. O rendimento da reação foi de 86% e a massa de quitosana obtida foi de 8,6 g.

O produto obtido (57) foi caracterizado por espectroscopia no infravermelho e por ressonância magnética nuclear ^{13}C e ^1H .

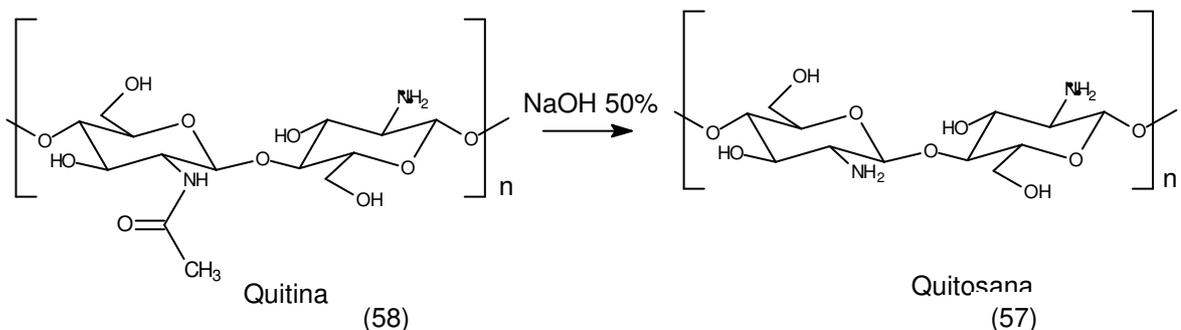


Figura 43 – Reação de desacetilação da quitina.

4.2.4 – OBTENÇÃO DO CLORETO DE N-[(2-HIDROXI-3-TRIMETILAMÔNIO) PROPIL] QUITOSANA

1,0 g de quitosana (57), previamente desacetilada, foi dispersada em 10 mL de água destilada a 85°C e adicionado 1,8 mL de cloreto de (2,3-epoxipropil) trimetil amônio (GTMAC) (78) em 3 partes de 0,6 mL num intervalo de 2 em 2 horas; após esse tempo, o sistema foi mantido sob refluxo por 10 horas (figura 44). Foi adicionado 33 mL de acetona sob a solução amarelada sob agitação e mantida na geladeira por uma noite. O produto em forma de gel foi decantado e recolhido por filtração a vácuo. O gel obtido foi dissolvido em 50 mL de metanol e precipitado com solução com a adição de 50 mL de solução de acetona/etanol na proporção 4:1. Posteriormente o sal de quitosana foi filtrado, seco e purificado por lavagem com etanol a quente usando um extrator Soxhlet por 24 horas. Por fim o produto foi seco a 70 °C durante uma noite.

O produto obtido (79) foi caracterizado por espectroscopia na região do infravermelho e por ressonância magnética nuclear ^{13}C e ^1H .

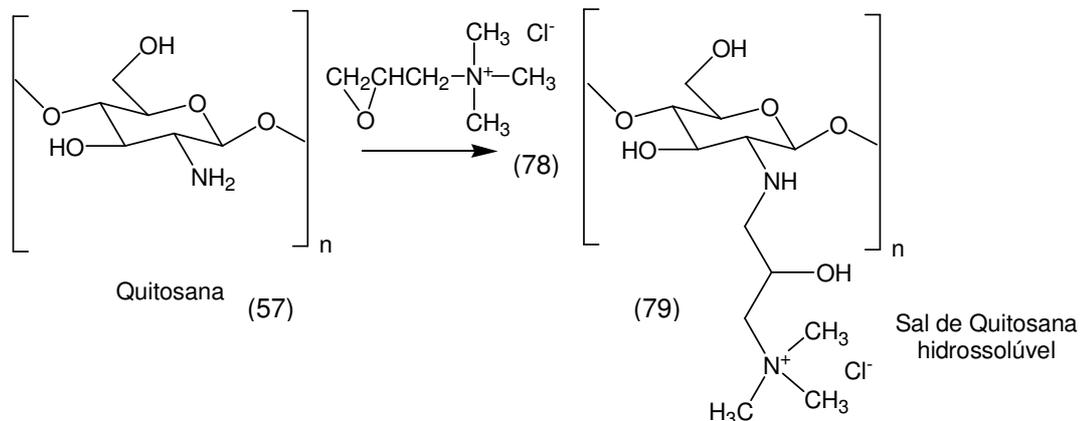


Figura 44 - Formação da quitosana contendo sal de amônio quaternário.

4.3 – REAÇÕES DE GUANIDILAÇÃO

4.3.1– GUANIDILAÇÃO DA GLICINA

Em um balão de fundo redondo foram misturados 75 mg de glicina (80) (1 mmol) com 147,5 mg de cloridrato de 1-H-1,2,4-triazol-carboximidina (81) (1 mmol) e 1 mL de solução aquosa de carbonato de sódio 1mol/L (Na_2CO_3) (figura 45, pág. 43). A solução foi agitada durante 3 horas a temperatura ambiente, sendo formado um precipitado branco na solução. O sólido obtido foi filtrado a vácuo e

lavado com pequenas porções de solução de MeOH/H₂O (1: 1) e seco. Foram obtidos 74,4 mg de produto, com rendimento de 99%.

O produto obtido (82) foi caracterizado por espectroscopia na no infravermelho e por ressonância magnética nuclear ¹³C e ¹H .

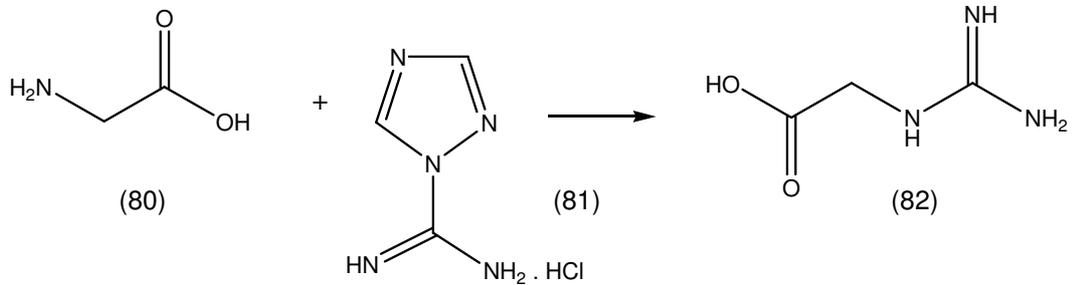


Figura 45 - Reação de guanidilação da glicina com com cloridrato de 1-H-1,2,4-triazol-carboxamidina.

4.3.2 - GUANIDILAÇÃO DO CLORIDRATO DE GLICOSAMINA COM CLORIDRATO DE 1-H-1,2,4-TRIAZOL-CARBOXAMIDINA

Uma mistura contendo 0,20 g de cloridrato de glicosamina (77) (1,0 mmol), cloridrato de 1-H-1,2,4-triazol-carboxamidina (81) (0,15 g, 1,0 mmol) e 1,0 mL de solução de carbonato de sódio 1,0 MolL⁻¹ (Na₂CO₃) foi agitada durante 24 horas em temperatura ambiente (figura 46). O sólido obtido (83) foi filtrado a vácuo e lavado com pequenas porções de solução de MeOH/H₂O (1: 1) e seco em dessecador.

O procedimento foi repetido refluxando a solução a 85°C. O sólido branco obtido foi novamente filtrado, sendo recolhida uma massa de produto 0,18 g. O produto da reação foi caracterizado por espectroscopia na no infravermelho e por ressonância magnética nuclear ¹³C e ¹H.

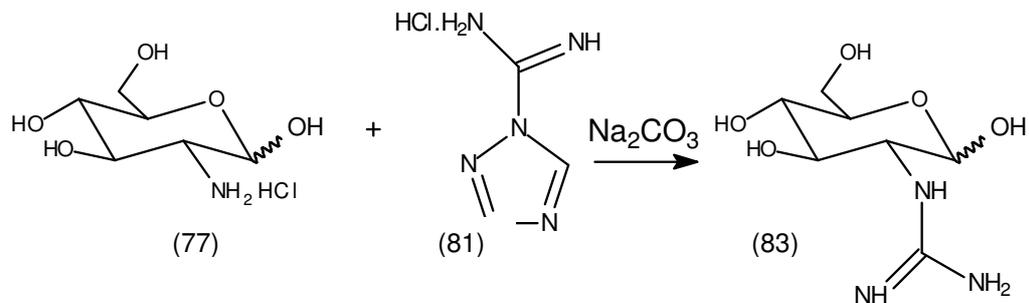


Figura 46 – Guanidilação do cloridrato de glicosamina com cloridrato de 1-H-1,2,4-triazol-carboxamidina.

4.3.3 - GUANIDILAÇÃO DA QUITOSANA COM CLORIDRATO DE 1-H-1,2,4-TRIAZOL-CARBOXAMIDINA

Misturou-se a quitosana (57) (1,0 mmol) o cloridrato de 1-H-1,2,4-triazol-carboxamidina (81) (1,0 mmol) e 1,0 mL de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) $1,0 \text{ MolL}^{-1}$. A solução foi agitada durante 24 horas em temperatura ambiente (figura 47). Completado o tempo da reação, o sólido obtido foi filtrado a vácuo lavando com pequenas porções de solução de $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1: 1) e seco a temperatura ambiente.

O procedimento foi repetido refluxando a solução a 85°C .

O produto obtido (84) foi caracterizado por espectroscopia na região do infravermelho e por ressonância magnética nuclear ^{13}C e ^1H .

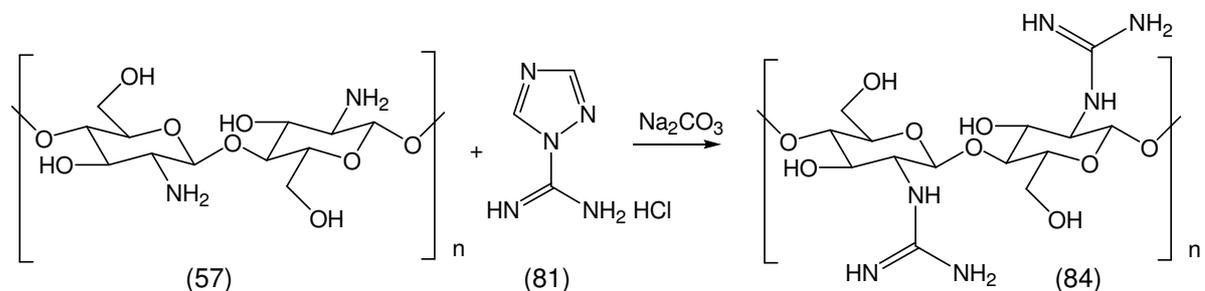


Figura 47 - Reação de guanidilação da quitosana com cloridrato de 1-H-1,2,4-triazol-carboxamidina.

4.3.4 – GUANIDILAÇÃO DO CLORETO DE N-[(2-HIDROXI-3-TRIMETILAMÔNIO) PROPIL] QUITOSANA COM CLORIDRATO DE 1-H-1,2,4-TRIAZOL-CARBOXAMIDINA

▪ Metodologia 1

Foram dispersadas em 10 mL de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) $1,0 \text{ molL}^{-1}$, 500 mg de cloreto de N-[(2-hidroxi-3-trimetilamônio) propil] quitosana (79), obtida no item 4.2.4 (pág. 42) e 1 g (0,0134 mol) de cloridrato de 1-H-1,2,4-triazol-carboxamidina (81) em um balão de fundo redondo adaptado a um condensador de refluxo (figura 48, pág. 45). O sistema foi mantido sob refluxo a 85°C por 24 horas. Foi adicionado 33 mL de acetona na solução amarelada sob agitação. A mistura foi mantida na geladeira por uma noite. O produto obtido na forma de gel foi decantado e recolhido por filtração a vácuo sendo dissolvido em 50 mL de metanol. A produto foi precipitado da solução com a adição de 50 mL de solução de acetona/etanol na proporção 4:1. Posteriormente o sal de quitosana obtido (85) foi filtrado, seco e purificado por lavagem com etanol a

quente usando um extrator Soxhlet por 24 horas. Por fim o produto foi seco a 70 °C em estufa durante uma noite. Posteriormente o produto obtido foi caracterizado por espectroscopia na região do infravermelho e por ressonância magnética nuclear ^{13}C e ^1H .

▪ Metodologia 2

500 mg de quitosana (57) previamente desacetilada foi dispersada em 10 mL de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) $1,0 \text{ MolL}^{-1}$, juntamente com 1 g (0,0134 mol) de cloridrato de 1-H-1,2,4-triazol-carboxamida (81) e 0,3 mL (0,0022 mol) de Cloreto de (2,3-epoxipropil) timetilamônio (GTMAC) (78) em um balão de fundo redondo adaptado a um condensador de refluxo (figura 48). O sistema foi mantido sob refluxo a 85 °C por 24 horas. Foi adicionado 33 mL de acetona sob agitação e mantida na geladeira por uma noite. O polímero branco (85) obtido não foi solúvel em metanol e portanto foi filtrado, seco a temperatura ambiente e purificado por lavagem com etanol a quente usando um extrator Soxhlet por 24 horas. Por fim o produto foi seco a 70 °C durante uma noite. Posteriormente o produto obtido foi caracterizado por espectroscopia na região do infravermelho e por ressonância magnética nuclear ^{13}C e ^1H .

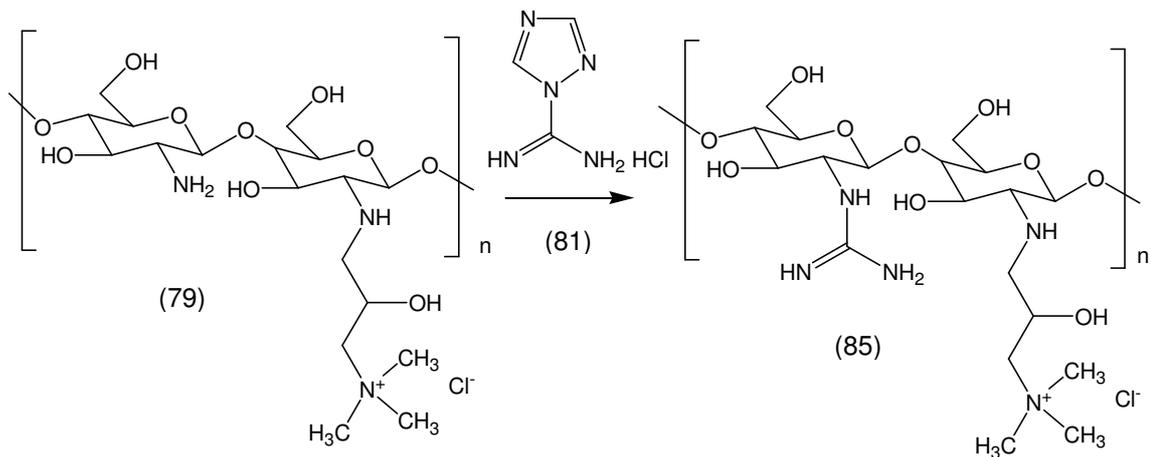


Figura 48 – Reação de guanidilação do sal de quitosana.

4.3.5 - GUANIDILAÇÃO DA NEOMICINA

Em um becker contendo 500 mg de sulfato de neomicina (74) foi adicionado 240 mg de hidróxido de sódio (NaOH) solubilizados em 10 mL de solução etanol/água na proporção 1:1, levando a formação de 265 mg de neomicina na

forma de base livre. A neomicina foi recolhida por filtração simples e transferida para um balão de fundo redondo onde foi solubilizada em 2,5 mL de solução aquosa de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 1 mol/L seguida da adição 383 mg de cloridrato de 1-H-1,2,4-triazol-carboxamidina (81) (figura 49). A solução foi mantida sob agitação constante a temperatura ambiente por 24 horas. O produto obtido (86) foi filtrado a vácuo, lavado com etanol e seco a temperatura ambiente e posteriormente caracterizado por espectroscopia na região do infravermelho e por ressonância magnética nuclear ^{13}C e ^1H .

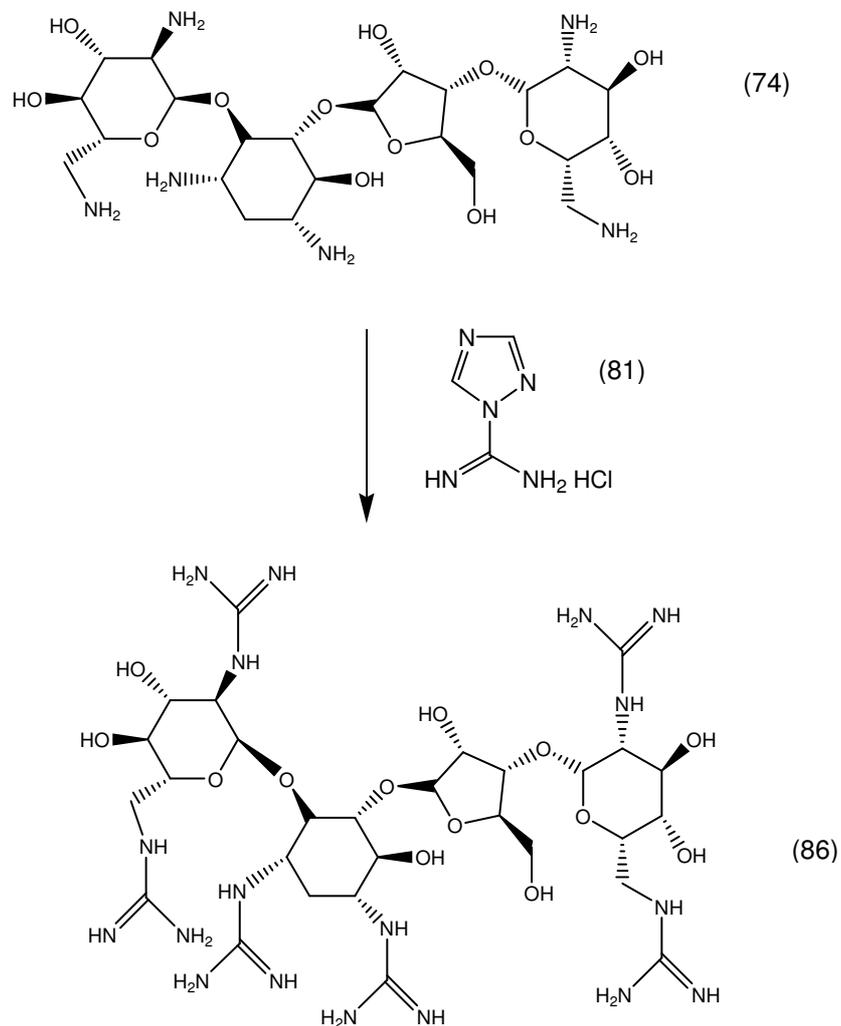


Figura 49 - Reação de guanidilação da neomicina.

5 - RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 - OBTENÇÃO DOS MATERIAIS DE PARTIDA

O método escolhido para remover os minerais, proteínas e pigmentos se encontram firmemente associados com a matriz polimérica de quitina na casca do camarão foi baseado na metodologia descrita por Leite e colaboradores para obter a quitina e o cloridrato de glicosamina.

5.1.1 – ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DA QUITINA

A quitina foi obtida da casca do camarão-sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) através da desmineralização com solução aquosa de ácido clorídrico $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$ e desproteinação com solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH) 4% (m/v), apresentando-se na forma de flocos com coloração branco rosado. O rendimento da reação foi de 86%.

A quitina extraída foi caracterizada por espectroscopia na região do infravermelho, apresentando bandas na região de 3483 cm^{-1} característica da ligação O-H, 3267 cm^{-1} de ligação N-H, 2960 cm^{-1} e 2879 cm^{-1} da ligação C-H, 1654 cm^{-1} característico da ligação C-N da amida, 1560 cm^{-1} da ligação C-N do grupo $-\text{NH}_2$, 1315 cm^{-1} (Amida III), 1157 cm^{-1} da tenção assimétrica do da ligação C-O-C, 1074 cm^{-1} e 1027 cm^{-1} das vibrações característica de estrutura piranósica (figura 50, pág. 48).

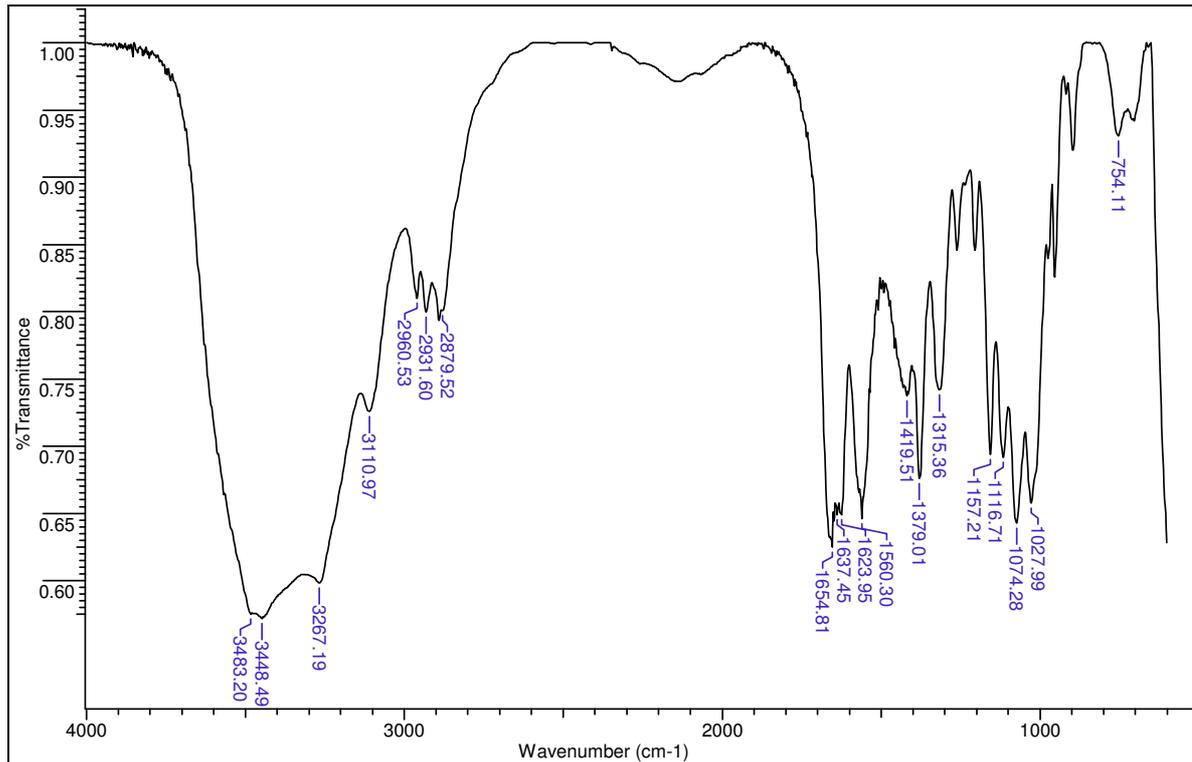


Figura 50 – Espectro de infravermelho da quitina.

Devido a insolubilidade da quitina em solventes orgânicos e em água, o espectro de RMN ^{13}C e ^1H não foi realizado.

5.1.2 – OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO CLORIDRATO DE GLICOSAMINA

O cloridrato de glicosamina foi obtido pela hidrólise ácida da quitina e purificada por recristalização com água e metanol a quente, sendo obtidos cristais brancos. O rendimento da reação foi de 65%.

A clivagem da ligação glicosídica pode ocorrer por dois mecanismos principais $\text{S}_{\text{N}}2$, relacionada à substituição nucleofílica direta por molécula de água no carbono anomérico C_1 da piranose, ou pelo mecanismo $\text{S}_{\text{N}}1$, sendo o primeiro mecanismo menos comum.

Pelo mecanismo $\text{S}_{\text{N}}1$, a hidrólise ácida da quitina (58) inicia-se com a protonação do oxigênio glicosídico com posterior quebra da ligação $\text{C}_1\text{-O}$. Ocorre a geração de um carbocátion (87) no estado de transição, que nesta etapa é estabilizado pela deslocalização do par de elétrons existente sobre o oxigênio do anel glicosídico, adjacente a C_1 formando o íon oxocarbênio (88). O estado de transição necessário para hidrólise da ligação glicosídica é caracterizado pela orientação pseudo-axial da ligação C-O a ser quebrada e conformação distorcida

“skew”. Com o ataque nucleofílico da água sobre C₁ ocorre a formação da glicosamina (77), como uma mistura de anômeros, encerrando a etapa de despolimerização (figura 51).

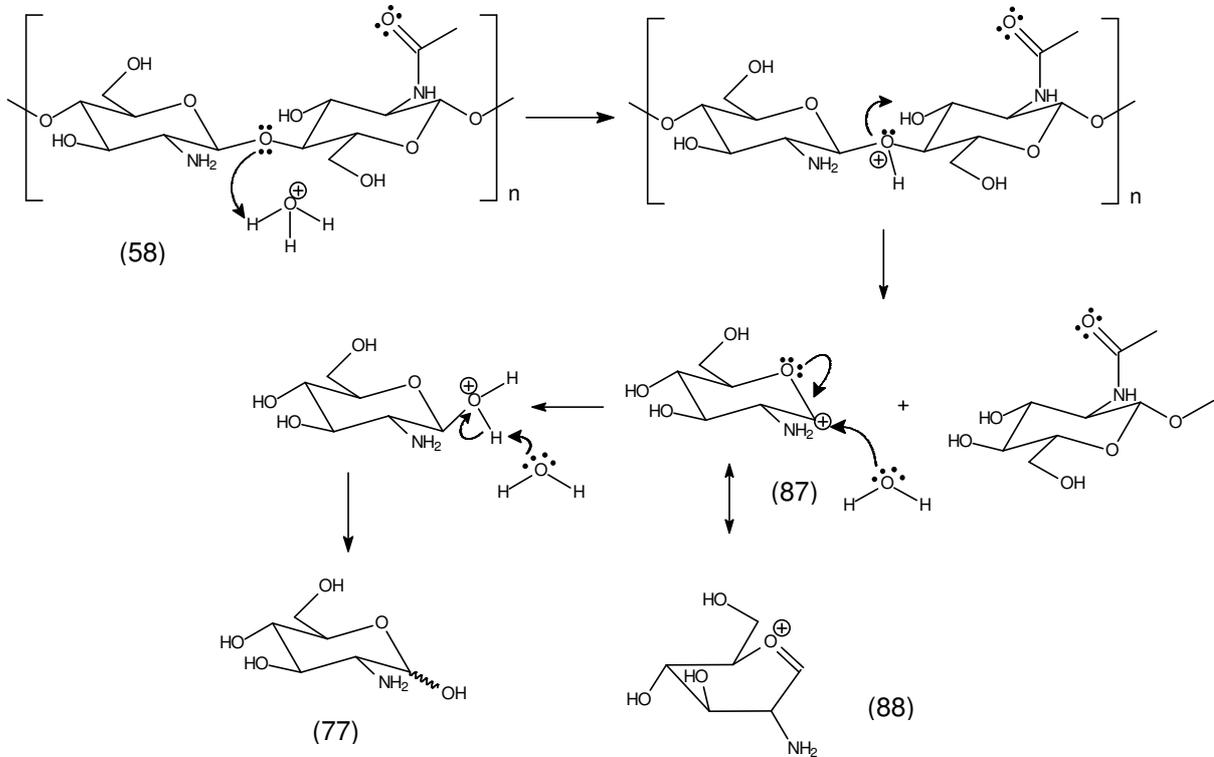


Figura 51 – Mecanismo SN₁ para a obtenção da glicosamina a partir da quitina.

A conversão da porção amida da quitina em amina se dá sob as condições de aquecimento e meio aquoso ácido. A reação de hidrólise ácida ocorre pela adição nucleofílica de água à amida protonada, seguida pelo despreendimento da amina, formando o cloridrato de glicosamina (figura 52, pág. 50).

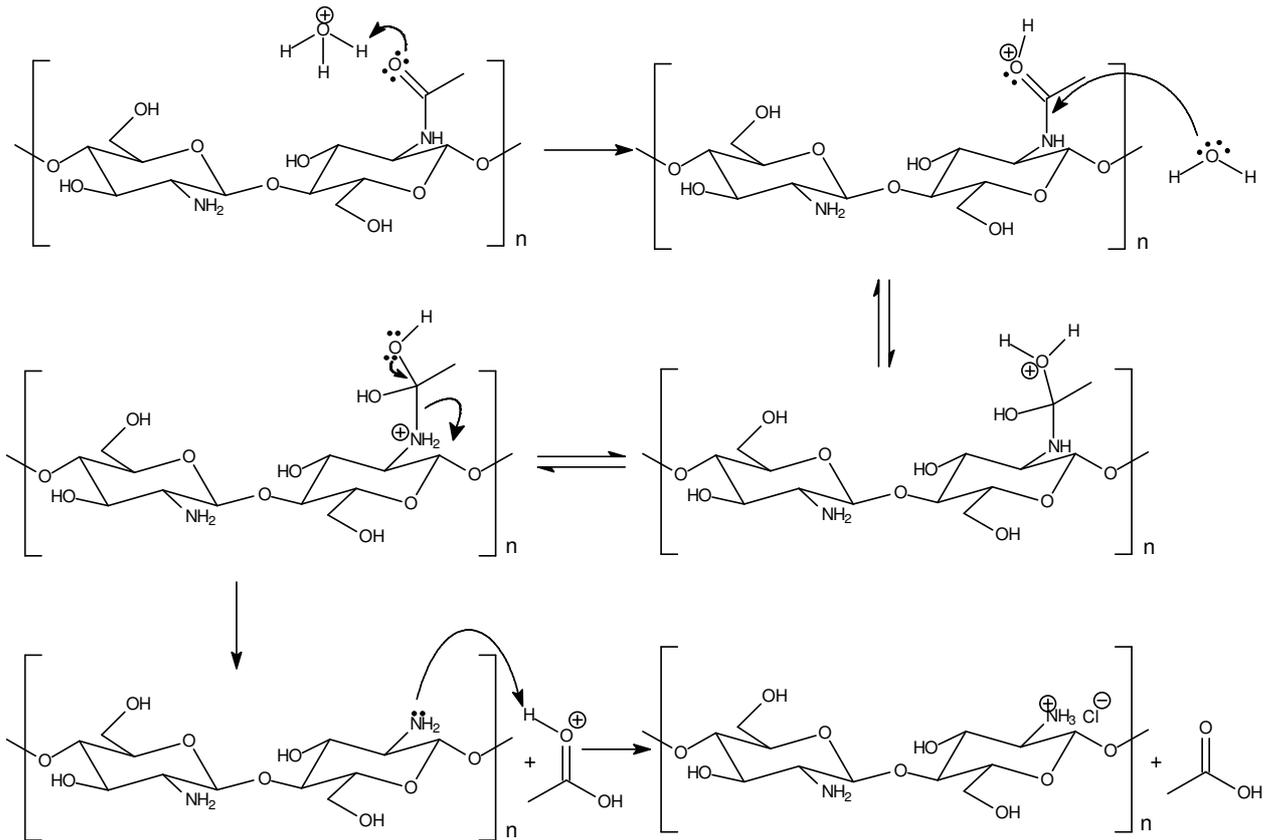


Figura 52 – Hidrólise da porção amida da quitina em meio ácido.

O espectro de infravermelho do produto da hidrólise da quitina obtido, apresenta forte e larga absorção na região de 3300 e 3294 cm^{-1} resultante da superposição das bandas de deformação axial de O-H e NH_3^+ , uma banda fraca de deformação angular assimétrica de NH_3^+ em 1616 cm^{-1} e uma banda relativamente forte de deformação angular simétrica de NH_3^+ em 1535 cm^{-1} que comparados a dados da literatura assemelham-se a bandas características do cloridrato de glicosamina (figura 53, pág. 51).

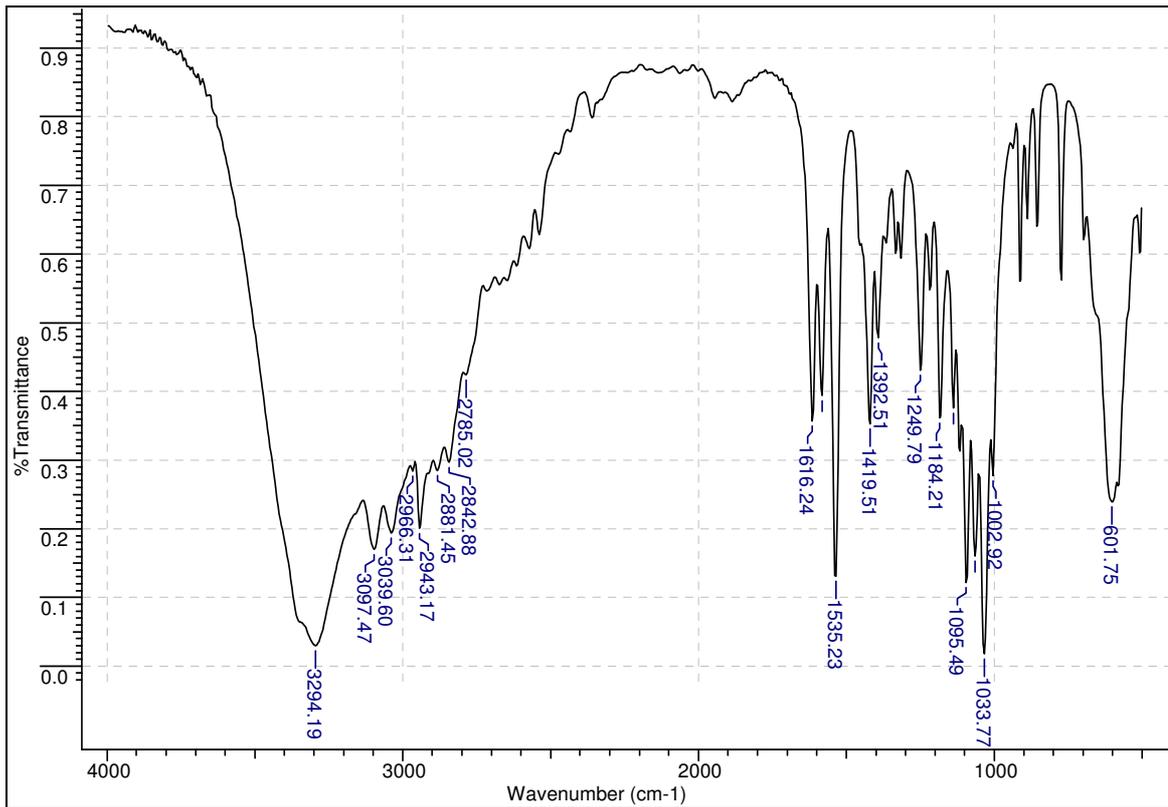


Figura 53 – Espectro de absorção na região do infravermelho do cloridrato de glicosamina.

O cloridrato de glicosamina obtido foi submetido a análise de RMN de ^1H e ^{13}C .

O espectro de RMN ^1H do cloridrato de glicosamina (figura 54, pág. 52) apresentou sinais entre 2,9 ppm e 3,2 ppm correspondem ao hidrogênio ligado ao carbono C_2 do anel de glicosamina, os sinais sobrepostos entre 3,3 ppm a 4,0 ppm estão relacionados aos hidrogênios ligados aos carbonos C_3 , C_4 , C_5 e C_6 da glicopirranose. Os sinais duplos em 4,88 ppm ($J = 8$) e 5,37 ppm ($J = 4$) pertencem ao hidrogênio ligado ao carbono anomérico C_1 , dos anômeros β e α , respectivamente.

A maior intensidade do sinal em 5,37 ppm indica uma maior quantidade de moléculas de glicosamina na forma α que na forma β , embora a sobreposição do sinal da água possa interferir na visualização dos sinais e atrapalhar a integração dos sinais para melhores resultados. O maior número de moléculas na forma α se deve a maior estabilidade dessa forma anomérica, onde a hidroxila ligada ao carbono anomérico fica na conformação axial, o que possibilita a sua estabilização por ligações de hidrogênio. Além disso as repulsões entre os dipolos do heteroátomo e da hidroxila ligada ao carbono anomérico são

minimizadas na posição axial. Outro fator é o efeito de hiperconjugação do orbital p do oxigênio que também contribui para estabilização da forma anomérica α .

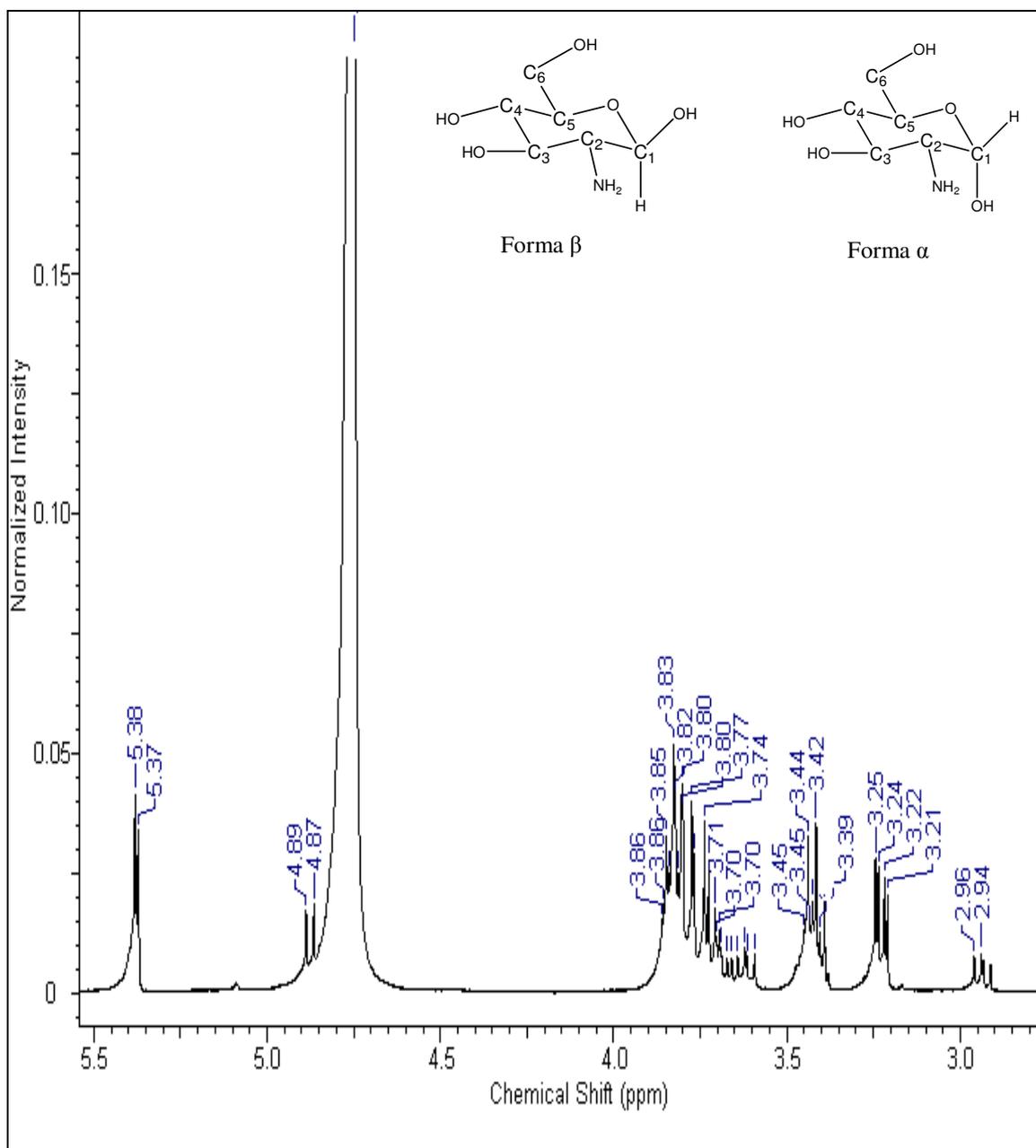


Fig. 54 - Espectro de ressonância magnética nuclear ^1H do cloridrato de glicosamina (D_2O).

O espectro de RMN ^{13}C (figura 55, pág. 53) apresentou sinais duplicados devido a presença das formas α e β da glicosamina. Os sinais em 92,7 ppm e 89,1 ppm são atribuídos aos carbonos anoméricos β e α , respectivamente. O deslocamento químico relativo ao carbono C_2 , ligado ao grupo NH_2 , ocorrem em 56,7 (anômero β) e em 54,2 ppm (anômero α). Os dois sinais em 60 ppm

correspondem ao metileno do carbono C₆, ligado ao grupo CH₂OH e os demais sinais correspondem aos carbonos da piranose.

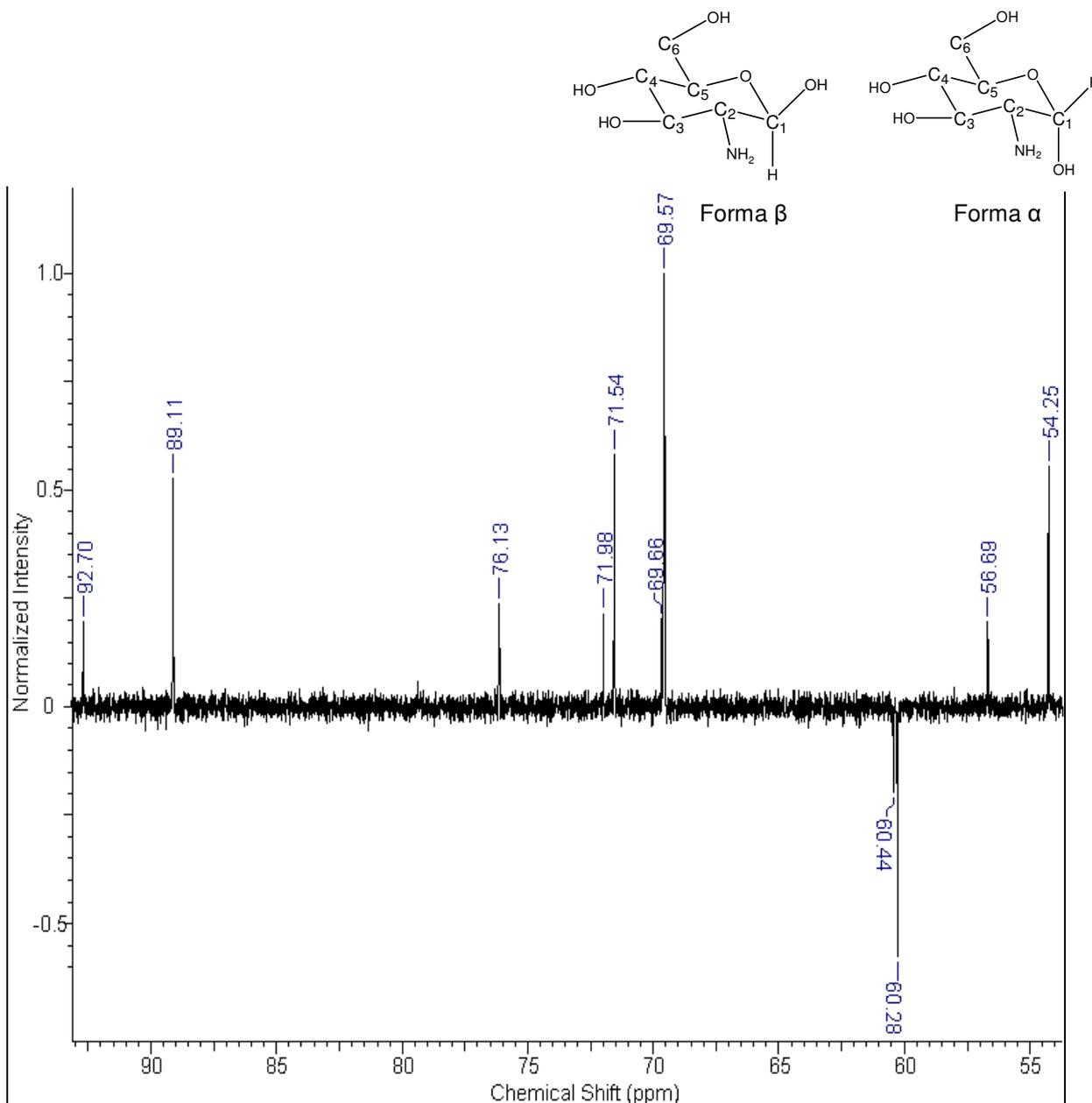


Figura 55 - Espectro de ressonância magnética nuclear-ATP ¹³C do cloridrato de glicosamina (D₂O).

5.1.3 – OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA

Neste trabalho foram utilizadas a quitosana comercial e a quitosana natural obtida pela desacetilação da quitina em meio alcalino.

A quitosana natural foi obtida na forma de flocos de coloração branco amarelado, com rendimento de 86%.

A diferença estrutural entre a quitina e a quitosana está na quantidade de grupos amino ($-NH_2$) presentes na estrutura desses polímeros. Os grupos acetanido ($-NHCOCH_3$) presentes em maior proporção na quitina podem ser convertidos em grupos amino através de hidrólise em meio aquoso ácido ou meio aquoso básico. Como as ligações glicosídicas dos polímeros também são suscetíveis a hidrólise ácida, que levaria a formação do monômero do polímero, foi realizada a hidrólise da amida em meio alcalino, utilizando solução aquosa de hidróxido de sódio a 50% (m/v). A hidrólise básica ocorre pela adição nucleofílica da hidroxila (OH^-) para o grupo carbonila da amida, seguida pela desprotonação do grupo hidroxila ($-OH$) e eliminação do grupo amino ($-NH_2$) (figura 56).

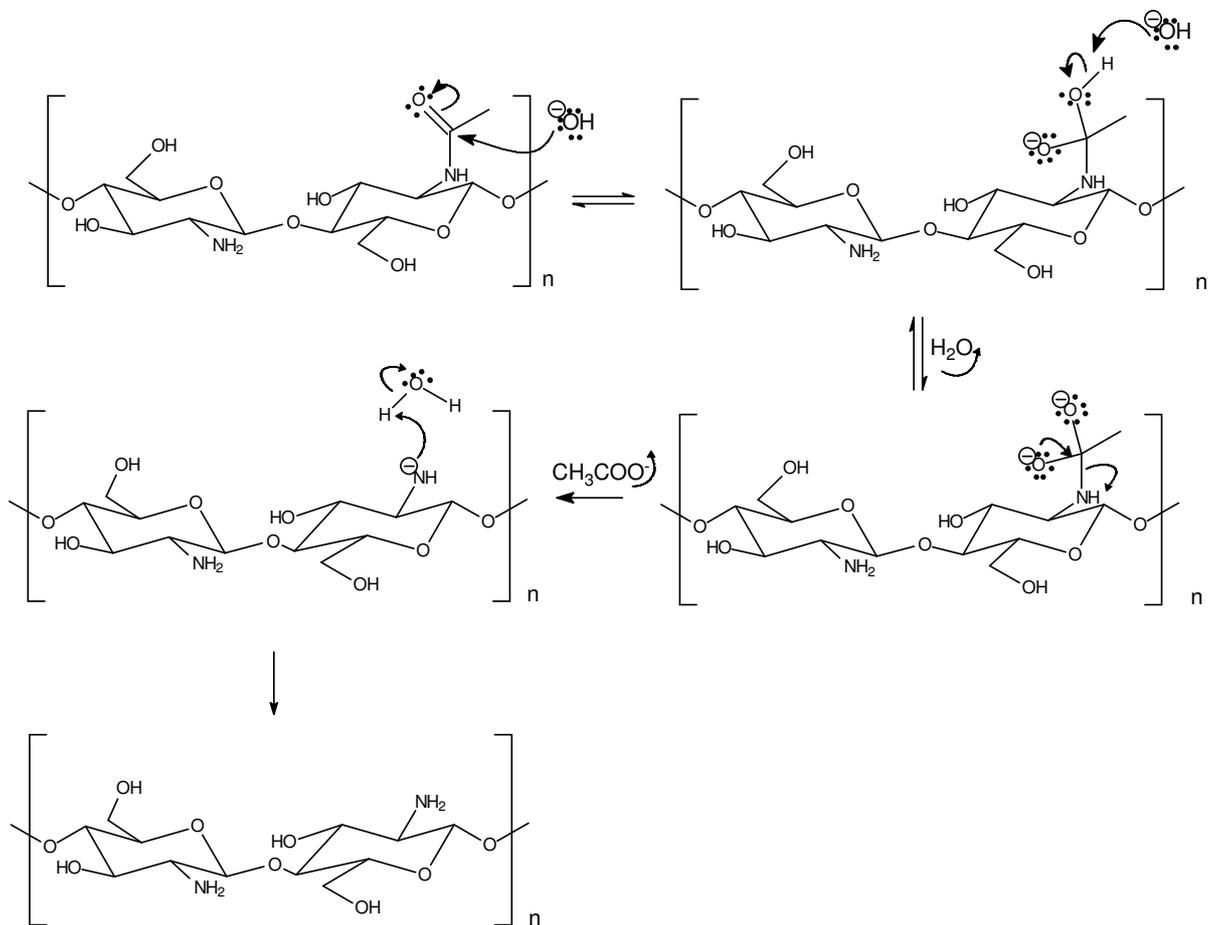


Figura 56 – Hidrólise básica da amida: conversão de quitina em quitosana.

A quitosana foi caracterizada por espectroscopia na região do infravermelho e por RMN ^{13}C e 1H .

No espectro de infravermelho da quitosana natural (figura 57, pág. 55), extraída da casca do camarão, pode ser destacada, além das bandas intensas entre 3452 a 3111 das ligações O-H e N-H. Vale a pena ressaltar a banda

intensa em 1654 cm^{-1} presentes no espectro da quitina estão reduzidas no espectro da quitosana, confirmando a hidrólise da função amida.

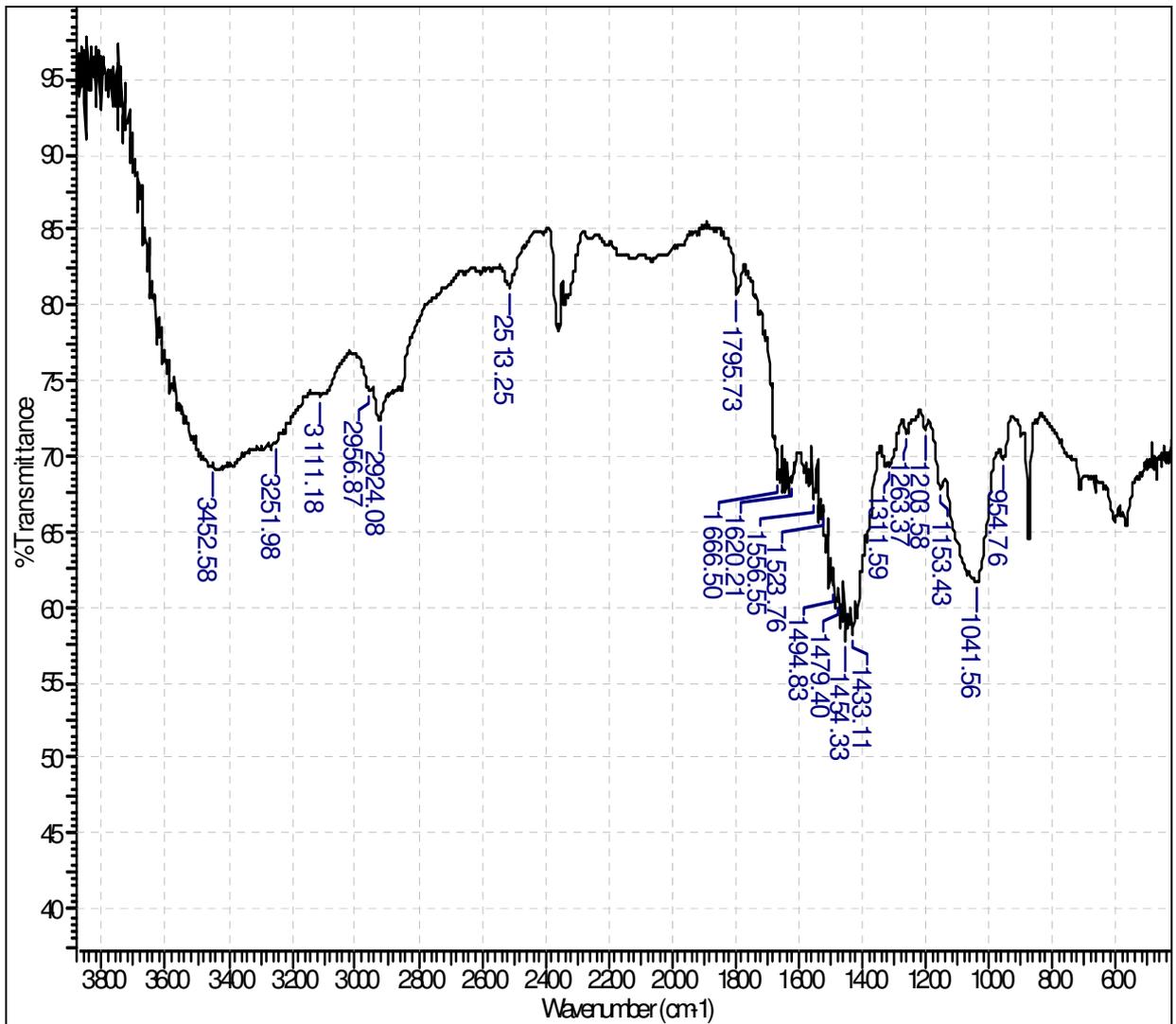


Figura 57 – Espectro de absorção na região do infravermelho da quitosana natural.

Na literatura são encontrados diversos trabalhos sobre a caracterização da quitosana por ressonância magnética nuclear ^{13}C e ^1H , entre outras técnicas. A discussão sobre os espectros de RMN ^{13}C e RMN ^1H foi baseada principalmente nos dados relatados nos trabalhos de Hudson (2004), Mao (2004) e Yoksan (2009).

O espectro de RMN ^1H (figura 58, pág. 56) mostra sinais com pouca resolução, os sinais são largos, entretanto é possível observar os sinais dos hidrogênios anoméricos a δ_{H} 5,2 ppm e outros sinais múltiplos relativos a quitosana.

Através da integração dos sinais do hidrogênio ligado a metila em 2,33 ppm ligadas aos grupos actamida que não sofreram hidrólise (I_{CH_3}) e da integração dos sinais dos outros hidrogênios da molécula ($I_{H_2-H_6}$) no espectro de RMN 1H da quitosana natural, podemos calcular o grau de acetilação (GA) pela fórmula:

$$GA = (I_{CH_3}/3) / (I_{H_2-H_6}/6)$$

O grau de acetilação calculado foi de 48 % para a quitosana natural.

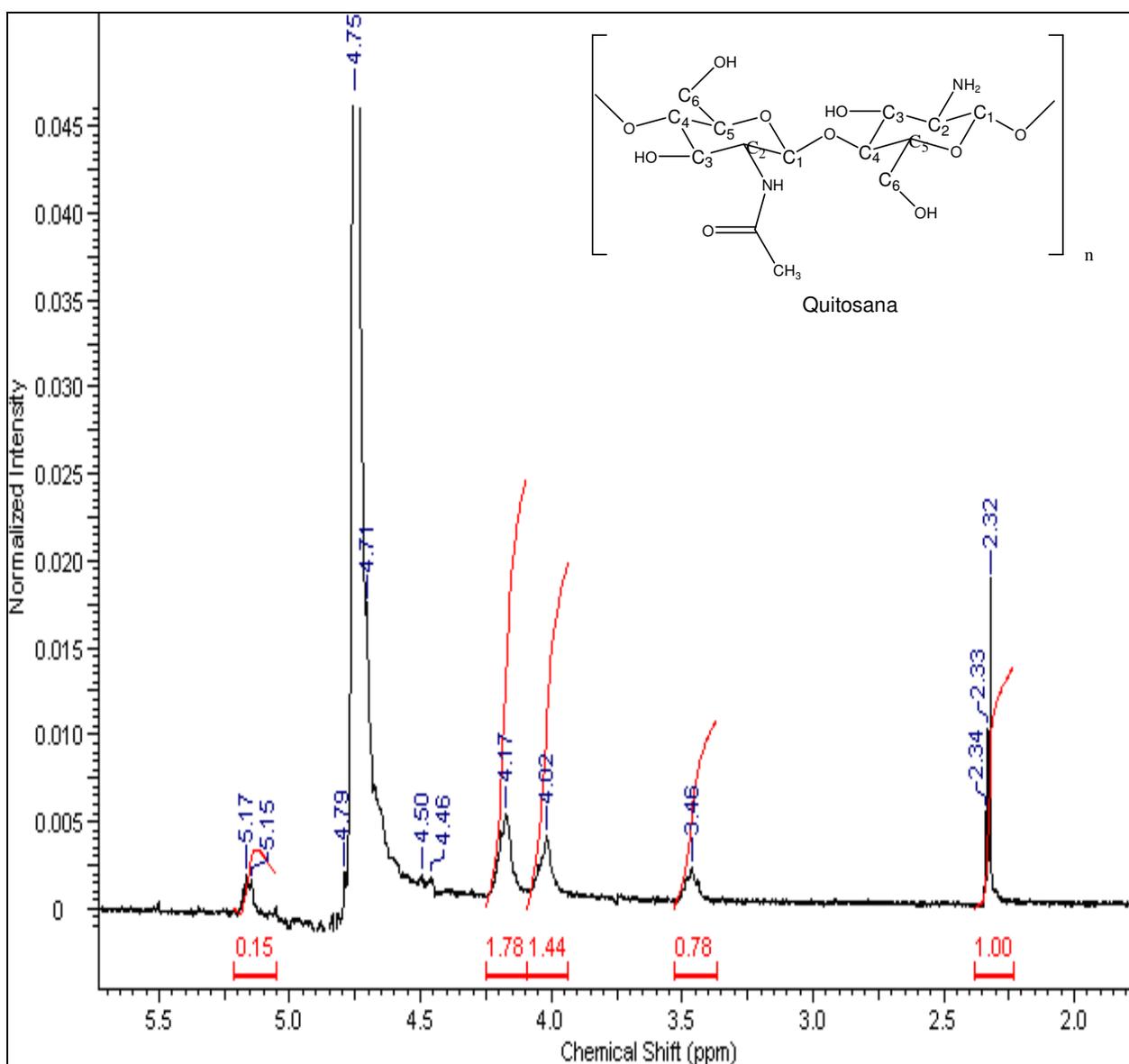


Figura 58 - Espectro de ressonância magnética nuclear 1H da quitosana natural (D_2O/DCI 2%).

No espectro de RMN ^{13}C da quitosana natural (figura 59), além dos sinais nas regiões características da quitosana, podemos observar que os sinais em 178 ppm do carbono da carbonila e 21 ppm de grupos metil, que correspondem aos grupos acetil (COCH_3) ligados ao carbono C2.

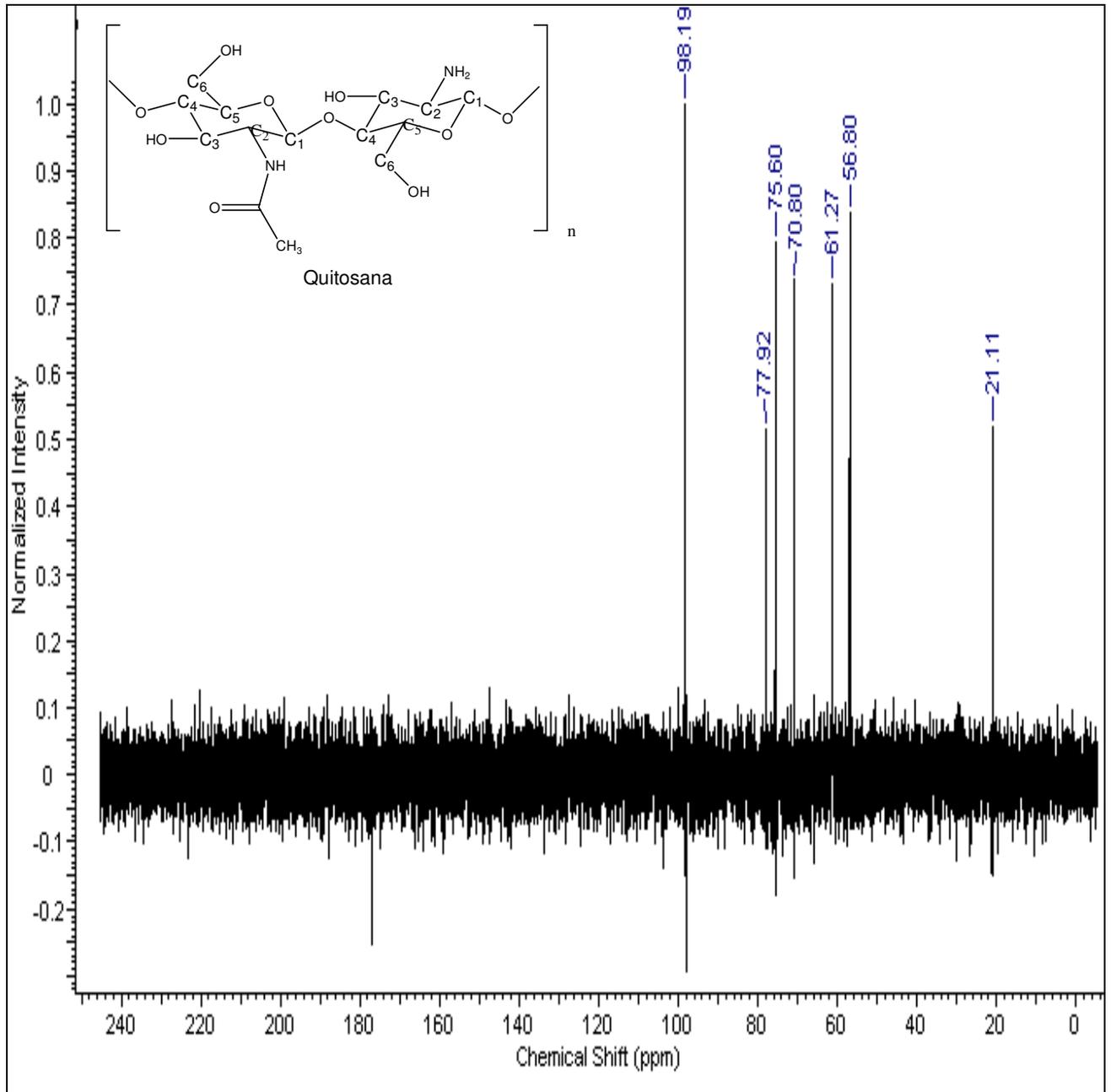


Figura 59 - Espectro de ressonância magnética nuclear ^{13}C da quitosana natural ($\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ 2%).

O espectro de RMN ^1H da quitosana comercial (figura 60) indica um sinal de baixa intensidade em 2,1 ppm, referente ao hidrogênio ligado ao carbono da metila do grupo acetil, indicando a presença de uma menor quantidade de grupos acetil na quitosana. O sinal em 4,9 ppm pertence ao hidrogênio ligado ao carbono anomérico, em 3,2 ppm o hidrogênio ligado ao carbono C2 que contém um grupo amino ligado. Os demais sinais pertencem ao anel da piranose.

Através da integração dos sinais no espectro de RMN ^1H da quitosana comercial foi calculado o grau de acetilação de 7 % para a quitosana comercial.

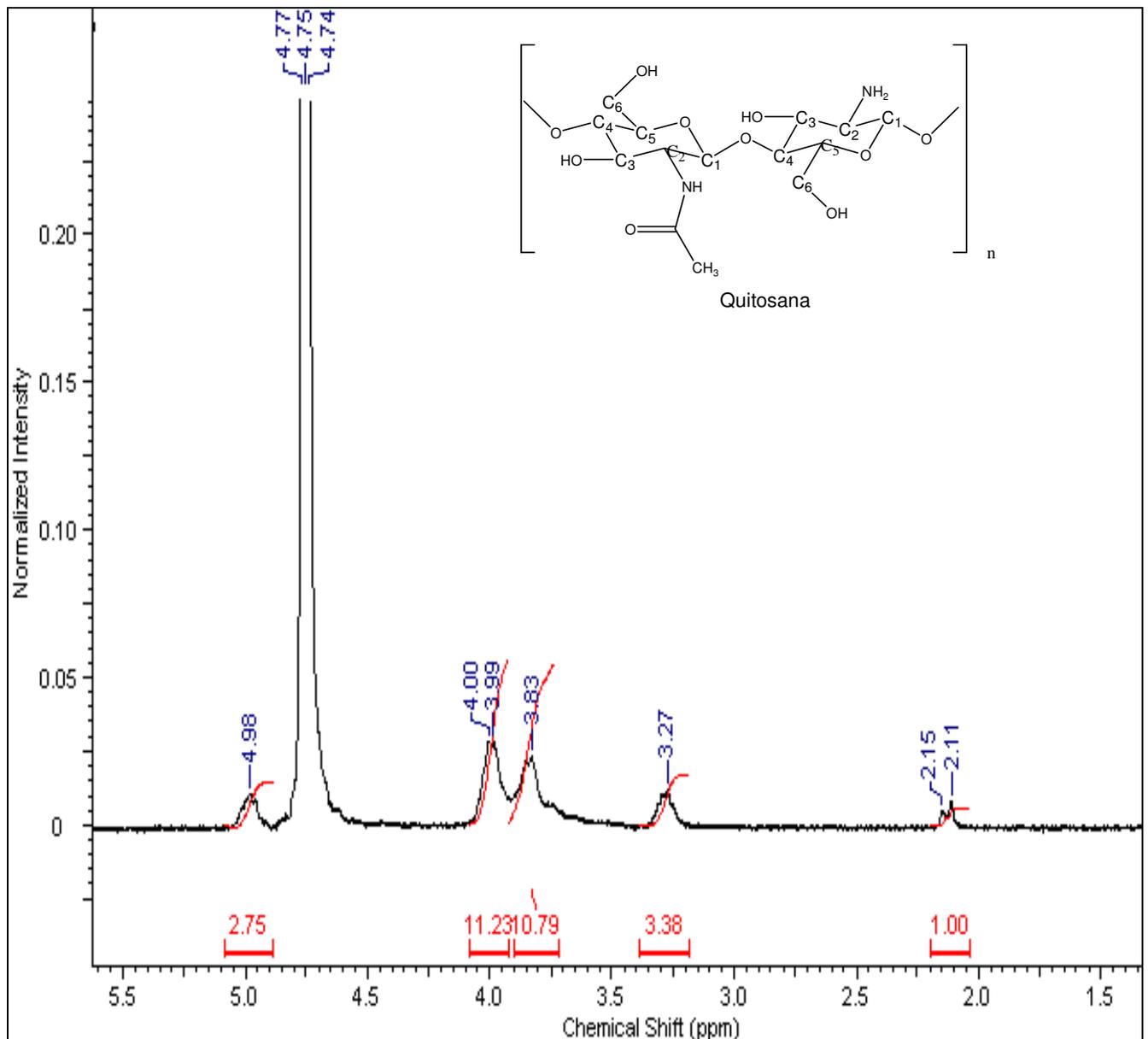


Figura 60 - Espectro de ressonância magnética nuclear ^1H da quitosana comercial ($\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ 2%).

O espectro de RMN ^{13}C da quitosana comercial (figura 61) indica um sinal de baixa intensidade em 175 ppm e 22 ppm correspondem, respectivamente, ao carbono de grupos acetil (COCH_3) e a metila presente no grupo, confirmando um alto grau de desacetilação na molécula de quitosana. Em 98 ppm o carbono anomérico C1, em 56 o carbono C2 ligado ao grupo NH_2 e em 61 ppm o carbono C6 do grupo CH_2OH . Os sinais em 70 ppm, 75 ppm e 77 ppm correspondem, respectivamente, aos carbonos C3, C5 e C4 da piranose.

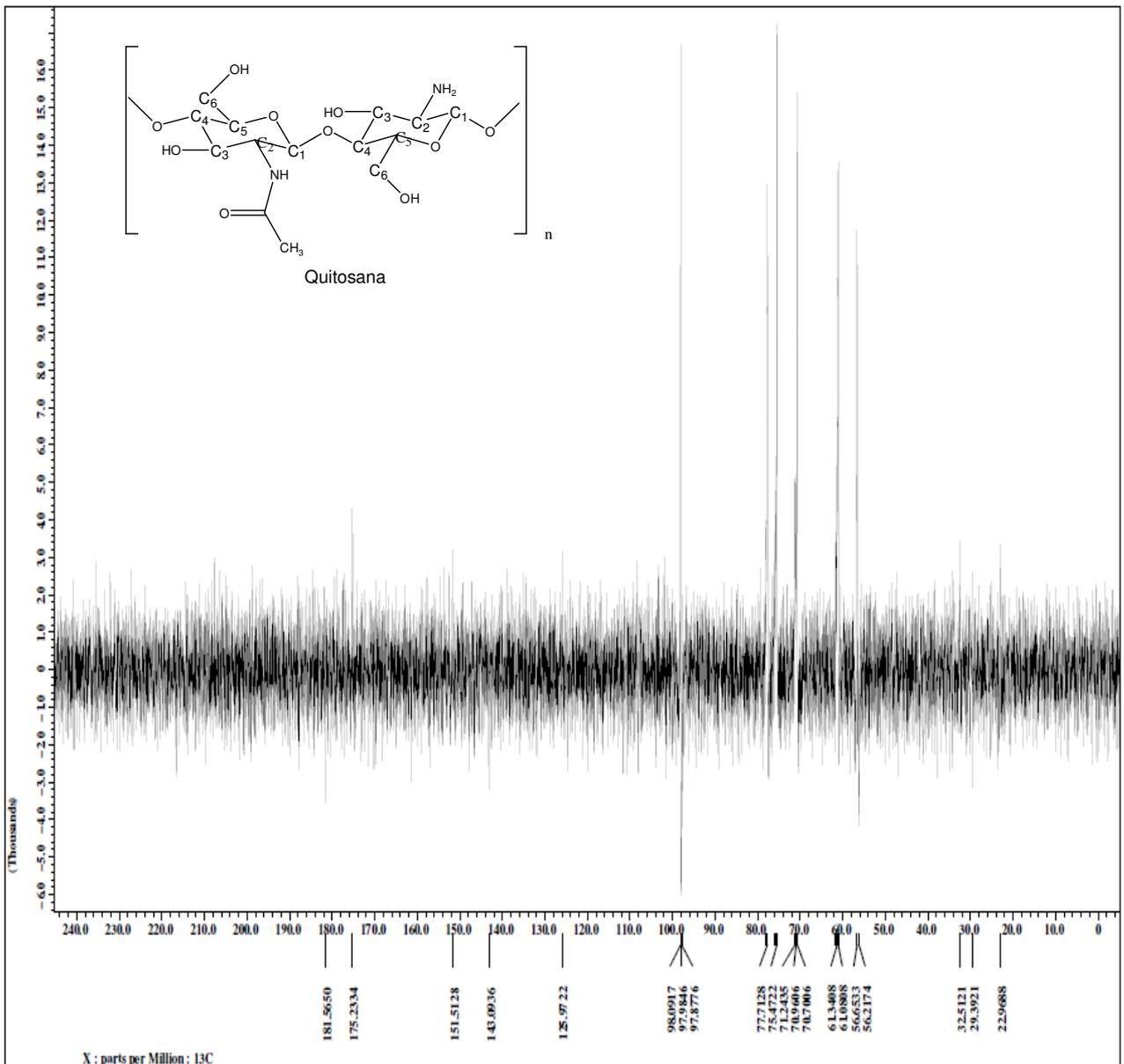


Figura 61 - Espectro de ressonância magnética nuclear ^{13}C da quitosana comercial ($\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$ 2%).

Comparando os espectros de RMN ^{13}C e ^1H da quitosana comercial e natural observamos que a quitosana comercial apresentou o menor grau de acetilação, fator que melhora a solubilidade e reatividade da quitosana. Por essa razão, quitosana comercial foi novamente desacetilada para garantir a máxima quantidade possível de grupos amino ($-\text{NH}_2$) reativos na quitosana.

A quitosana comercial desacetilada foi caracterizada por espectroscopia de infravermelho e RMN de ^1H para confirmar o aumento do grau de desacetilação.

O espectro de infravermelho da quitosana comercial desacetilada obtida (figura 62) apresenta pequena absorção em 3645 cm^{-1} característica de grupos hidroxila (O-H) livre, ou seja, que não participam de ligações de hidrogênio, intensa absorção em 3409 cm^{-1} devido a ligação de hidrogênio intramolecular entre os grupos $-\text{OH}$ e $-\text{CH}_2\text{OH}$, observa-se também a sobreposição de bandas entre 2900 a 3000 cm^{-1} relativas ao estiramento da ligação N-H e em 1569 cm^{-1} o modo vibracional da ligação N-H confirmando a presença do grupo amino (NH_2) na estrutura do composto. A ausência de intenso sinal acima de 1650 característica da ligação C=O da amida confirma a desacetilação da molécula.

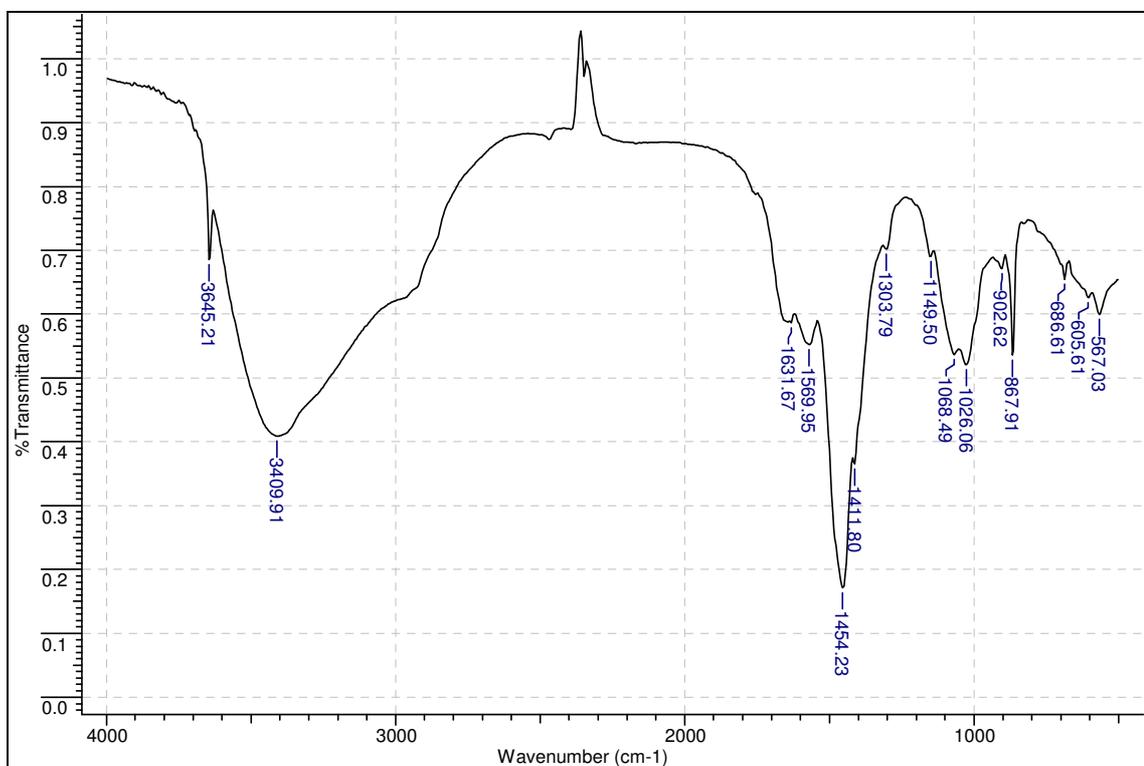


Figura 62 – Espectro de absorção na região do infravermelho da quitosana comercial desacetilada.

O espectro de RMN ^1H da quitosana comercial desacetilada obtido (figura 63) mostra uma diminuição da intensidade do sinal em 2,0 ppm, que corresponde a metila do grupo acetil, indicando um menor grau de acetilação para a quitosana após a desacetilação. Porém o grau de acetilação não foi calculado pela baixa resolução na região entre 5 ppm a 6 ppm, dificultando a integração dos sinais relativos aos hidrogênios que apresentam deslocamentos químicos nessa região.

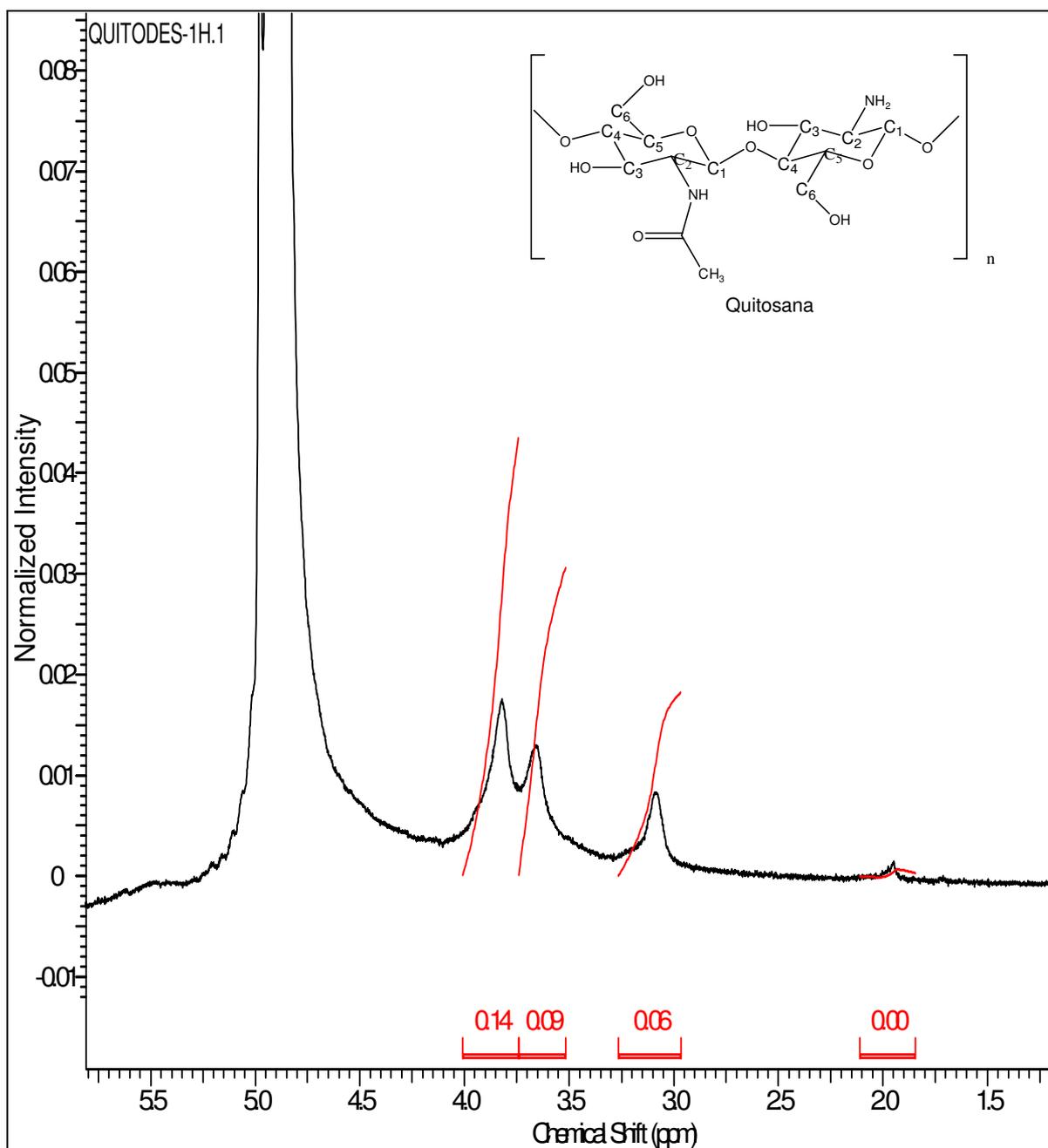


Figura 63 - Espectro de ressonância magnética nuclear ^1H da quitosana comercial ($\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ 2%).

A quitosana escolhida para realizar as próximas etapas de síntese foi a quitosana comercial desacetilada, pois esta apresentou um maior grau de desacetilação.

As modificações estruturais na quitosana podem ser dificultadas pela presença de estruturas cristalinas no polissacarídeo, com fortes interações entre hidrogênios intra e intermoleculares. Geralmente, em condições heterogêneas, a reatividade deste polissacarídeo tende a aumentar com o decréscimo do grau de cristalinidade e a reação pode se processar mais rapidamente em regiões amorfas que em regiões cristalinas. Além disto, os produtos obtidos em condições heterogêneas podem ter difícil controle do grau de substituição, bem como da solubilidade e de outras propriedades.

Quitosanas com alto grau de acetilação apresentam menor afinidade por solventes polares próticos como água e solução de ácido acético diluído pois presença de grupos acetil hidrofóbicos na macromolécula diminui as atrações entre as cadeias poliméricas via ligação de hidrogênio já um aumento dos grupos hidrofílicos como $-OH$ e $-NH_2$ livres no polímero aumentam a solubilidade do mesmo nesse tipo de solvente. Quando a distribuição dos grupos acetil se dá de maneira aleatória diminuem as atrações entre as cadeias poliméricas via ligação de hidrogênio, facilitando a solubilização do polímero, independente do pH do meio, para quitosanas com um grau de acetilação de até 50%. Mas se a distribuição dos grupos acetil na cadeia polimérica ocorrer de forma seqüenciada, em bloco, as interações hidrofóbicas entre os grupos acetil juntamente com interações de hidrogênio entre os grupos $-OH$ e $-NH_2$ podem intensificar as atrações entre as cadeias poliméricas, dificultando a solubilização do polímero.

5.1.4 - OBTENÇÃO DO CLORETO DE N-[(2-HIDROXI-3-TRIMETILAMÔNIO) PROPIL] QUITOSANA

A quitosana se dissolve na água somente em condições ácidas pela protonação dos grupos amino, desta forma, sua atividade antimicrobiana fica limitada a condições ácidas. Portanto, a introdução do sal de amônio quaternário na cadeia da quitosana é um dos melhores métodos para aumentar a atividade

antimicrobiana, bem como a solubilidade em água de quitosana em uma escala de pH maior.

A introdução do grupo trimetil amônio na quitosana foi baseada no trabalho de Hudson e colaboradores em 2004 que sintetizou o sal de quitosana hidrossolúvel, o Cloreto de N-[(2-Hidroxi-3-Trimetilamônio) Propil] Quitosana pela reação da quitosana desacetilada a 97% (57) com o cloreto de (2,3-epoxipropil) trimetil amônio (78). A reação ocorre via mecanismo S_N2 , os grupos aminos ($-NH_2$) presentes na quitosana atuam como nucleófilos e atacam o carbono do epóxido ocorrendo abetura do anel (figura 64). O produto (79) foi obtido na forma de um sólido marrom claro.

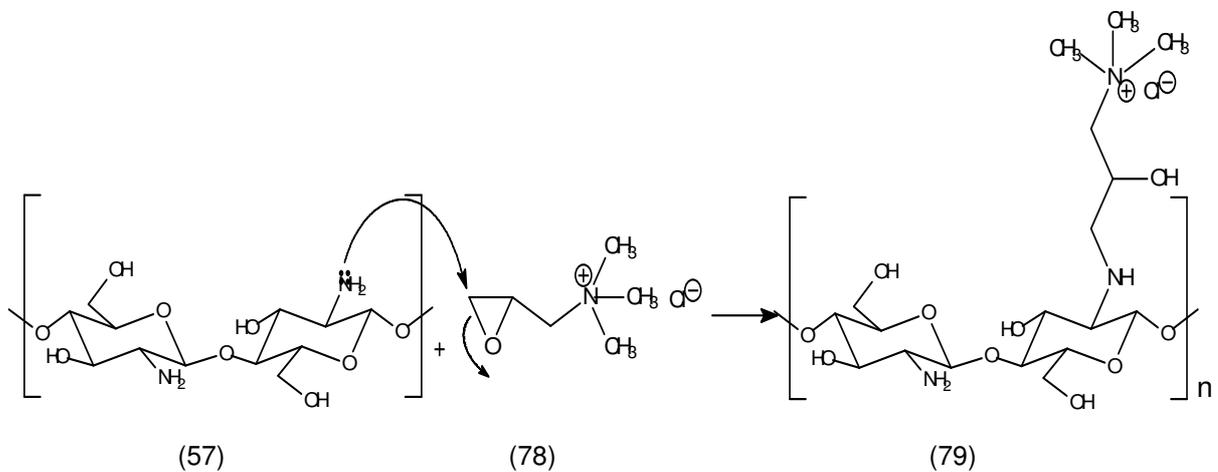


Figura 64 - Mecanismo da reação de formação do cloreto de N-[(2-hidroxi-3-trimetilamônio) propil] quitosana.

O grupo trimetilamônio contribui para a solubilização do polímero por apresentar interações iônicas que são responsáveis pela ruptura das regiões cristalinas na quitosana, isso pode ser explicado pela formação de um complexo entre a porção $(CH_3)_3N^+Cl^-$ com o solvente, no caso a água, originando um macrocátion e os íons cloreto por sua vez, passam a formar interações semelhante as ligações de hidrogênio com os átomos de hidrogênio das hidroxilas do polissacarídeo, promovendo a redução das interações entre as moléculas de quitosana e a conseqüente solubilização do polímero. A presença dos blocos de unidades de glicosamina não acetilados possibilitam ainda interações intermoleculares significativamente fortes, formando zonas de junção por ligações de hidrogênio.

Dentre as bandas de absorção apresentadas no espectro de infravermelho do sal de quitosana hidrossolúvel (figura 65), podemos destacar a absorção em 1481 cm^{-1} do estiramento da ligação C-H do grupo trimetil amônio. A ausência da banda em 1569 cm^{-1} do modo vibracional da ligação N-H da amina primária confirmando sua substituição por pela amina secundária, além da diminuição da intensidade da banda de absorção em 3302 cm^{-1} referente a ligação O-H, que aparecia sobreposta a ligação N-H com maior intensidade.

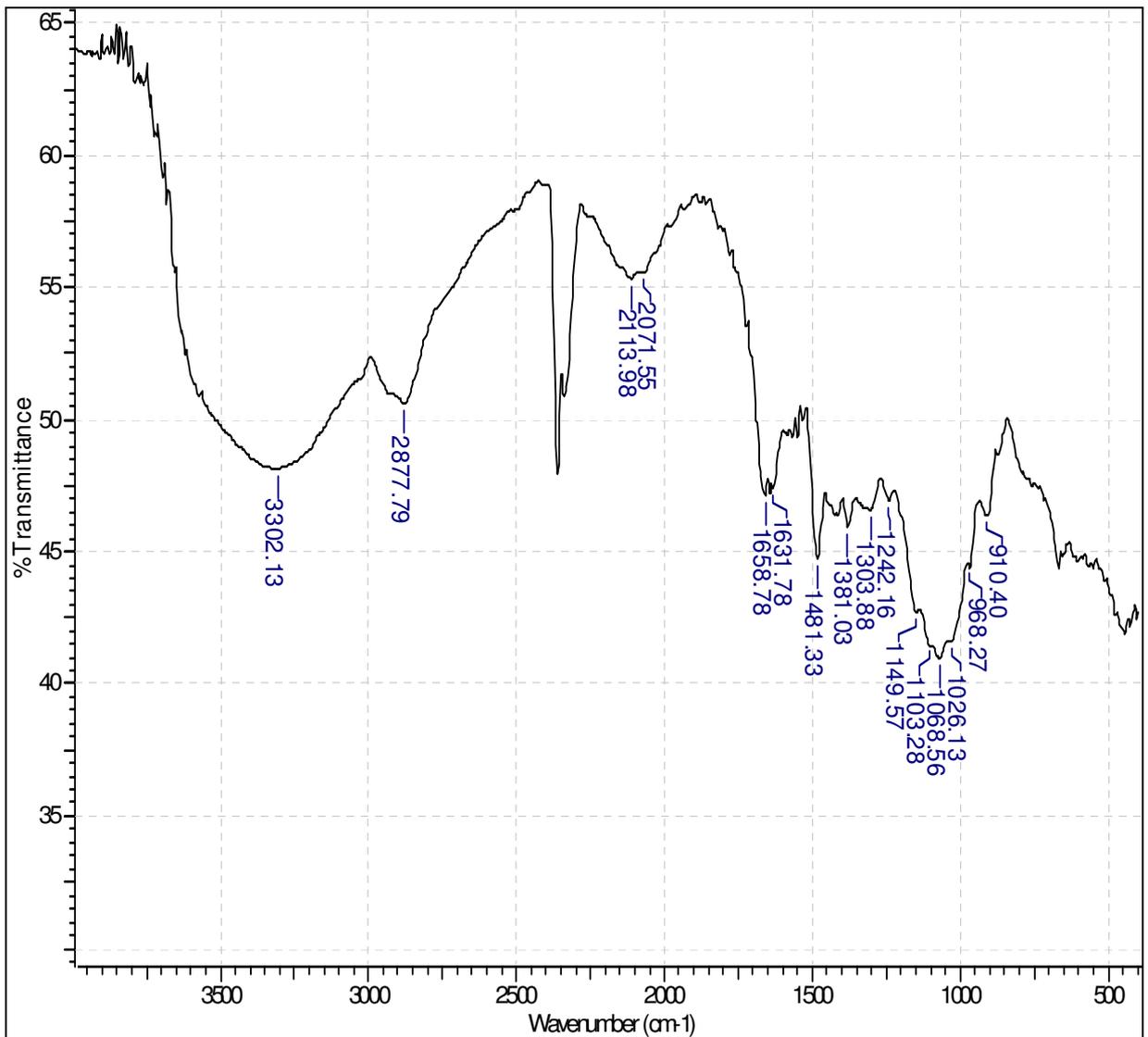


Figura 65 – Espectro de absorção na região do infravermelho do sal de quitosana hidrossolúvel.

O espectro de RMN ^1H do sal de quitosana hidrossolúvel (figura 66) apresenta intenso sinal em 3,17 ppm indicado a presença das metilas do grupo trimetil amônio presente no sal de amônio quaternário introduzido na molécula de quitosana.

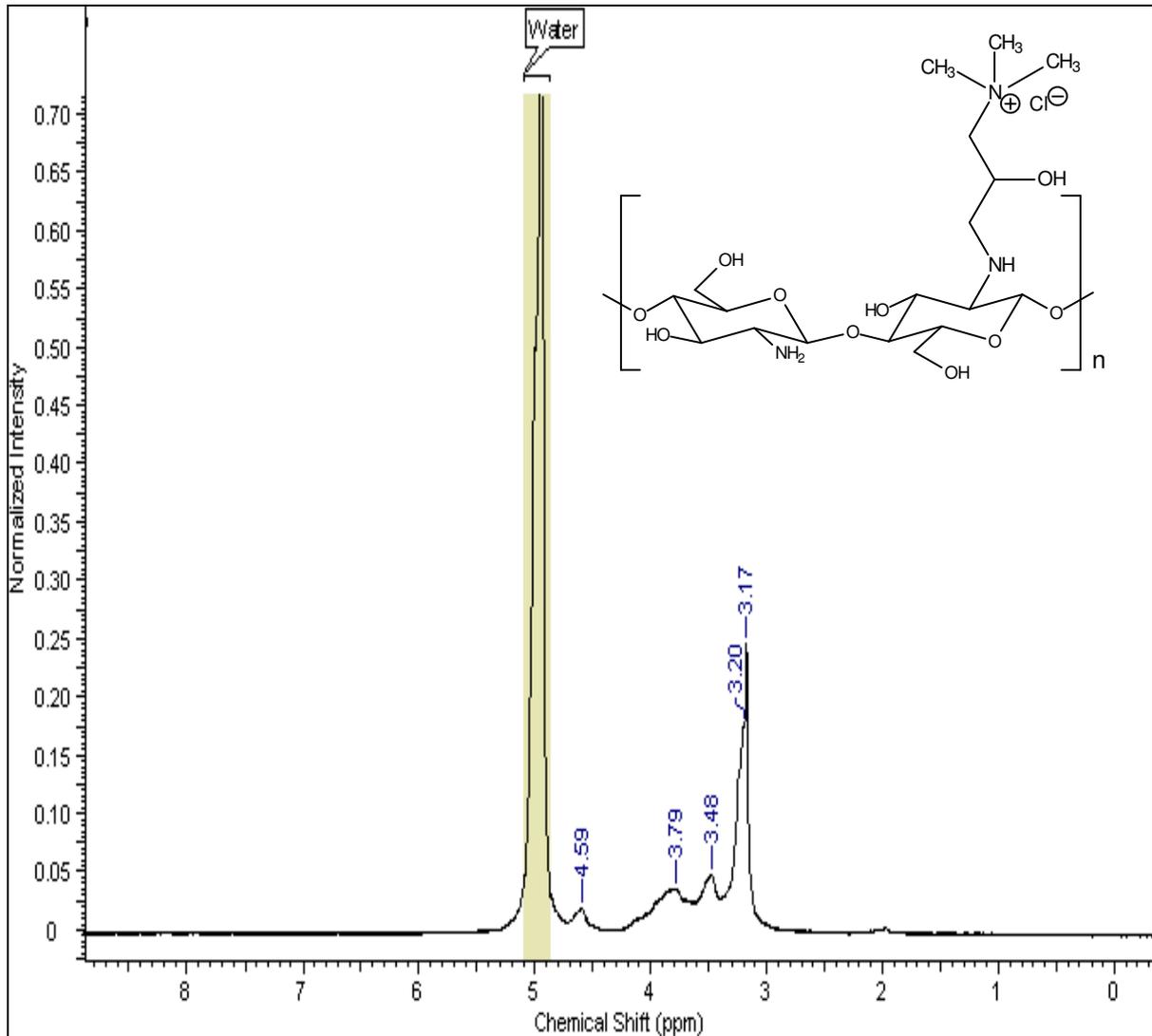


Figura 66 - Espectro de ressonância magnética nuclear ^1H do N-[(2-hidroxi-3-trimetilamônio)-propil] quitosana (D_2O).

A análise do espectro de RMN ^{13}C (figura 67, pág. 66) confirma a introdução do sal de amônio quaternário na quitosana pela presença do intenso sinal em 54,9 ppm, além dos outros sinais de carbono característicos da quitosana. Além disso, não foi observado sinal na região de 170 ppm, característica de grupos acetil na quitosana, confirmando a desacetilação da quitosana comercial, que já apresentava alto grau de desacetilação, usada como material de partida .

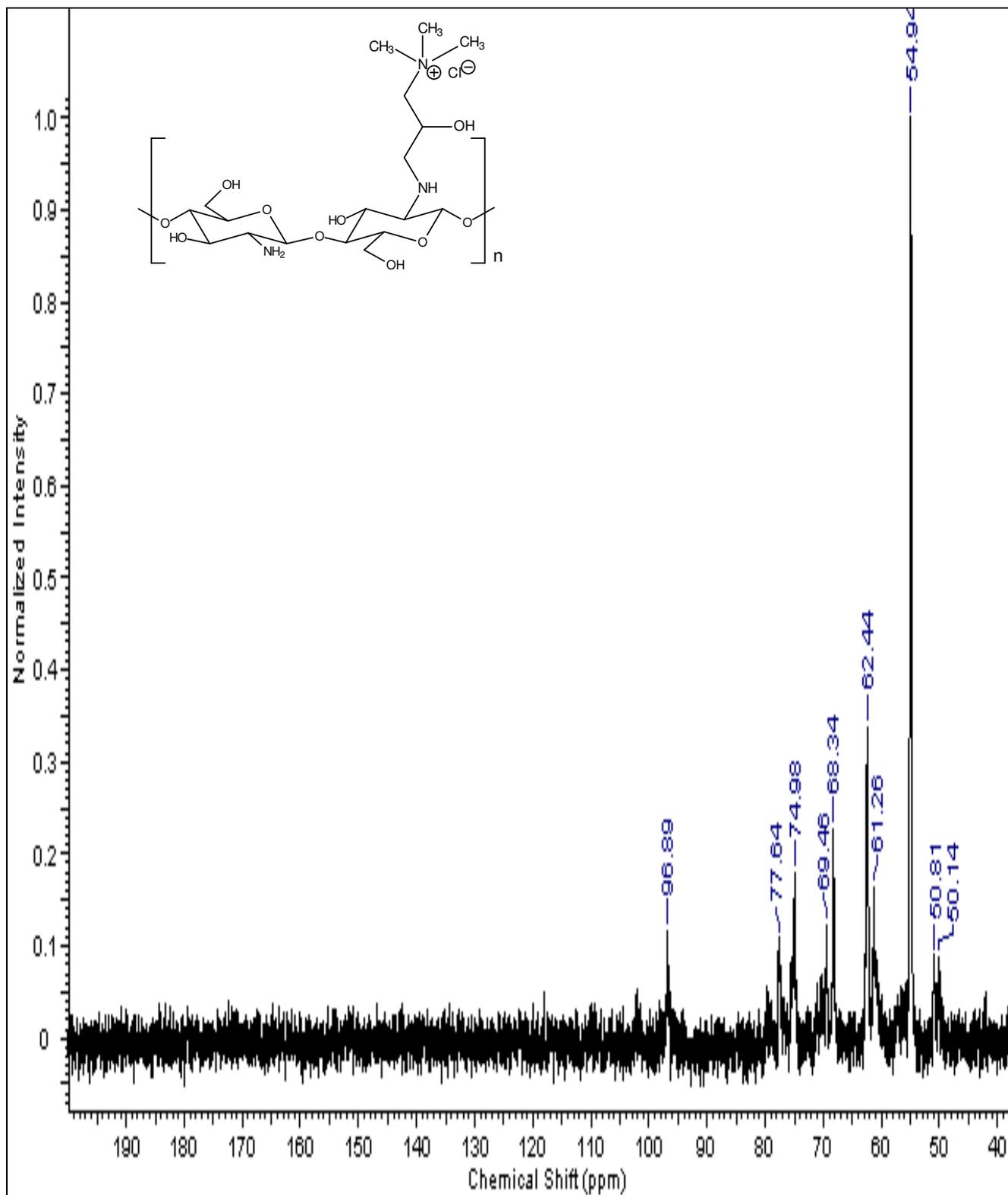


Figura 67 - Espectro de ressonância magnética nuclear ^{13}C do N-[(2-hidroxi-3-trimetilamônio)-propil] quitosana (D_2O).

pirazol-1-carboxamida (81) como reagente guanilante formando o ácido 2-guanidino etanóico (82) e triazol (90) (figura 70).

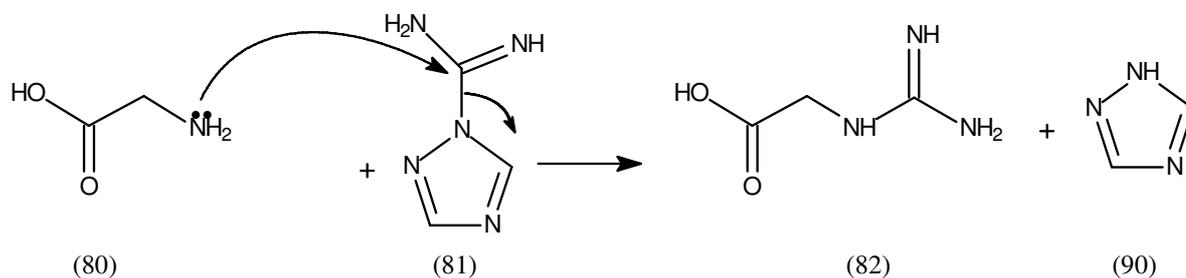


Figura 70 – Reação de guanidação da glicina.

A formação do ácido 2-guanidino etanóico, foi confirmada pelo espectro de RMN ^1H (figura 71) ou apenas um sinal em 3,8 ppm referente ao hidrogênio ligado ao grupo CH_2 da molécula de glicina.

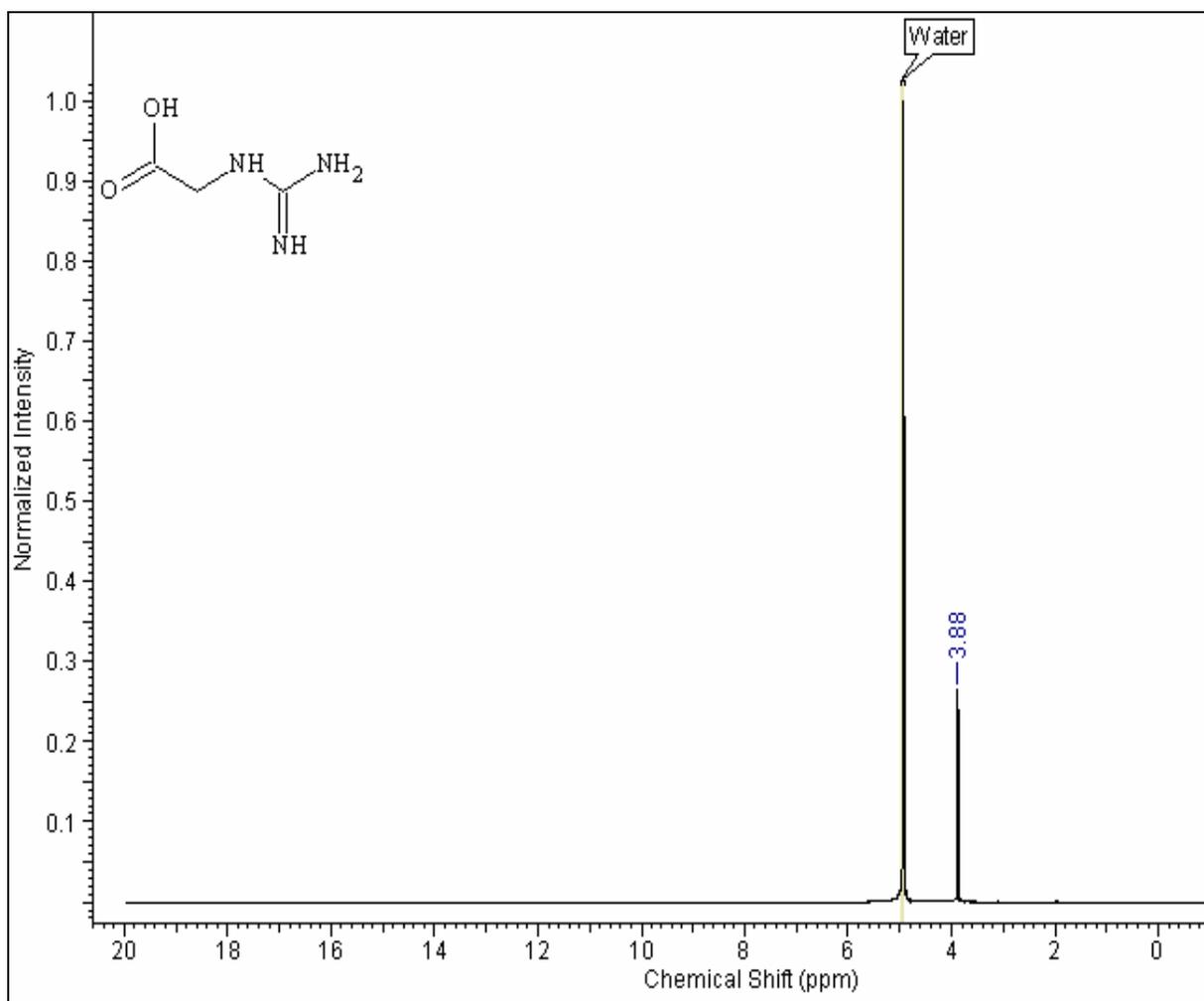


Figura 71 - Espectro de ressonância magnética nuclear ^1H da glicina guanilada (D_2O).

O espectros de RMN ^{13}C (figura 72) apresentou 3 sinais de carbono em 43 ppm correspondente ao carbono α a carbonila, em 172 ppm para o carbono carbonílico e em 157 ppm, região característica para o carbono do grupo guanidina.

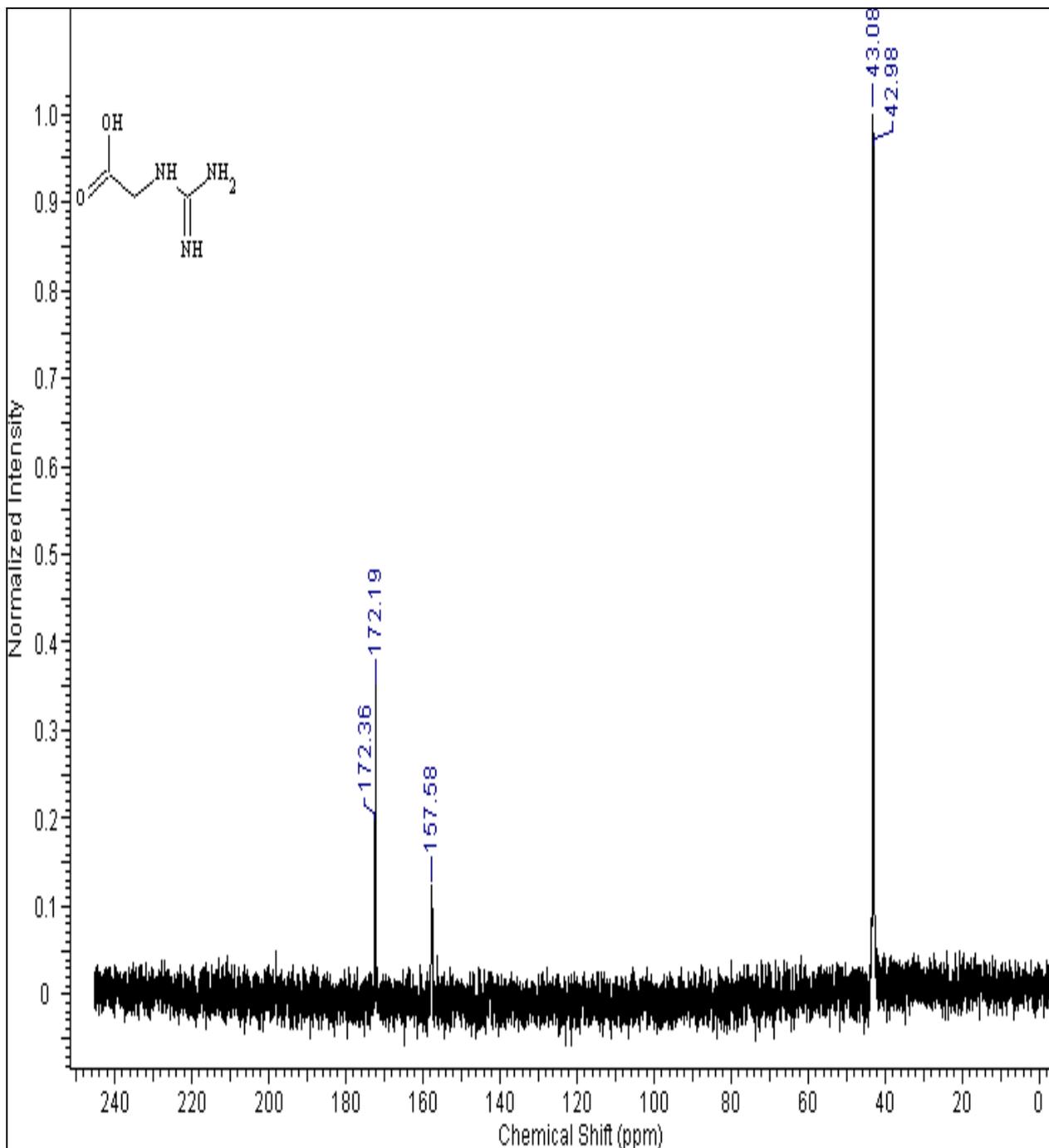


Figura 72 - Espectro de ressonância magnética nuclear ^{13}C da glicina guanilada (D_2O).

5.2.2 - GUANIDILAÇÃO DO CLODRATO DE GLICOSAMINA COM MONOCLORIDRATO DE 1-H-1,2,4-TRIAZOL-CARBOXAMIDINA

Diversas tentativas de reagir o monocloridrato de glicosamina (77) com o monocloridrato de 1-H-1,2,4-triazol-carboxamidina (81) foram infrutíferas. Provavelmente a glicosamina em meio básico sofre auto polimerização, indisponibilizando o grupamento amino para a reação com o reagente guanilante.

A reação foi testada a temperatura ambiente e sob refluxo a 85°C.

5.2.3 – GUANIDILAÇÃO DA QUITOSANA

A guanidilação da quitosana (57) com o monocloridrato de 1-H-1,2,4-triazol-carboxamidina (81), nas condições empregadas, não ocorreu. Como o procedimento foi realizado em meio básico, o aumento do pH pode ter reduzido a solubilidade da mesma, dificultando a reação.

5.2.4 - GUANIDILAÇÃO DO CLORETO DE N-[(2-HIDROXI-3-TRIMETILAMÔNIO) PROPIL] QUITOSANA

Nas duas metodologias realizadas, ocorreu a formação do polímero misto de quitosana contendo grupos trimetil amônio e grupos guanidínicos (91) (figura 73). O polímero formado possui aspecto de borracha, coloração branca, apresenta solubilidade em água, mas é insolúvel em metanol.

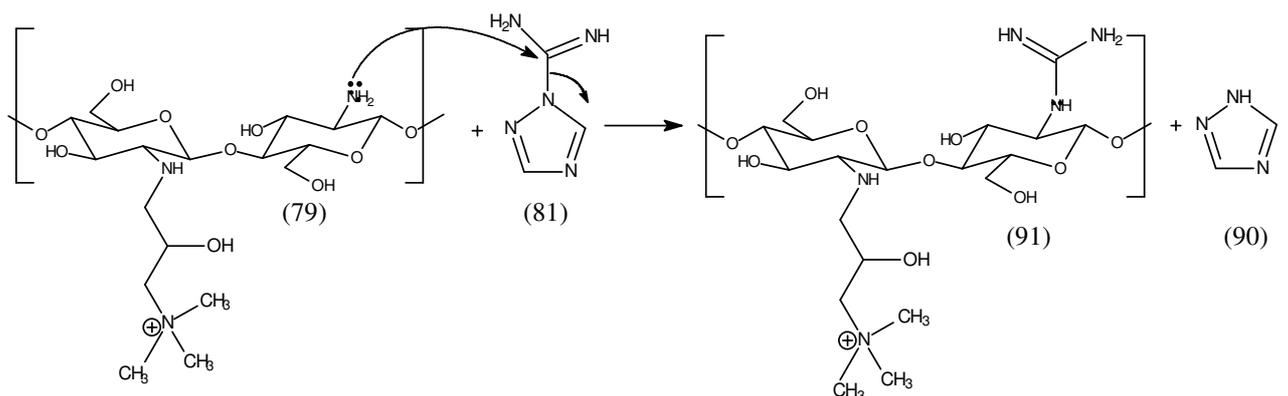


Figura 73 – Reação de guanidilação do N-[(2-hidroxi-3-trimetilamônio)-propil] quitosana.

O espectro de RMN ^1H do polímero de quitosana contendo sal de amônio quaternário e guanidina (figura 74, pág.71) indica que os sinais da metila do

grupo trimetil amônio foram mantidos em 3,43 ppm, além dos sinais característicos da quitosana já descritos anteriormente.

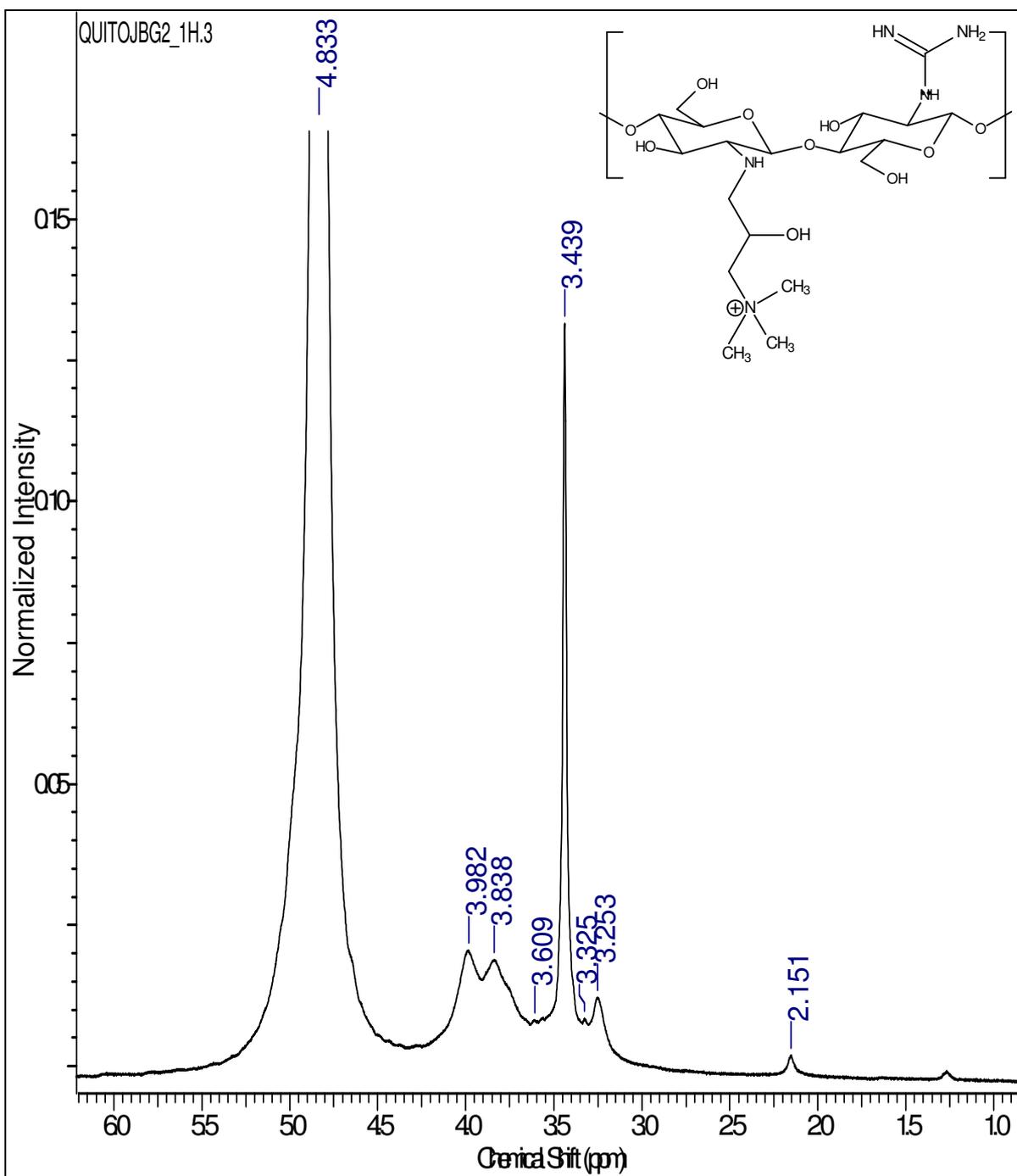


Figura 74 - Espectro de ressonância magnética nuclear ^1H do N-[(2-hidroxi-3-trimetilamônio)-propil] quitosana guanilado (D_2O).

O espectro de RMN ^{13}C do polímero de quitosana contendo sal de amônio quaternário e guanidina (figura 75, pág. 72) apresenta um sinal em 158 ppm, típico de deslocamento químico do carbono da porção guanidina, como descrito

na literatura, indicando a presença do grupo guanidina na molécula, além dos sinais característicos e do intenso sinal em 56 ppm referentes as metilas do sal de amônio quaternário.

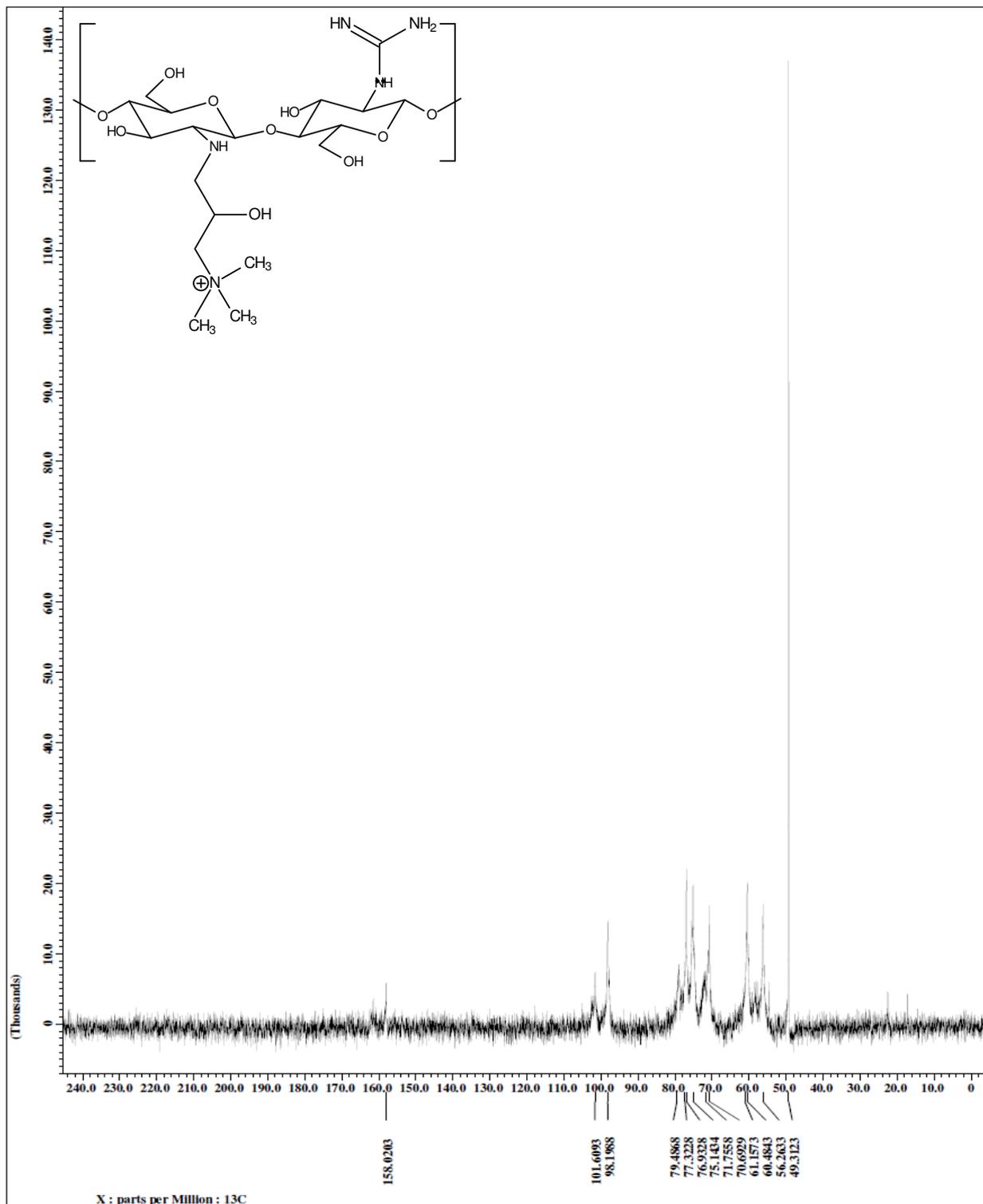


Figura 75 - Espectro de ressonância magnética nuclear ¹³C do N-[(2-hidroxi-3-trimetilamônio)-propil] quitosana guanilado (D₂O).

Os dados aqui apresentados indicam a obtenção da quitosana com funções mistas, guanidina e sal de amônio quaternário, que para o nosso conhecimento está sendo descrito pela primeira vez na literatura.

Os dados de análise elementar (CHN), listados na tabela 2 indicam um aumento na porcentagem de nitrogênio de 7,08 quando comparamos a quitosana comercial, o sal de quitosana hidrossolúvel e o sal de quitosana guanilado que apresenta uma porcentagem de nitrogênio de 8,37, isto se deve ao maior de átomos de nitrogênio em sua estrutura pela introdução do grupo guanidínico na molécula.

Os cálculos das fórmulas mínimas que possibilitam melhor entendimento dos dados da tabela não foram feitos pois não foi possível chegar a uma fórmula mínima com números inteiros para os polímeros estudados.

Tabela 2 – Dados da análise elementar (CHN) para a quitosana e derivados

Amostras	% de C	% de H	% de N
Quitosana Comercial	38,82	7,57	7,08
N-[(2-hidroxi-3-trimetilamônio)-propil] quitosana	38,32	7,37	7,09
N-[(2-hidroxi-3-trimetilamônio)-propil] quitosana guanilado	29,99	7,28	8,37

5.2.5 – GUANIDILAÇÃO DA NEOMICINA

Comparando o espectro de RMN ^{13}C do sulfato de neomicina (figura 76, pág. 74) com o espectro de RMN ^{13}C da neomicina após a reação de guanidilação (figura 77, pág. 75) observamos a introdução de grupos guanidínicos na molécula pela presença de seis sinais em 157,4; 157,7; 157,9; 164,30; 164,6 e 163 ppm no espectro, que não ocorrem no espectro do sulfato de neomicina antes da reação.

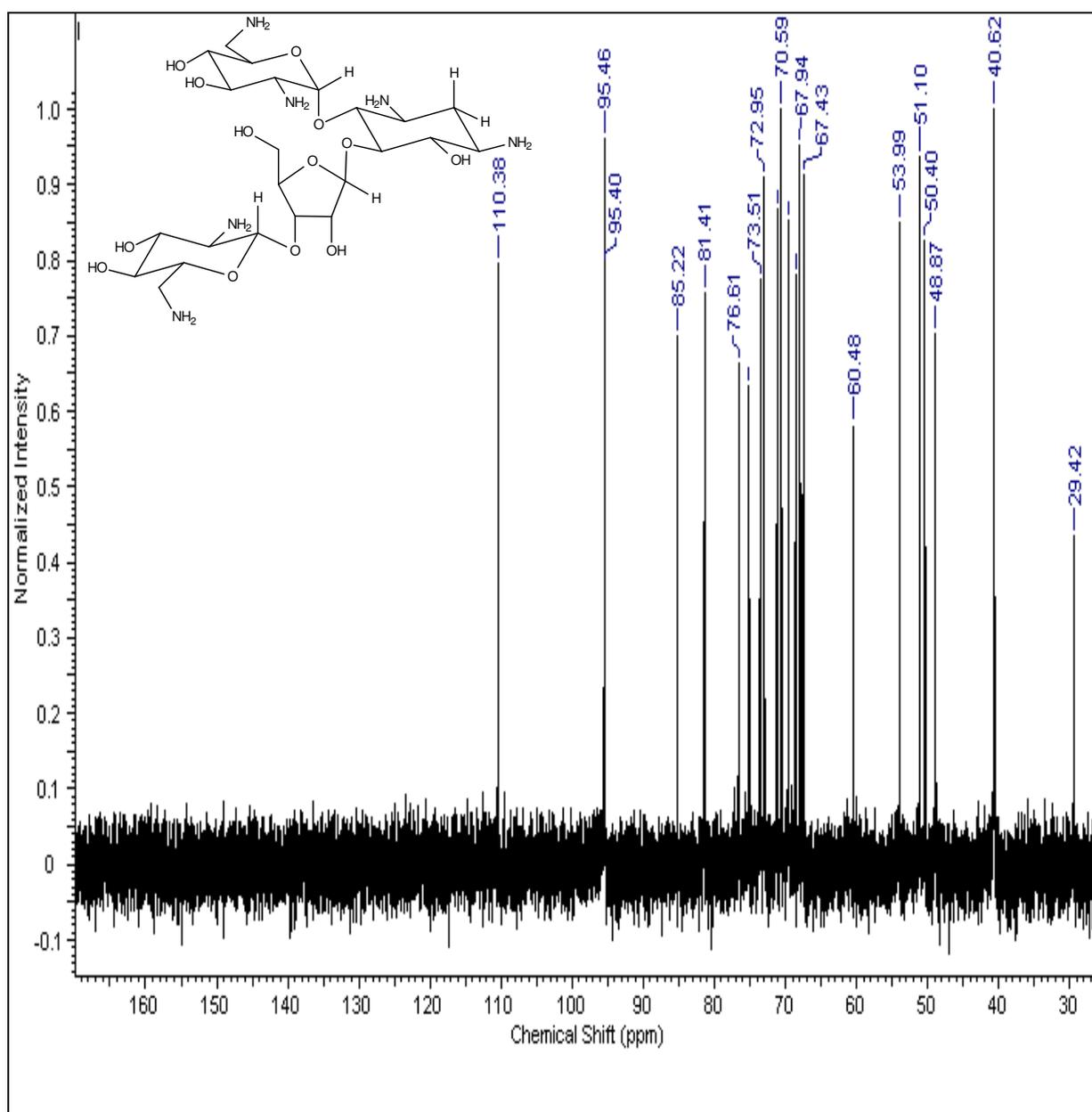


Figura 76 - Espectro de ressonância magnética nuclear ^{13}C da neomicina (D_2O).

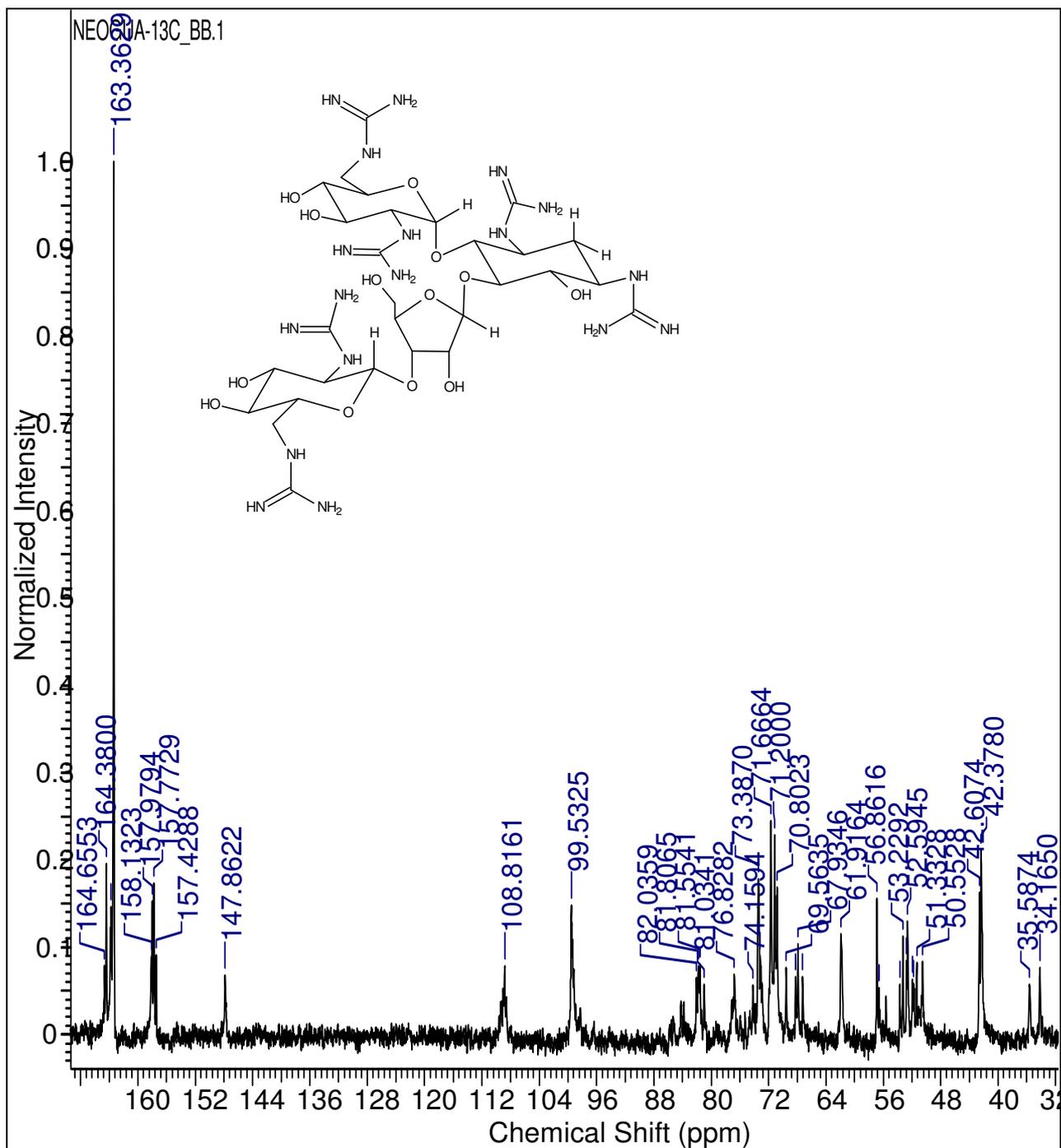


Figura 77 - Espectro de ressonância magnética nuclear ^{13}C da neomicina guanilada (D_2O).

Observando o espectro de RMN ^1H da neomicina (figura 78, pág. 76) destacam-se, entre outros, os sinais em 6,00; 5,41 e 5,27 ppm referentes respectivamente aos hidrogênios anoméricos H-1', H-1'' e H-1''''. No espectro do produto formado pela reação de guanidilação (figura 79, pág. 77) os sinais dos hidrogênios anoméricos apresentaram no RMN ^1H como sinais múltiplos entre 5,4 e 5,0 ppm, mostrando que a presença dos grupos guanidínicos vizinhos a estes hidrogênios causaram efeito de blindagem, diminuindo os deslocamentos químicos

comparado a neomicina com o sinal H-1' em 6,0 ppm praticamente desapareceu, deslocando-se para a região de 5 ppm. Outros sinais de RMN ^1H que merecem atenção são os referentes aos hidrogênios metilênicos H-3, enquanto na neomicina a absorção era de 1,87 ppm para o H-3 axial e 2,37 ppm para o H-3 equatorial, no produto obtido esses deslocamentos químicos foram de 1,35 ppm para o H-3 axial e 2,02 ppm para o H-3 equatorial. Novamente o efeito do grupo vizinho é observado.

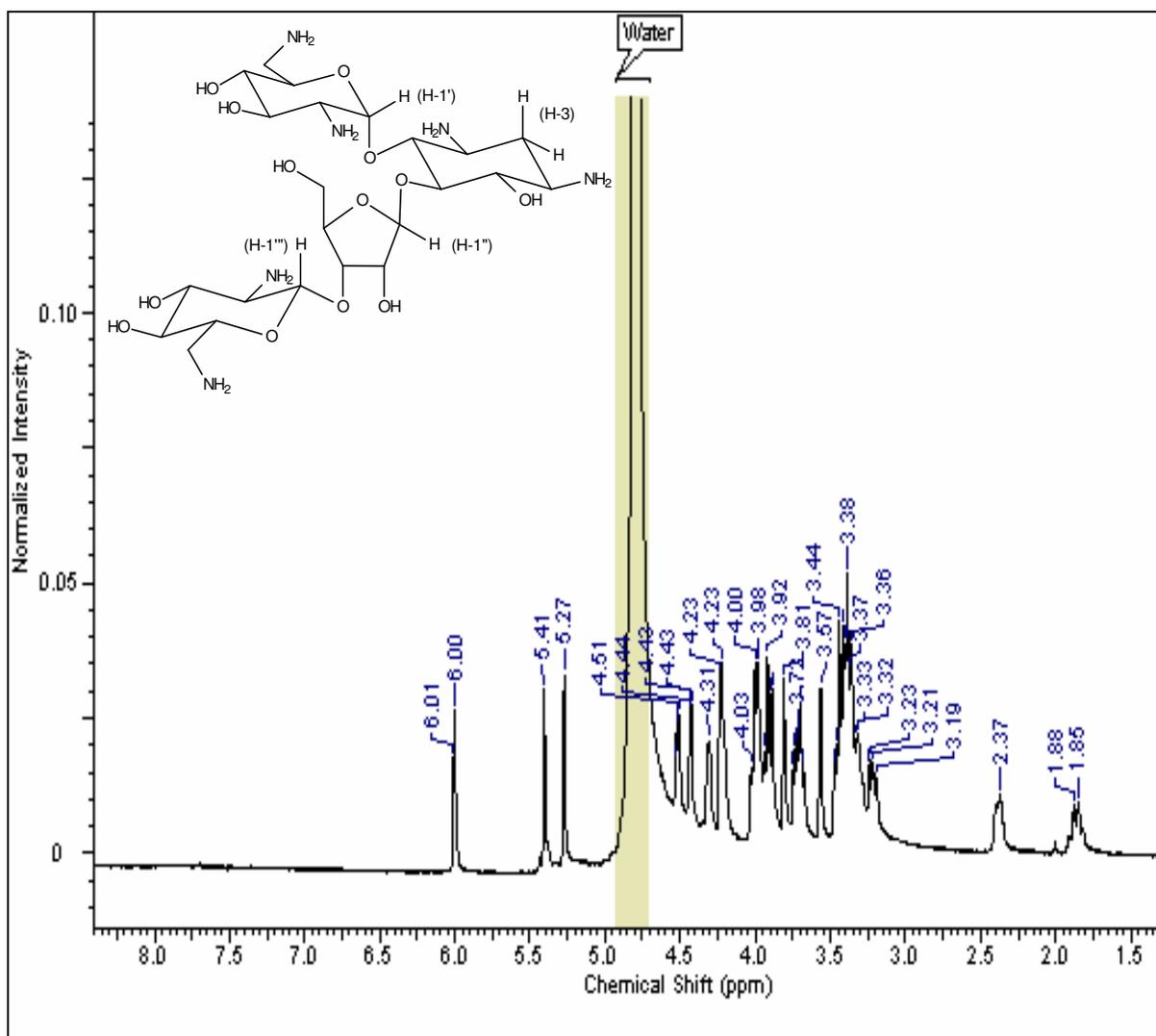


Figura 78 - Espectro de ressonância magnética nuclear ^1H da neomicina (D_2O).

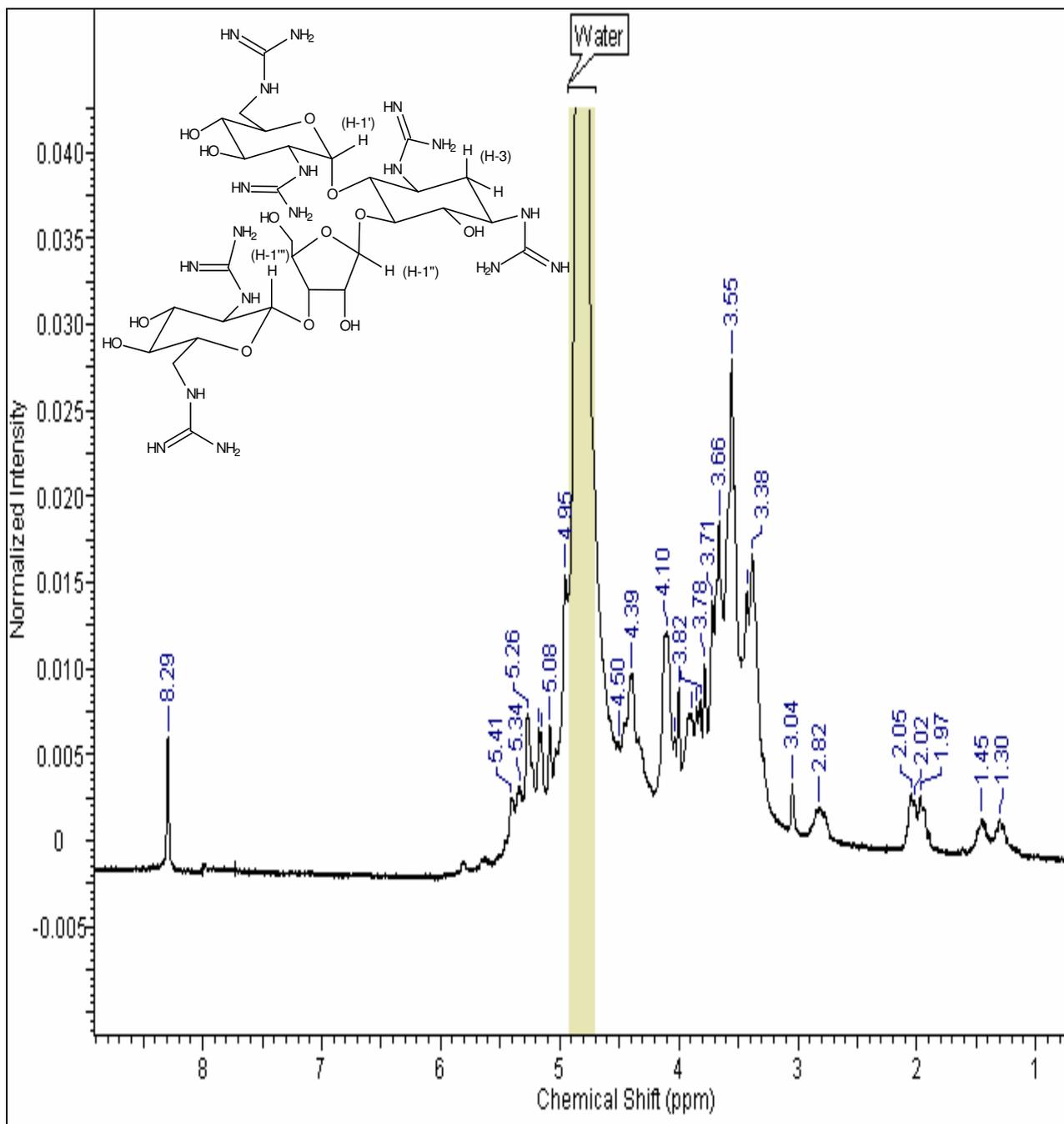


Figura 79 - Espectro de ressonância magnética nuclear ^1H da neomicina guanilada.

6 - CONCLUSÃO

- No presente trabalho foi extraída a quitina da casca de camarão-sete-barbas, através do qual foram obtidos os materiais de partida quitosana e cloridrato de glicosamina;
- A reação de guanidilação do cloridrato de glicosamina e da quitosana nas condições testadas utilizando o reagente guanilante monoclórato de 1-H-1,2,4-triazol carboxamida não ocorreu.
- O sal de amônio quaternário da quitosana foi obtido com sucesso.
- O polímero misto contendo grupos guanidínicos e grupos trimetil amônio foi sintetizado;

7 - BIBLIOGRAFIA

- Airoldi, C., (2008); A Relevante potencialidade de centros básicos nitrogenados disponíveis em polímeros inorgânicos e biopolímeros na remoção catiônica, *Química Nova*, vol. 31, nº1, 144-153.
- Allinger, N. L., Cava, M. P., Johnson, C. R., Lebel, N. A., Stevens, C. L., *Química Orgânica*, 2ª Edição, editora Guanabara Dois, 1978, Rio de Janeiro, pág. 646-7; 663-4.
- Arafa, R. K.; Ismail, M. A.; Munde, M.; Wilson, D. W.; Wenzler, T.; Brun, R.; Boykin, D. W.; (2008). Novel linear triaryl guanidines, N-substituted guanidines and potential prodrugs as antiprotozoal agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, xx 1-8.
- Baker, T. J.; Luedtke, N. W.; Tor, W.; Goodman, M. (2000). Synthesis and Anti-HIV Activity of Guanidinoglycosides. *J. Org. Chem*, 65, 9054-9058.
- Berlinck, R. G. S.; Burtoloso, A. C. B.; Kossuga, M. H.; (2008). The chemistry and biology of organic guanidine derivatives. *Nat. Prod. Rep.*, 2008, 25, 919–954.
- Bernatowicz, M. S.; Wu, Y.; Matsueda, G. R.. (1992). 1H-Pyrazole-1-carboxamidinHey drochloride: Na Attractive Reagent for Guanylation of Amines and Its Application to Peptide Synthesis. *J. Org. Chem.*, Vol. 57, nº. 8.
- Bream, J.; Picard, C. W.; White, T. G.; (1970). Aralkylaminoguanidines and Related Compounds, *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 13, nº 6.
- Campana-Filho, S. P., Britto, D., Curti, E., Abreu, F. R., Cardoso, M. B., Battisti, M. V., Sim, P. C., Goy, R. C., Signini, R., Lavall, R. L. (2007). Extração Estruturas e Propriedades de α - e β -Quitina. *Química Nova*, Vol. 30, nº3, 644-650.
- Carvalho, T. V. (2006); Biomateriais à base de quitosana de camarão e bactérias para remoção de metais traços e petróleo, Dissertação (mestrado) Universidade federal do Ceará, Fortaleza.
- Chalina, E. G., Chakarova, L. (1998). Synthesis, hypotensive and antiarrhythmic activities of 3-alkyl-l-(2-hydroxy-5,8-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydro-3-naphthalenyl)ureas or thioureas and their guanidine analogues. *Eur. J. Med. Chem.*, 33, 975-983.
- Chen, H. J.; Zhang, J.; Freg, W. L.; Fu, M. (2006); Synthesis, structures of cobalt/copper complexes and magnetic property of copper complex with the

- mixed ligands 5-nitro-1,3-benzenedicarboxylic acid and imidazole"; *Inorganic Chemistry Communications.*, 9, 300-303.
- Cho, C.; Kim, I. Y.; Seo, S. J.; Moon, H. S.; Yoo, M. K.; Park, I. Y.; Kim, B. C.; (2008). Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications, *Biotechnology Advances*, 26, 1–21.
- Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P; (2001). Organic Chemistry, Editora Oxford, Pág. 200 – 203.
- Costa Silva, H. S. R., Santos, K. S. C. R., Ferreira, E. I. (2006). *Química Nova*, Vol. 29, nº4, 776-785.
- Cunha, S.; Costa, M. D.; Napolitano, H. B.; Lariucci, C.; Vencato, I. (2001); Study of N-benzoyl-activation in the HgCl₂-promoted guanylation reaction of thioureas. Synthesis and structural analysis of N-benzoyl-guanidines; *Tetrahedron.*, 57, 1671-1675.
- Dumitriu, S. (2001). Polymeric Biomaterials .Editora Taylor Print On Dema, 2^o Edição, *University Of Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada*, pág. X.
- Delezuk, J. A. M. (2009); Desacetilação de Beta-Quitina Assistida por Ultra-Som de Alta intensidade: Estudo dos efeitos da amplitude e do tempo de irradiação e da Temperatura da reação. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Carlos, págs. 20 e 21.
- Galed, G.; Miralles, B.; Paños, I.; Santiago, A.; Heras, A.; (2005). N-Deacetylation and depolymerization reactions of chitin/chitosan: Influence of the source of chitin, *Carbohydrate Polymers*, 62, 316–320.
- Garcia, R. B., Silva, D. L. P., Costa, M. (2008). Avaliação de Géis Obtidos a Partir Da Acetilação da Quitosana em Meio Heterogêneo. *Química Nova*, Vol. 31, nº 3, 486-492.
- Ghosh, A. K.; Hol, W. G. J.; Fan, E.(2001). Solid-Phase Synthesis of N-Acyl-N ϕ -Alkyl/Aryl Disubstituted Guanidines. *J. Org. Chem.*, 66, 2161-2164.
- Gilman, A. G.; Limbird, L. E.; Hardman, J. G. (2001); As Bases farmacológicas da terapeutica. Editora Mc Graw Hill, 10^a edição, Rio de Janeiro.
- Guan, Y.; Xiao H.; Sullivan, H.; Zheng, A.; (2007). Antimicrobial-modified Sulfite Pulps Prepared by in Situ Copolymerization. *Carbohydrate Polymers*, 69, 688-696.
- <http://www.espbr.com/noticias>
- <http://www.rborl.org.br/conteudo/acervo>

- Hui, Y.; Ptak, R.; Paulman, R.; Pallansch, M.; Changa, C. T.; (2002). Synthesis of novel guanidine incorporated aminoglycosides, guanidinopyranmycins. *Tetrahedron Letters*, 43, 9255–9257.
- Jeon, Y. J.; Kim, S. K.; (2001). Effect of antimicrobial activity by chitosan oligosaccharide N-conjugated with asparagine. *Journal Of Microbiology And Biotechnology*, Vol. 11, Issue 2, 281-286.
- Kim, I. Y.; Cho, C.; Seo, S. J.; Moon, H. S.; Yoo, M. K.; Park, I. Y.; Kim, B. C.; (2008). Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications, *Biotechnology Advances*, 26, 1–21.
- Khor, E. (2001) Chitin-Fulfilling A Biomaterials Promise, Editora Elsevier Science, 1^o Edição, Singapura, pág. N
- Krajewska, B. (2004); Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review, *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 126–139.
- Kubota, N.; Tastumoto, N.; Sano, T.; Toya, K. (2000). A Simple Preparation of Half N-acetylated Chitosan Highly Soluble in Water and Aqueous Organic Solvents, *Carbohydrate Reserch*, 324, 268-274.
- Kumar M.N.V.R., (2000) A review of chitin and chitosan applications, *Reactive & Functional Polymers* 46, 1–27.
- Leite, A. C. C.; *et al*, Otimização da Síntese, Análises Físico-químicas e utilização em um Modelo Experimental do Cloridrato de Glucosamina, Revista da UFC.
- Lima, S. I.; Ribeiro, E. S.; Airoidi, C. (2006); O Emprego De Quitosana Quimicamente Modificada com Anidrido Succínico na Adsorção de Azul de Metileno; *Quim. Nova*, Vol. 29, No. 3, 501-506.
- Lin, W., Champman, M.E., Wang, Z.Y., Yee, G.T. (2000); Three-Dimensional Manganese(II) Coordination Polymers Based on m-Pyridinecarboxylates: Synthesis, X-ray Structures, and Magnetic Properties; *Inorganic Chemistry*, 39, 4169-4173.
- Matz, G. et al; (2004). Ototoxicity of ototopical antibiotic drops in humans. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*, p. 79-82.
- Moroder, L.; Musiol, J. H.; (2001). *N,N*-Di-*tert*-butoxycarbonyl-1*H*benzotriazole-1-carboxamide Derivatives Are Highly Reactive Guanidinyllating Reagents. *Organic Letters*, Vol. 3, No. 24, 3859-3861.
- Muzzarelli, C.; Tosi, G.; Francescangeli, O.; Muzzarelli, R. A. A. (2003). Alkaline Chitosan Solutions, *Carbohydrate Research*, 338, 2247- 2255.

- Nozaki, Y.; Tanford, C. (1970). The Solubility of Amino Acids, Diglycine, and Triglycine in Aqueous Guanidine Hydrochloride Solutions, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 245, Nº 7, Issue 10, 1648-1652.
- Oliveira, J. F. P.; Cipullo, J. P.; Burdmann, E. A.; (2006). Nefrotoxicidade Dos Aminoglicosídeos. *Braz J Cardiovasc Surg*; 21(4): 444-452.
- Oliveira, V. C. R. et al. (2001). Interferência do intervalo de administração da droga sobre a nefrotoxicidade da gentamicina em ratos, *Rev Esc Enf USP*, v. 35, n.2, p. 200-204.
- Place, C.; Zimmermann, J.; Mulliez, E.; Guillot, G.; Bois, C. E Chottard, J. (1998) Crystallographic, Electrochemical, and Pulsed EPR Study of Copper(II) Polyimidazole Complexes Relevant to the Metal Sites of Copper Proteins; *Inorganic Chemistry*, 37, 4030-4039.
- Porcheddu, A.; Giacomelli, G.; Chighine, A.; Masala, S.; (2004). New Cellulose-Supported Reagent: A Sustainable Approach to Guanidines. *Organic Letters* Vol. 6, No. 26, 4925-4927.
- Prashanth, K.V.H.; Tharanathan, R.N. (2007). Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential and an overview, *Trends in Food Science & Technology* 18 117-131.
- Qian, L., Xiao, H.; He, B.; Guan, Y.; (2008). Modified guanidine polymers: Synthesis and antimicrobial mechanism revealed by AFM, *Polymer*, 49, 2471–2475.
- Rinaudo, M.; Pavlov, G.; Desbrières, J.; (1999). Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan, *Polymer*, 40, 7029–7032.
- Rodriguez, F.; Rozas, I.; Ortega, J. E.; Erdozain, A. M.; Meana, J. J.; Callado, L. F.; (2008). Guanidine and 2-Aminoimidazoline Aromatic Derivatives as α_2 -Adrenoceptor Antagonists. 2. Exploring Alkyl Linkers for New Antidepressants. *J. Med. Chem.*, 51, 3304–3312.
- Santos, J. E.; Soares, J. P.; Dockal, E. R. (2003); Caracterização de Quitosanas Comerciais de Diferentes Origens. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, vol. 13, nº 4, p. 242-249.
- Sashiwa, H.; Shigemasa, Y. (1999). Chemical modification of chitin and chitosan 2: preparation and water soluble property of *N*-acylated or *N*-alkylated partially deacetylated chitins; *Carbohydrate. Polymer*, 39, 127-138.
- Shigemasa, Y.; Usui, H.; Morimoto, M.; Saimoto, H.; Okamoto, Y.; Minami, S.; Sashina, H. (1999); Chemical modification of chitin and chitosan 1: preparation of

- partially deacetylated chitin derivatives via a ring-opening reaction with cyclic acid anhydrides in lithium chloride/*N,N*-dimethylacetamide, *Carbohydrate. Polymers*, **39**, 237-243.
- Tharanathan, R. N.; Vishu Kumar, A.B.; Varadaraj, M.C.; Lalitha R.G.; (2004). Low molecular weight chitosans: preparation with the aid of papain and characterization, *Biochimica et Biophysica Acta* **1670**, 137– 146.
- Torres, M. A.; Vieira, R. S.; Beppu, M. M.; Santana, C. C.; (2005). Produção e Caracterização de Microesferas de Quitosana Modificadas Quimicamente, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, vol. 15, n° 4, p. 306-312.
- Tuner, S.; Myers, M.; Gadie, B.; Hale, S. A.; Horsley, A.; Nelson, A. J.; Pape, R.; Saville, J. F.; Doxey, J. C.; Berridge, T. L.; (1988). Antihypertensive Thiadiazoles. Vasodilatador Activity of Some 2-Aryl-5-guanidino-1,3,4-thiadiazoles, *American Chemical Society*, **31**, 906-913.
- Vinsova, J. ; Vavrikova E. (2008). Recent Advances in Drugs and Prodrugs Design of Chitosan. *Current Pharmaceutical Design*, **14**, 1311-1326 1311.
- Wu, Y. Q.; Hamilton, S. K.; Wilkinson, D. E.; Hamilton, G. S. (2002). Direct Synthesis of Guanidines Using Di(imidazole-1-yl)methanimine. *J. Org. Chem.*, **67**, 7553-7556.
- Xavier, C. P. M.; Síntese e Atividade Catalítica de biguanidinas; Dissertação de Mestrado, Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, pág. 4-10.
- Xie, W.; Xu, P.; Liu, Q. (2001). Antioxidant Activity of Water-Soluble Chitosan Derivatives; *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* , **11**, 1699–1701.
- Xu, X.; Liu, P.; Li, S.; Zhang, P.; Wang, X. (2006); Chitosan-Supported Imine Palladacycle Complex and Its Catalytic Performance For Heck Reaction, *Reaction Kinetics and Catalysis Letters*, **88**, 2, 217-223.
- Zhang, Y.; Jiang, J.; Chen Y. (1999); Synthesis and antimicrobial activity of polymeric guanidine and biguanidine salts; *Polymer*, **40**, 6189–6198.
- Zhao, Y.; Chen, J.; Zeng, E.; Hu, X.; Liu, A.; Dong, Y.; (2008). Synthesis and characterization of hydroxyethyl chitosan grafted by carboxyl ending DOVOB dendrimer: A novel liquid crystalline polymer, *Carbohydrate Polymers*, **74**, 828–833.