UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

MÁRCIA BARRETO CARDOSO

Contribuição ao estudo da reação de desacetilação de quitina: Estudos da desacetilação assistida por ultra-som de alta potência

São Carlos
(2008)

MÁRCIA BARRETO CARDOSO

Contribuição ao estudo da reação de desacetilação de quitina: Estudos da desacetilação assistida por ultra-som de alta potência

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Físico-Química
Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana Filho

São Carlos

(2008)

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, sob a exclusiva responsabilidade do autor.

São Carlos, 30/07/2008

_____

Márcia Barreto Cardoso

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Cardoso, Márcia Barreto
Contribuição ao estudo da reação de desacetilação de quitina: estudos da desacetilação assistida por ultra-som de alta potência. / Márcia Barreto Cardoso. -- São Carlos, IQSC, 2008.
102p.

Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2008.
Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana Filho

1. Quitina. 2. Quitosana. 3. Ultra-som. 4. Desacetição. 5. Caracterização. I.Título

Referências Bibliográficas conferidas pelo SBI/IQSC

Ao Rafael, pelo incentivo, compreensão, apoio, ajuda e presença constante.

Aos meus pais, Expedito e Maria, e à minha irmã, Mônica.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana Filho, pela orientação, paciência e constante estímulo à pesquisa e ao aprendizado no decorrer da minha formação profissional.

Aos amigos do Grupo de Físico-Química Orgânica, especialmente à Ilce, à Franciéli, à Roberta e ao Wanderson, pela ajuda nos momentos mais críticos, pelo companheirismo e por tornarem, com as suas presenças, o laboratório um ambiente tão agradável e favorável à pesquisa e ao estudo.

Ao Douglas de Britto e ao Rodrigo Lavall, por todo o auxílio prestado.

Aos colegas do Grupo de Físico-Química Orgânica: Bianca, Cristina, Daniella, Elaine, Érika, Jorge, Juliana, Leonardo, Maurício, Rejane e Talita, pela convivência e pelos debates da sala 44.

Aos técnicos: Márcia, Sylvana, Carlos, Márcio, Virgínia e Mauro, pelas análises realizadas, pela competência e pela paciência.

Aos técnicos do STI: Talhati, Flávio, Irineu e Ângelo, pelo auxílio com a manutenção dos computadores.

Aos pesquisadores e pós-graduandos da EMBRAPA Instrumentação Agropecuária: Luiz Alberto Colnago, Lucimara Aparecida Forato e Poliana Macedo dos Santos, pela cordialidade e pelas análises de ressonância magnética nuclear.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS **8**

LISTA DE TABELAS **10**

LISTA DE ABREVIATURAS **11**

LISTA DE SÍMBOLOS **12**

RESUMO **13**

ABSTRACT **14**

1 INTRODUÇÃO **15**

1.1 Quitina e quitosana **17**

1.1.1 Caracterização 19

1.1.1.1 Determinação do grau médio de acetilação 20

1.2 Determinação da massa molar média **25**

1.3 Quitina e quitosana no estado sólido **28**

1.4 Obtenção de quitina **31**

1.5 Desacetilação de quitina **33**

JUSTIFICATIVA **39**

OBJETIVOS **42**

PARTE EXPERIMENTAL **43**

2 MATERIAIS E MÉTODOS **43**

2.1 Extração de α-quitina **43**

2.1.1 Desmineralização 44

2.1.2 Desproteinização 44

2.1.3 Despigmentação 45

2.2 Extração de β-quitina **45**

2.2.1 Desproteinização de gládios (Método I) [67,94] 45

2.2.2 Desproteinização de gládios (Método II) [65] 46

2.3 Desacetilação de α-quitina **46**

2.4 Desacetilação de β-quitina **47**

2.4.1 Desacetilação heterogênea [67] 47

2.4.2 Desacetilação homogênea [62] 47

2.4.3 Desacetilação de α- e β-quitina assistida por ultra-som 48

2.5 Ensaios para determinação de parâmetros cinéticos da reação de desacetilação heterogênea assistida por ultra-som **50**

3 CARACTERIZAÇÕES **53**

3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) **53**

3.2 Estabilidade térmica **53**

3.3 Cristalinidade **54**

3.4 Determinação do grau médio de acetilação (%$\overline{GA}$) **54**

3.4.1 Determinação do grau médio de acetilação (%$\overline{GA}$) por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^{1}H-RMN) 54

3.4.2 Determinação do grau médio de acetilação (%$\overline{GA}$) por titulação condutimétrica 57

3.4.3 Determinação do grau médio de acetilação (%$\overline{GA}$) por análise elementar 59

3.5 Determinação da massa molar média das amostras de quitosana por viscosimetria capilar **59**

SÍMBOLOS UTILIZADOS **61**

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO **63**

4.1 Caracterização e processamento das matérias-primas **63**

4.2 Desacetilação de quitina **67**

4.2.1 Desacetilação heterogênea versus desacetilação assistida por ultra-som 71

4.2.2 Estudo cinético da desacetilação assistida por ultra-som 82

5 CONCLUSÕES **87**

6 PERSPECTIVAS **90**

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **92**

APÊNDICE A **101**

APÊNDICE B **103**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação das estruturas primárias idealizadas de celulose (a) e de quitina (b).17
Figura 2. Representação da estrutura primária idealizada da quitosana. 17
Figura 3. Representação da unidade repetitiva comum à quitina e à quitosana, sendo *GA* o grau médio de acetilação do copolímero. 19
Figura 4. : Espectro RMN ^{1}H de quitosana adquirido a 80°C a partir de solução da amostra em HCl/D2O 24
Figura 5: Representação esquemática das ligações hidrogênio intermoleculares entre segmentos de cadeias adjacentes 29
Figura 6. Representação do arranjo dos segmentos de cadeia e da disposição das folhas na estrutura correspondentes à α-quitina (a) e da β-quitina (b).. 30
Figura 7. Fotografias de exemplares do camarão (a) e da lula (b), cujos resíduos foram empregados como matéria-prima neste trabalho. 43
Figura 8. Representação dos procedimentos experimentais realizados para obtenção de α-quitina. 44
Figura 9. Representação do procedimento realizado para obtenção de β-quitina (Método I).. 46
Figura 10. Representação do procedimento realizado para obtenção de β-quitina (Método II). 46
Figura 11: Esquema do procedimento adotado nas reações de desacetilação heterogênea assistida por ultra-som. 49
Figura 12. Esquema representativo do processo de desacetilação de quitina. 50
Figura 13. Espectros de RMN ^{1}H da solução da solução de DCl / D_2O 20%, da solução de DCl / D_2O 20% com adição de DSS e de uma amostra de quitina..... 55
Figura 14. Espectro de RMN ^{1}H característico de uma amostra de quitina (DCl / D_2O 20%, 80°C)..... 55
Figura 15. Curva de titulação condutimétrica característica de uma amostra de quitosana..... 57
Figura 16. Difratogramas de de α-quitina (A) e β-quitina (B) extraídas de cefalotórax de *M. rosenbergii* e de gládios de *L. plei* e *L. sanpaulensis*, respectivamente. 66
Figura 17. Representação esquemática das estruturas de α-quitina e β-quitina no estado sólido. 68

Figura 18. Avanço da reação de desacetilação destacando o domínio cinético e o patamar de velocidade de reação constante.....69
Figura 19. Representação esquemática das cinéticas de desacetilação por processo multietapas, antes e após a otimização das condições reacionais (curvas superiores), e processo contínuo (curva inferior).....70
Figura 20. Difratogramas das amostras de α-quitina (A), α-quitina desacetilada por 6h, a 115°C ((Ad)6/115), α-quitina irradiada com ultra-som e em seguida desacetilada por 1h, a 100°C ((As4d)1/100) e de α-quitina desacetilada durante 1h, a 100°C ((Ad)1/100).....73
Figura 21. Difratogramas das amostras de β-quitina (B), β-quitina irradiada com ultra-som e em seguida desacetilada por 2h, a 100°C ((Bs4d)2/100), β-quitina irradiada com ultra-som e em seguida desacetilada por 1h, a 100°C ((Bs4d)1/100) e β-quitina desacetilada por 3 h, a 80°C ((Bd)3/80).....74
Figura 22. Difratogramas das amostras de β-quitina (B), β-quitina irradiada com ultra-som e em seguida desacetilada por 1h, a 100°C ((Bs4d)1/100), β-quitina irradiada com ultra-som e em seguida resfriada e neutralizada (Bs4) e β-quitina desacetilada por 1 h, a 100°C ((Bd)1/100).....75
Figura 23. Micrografias das amostras B (a) e (Bd)1/100 (b).....78
Figura 24: Micrografias das amostras (Bs2d) 1/100 (a) e (Bs4d) 1/100 (b).....79
Figura 25. Micrografias das amostras B (a) e (Bd)1/100 (b).....80
Figura 26. Micrografias das amostras (Bs2d) 1/100 (a) e (Bs4d) 1/100 (b).....81
Figura 27. Representação esquemática do processo de intumescimento das cadeias de α- e β-quitina pelos reagentes, adaptada da referência 95.....84
Figura 28. Curvas cinéticas da desacetilação de β-quitina assistida por ultra-som, nas quais $\overline{GD}$ representa o grau médio de desacetilação.....85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Bandas de absorção e números de onda (cm-1) características de quitina e quitosana [(a)] 22

Tabela 2. Razões de intensidades de bandas propostas para a avaliação de $\overline{GA}$ por espectroscopia no infravermelho 22

Tabela 3. Descrição das condições reacionais adotadas nos experimentos destinados à determinação dos parâmetros cinéticos da desacetilação de β-quitina assitida por ultra-som . 52

Tabela 4. Símbolos utilizados para identificar os cefalotórax e as amostras de quitina obtidas 61

Tabela 6. Composição percentual aproximada das matérias-primas empregadas para a extração de α- e β-quitina [(a)] 64

Tabela 7. Teor de cinzas encontrado em amostras de cefalotórax de camarão antes (amostra C) e após a desmineralização (amostra C_M) 65

Tabela 8. Valores de grau médio de acetilação ($\%\overline{GA}$) das alomorfas de α-quitina, β-quitina e dos derivados desacetilados de α-quitina 76

Tabela 9. Valores de viscosidade intrínseca [η], massa molar média viscosimétrica ($\overline{MM}_v$) e grau médio de acetilação ($\%\overline{GA}$) dos derivados desacetilados de α- e de β-quitina..... 76

Tabela 10. Energia de ativação da reação de desacetilação heterogênea de quitina 82

LISTA DE ABREVIATURAS

$\%\overline{GA}$ = Grau médio de acetilação

$\%\overline{GD}$ = Grau médio de desacetilação ($\%\overline{GD}$ = 100 - $\%\overline{GA}$)

$\%\overline{GP}$ = Grau médio de polimerização

RMN = Ressonância magnética nuclear

$\overline{M}_v$ = Massa molar média viscosimétrica

GPC = Cromatografia de permeação em gel

GlcN = D-glucosamina

GlcNAc = N-acetil-D-glucosamina

TG = Termogravimetria

rpm = Rotações por minuto

DSS = Ácido 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfônico

LISTA DE SÍMBOLOS

$[\eta]$= Viscosidade intrínseca

η_{sp} = Viscosidade específica

η_{rel} = Viscosidade relativa

η_{red} = Viscosidade reduzida

k_H = Constante de Huggins

Å = angstrom (1Å = 10^{-10} m)

RESUMO

CARDOSO, M. B. **Contribuição ao estudo da reação de desacetilação de quitina: Estudos da desacetilação assistida por ultra-som de alta potência.** 2008. 102 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

Quitosana é um polímero de baixa toxicidade, biodegradável e biocompatível, obtido pela desacetilação heterogênea de quitina, que é um polissacarídeo encontrado abundantemente na biomassa. Em meios aquosos de acidez moderada, a quitosana também exibe comportamento de polieletrólito catiônico, reunindo, assim, características que favorecem a sua aplicação em diversas áreas, dentre elas, agricultura, medicina, indústrias alimentícia e de cosméticos. As principais limitações ao uso da quitosana em grande escala estão relacionadas à dificuldade em conciliar os custos de produção e a obtenção de quitina/quitosana com características uniformes e presença reduzida de impurezas. De modo geral, os métodos físicos e químicos propostos na literatura favorecem a obtenção de quitosanas mais desacetiladas e com distribuição mais uniforme de unidades, no entanto, são pouco viáveis, principalmente do ponto de vista econômico, para aplicações em escala industrial. Neste trabalho, as alomorfas α- e β-quitina foram extraídas da biomassa, i. e., cefalotórax de *Macrobrachium rosenbergii* e gládios de *Loligo plei* e *L. sanpaulensis*, respectivamente, e usadas como matérias-primas para obtenção de quitosana empregando diferentes procedimentos. Assim, diferentes metodologias de desacetilação de quitina foram executadas, a saber, a desacetilação heterogênea, a desacetilação precedida pela execução de ciclos térmicos (método FPT) e a desacetilação assistida por ultra-som. Também foi realizado um estudo cinético da reação de desacetilação assistida por ultra-som. Com base nos resultados de %GA das amostras de quitina e de quitosana, os quais foram obtidos por espectroscopia de RMN ^{1}H, análise elementar e titulação condutimétrica, pôde ser observado que o uso de ultra-som favoreceu o processo de desacetilação. Além disso, os resultados do estudo cinético da reação assistida por ultra-som a 100°, 110° e 120°C indicaram que o domínio cinético da reação foi abreviado para tempos inferiores a 30 min e que o patamar de velocidade constante corresponde a uma desacetilação mais completa (GA< 20%) do que aquele atingido com o uso do método de desacetilação heterogênea (20% < %GA < 45%). Estas conclusões estão de acordo com as caracterizações por difração de raios X, as quais revelaram a progressiva destruição dos domínios cristalinos à medida que os produtos foram mais desacetilados. Dessa forma, a desacetilação assistida por irradiação de ultra-som de alta potência possibilitou, de um modo mais simples e rápido, a obtenção de quitosanas com características semelhantes às obtidas após o emprego do método FPT, sendo que este último é relatado na literatura como o método mais eficiente para produção de quitosanas extensivamente desacetiladas. É proposto que a irradiação de ultra-som de alta potência contribuiu para aumentar acentuadamente a área superficial das partículas de quitina, propiciando pleno acesso do hidróxido de sódio aos grupos acetamida do polímero e promovendo a sua desacetilação homogênea.

Palavras-chave: quitina, quitosana, ultra-som, desacetilação, caracterização.

ABSTRACT

CARDOSO, M. B. **Contribution to the study of the chitin deacetylation reaction: Studies on the deacetylation of chitin assisted by power ultrasound.** 2008. 102 f. Thesis (Doctoral) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

Chitosan is a low toxicity, biodegradable and biocompatible polymer which is obtained by deacetylating chitin, an abundant polysaccharide. The applications of chitosan in several areas, such as agriculture, food and cosmetic industries, are favored by its cationic polyelectrolyte character, conferred by dissolving chitosan in moderately acid aqueous media. The main limitation to the widespread use of chitosan concerns the compromise between the production costs and the accomplishment of uniform characteristics and reduced amount of impurities. However, the physical and chemical methods currently proposed to deacetylate chitin which allow the production of chitosan with such characteristics are not feasible for large scale production. In this work, the allomorphs α- and β-chitin were extracted from the biomass, i. e., the cephalothoraxes of *Macrobrachium rosenbergii* and squid pens from *Loligo plei* and *L. sanpaulensis*, respectively, and then they were used as raw materials to produce chitosan. Thus, different methods for deacetylating chitin were used, such as the heterogeneous deacetylation, the freeze – pump out – thaw method (FPT method) and the ultrasound assisted deacetylation. Also, the kinetics of the ultrasound assisted chitin deacetylation was studied. From the values of average degree of acetylation (%DA) of chitin and chitosan samples, which were determined by ^{1}H NMR spectroscopy, elemental analysis and conductimetry, it was observed that the ultrasound treatment favored the deacetylation of chitin. Moreover, the study on the kinetics of the ultrasound assisted chitin deacetylation at 100°, 110° and 120°C showed that the kinetics domain was shortened to times lower than 30 min as compared to the heterogeneous reaction. Additionally, the plateau of constant DA attained at this time corresponds to a more efficient deacetylation (DA< 20%) as compared to the heterogeneous deacetylation (20% < DA < 45%). Accordingly, the X-rays diffraction experiments revealed the progressive destruction of the crystalline domains as the deacetylation reaction progressed. This work showed that the ultrasound assisted chitin deacetylation is a faster and simpler process to produce chitosan as compared to the methods currently used. Moreover, it allows the preparation of chitosans with characteristics similar to those produced by applying the FPT method, a process reported as the most efficient ever developed to promote the deacetylation of chitin, and it allows that in a simpler and faster manner as well. It is proposed that as a consequence of the ultrasound irradiation the superficial area of the chitin particles increased dramatically, increasing the accessibility to the acetamida groups and promoting a nearly homogeneous deacetylation of chitin.

Keywords: chitin, chitosan, deacetylation, power ultrasound, characterization.

1 Introdução

A biomassa é definida como a massa de matéria orgânica presente nos organismos, em ecossistemas ou em determinada população animal ou vegetal. Sua composição é, em geral, complexa e varia enormemente em função de vários fatores, como os organismos e as espécies consideradas, as condições climáticas e sazonais, o tempo e a temperatura de armazenagem, o local de coleta, etc. A biomassa pode ser empregada como fonte de energia e como matéria-prima, sendo que o seu aproveitamento pode contribuir para reduzir a quantidade de resíduos descartados no meio ambiente, além de abrir a possibilidade de substituição parcial dos combustíveis fósseis por uma fonte alternativa de energia, abundante e renovável [1]. Nesse sentido, a partir da década de 1970, o interesse em pesquisas visando o aproveitamento da biomassa foi renovado, o que tem possibilitado o desenvolvimento de tecnologias mais eficientes, como, por exemplo, nos processos de combustão, pirólise e gaseificação da biomassa para obtenção de energia [2].

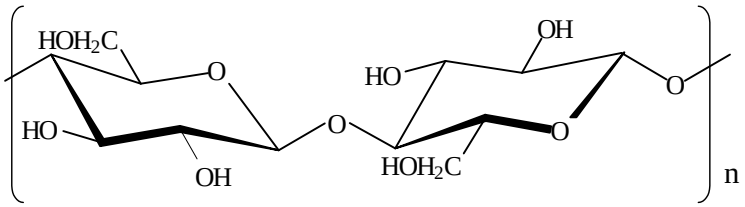
Além do desenvolvimento de tecnologias mais eficientes para obtenção de energia, as pesquisas visando o melhor aproveitamento da biomassa também favoreceram o desenvolvimento de novos produtos, como espessantes, fibras, biomateriais, produtos farmacêuticos e terapêuticos [3]. Muitos destes materiais são desenvolvidos a partir de macromoléculas presentes nos resíduos da agroindústria (bagaço, folhas, caules), da indústria pesqueira (cascas de camarões, carapaças de caranguejos) e das indústrias de processamento alimentício (farelos, tortas). Conseqüentemente, a biomassa é uma fonte de matéria-prima relativamente barata, renovável e que pode ser utilizada para o desenvolvimento de novos produtos e materiais. No entanto, dentre os aspectos desfavoráveis ao aproveitamento da biomassa para essas finalidades, devem ser destacadas as dificuldades nas etapas de extração, conversão e processamento da matéria-prima, que demandam o emprego de processos físicos

e químicos vigorosos, resultando em consumo de energia e na geração de resíduos, cujo descarte pode provocar danos ao ambiente. Além disso, por se tratar de matéria-prima derivada diretamente da natureza, podem ocorrer grandes variações de composição em função de fatores já mencionados, as quais demandam o freqüente ajuste das condições de processamento.

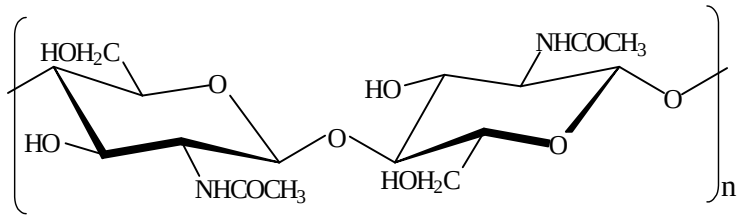
Os polissacarídeos, macromoléculas constituídas por resíduos de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas, ocorrem abundantemente na biomassa, podendo ser encontrados em animais, plantas e microrganismos. Nos seres vivos, os polissacarídeos têm muitas funcionalidades, como materiais estruturais, para armazenamento de energia e também para conferir propriedades biológicas específicas [4].

Quitina e celulose são os polissacarídeos mais abundantes na biomassa. A celulose ocorre abundantemente nos vegetais, conferindo resistência mecânica, e atuando como um dos componentes da parede celular. A quitina é encontrada em animais invertebrados, nos quais é um dos componentes do exoesqueleto, e em alguns microrganismos, nos quais é um dos componentes da parede celular. De fato, o termo quitina é derivado da palavra grega *khitón*, que significa envoltório ou caixa de revestimento [5].

As semelhanças nas funções exercidas pela celulose e pela quitina nos seres vivos podem ser atribuídas às suas características estruturais semelhantes [5], pois ambas são macromoléculas constituídas de unidades de glicopiranose, unidas por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$. A principal diferença estrutural se refere ao grupo funcional ligado ao carbono 2 do anel de glicopiranose, que na celulose é o grupo hidroxila (Figura 1(a)) e na quitina é o grupo acetamida (Figura 1(b)). Além disso, como será discutido posteriormente, a disposição relativa das cadeias de quitina nas lamelas resulta em diferentes polimorfas, α-quitina e β-quitina, as quais têm funcionalidades diferentes nos organismos em que ocorrem.



(a)



(b)

Figura 1. Representação das estruturas primárias idealizadas de celulose (a) e de quitina (b).

1.1 Quitina e quitosana

A quitina é um polissacarídeo encontrado abundantemente em animais invertebrados de diversos filos, tais como *Arthropoda*, *Annelida*, *Mollusca* e *Coelenterata*, e também em vários fungos como, por exemplo, *Eusomycetes*, *Zygomycetes* e *Deuteromycetes* [6]. A quitosana (Figura 2) é o principal derivado de quitina e pode ser encontrada em determinados fungos, embora em pequena quantidade. Assim, como será discutido posteriormente, a principal via de obtenção de quitosana é a execução da reação de desacetilação de quitina [5].

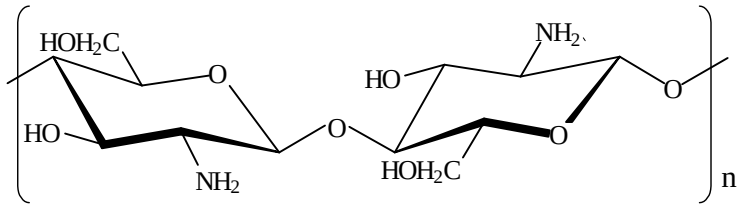


Figura 2. Representação da estrutura primária idealizada da quitosana.

Quitina e quitosana são polímeros biodegradáveis, biocompatíveis e de baixa toxicidade. Estas propriedades possibilitam a aplicação destes polissacarídeos em diversas aplicações biotecnológicas, nas quais a ausência de contaminantes e a elevada massa molar

dos polímeros também constituem características de grande importância [7]. Além disso, em soluções aquosas de ácidos diluídos, a quitosana adquire cargas positivas devido à protonação dos grupos amino de suas cadeias e passa a exibir o comportamento de um polieletrólito catiônico [8]. Essas características conferem grande potencial de aplicação à quitosana em diversas áreas tais como na indústria alimentícia, para o processamento de alimentos, em formulações farmacêuticas, para a elaboração de dispositivos para liberação controlada de medicamentos, e em formulações cosméticas [9,10,11,12].

Quitina e quitosana são termos amplamente empregados, embora nenhum deles represente uma estrutura química única. De forma geral, a proposta mais aceita é que este polissacarídeo não seja encontrado na natureza como uma substância pura, uma vez que a quitina ocorre associada a outras substâncias, como proteínas, sais de cálcio, pigmentos e lipídeos [13,14]. De fato, quitina pura foi identificada, até agora, apenas em algas diatomáceas *Thalassiosira fluviatis* e *Cyclotella cryptica* [5]. Neste contexto, a palavra quitina designa o polissacarídeo obtido a partir da biomassa após o emprego de processos de purificação rigorosos, os quais removem outros componentes e, também, podem provocar modificações na estrutura nativa da quitina.

Assim, quitina pura corresponde geralmente ao material isolado e purificado a partir da biomassa e não a um produto de composição química bem definida, pois após os processamentos empregados na extração do polissacarídeo ainda podem restar substâncias contaminantes, tais como fragmentos de proteínas e sais inorgânicos. Além disso, tais processamentos também podem resultar na hidrólise de grupos acetamida, em diferente extensão conforme a severidade dos tratamentos e a matéria-prima empregada para extrair a quitina. Por outro lado, a desacetilação de quitina para preparação de quitosana geralmente resulta na hidrólise parcial dos grupos acetamida e o produto resultante apresentará diferentes conteúdos residuais de unidades acetiladas e desacetiladas. Desta forma, quitina e quitosana

podem ser classificados como copolímeros constituídos por diferentes conteúdos de unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranose e 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranose (Figura 3).

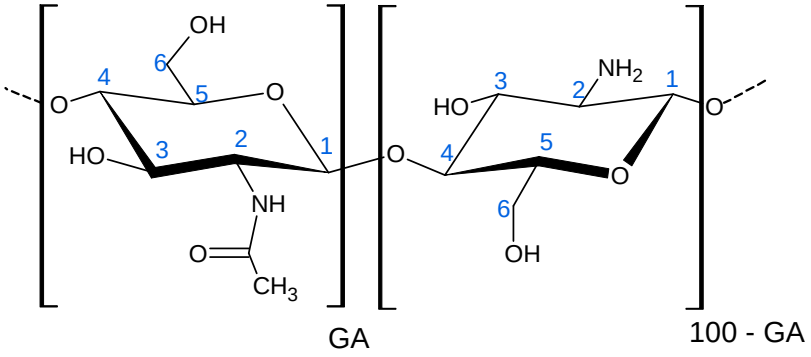


Figura 3. Representação da unidade repetitiva comum à quitina e à quitosana, sendo *GA* o grau médio de acetilação do copolímero.

Os copolímeros com predominância de unidades acetiladas (GlcNAc), solúveis apenas em solventes específicos (como N,N-dimetilacetamida contendo 5% de cloreto de lítio) são denominados quitina, enquanto os copolímeros com maior abundância de unidades desacetiladas (GlcN), que são solúveis em soluções de ácidos diluídos, são denominados quitosanas [5,15]. Desta forma, quitina e quitosana descrevem copolímeros que podem ser distintos em termos de solubilidade e de grau médio de acetilação [16], $\overline{GA}$, que é a medida do número médio das unidades de N-acetil-D-glicosamina presentes nas cadeias macromoleculares. Essa característica estrutural, bem como a distribuição de unidades acetiladas e desacetiladas, a massa molar média e a polidispersividade do polímero, afetam fortemente suas propriedades e, conseqüentemente, suas aplicações. Assim, no tópico a seguir serão abordados os aspectos relativos à caracterização de quitina e quitosana.

1.1.1 Caracterização

As principais características do conjunto de copolímeros constituído por quitina e quitosana são o grau médio de acetilação ($\overline{GA}$), o grau médio de polimerização ($\overline{GP}$), também expresso em função das massas molares médias dos polímeros (massa molar média

ponderal, $\overline{M}_w$; massa molar média viscosimétrica, $\overline{M}_v$; massa molar média numérica, $\overline{M}_n$), a polidispersividade e a distribuição de unidades acetiladas e desacetiladas ao longo das cadeias poliméricas. Além disso, no estado sólido quitina e quitosana ocorrem como várias alomorfas e a caracterização empregando técnicas de difração de raios X também é muito importante. Assim, as características estruturais dos copolímeros e suas determinações são discutidas a seguir.

1.1.1.1 Determinação do grau médio de acetilação

O grau médio de acetilação (ou seja, a fração molar de resíduos de N-acetil-D-glucosamina nas cadeias poliméricas, conforme descrito na Eq. 1) e o grau médio de polimerização ($\overline{GP}$), bem como a distribuição de unidades acetiladas (GlcNAc) e desacetiladas (GlcN) ao longo das cadeias, afetam tanto as propriedades físico-químicas como a bioatividade de quitina e quitosana.

$$\%\overline{GA} = \left(\frac{n_{GlcNAc}}{n_{GlcNAc} + n_{GlcN}} \right) \times 100 \qquad \text{Eq. 1}$$

Assim, a determinação precisa de $\overline{GA}$ é uma tarefa rotineira para os pesquisadores da área, e muitos esforços têm sido empenhados para desenvolver métodos rápidos, baratos, confiáveis e reprodutíveis, porém nenhum deles atende a todos esses requisitos em todo o intervalo de grau médio de acetilação. Dentre as técnicas mais empregadas, podem ser destacadas:

- Técnicas de dosagem, tais como titrimetria ácido/base [17,18,19] e coloidal [20], colorimetria [21] e metacromasia [22,23];
- Técnicas espectroscópicas, como, por exemplo, espectroscopia nas regiões do ultravioleta [24,25,26] e do infravermelho [27], dicroísmo circular [28], ressonância magnética nuclear e espectroscopia de massa [29,30];

- Técnicas cromatográficas [24,31,32,33,34];
- Análise elementar [31,35], análise térmica [36,37] e;
- Métodos de hidrólise enzimática [38,39].

Algumas dessas técnicas permitem a determinação direta de $\overline{GA}$ (RMN; FTIR; titulação ácido/base; análise elementar), porém a maioria das análises demanda uma etapa de calibração a partir dos resultados obtidos com uma das técnicas inicialmente citadas. Muitos estudos têm sido desenvolvidos no sentido de padronizar e comparar as técnicas empregadas para a determinação de $\overline{GA}$, mas não há convergência quanto a uma técnica universal e acessível. Assim, alguns métodos são considerados pouco confiáveis (técnicas de dosagem, espectroscopia na região do ultravioleta) [40], singulares (dicroísmo circular), restritos a intervalo pequeno de $\overline{GA}$ (métodos enzimáticos) ou de $\overline{GP}$ (espectrometria de massa), de custo elevado (espectrometria de massa, RMN), bem como necessitam de etapas longas e trabalhosas para a preparação das amostras (análises dos produtos de hidrólise química ou enzimática por HPLC e CG). Dentre as técnicas analíticas citadas, é atualmente bem aceito que aquelas que empregam as espectroscopias de ressonância magnética nuclear e no infravermelho são as mais adequadas e amplamente utilizadas para a determinação de $\overline{GA}$, embora ambas também possuam limitações. Assim, no que se segue será dado destaque ao emprego dessas técnicas espectroscópicas para a determinação do $\overline{GA}$.

A espectroscopia no infravermelho é a técnica mais largamente empregada para avaliar $\overline{GA}$ no intervalo de 0 a 100%, porém a aquisição dos espectros e o tratamento dos dados exigem cuidados especiais. Sua aplicação se baseia no estudo da variação da intensidade de uma banda característica da quitina (quitosana) em relação a alguma banda de referência. As principais bandas características e de referência são listadas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1. Bandas de absorção e números de onda (cm^{-1}) características de quitina e quitosana [(a)]

Banda	$\bar{\nu}$ (cm^{-1})	Banda	$\bar{\nu}$ (cm^{-1})
Amida I (-C=O-NH_2)	≈ 1650 e 1630	Amida II (-C=O-NH_2)	≈ 1550 e 1560
Amida III (-C=O-NH_2)	≈ 1310	-N-H_3^+ *(s)*	≈ 3350 - 3100 e 2100 [41]
-N-H_2 *(s)*	≈ 3250 - 3350	-N-H_2 *(b)*	≈ 1590 - 1630
-O-H *(s)*	≈ 3450	-O-H *(b)*	≈ 1260 [42]
-C-OH *(s)*	≈ 1030 e 1070	-C-H_2 *(b, sc)*	≈ 1410 - 1420
-NH-C(O)-C-H_3 *(s)*	≈ 1380	-NH-C(O)-C-H_3 *(b)*	≈ 2860 - 2910

(a) *s* = estiramento (“stretching”); *b* = torção (“bending”); *sc* = (“scissor”).

Tabela 2. Razões de intensidades de bandas propostas para a avaliação de $\overline{GA}$ por espectroscopia no infravermelho

Banda de referência	Referência interna [(a)]	$\overline{GA}$ (%) [(b)]	Intervalo de $\overline{GA}$	Referência
Amida I	-O-H *(s)*	$\frac{A_{1655}}{A_{3450}} x(k=[0,75;1,15])x100$	$\overline{GA}$ > 10 %	28,43,44,45,46
Amida II	-NH-C(O)-C-H_3 *(b)*	$\frac{A_{1550}}{A_{2878}} xk$	$\overline{GA}$ baixos	47
Amida I	-NH-C(O)-C-H_3 *(b)*	$\frac{A_{1655}}{A_{2878}} xk$	$\overline{GA}$ < 20 %	46,48
n.d.	n.d.	$31,92x\frac{A_{1320}}{A_{1420}}-12,2$	$\overline{GA}$ elevados	49,50
n.d.	-O-H *(s)*	$442,48x\frac{A_{1320}}{A_{3450}}-13,92$	n.d.	50
Amida I	-C-OH *(s)*	$\frac{A_{1655}}{A_{1070}} xk$	$\overline{GA}$ baixos	51
Amida II	-C-OH *(s)*	$\frac{A_{1560}}{A_{1030}} xk$	0-100 %	52
Amida II	-C-OH *(s)*	$\frac{A_{1560}}{A_{1070}} xk$	0-100 %	51,52

(a) *s* = estiramento (“stretching”); *b* = torção (“bending”);
(b) k = inclinação da reta que permite a correlação entre a razão de absorbâncias e o valor de $\overline{GA}$ do copolímero.

Como expresso na Tabela 2, a escolha das bandas de medida e de referência se reflete diretamente sobre a adequação de uma dada razão de absorbâncias a um intervalo específico

de $\overline{GA}$. Além dessa limitação, é preciso considerar que certas bandas são pouco intensas, apresentam baixa resolução e alguma superposição com outras bandas, e podem se deslocar em função do grau de hidratação da amostra e da ocorrência de ligações hidrogênio. Assim, levando em conta essas limitações e as dificuldades de avaliar precisamente as bandas e suas intensidades a partir da adoção de linhas de base adequadas, somadas à baixa reprodutibilidade dos resultados para $\overline{GA}$ > 60%, a espectroscopia no infravermelho encontra aplicação limitada para a determinação de $\overline{GA}$ de quitina e quitosana, fazendo com que atualmente a espectroscopia RMN seja a técnica mais empregada para essa finalidade.

A espectroscopia RMN apresenta a vantagem de empregar pequenas quantidades de amostra por análise, permitindo analisar tanto as amostras em estado líquido (RMN ^{1}H e ^{13}C) como aquelas no estado sólido (RMN ^{13}C e ^{15}N). No primeiro caso, as amostras de quitosana são solubilizadas em soluções moderadamente ácidas de D_2O contendo CD_3COOD, DCOOD ou DCl/HCl. Segundo a literatura [53], a aquisição dos espectros com soluções da quitosana em CD_3COOD/ D_2O não é a mais adequada devido à ocorrência de superposição dos sinais da amostra. Assim, é mais apropriado empregar soluções da amostra em HCl/ D_2O, pois, nestas condições, os sinais observados são mais bem resolvidos (Figura 4) e o valor de $\overline{GA}$ pode ser calculado pelo emprego das Equações (2) e (3):

$$\%\overline{GA} = \left(\frac{A_{CH3}}{3} \Big/ \frac{A_{H2-H6}}{6} \right) \times 100 \qquad \text{Eq. 2}$$

$$\%\overline{GA} = \left(\frac{A_{CH3}}{3} \Big/ A_{H2} \right) x100 \qquad \text{Eq. 3}$$

Sendo: A_{CH3} a área correspondente aos hidrogênios metílicos do grupo acetamida; A_{H2-H6} a soma das áreas dos hidrogênios ligados aos carbonos 2-6 do anel glicopiranosídico e A_{H2} a área do hidrogênio ligado ao carbono 2 do anel glicopiranosídico.

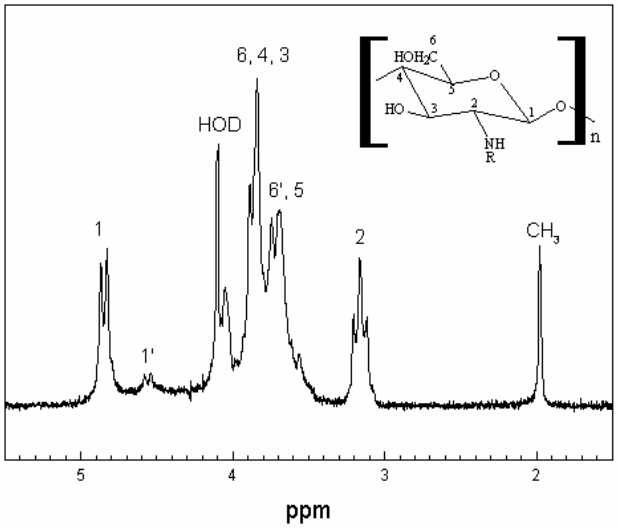


Figura 4. : Espectro RMN ^{1}H de quitosana adquirido a 80°C a partir de solução da amostra em HCl/D_2O [54].

Em função da qualidade do espectro, principalmente da resolução dos sinais, é possível empregar relações como as Equações (2) e (3), envolvendo as intensidades de outros hidrogênios, de modo que as soluções de quitosana em HCl/D_2O sejam as mais comumente empregadas. É importante frisar, entretanto, que a calibração do espectro e a atribuição dos sinais devem ser feitas com muito cuidado, pois os deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio presentes na solução (provenientes das unidades GlcNAc e GlcN, como também aqueles da água não-deuterada) são sensíveis ao pH (pD) da solução e, portanto, também são afetados pelo $\overline{GA}$ das amostras. Por outro lado, copolímeros como a quitina e as quitosanas pouco desacetiladas e de massa molar elevada não são suficientemente solúveis em HCl/D_2O e nem em qualquer dos outros solventes mencionados. Assim, alguns autores [55,56] têm proposto o uso de soluções mais concentradas de DCl/D_2O e o aquecimento das suspensões resultantes de modo a promover a despolimerização parcial das amostras e a sua conseqüente

solubilização. Tal abordagem permite a determinação de $\overline{GA}$ das amostras menos solúveis, mesmo de quitinas, porém é preciso ressaltar que o DCl pode provocar a hidrólise de grupos acetamida e a degradação das anéis de glicopiranose. Além disso, a cuidadosa calibração dos espectros e a atribuição dos sinais se tornam ainda mais importantes.

No caso da espectroscopia RMN ^{13}C, a técnica é útil para a caracterização de monômeros e oligômeros de GlcNAc e GlcN, mas seu caráter semiquantitativo não permite a determinação de $\overline{GA}$ dos copolímeros. As técnicas de espectroscopia RMN no estado sólido CP/MAS ("Cross Polarization/Magic-Angle Spining") de carbono [57] e de nitrogênio [58] permitem a determinação precisa de $\overline{GA}$ e também permitem o estudo das diferentes alomorfas de quitina e quitosana, mas demandam longos tempos de aquisição e, principalmente no caso do nitrogênio, o uso de sondas muito sensíveis e caras.

Conforme o que foi brevemente discutido, não há uma técnica universal e absoluta para determinar $\overline{GA}$ em todo intervalo desde os copolímeros até os homopolímeros de GlcNAc e GlcN. Em função dos fatores mencionados e da disponibilidade dos equipamentos, os pesquisadores fazem uso da técnica que melhor se adapta as suas necessidades, sendo que as técnicas de titulação e de espectroscopias no infravermelho e de ressonância magnética nuclear, principalmente RMN ^{1}H, são freqüentemente as mais empregadas.

1.2 Determinação da massa molar média

A determinação de massa molar média de quitina e de quitosana pode ser realizada pelo uso das técnicas comumente usadas para polímeros sintéticos, mas as mais empregadas são a cromatografia de exclusão por tamanho (GPC), o espalhamento de luz e a viscosidade de soluções diluídas. Entretanto, será discutida aqui apenas a técnica viscosimétrica, que foi empregada neste trabalho, sendo também excluída a discussão da espectrometria de massas, por ter seu uso restrito nos casos de quitina e quitosana.

A viscosidade de uma cadeia polimérica em solução diluída e em condições de fluxo laminar, assumindo-se que tal fluido exiba o comportamento de líquidos newtonianos, é função de seu volume hidrodinâmico e, portanto, de suas dimensões macromoleculares. Assim, a medida da viscosidade da solução de polímero reflete a resistência ao escoamento e a viscosidade intrínseca da cadeia macromolecular dependerá também de sua permeabilidade ao solvente, isto é, de sua capacidade de deixar o solvente permear o espaço definido como seu volume hidrodinâmico. No caso de uma macromolécula isolada em um bom solvente a aproximação ao modelo de esfera estatística se verifica e para soluções suficientemente diluídas as seguintes definições são válidas:

- Viscosidade relativa: $\eta_{rel} = t/t_0 = \eta/\eta_0$ Eq. 4
- Viscosidade específica: $\eta_{sp} = (\eta - \eta_0)/\eta_0 = \eta_{rel} - 1$ Eq. 5

Nas quais t e t_0 representam os tempos de escoamento da solução polimérica de concentração C e do solvente puro, respectivamente.

No regime diluído, tanto nos casos de polímeros neutros como nos de polieletrólitos em presença de concentração suficientemente elevada de sal inerte, a relação de Huggins (Eq. 6) é válida.

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] + k_H.[\eta]^2.C \qquad \text{Eq. 6}$$

Em que: [η] = viscosidade intrínseca do polímero [59].

A quitosana comporta-se como um polieletrólito catiônico em soluções de ácidos diluídos, e sua viscosidade pode ser descrita pela Eq. (6) desde que a solução seja suficientemente diluída e haja de excesso de sal externo na solução. Dessa maneira, a

viscosidade intrínseca é determinada pela extrapolação da reta resultante da aplicação da relação de Huggins para a condição de diluição infinita.

A massa molar média do polímero pode ser determinada a partir do valor da sua viscosidade intrínseca, pelo emprego da relação de Mark-Houwink-Sakurada:

$$[\eta] = K\overline{M}_V{}^a, \qquad \text{Eq. 7}$$

Em que: K e a são constantes características do polímero, do solvente, da temperatura e da polidispersividade da amostra; $\overline{M}_V$ é a massa molar média viscosimétrica.

No caso de quitosana, não há consenso sobre a variação das constantes “K” e “a” em função do $\overline{GA}$ da amostra considerada e diferentes valores são adotados nas teses e nos trabalhos publicados [5,60]. Neste trabalho, como detalhado posteriormente, foram adotados diferentes valores das constantes citadas para quitosanas com diferentes $\overline{GA}$ dissolvidas no mesmo solvente (tampão ácido acético/acetato de sódio).

É importante ressaltar que, se no caso de quitosana a técnica de viscosidade é amplamente empregada e aceita como medida da massa molar média do polímero, apesar da falta de consenso acima mencionada, as soluções de quitina em N,N-dimetilformamida/LiCl 5%, um dos poucos sistemas solventes para esse polímero, apresentam comportamento marcadamente não-ideal. Assim, a solubilização parcial, a presença de agregados e a instabilidade dessas soluções são limitações que trazem como conseqüência o fato de que poucos laboratórios no mundo dominam a técnica e conseguem obter resultados relativamente reprodutíveis e confiáveis. Pelo mesmo motivo, a caracterização de quitina em solução pelas técnicas de espalhamento de luz e de cromatografia de exclusão por tamanho apresentam muitas dificuldades e não foram empregadas neste trabalho.

1.3 Quitina e quitosana no estado sólido

Os copolímeros estudados neste trabalho, como a maioria dos polímeros naturais, são semicristalinos e podem ocorrer como diferentes alomorfas. Como conseqüência de suas diferentes estruturas no estado sólido, quitina e quitosana exibem propriedades físico-químicas (solubilidade, capacidade de intumescimento, rigidez, etc.) e reatividades particulares. Assim, a estrutura das mais importantes alomorfas e as suas propriedades são discutidas a seguir.

De acordo com estudos de difração de raios X, quitina ocorre como três alomorfas, denominadas como α-, β- e γ-quitina. As duas primeiras alomorfas são as mais estudadas, enquanto a última tem sido proposta como uma estrutura intermediária às duas primeiras e não será discutida aqui.

As diferentes alomorfas de quitina apresentam regiões ordenadas nas quais as cadeias poliméricas se dispõem em arranjo paralelo, adotando mesma direção e sentido da extremidade redutora (carbono 1) para a não-redutora (carbono 4). Este arranjo favorece o estabelecimento de ligações hidrogênio intra e intermoleculares e a organização das cadeias em estruturas denominadas folhas (Figura 5). A orientação das cadeias de folhas adjacentes em sentido paralelo ou antiparalelo resulta em diferentes interações intermoleculares e, conseqüentemente, em diferentes estruturas no estado sólido.

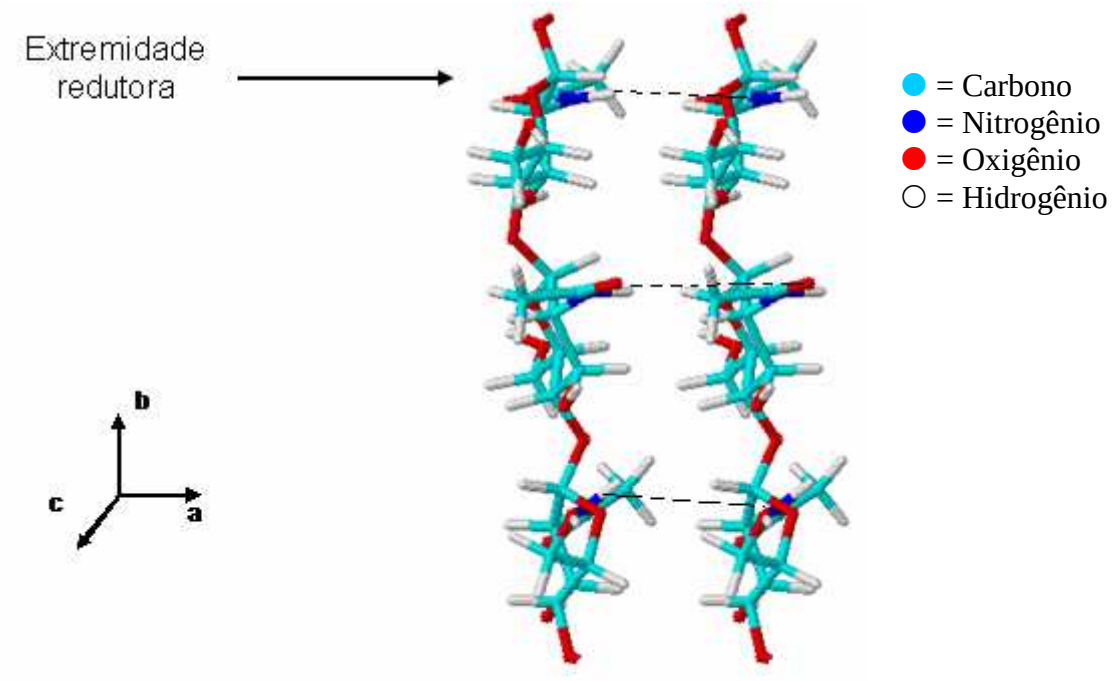


Figura 5: Representação esquemática das ligações hidrogênio intermoleculares entre segmentos de cadeias adjacentes.

Na estrutura correspondente à α-quitina, os segmentos de cadeia de folhas adjacentes estão dispostos de forma antiparalela, em um arranjo de cela unitária ortorrômbico. A disposição das folhas em sentido antiparalelo favorece o estabelecimento de ligações hidrogênio intermoleculares entre as cadeias de diferentes folhas, resultando em uma estrutura com elevado grau de ordem, insolúvel e de limitada capacidade de intumescimento em meios aquosos[61]. Na β-quitina, os segmentos de cadeia de diferentes folhas estão dispostos de forma paralela, o que dificulta o estabelecimento de ligações hidrogênio intermoleculares entre as cadeias de diferentes folhas, resultando em uma estrutura com empacotamento menos denso e cujo arranjo de cela unitária é do grupo monoclínico. Como as interações intermoleculares entre as folhas são menos intensas, a β-quitina apresenta maior solubilidade, maior intumescimento em meios aquosos e, devido à maior acessibilidade aos sítios reativos, maior reatividade do que a α-quitina [62,63].

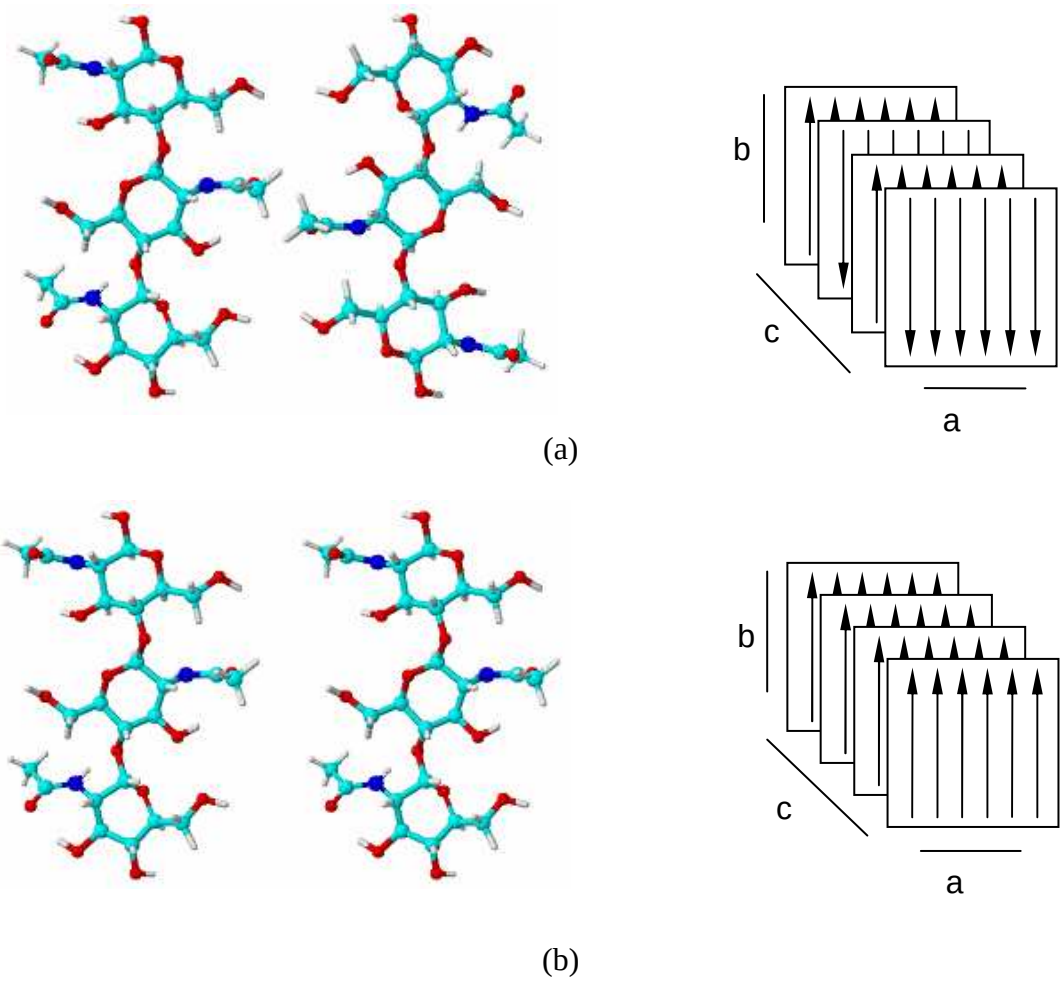


Figura 6. Representação do arranjo dos segmentos de cadeia e da disposição das folhas na estrutura correspondentes à α-quitina (a) e da β-quitina (b). (● = C; ●= N; ● = O e ○ = H). As setas representam as cadeias poliméricas (extremidade redutora → extremidade não-redutora).

A α-quitina é a forma mais estável, pois β- e γ-quitina podem ser convertidas irreversivelmente a α-quitina através de procedimentos adequados [64].

A α-quitina é a alomorfa mais abundante na biomassa, sendo encontrada principalmente em estruturas que demandam grande resistência mecânica, como os exoesqueletos de animais invertebrados. Nestes organismos, a α-quitina se encontra combinada, principalmente, com proteínas, minerais e pigmentos. Já a forma β-quitina é encontrada em estruturas que requerem maior flexibilidade, como, por exemplo, em gládios de moluscos.

1.4 Obtenção de quitina

Os exoesqueletos de crustáceos são constituídos, principalmente, de quitina, proteínas, sais minerais e pigmentos. Assim, o processo de extração de α-quitina a partir destes organismos compreende três etapas seqüenciais de tratamento: desmineralização, desproteinização e despigmentação [5]. A β-quitina pode ser obtida a partir de gládios de moluscos, nos quais ocorre combinada a proteínas e a pequena quantidade de sais inorgânicos. Assim, a extração de β-quitina requer procedimentos mais brandos do que aqueles empregados para extrair α-quitina, a qual ocorre fortemente combinada a proteínas e a carbonatos de cálcio e magnésio, cuja eliminação demanda a execução de desmineralização, geralmente por tratamento ácido. De fato, diferentemente do que ocorre nos casos das cascas de camarões e carapaças de caranguejos, a desmineralização dos gládios de lulas não é necessária. Assim, um procedimento brando de desproteinização dos gládios, executado a temperatura ambiente e empregando soluções alcalinas diluídas, permite a obtenção de β-quitina com teor bastante reduzido de contaminantes [65].

As cascas de crustáceos são formadas por 13%-42% de quitina, 30%-40% de proteínas e 30%-50% de carbonato de cálcio [66], além de pigmentos e lipídeos em pequena quantidade. Os gládios de lulas possuem 35%-40% de quitina, 60%-65% de proteínas e uma quantidade mínima de sais de cálcio [67]. Vários procedimentos, incluindo métodos químicos e enzimáticos, têm sido propostos para a extração de quitina, sendo que o mais empregado compreende três etapas: desmineralização, desproteinização e despigmentação.

Na desmineralização os carbonatos de cálcio e de magnésio são eliminados através de tratamento ácido, utilizando soluções de ácido clorídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico e outros [5]. As soluções diluídas de ácido clorídrico são as mais utilizadas e a reação, que gera cloretos hidrossolúveis e libera dióxido de carbono (ver reação a seguir), deve ser executada à

temperatura ambiente para evitar a ocorrência de severa despolimerização, preservando as características da quitina nativa.

$$2HCl + CaCO_3 \Rightarrow CaCl_2 + H_2O + CO_2$$

Os tratamentos propostos empregam diferentes condições, como temperaturas entre 0° e 100°C e tempos que variam de 30 min até mais que dois dias. Entretanto, um tratamento vigoroso (concentrações elevadas de ácido, temperaturas elevadas e reações prolongadas) pode causar modificações indesejadas, como a despolimerização e a desacetilação da quitina.

A etapa de desproteinização é executada para a remoção de proteínas através de um tratamento alcalino que emprega soluções diluídas de hidróxido de sódio (1-20%) a temperaturas que podem variar de 20° a 100°C. Neste tratamento, as proteínas presentes são hidrolisadas gerando fragmentos solúveis. Embora hidróxido de sódio seja o mais utilizado, outros reagentes podem ser empregados nessa etapa, tais como: Na_2CO_3, KOH, K_2CO_3, $Ca(OH)_2$, Na_2SO_3, $NHSO_3$, $CaHSO_3$, Na_3PO_4 e Na_2S [5]. Como na etapa de desmineralização, o tratamento alcalino prolongado em condições severas origina despolimerização e, principalmente, desacetilação da quitina. Desta forma, é recomendável que estas reações sejam realizadas em condições moderadas e por tempos curtos, suficientes para promover a remoção de proteínas sem modificar a estrutura nativa do polissacarídeo.

A despigmentação, quando necessária, é realizada através de tratamento de branqueamento com agentes oxidantes, como hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio e permanganato de potássio, ou por extração com solventes orgânicos, como etanol, acetona e éter etílico [5].

As condições e a seqüência de etapas empregadas na extração de quitina têm influência sobre o rendimento do processo e também sobre as características do polissacarídeo. Assim, um tratamento alcalino seguido de um tratamento ácido resulta em

maior rendimento de quitina, porém esta pode ser desacetilada durante o tratamento alcalino. Por outro lado, a seqüência inversa resulta em material com baixos teores de cinzas e metais, mas a quitina resultante apresenta menor massa molar, pois suas cadeias são degradadas pela ação do ácido.

Recentemente alguns trabalhos têm explorado o emprego de ultra-som de alta potência nas etapas de desproteinização e desmineralização de carapaças de camarões [63,68,69].

1.5 Desacetilação de quitina

A quitosana ocorre na natureza em alguns fungos, como *Aspergillus niger* e *Mucor rouxii* [11], mas em quantidade pouco expressiva e geralmente associada a outros polissacarídeos [5]. Assim, quitosana é geralmente obtida através da desacetilação de quitina, processo que pode ser executado por diferentes metodologias. A hidrólise enzimática é de aplicação restrita a laboratórios de pesquisa, pois os custos de extração e purificação de quitinases são muito elevados [70] e a eficiência da desacetilação muito baixa. Além disso, apenas quitinas pouco cristalinas e de baixa massa molar são susceptíveis à hidrólise enzimática [71]. A fusão alcalina promove acentuada desacetilação, mas é acompanhada de severa despolimerização, o que limita fortemente sua aplicação. A desacetilação homogênea também tem aplicação limitada, principalmente em razão da baixa eficiência e dos prolongados tempos de reação [62,72,73]. Além disso, processos não-convencionais têm sido propostos, como o tratamento por explosão a vapor [74], a extrusão reativa [75], o tratamento com microondas [76] e com ultra-som [77,78], entretanto, os procedimentos mais empregados ocorrem por via de desacetilação heterogênea [5,79].

A desacetilação heterogênea de quitina emprega soluções aquosas alcalinas, altas temperaturas e intervalos prolongados de tempo e, sem dúvida, é o método mais utilizado para obtenção de quitosana de grau médio de acetilação moderado ($\%\overline{GA}$ = 15-30%). Soluções

aquosas de NaOH, KOH, LiOH, $Ca(OH)_2$ e Na_3PO_4 podem ser empregadas para promover a hidrólise dos grupos acetamida, sendo que a primeira é a mais utilizada. Neste método de desacetilação, o acesso do reagente aos sítios reativos da quitina ocorre principalmente nas regiões não-ordenadas das cadeias, resultando em polímeros nos quais as unidades de GlcNAc e de GlcN estão distribuídas em blocos. Desta forma, para que estes polímeros sejam solúveis em soluções de ácidos diluídos é necessário que as cadeias estejam extensivamente desacetiladas e segundo alguns autores, o termo quitosana se aplica a derivados em que o grau médio de acetilação é igual ou inferior a 40% [16].

A despolimerização das cadeias macromoleculares é um processo que acompanha a desacetilação e é mais acentuada à medida que condições mais vigorosas de reação (como, por exemplo, maior concentração de álcali, temperaturas mais elevadas e tempos de reação prolongados) são empregadas. A extensão da degradação das cadeias macromoleculares durante a desacetilação pode ser reduzida pelo emprego de condições mais brandas de reação, e também pelo uso de aditivos, como o borohidreto de sódio, no meio reacional [5].

As propriedades funcionais da quitosana, por exemplo, a viscosidade, suas propriedades mecânicas e a porosidade de suas membranas, dependem, principalmente, da massa molecular média e do grau médio de acetilação da quitosana considerada. Essas características, por sua vez, dependem das condições de preparação da quitosana [80,81]. Assim, as características das quitosanas são governadas pela concentração de álcali, temperatura, tamanho das partículas, presença de aditivos que evitem a despolimerização e tempo de reação [82]. O uso de soluções alcalinas mais concentradas requer temperaturas mais baixas (ou tempos de reação mais curtos, ou ambos). Desta forma, quitosana pode ser obtida, por exemplo, pelo tratamento da quitina com:

- Solução aquosa de NaOH 5% (em massa), a 150ºC por 24 h; ou
- Solução aquosa de NaOH 40% (em massa), a 100ºC por 18 h; ou
- Solução aquosa de NaOH 50% (em massa), a 100ºC por 1 h [5].

Além da ocorrência de despolimerização, outra desvantagem importante das reações heterogêneas é a baixa acessibilidade aos sítios reativos da quitina, o que compromete o rendimento do processo e a uniformidade dos produtos. A trituração da quitina, a qual resulta no aumento da área superficial das partículas, pode promover a degradação do polímero por efeitos térmicos e de cisalhamento e, além disso, rendimentos baixos podem decorrer devido à deposição de material finamente particulado nas hélices e nas paredes do reator [83].

São descritos na literatura diversos tratamentos físicos e químicos de quitina com o objetivo de favorecer a reação de desacetilação que ocorreria, então, em condições praticamente homogêneas. A proposta mais aceita para justificar o aumento de reatividade da quitina sugere que estes tratamentos resultariam em alterações na estrutura secundária do polissacarídeo e favoreceriam o acesso dos reagentes aos sítios reativos de quitina, possibilitando, assim, a obtenção de derivados desacetilados de elevada massa molar e solúveis em soluções aquosas de ácidos diluídos. Além disso, tais métodos de desacetilação de quitina resultam na obtenção de quitosanas em que as unidades GlcNAc e GlcN estão distribuídas ao longo das cadeias de forma aleatória, o que favorece a solubilização do polímero mesmo quando o grau médio de acetilação é superior a 40% [74]. O método descrito por SANNAN e colaboradores [84,85], por exemplo, consiste no pré-tratamento de uma suspensão de quitina em solução aquosa de NaOH 40% a 25°C, durante pelo menos 3h, sob pressão reduzida. Após a desacetilação da quitina é obtida quitosana com grau médio de acetilação próximo de 50% e, provavelmente em função da distribuição aleatória das unidades acetiladas e desacetiladas nas cadeias, solúvel em água destilada. No entanto, a desacetilação

nestas condições demanda um tempo de reação longo (superior a 60 h), o que dificulta a utilização deste método em escala industrial.

Um dos métodos mais recentes, proposto um método por LAMARQUE e colaboradores [62], consiste na utilização de ciclos de congelamento, desgaseificação e descongelamento de suspensões de quitina em soluções aquosas de NaOH 50% (m/v) como etapas prévias à desacetilação da quitina. Nesse caso, são executados pelo menos 7 ciclos sucessivos visando promover a destruição dos domínios cristalinos de quitina e a exclusão do oxigênio molecular do meio reacional. A desacetilação do material tratado desta maneira resulta em quitosanas de elevada massa molar, solúveis em soluções de ácidos diluídos. Além disso, a repetição das etapas de pré-tratamento e desacetilação permite a obtenção de quitosanas com grau médio de acetilação inferior a 3% e de elevada massa molar. No entanto, esse método é longo e fastidioso, os ciclos térmicos são efetuados em frascos reacionais de custo relativamente elevado e N_2 líquido é consumido em quantidades consideráveis, fatores que indicam as grandes dificuldades envolvidas para a obtenção de quitosana em larga escala.

Uma alternativa para favorecer a acessibilidade dos reagentes aos sítios reativos de quitina consiste no pré-tratamento do polissacarídeo com ultra-som de alta potência. Nesse caso é proposto que, como conseqüência do fenômeno de cavitação, é liberada energia suficiente para ativar partículas sólidas, tanto pela limpeza e remoção de camadas inertes de sua superfície quanto pela sua pulverização, propiciando assim uma embebição mais completa do material suspenso no meio reacional e, conseqüentemente, produtos mais desacetilados e de características mais uniformes. Entre as principais vantagens do uso do ultra-som podem ser citadas a possibilidade de utilização de condições reacionais mais brandas no que se refere à temperatura, pressão e concentração dos reagentes e o custo relativamente baixo do equipamento.

O ultra-som pode ser definido como ondas mecânicas em uma freqüência além da faixa de audibilidade dos seres humanos, ou seja, ondas sonoras de freqüências superiores a 18 kHz [86]. Por ser uma forma de energia mecânica, estas ondas não são absorvidas pelas moléculas. Assim, o ultra-som se propaga através de uma série de ondas de compressão e rarefação induzidas no meio que atravessa. Se a energia aplicada for suficientemente elevada, durante o ciclo de rarefação ela pode superar as forças intermoleculares que mantém a estrutura do líquido e serão formadas bolhas cavitacionais. Estas bolhas crescerão durante os ciclos seguintes adquirindo vapor ou gás do meio até atingirem um ponto de equilíbrio, em que a freqüência de ressonância da bolha está ajustada à freqüência aplicada. O campo acústico sentido por uma bolha não é estável, devido à interferência de outras bolhas (em formação ou em ressonância) ao seu redor; estas condições podem causar a expansão súbita da bolha até um tamanho instável e seu colapso violento, com liberação de grande quantidade de energia. Há algumas teorias para explicar a liberação de energia no colapso cavitacional, sendo que a mais compreensível (qualitativamente) é a abordagem conhecida como "hot spot" [87]. De acordo com essa aproximação, cada bolha cavitacional atuaria como um microrreator no qual, em sistemas aquosos, são geradas temperaturas de milhares de graus e pressões acima de 100 atmosferas [88].

Uma das conseqüências do fenômeno cavitacional é a geração de ondas de choque, que induzem efeitos mecânicos até mesmo em sistemas homogêneos. Este fenômeno é muito rápido para alterar moléculas “pequenas”, mas, provavelmente, favorece a ruptura de polímeros em fragmentos menores (inclusive radicais) devido à ação de forças de cisalhamento, além de favorecer o processo de mistura dos reagentes e o aquecimento do meio no qual se propaga [89]. É devido a essas características, provavelmente, que boa parte dos estudos envolvendo irradiação de polissacarídeos com ultra-som tenha como objetivo a

despolimerização, enquanto os estudos de irradiação de polímeros em suspensão, para provocar alterações morfológicas nas partículas sejam menos freqüentes [77,78, 90].

Em trabalhos recentes [63,68,77,78,91,92], foi relatado o uso do ultra-som para a extração de quitina a partir da biomassa e também como um pré-tratamento para a reação de desacetilação. Os resultados obtidos sugerem que os pré-tratamentos efetuados favorecem a etapa de desacetilação, provavelmente devido a alterações na superfície do material, conforme observado em análises por microscopia eletrônica de varredura. No entanto, ainda são necessários experimentos que permitam determinar de forma quantitativa os efeitos de pré-tratamentos com ultra-som na desacetilação de quitina, bem como a determinação de condições ótimas e respectivos parâmetros cinéticos da reação. Mais recentemente [69], o tratamento de ultra-som foi aplicado a suspensões alcalinas de quitina, resultando em quitosanas com características semelhantes àquelas obtidas após os ciclos térmicos propostos por LAMARQUE et al [62].

JUSTIFICATIVA

O trabalho apresentado nesta tese teve como uma de suas principais motivações contribuir para a área dedicada a estudar e desenvolver procedimentos e metodologias que resultem na valorização da biomassa como matéria-prima para a produção de polímeros e materiais poliméricos que possuam elevado potencial para aplicações tecnológicas. Assim, as cascas de camarões e os gládios de lulas, refugos abundantes do processamento de frutos do mar pela indústria pesqueira, foram as matérias-primas escolhidas para os estudos de extração de quitina, um dos mais abundantes polissacarídeos presentes na biomassa. Entretanto, como também ocorre na celulose, as cadeias de quitina se associam firmemente por numerosas ligações hidrogênio, o que limita fortemente sua capacidade de intumescimento e restringe sua solubilidade a uns poucos solventes não-convencionais, resultando em importantes limitações de processabilidade e aplicabilidade. Por outro lado, a reação de desacetilação de quitina, geralmente executada por tratamento com soluções concentradas de hidróxido de sódio, leva à produção de quitosana, polímero solúvel em meios aquosos de acidez moderada. A quitosana é um polímero atóxico, biocompatível e biodegradável cujas aplicações se estendem por vários campos, tais como a agricultura, farmácia, medicina, odontologia e indústrias, como a de alimentos e a de cosméticos, entre outras. Assim, o estudo de aspectos fundamentais da reação de desacetilação de quitina foi o objetivo principal deste trabalho, que buscou desenvolver e avaliar metodologias originais que representem avanços em relação àquelas convencionalmente empregadas para produzir quitosana. Nesse sentido, a proposta do trabalho foi a de desenvolver um estudo cinético da reação de desacetilação de quitina empregando a irradiação de ultra-som de alta potência como metodologia destinada a aumentar a acessibilidade aos sítios reativos de quitina, aumentando assim sua reatividade e a eficiência do processo de desacetilação. Tal estudo representa uma contribuição importante e

que se reveste de ineditismo. De fato, embora se encontrem muitos trabalhos na literatura relacionando o emprego da irradiação de ultra-som para processar e caracterizar polímeros e materiais poliméricos bem como para provocar ou acelerar processos de despolimerização, há poucos registros de reações de introdução de novos grupos funcionais em polímeros que sejam favorecidas pela irradiação de ultra-som. É preciso ressaltar ainda que, no contexto específico da área em que se insere este trabalho, a preparação reprodutível de quitosanas com características e propriedades homogêneas é um objetivo recorrente em muitos trabalhos desenvolvidos ao longo de muitas décadas, pois é estimulante e desafiador tanto do lado acadêmico como do industrial. De fato, os estudos desenvolvidos com tais quitosanas permitem aprofundar os conhecimentos acerca das relações estruturas/propriedades desse polímero e assim fundamentar melhor as suas aplicações. Assim, o estudo desenvolvido neste trabalho pretende contribuir para o contexto científico e de pesquisas acadêmicas, mas também almeja indicar a potencialidade de sua aplicação para favorecer a produção industrial de quitosana. Inicialmente deve ser considerado que as reações de desacetilação de quitina que são executadas nas indústrias são processos heterogêneos com baixos rendimentos e que resultam em produtos heterogêneos. Além disso, quitosana extensivamente desacetilada, de elevada massa molar e com características homogêneas, não é um produto disponível no mercado atual, pois a sua preparação demanda a execução de repetidas reações de desacetilação, o emprego de condições reacionais especiais e de reagentes específicos para minimizar a ocorrência de acentuada despolimerização. Assim, embora tais procedimentos sejam aplicáveis em escala de laboratórios de pesquisa, a sua execução nas indústrias não é economicamente viável, pois representam altos custos de produção, tanto em função das elevadas quantidades de reagentes e de água empregadas como em decorrência do emprego de temperaturas elevadas, de tempos prolongados de reação e de processamentos. Entretanto, conforme os resultados do estudo apresentado nesta tese, o emprego de irradiação de ultra-

som de alta potência pode representar uma alternativa viável para a produção de quitosana com melhores características do que aquelas apresentadas pelos produtos comerciais atualmente disponíveis, com economia de tempo, de etapas de processamento e de reagentes. Nesse sentido, este trabalho mostra que a quitina pode ser eficientemente desacetilada, com rendimento de 80%, através de um tratamento executado em temperatura inferior a 100°C por menos de uma hora, para resultar em quitosana solúvel em solução diluída de ácido acético, e com grau médio de acetilação inferior a 20% e massa molar média de aproximadamente 800000 g/mol. Conforme é proposto nesta tese, a irradiação de ultra-som aumenta a área superficial das partículas de quitina, aumentando a acessibilidade aos sítios reativos e a disponibilidade das espécies reativas de hidróxido de sódio nesses sítios, e contribui para minimizar os efeitos da despolimerização visto que permite a execução da reação em tempo e temperatura inferiores aos empregados nos processos convencionais. Assim, como resultado do tratamento de ultra-som, a velocidade da reação de desacetilação de quitina é aumentada, de maneira que o domínio cinético do processo é abreviado e o patamar correspondente à máxima desacetilação é atingido antes quando comparado ao processo convencional. Além disso, embora seja executada por tempo mais curto e a temperatura mais baixa quando comparada ao processo convencional, a desacetilação assistida por tratamento de ultra-som é mais completa.

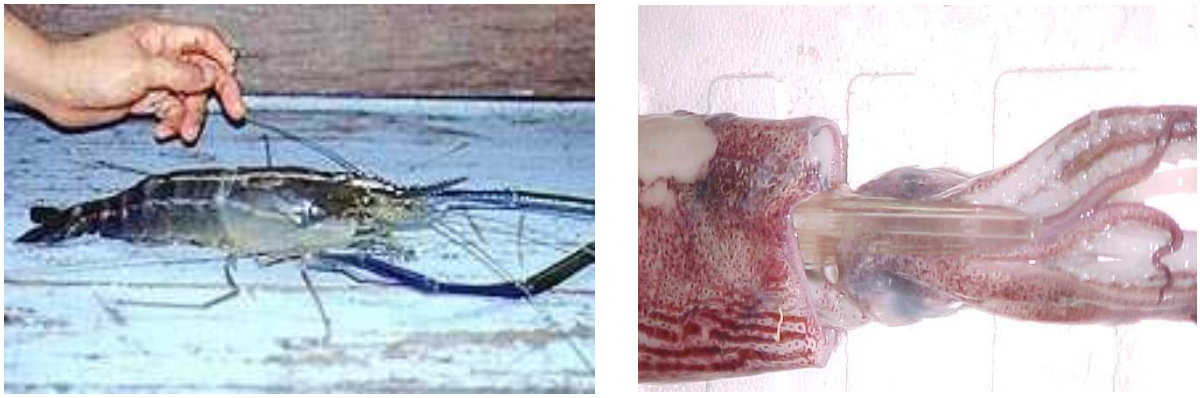
OBJETIVOS

Investigar os efeitos da irradiação com ultra-som na reação de desacetilação de α- e de β-quitina, bem como o estudo da influência do pré-tratamento com ultra-som sobre as propriedades dos derivados desacetilados e a determinação de condições ótimas de reação e seus respectivos parâmetros cinéticos.

PARTE EXPERIMENTAL

2 Materiais e métodos

Amostras de α-quitina extraída de cefalotórax de camarões da espécie *Macrobrachium rosenbergii* (Figura 7a) e de β-quitina extraída de gládios de moluscos (*Loligo plei* e *Loligo sanpaulensis*) (Figura 7b) foram utilizadas como matéria-prima neste trabalho. Exceto quando especificado, todos os demais reagentes foram utilizados tal como recebidos.



(a) (b)

Figura 7. Fotografias de exemplares do camarão (a) e da lula (b), cujos resíduos foram empregados como matéria-prima neste trabalho.

2.1 Extração de α-quitina

Os cefalotórax de camarão empregados como material de partida neste trabalho foram cedidos pelo Prof. Dr. Wagner Valenti Cotroni, do Centro de Aqüicultura da UNESP (CAUNESP – Jaboticabal) e mantidos sob refrigeração a –20°C até o momento de sua utilização. Em uma etapa anterior à extração de quitina, os cefalotórax foram lavados manualmente para remoção de resíduos de carne, enxaguados com água destilada e secos em estufa com circulação e renovação de ar durante 24 h, a 30°C. Depois de secas, as cascas de

camarão foram trituradas em liquidificador doméstico e classificadas em relação ao tamanho médio das partículas por tamisação, utilizando peneiras com aberturas de 1,68, 1,34, 1,00, 0,43, 0,29 e 0,18 mm. As frações com diâmetro médio das partículas superior a 0,18mm, correspondente a aproximadamente 90% da massa total de cefalotórax recuperados após a classificação, foram separadas e submetidas a procedimentos para remoção de minerais, proteínas e pigmentos [93] (Figura 8).

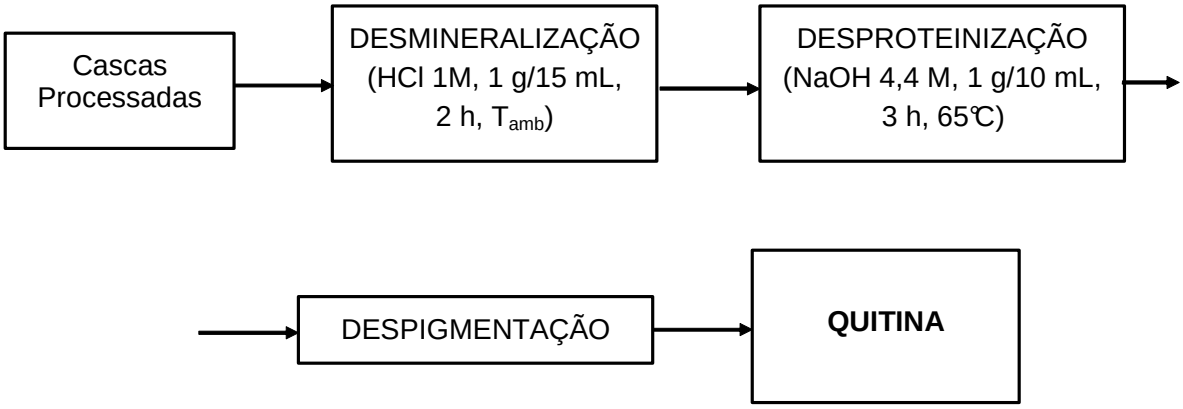


Figura 8. Representação dos procedimentos experimentais realizados para obtenção de α-quitina.

2.1.1 Desmineralização

Nas reações de desmineralização realizadas, cerca de 70 g de cascas de camarão foram suspensos em 1,1 L de uma solução de ácido clorídrico 1 M, à temperatura ambiente, sob agitação mecânica constante (350 rpm), durante 2 h. O meio reacional foi filtrado e as cascas desmineralizadas foram lavadas com água destilada até a neutralidade das águas de lavagem. O material foi então transferido para placas de Petri e seco em estufa com circulação e renovação de ar a 30°C por 12 h.

2.1.2 Desproteinização

Nas reações efetuadas, cerca de 50 g de cascas de camarão, previamente desmineralizadas, foram adicionados a um reator de vidro contendo 0,5 L de solução aquosa de hidróxido de sódio 4,4 M, a 65 ± 2°C, sob agitação mecânica constante (350 rpm), durante

3 h. Ao fim da reação, o sólido suspenso foi lavado com água destilada até a neutralidade do sobrenadante, transferido para placas de Petri e seco em estufa com circulação e renovação de ar por 12h, a 30°C.

2.1.3 Despigmentação

Após a etapa de desproteinização das cascas, o material foi transferido para um extrator Soxhlet contendo etanol e foi mantido em refluxo durante 24 h. Em seguida, o material foi transferido para placas de Petri e seco à temperatura ambiente.

2.2 Extração de β-quitina

Os gládios de lula empregados neste trabalho foram cedidos pela Empresa Miami Pescados (Cananéia/SP) e mantidos sob refrigeração a –20°C até sua utilização. Para efetuar a extração da quitina, os gládios foram lavados manualmente para remoção de resíduos de carne, enxaguados com água destilada e secos em estufa com circulação e renovação de ar durante 24 h, a 30°C.

De acordo com trabalhos já realizados no grupo de Físico-Química Orgânica [94], os gládios de molusco utilizados não contêm sais minerais em quantidades significativas, o que permite dispensar a etapa de desmineralização do material. Para remoção das proteínas presentes nos gládios foram realizados dois métodos diferentes. Os métodos descritos por LAVALL [67,94] e CHAUSSARD [65] foram empregados para obtenção de quitina como matéria-prima para reações de desacetilação.

2.2.1 Desproteinização de gládios (Método I) [67,94]

Nesta etapa da extração de quitina (Figura 9), cerca de 30 g de gládios moídos foram transferidos para um reator de vidro, contendo 0,6 L de uma solução aquosa de NaOH 0,3 M, a 85 ± 2°C, sob agitação mecânica constante (350 rpm). O meio reacional foi mantido nestas

condições durante 1 h e em seguida o sólido suspenso foi lavado com água destilada até a neutralidade do sobrenadante. O material foi então transferido para placas de Petri e seco em estufa com circulação e renovação de ar durante 24 h, a 30°C. Depois de seco, o material foi novamente desproteinizado, utilizando as mesmas condições experimentais.

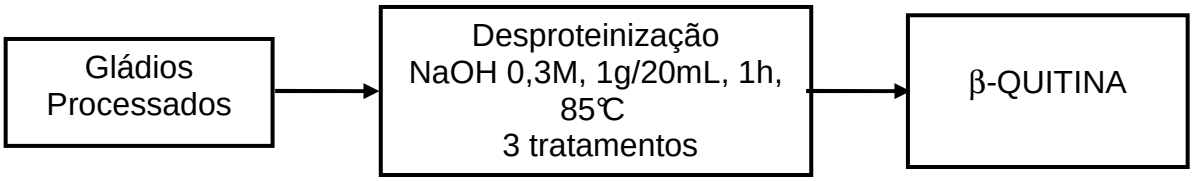


Figura 9. Representação do procedimento realizado para obtenção de β-quitina (Método I).

2.2.2 Desproteinização de gládios (Método II) [65]

Neste procedimento para obtenção de β-quitina (Figura 10), cerca de 200 g de gládios moídos foram suspensos em 3 L de uma solução aquosa de NaOH 1 M, sob agitação mecânica (350 rpm), durante 18 h. Em seguida, o meio reacional foi filtrado e o sólido suspenso lavado com água destilada até a neutralidade das águas de lavagem. O material foi então transferido para placas de Petri e seco em estufa com circulação e renovação de ar durante 24 h, a 30°C.

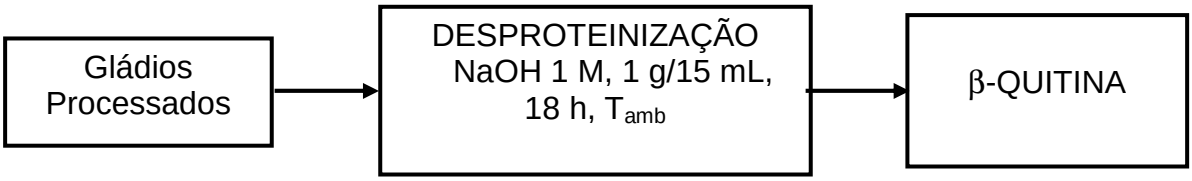


Figura 10. Representação do procedimento realizado para obtenção de β-quitina (Método II).

2.3 Desacetilação de α-quitina

Em um experimento típico [54], 4,58 g de quitina foram suspensos em 0,22 L de uma solução aquosa de NaOH 40% (em massa) em um reator de vidro com capacidade útil de 1 L, sob agitação mecânica constante (350 rpm), à temperatura de 115 ± 2º C. A reação prosseguiu

nessas condições durante 6 h, quando o meio reacional foi filtrado e o material desacetilado lavado com água destilada até a neutralidade das águas de lavagem. Após a neutralização, a quitina desacetilada foi lavada com etanol, filtrada, transferida para uma placa de Petri e seca à temperatura ambiente.

2.4 Desacetilação de β-quitina

2.4.1 Desacetilação heterogênea [67]

Em um experimento típico, 9 g de quitina foram suspensos em 0,18 L de NaOH 40% (em massa) em um reator de vidro com capacidade útil de 0,5 L, à temperatura de 80 ± 2°C e sob agitação mecânica constante (350 rpm). Após 3 h de reação, o meio reacional foi filtrado e o sólido retido no filtro foi lavado com água destilada até a atingir a neutralidade do sobrenadante. O material desacetilado foi então lavado com metanol e em seguida com acetona, transferido para placas de Petri e seco à temperatura ambiente.

2.4.2 Desacetilação homogênea [62]

O método descrito por LAMARQUE e colaboradores, em que suspensões de quitina em soluções concentradas de álcali são submetidas a ciclos de congelamento, desgaseificação e descongelamento, foi empregado como pré-tratamento da quitina visando a obtenção de quitosanas com grau médio de acetilação próximo de 50% e solúveis em soluções aquosas de ácidos diluídos. Estas características tornam possível a solubilização de quitosana em soluções diluídas de ácidos e, nos ciclos seguintes, a obtenção de quitosana com baixo grau médio de acetilação e de elevada massa molar.

Neste procedimento, 10 g de quitina foram suspensos em 500 g de uma solução aquosa de hidróxido de sódio 40% (em massa) em um tubo de Schlenck feito de vidro reforçado, sob agitação magnética, a temperatura ambiente. Após a adição de quitina, o frasco foi fechado, congelado em N_2 líquido e o meio reacional foi desgaseificado com o uso de uma

bomba de alto vácuo. Em seguida, o frasco reacional foi mantido a temperatura ambiente até seu descongelamento. Este ciclo de congelamento, desgaseificação e descongelamento foi repetido mais seis vezes, a fim de assegurar a desgaseificação completa do meio reacional. Após o último ciclo, o frasco reacional foi mergulhado em um banho de óleo aquecido a 90 ± 3°C. Uma vez atingido o equilíbrio térmico (cerca de 10 - 15 min), o frasco reacional foi mantido sob agitação magnética constante por 30 min e em seguida foi mergulhado em uma mistura de gelo, água e etanol (T = -10°C) para interromper a reação de desacetilação. Ao fim da reação, as suspensões foram parcialmente neutralizadas com a adição de solução de ácido clorídrico 6 M, até que o pH do sobrenadante atingisse 8,5 – 9,0. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas e o precipitado foi lavado com água destilada até que a condutividade do sobrenadante atingisse um valor próximo ao da água. Depois de lavada, a quitosana foi congelada em N_2 líquido e liofilizada.

2.4.3 Desacetilação de α- e β-quitina assistida por ultra-som

Em um experimento característico, aproximadamente 80 mL de uma suspensão de quitina em uma solução aquosa de NaOH 40% (proporção quitina/álcali de 1 g /17,5 mL) foram irradiados com ultra-som (BRANSON Sonifier modelo 450, na freqüência de 20kHz) empregando diferentes condições com relação à fonte de quitina utilizada (α- ou β-quitina), à potência utilizada (16,9 ou 32,7 W) e à duração do pré-tratamento (10 ou 30 min; Figura 11). Após o pré-tratamento, a suspensão foi transferida para um reator de vidro, que foi fechado e imerso em um banho de óleo a 100 ± 2 °C, com agitação magnética constante. Uma vez atingido o equilíbrio térmico (aproximadamente 20 min), o sistema foi mantido nestas condições durante 1 h, quando o reator foi então resfriado pela imersão em um banho de gelo/NaCl/etanol (T = -15°C). A suspensão foi parcialmente neutralizada com HCl 4 M (até atingir pH = 9) e o polímero isolado foi lavado com uma solução etanol/água 80% (v/v) para promover a remoção dos íons cloreto presentes no sobrenadante e em seguida lavado com

etanol absoluto e seco à temperatura ambiente. Com a finalidade de avaliar os efeitos do uso do ultra-som sobre a reação de desacetilação, também foram obtidas amostras de α- e β-quitina desacetiladas nas mesmas condições descritos neste item, exceto pelo fato de que a quitina utilizada não foi submetida à irradiação com ultra-som.

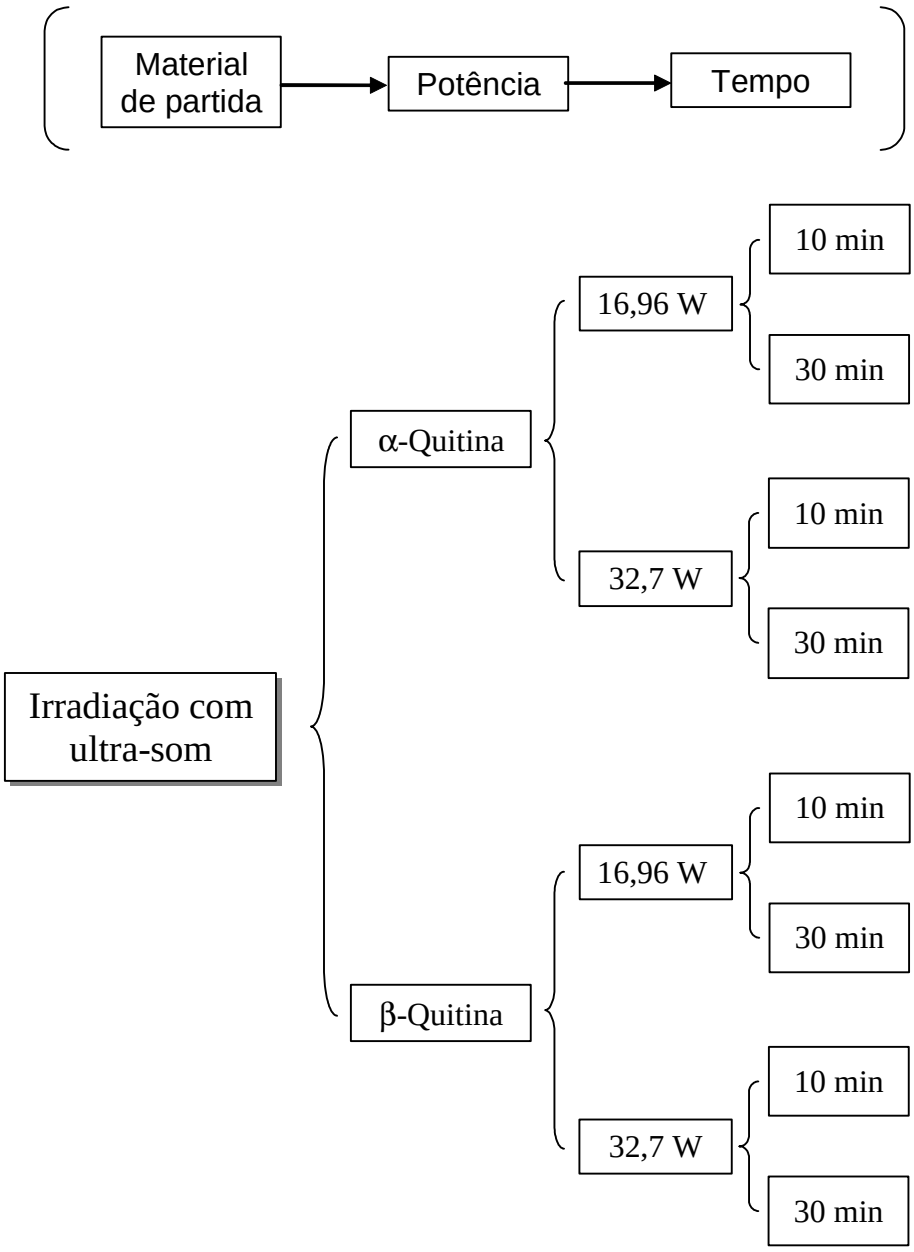


Figura 11: Esquema do procedimento adotado nas reações de desacetilação heterogênea assistida por ultra-som.

2.5 Ensaios para determinação de parâmetros cinéticos da reação de desacetilação heterogênea assistida por ultra-som

De acordo com os estudos publicados por diversos autores [5,79,95], durante a reação desacetilação de quitina (Figura 12), o grau médio de desacetilação do material ($\%\overline{GD}$) aumenta nos minutos iniciais da reação em função do tempo e da temperatura até atingir um valor crítico, a partir do qual se observa um patamar nos valores de grau médio de desacetilação em função do tempo de reação. O intervalo de tempo de reação crítico, a partir do qual a eficiência do processo de desacetilação é acentuadamente reduzida, é estimado por diversos autores como inferior a 1 h de reação.

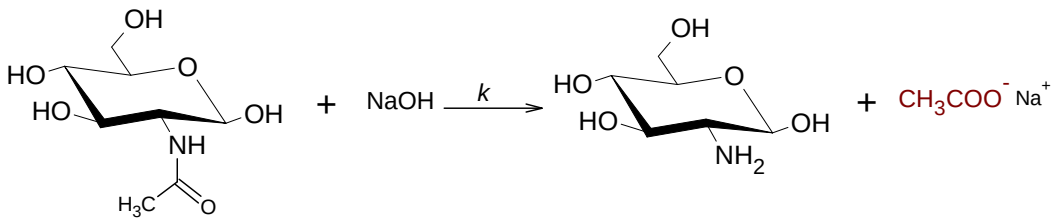


Figura 12. Esquema representativo do processo de desacetilação de quitina.

Além disso, a variação linear do grau médio de desacetilação nos minutos iniciais de reação, empregando excesso de álcali, sugerem que a desacetilação heterogênea da quitina obedece a uma cinética de reação de pseudo-primeira ordem. Desta forma, assumindo que, em virtude do excesso de álcali utilizado, a quitina está solvatada pela solução alcalina, torna-se possível utilizar equações cinéticas aplicadas a reações em meio homogêneo representadas nas equações 8 e 9.

$$-\frac{d[GlcNAc]}{dt} = k[NaOH][GlcNAc] = k'[GlcNAc] \qquad \text{Eq. 8}$$

$$ln\left(\frac{[GlcNAc]_0}{GlcNAc]}\right) = k't \qquad \text{Eq. 9}$$

sendo k' a constante de velocidade observada na reação.

Desta forma, a determinação dos graus médios de desacetilação de amostras de quitina desacetilada em um determinado conjunto de intervalos de tempo de reação e de temperatura possibilita a determinação dos parâmetros cinéticos da reação, utilizando a equação de Arrhenius (Eq. 10)

$$k' = Ae^{-E_a/RT} \qquad \text{Eq. 10}$$

Sendo *A* o fator pré-exponencial, relacionado à freqüência de colisões entre os reagentes e à fatores estéricos e E_a a energia de ativação.

Nos ensaios para determinação dos parâmetros cinéticos da desacetilação heterogênea assistida por ultra-som, foram adotadas as condições de irradiação com ultra-som definidas no item 2.4.3 que resultaram nas amostras mais desacetiladas (ou seja, irradiação de β-quitina com ultra-som durante 30 min, na potência de 32,7 W).

Depois do tratamento com ultra-som, as suspensões foram transferidas para reatores de vidro e imersas em um banho de aquecimento durante diferentes intervalos de reação. Desta forma, foram realizadas 3 séries de reações de desacetilação, nas quais foram variadas a temperatura de reação (T = 100°C, 110°C e 120°C) e o tempo de desacetilação (t = 0, 10, 20, 30, 45, 60 e 120 min), conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Descrição das condições reacionais adotadas nos experimentos destinados à determinação dos parâmetros cinéticos da desacetilação de β-quitina assistida por ultra-som

Tempo de reação (min)	0	Tempo de indução	10	20	30	45	60	120
				Amostra				
Série C (T = 100°C)	C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
Série D (T = 110°C)	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
Série E (T = 120°C)	E0	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7

Uma vez decorrido o tempo de desacetilação desejado, a reação foi interrompida com o resfriamento do frasco reacional em um banho de gelo/NaCl/etanol (T = -15°C) e o produto obtido foi isolado e neutralizado conforme descrito no item 2.4.3.

3 Caracterizações

3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia dos gládios e dos cefalotórax utilizados, das amostras de quitina obtidas e dos derivados obtidos após a irradiação com ultra-som foi investigada em um microscópio eletrônico de varredura LEO-440. As amostras foram previamente secas em estufa à vácuo a 60°C por 6h e recobertas com uma camada de ouro de 20 nm de espessura. A tensão e a corrente do feixe utilizados foram de 20 kV e 2,85 pA, respectivamente.

3.2 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica das amostras de quitina obtidas foi estudada através de medidas termogravimétricas, utilizando o equipamento TGA-50, da Shimadzu, empregando atmosfera dinâmica de ar sintético a uma vazão de 30 mL/min e suporte da amostra de platina. As amostras foram aquecidas a uma razão de 10º/min até 105ºC (permanecendo a 105ºC durante 20 min, para eliminação de água), e de 105ºC até 800ºC (permanecendo a 800ºC por 5 min). A quantidade de amostra utilizada em cada análise foi de aproximadamente 5 mg.

As amostras de quitina e de quitosana analisadas foram previamente trituradas em um moinho analítico (Ika) e armazenadas em um dessecador contendo sílica gel durante 7 dias.

A estabilidade térmica das amostras de quitosana foi estudada através de medidas termogravimétricas nas condições já descritas para as amostras de quitina, diferenciando-se apenas pela programação de aquecimento empregada, em que as amostras foram aquecidas a uma razão de 10º/min até 95ºC (permanecendo a 95ºC durante 20 min), e de 95ºC até 800ºC (permanecendo a 800ºC por 5 min).

3.3 Cristalinidade

A cristalinidade das amostras de quitina obtidas foi determinada por medidas de difração de raios X, em difratômetro de raios X RIGAKU com tubo de cobre (λ = 1,54 Å), no intervalo de 3-50º, empregando varredura contínua com velocidade de 1°/min. A tensão e a corrente utilizadas foram de 50kV e 100mA, respectivamente. A partir destas medidas, os índices de cristalinidade das amostras de quitina podem ser determinados através da expressão [74,96]

$$I_{cr} = \frac{I_{110} - I_{am}}{I_{110}} * 100 \qquad \text{Eq. 11}$$

em que,

I_{cr} = índice de cristalinidade

I_{110} = intensidade máxima (em unidades arbitrárias) da difração de rede (110)

I_{am} = intensidade de difração (em unidades arbitrárias) de regiões não-ordenadas; nos difratogramas obtidos, foi considerada a intensidade de difração em 2θ = 16°

3.4 Determinação do grau médio de acetilação (% $\overline{GA}$)

3.4.1 Determinação do grau médio de acetilação (% $\overline{GA}$) por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^{1}H-RMN)

O grau médio de acetilação das amostras de quitina obtidas foi determinado através de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^{1}H RMN). Os espectros foram adquiridos em um espectrômetro VARIAN Unit Inova 400, na freqüência de 400 MHz, em um laboratório da EMBRAPA Instrumentação Agropecuária. As amostras foram preparadas através da adição de 1 mL de uma solução de DCl/D_2O 20% a 10 mg de amostra, sob agitação magnética constante da suspensão, a 70°C, durante 18 h. Os espectros foram obtidos a 80ºC, com pulso de 10 µS (90º), acumulando 32 varreduras. O sinal correspondente ao hidrogênio (HOD) observado

no espectro do solvente (DCl / D_2O 20%), ao qual foi adicionado ácido 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfônico (DSS) como padrão, em 6,95 ppm, foi usado como referência para atribuição dos deslocamentos químicos referentes à quitina (Figura 13).

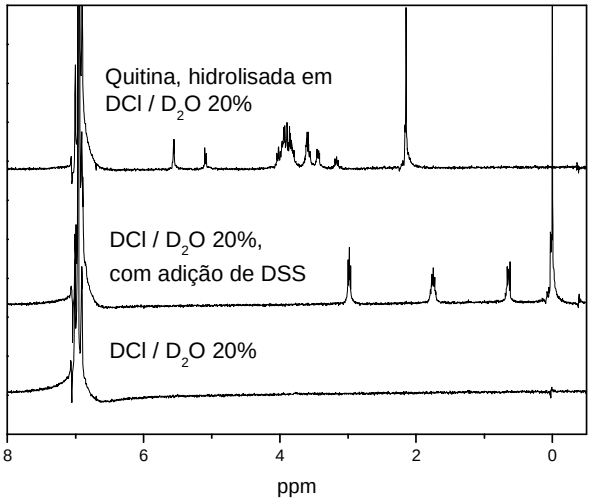


Figura 13. Espectros de RMN ^1H da solução da solução de DCl / D_2O 20%, da solução de DCl / D_2O 20% com adição de DSS e de uma amostra de quitina.

Um espectro representativo das amostras de quitina analisadas é apresentado na Figura 14.

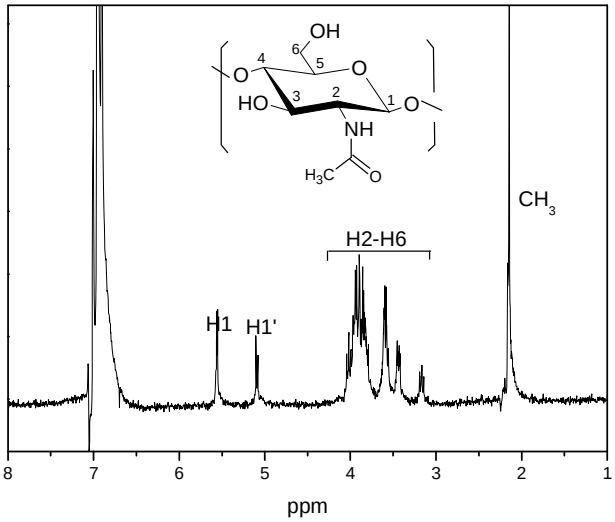


Figura 14. Espectro de RMN ^1H característico de uma amostra de quitina (DCl / D_2O 20%, 80°C).

O grau médio de acetilação ($\%\overline{GA}$) foi calculado a partir da razão entre as áreas dos prótons metílicos do grupo acetamida (sinais 2,0 ppm) e da soma das áreas dos prótons ligados aos carbonos 2 a 6 do anel glicopiranosídico (cujos sinais foram observados na região de deslocamento químico de 3 a 4,2 ppm), conforme a Eq. (2) [97]:

$$\%\overline{GA} = \left(\frac{A_{CH_3}/3}{A_{H_2-H_6}/6} \right) * 100$$

Para as amostras de quitosana obtidas de acordo com os procedimentos descritos nos itens 2.3, 2.4.1 e 2.4.2, aproximadamente 10 mg de amostra foram solubilizados 1 mL de uma solução de HCl/D_2O 1% (em volume), sob agitação magnética constante, durante 24 h, à temperatura ambiente.

As soluções obtidas foram transferidas para tubos de vidro apropriados (ϕ = 5 mm) e os respectivos espectros foram obtidos em espectrômetro BRUKER AC200 a 80ºC; o pulso utilizado foi de 8,2 μS (90º), acumulando 16 varreduras e o parâmetro LB foi de 0,2 Hz. Os espectros foram calibrados a partir dos sinais da água em 4,1 ppm.

As soluções das amostras de quitosana obtidas nos experimentos para determinação dos parâmetros cinéticos também tiveram os seus respectivos espectros adquiridos no espectrômetro VARIAN Unit Inova 400, na freqüência de 400 MHz, da EMBRAPA Instrumentação Agropecuária, usando pulso de 10 μS (90º) e acumulando 32 varreduras, à temperatura de 80°C. Os espectros obtidos também foram calibrados a partir dos sinais da água em 4,1 ppm.

Os graus médios de acetilação foram determinados calculando a razão entre as áreas dos prótons metílicos do grupo acetamida (A_{CH3}; 2,00 ppm) e do próton ligado ao carbono 2 do anel de glicosamina (A_{H2}; 3,12 ppm), utilizando a Eq. (3):

$$\%\overline{GA} = \frac{A_{CH_3}/3}{A_{H_2}} * 100$$

3.4.2 Determinação do grau médio de acetilação (%$\overline{GA}$) por titulação condutimétrica

A amostra de quitosana (0,2500 g), previamente seca em estufa a vácuo a 60°C por 6 h, foi suspensa em 50 mL de uma solução de HCl 0,05 M e mantida sob agitação magnética constante durante 15 h. A solução obtida foi transferida para um balão volumétrico de 250 mL e o seu volume foi ajustado com água destilada e desionizada. Alíquotas de 50 mL das soluções resultantes foram tituladas com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 M (previamente padronizada com biftalato de potássio) e a neutralização da solução foi acompanhada através de medidas de condutividade, utilizando um condutivímetro modelo Handylab LF1 e titulador automático Titronic Universal, ambos da Schott-Gerätte. As medidas de condutividade da amostra durante as titulações foram efetuadas à temperatura de 25,0 ± 0,1 °C.

Um gráfico de condutividade em função do volume de titulante adicionado, representativo para titulações de amostras de quitosana, é apresentado na Figura 15.

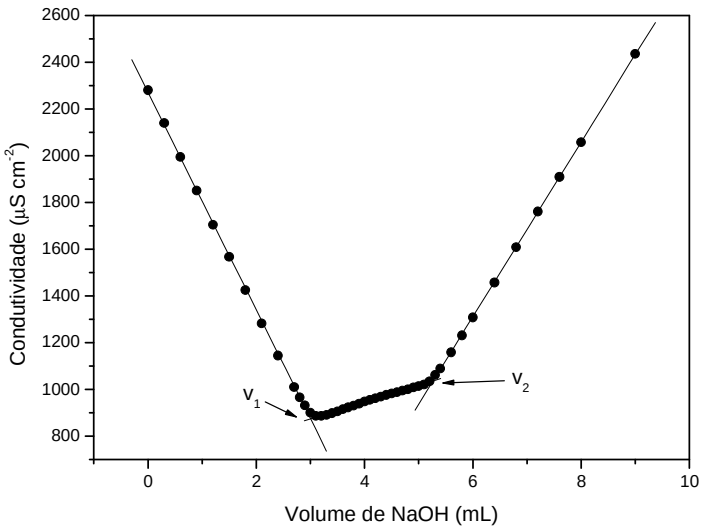


Figura 15. Curva de titulação condutimétrica característica de uma amostra de quitosana.

Como pode ser observado, a curva apresentada na Figura 15 é característica de uma titulação de uma mistura de um ácido forte e de um ácido fraco, utilizando uma base forte. Inicialmente, ocorre a neutralização do ácido clorídrico pela adição do hidróxido de sódio, de forma que os íons H^+ provenientes do ácido clorídrico presentes na solução são substituídos pelos íons Na^+ , resultando na redução brusca da condutividade da solução. Após a neutralização do ácido forte (v_1), a adição do hidróxido de sódio promove a desprotonação dos grupos amino da quitosana, promovendo ligeiro aumento da condutividade do meio. Uma vez concluída a neutralização do ácido fraco, proveniente dos grupos $–NH_3^+$ presentes (v_2) , a adição de excesso de base resulta no aumento de concentração de íons hidroxila na solução e na elevação mais acentuada da condutividade. Desta forma, a partir da determinação dos volumes nos respectivos pontos de equivalência (v_1 e v_2), o grau médio de acetilação das amostras de quitosana analisadas pode ser determinado através da expressão:

$$\%\overline{GA} = \left(1 - \frac{161*(v_2 - v_1)*[NaOH]}{m}\right)*100 \qquad \text{Eq. 12}$$

sendo:

$\%\overline{GA}$ = Grau médio de acetilação

161 = Massa molar média da unidade repetitiva de quitosana (g / mol)

($v_2 – v_1$) = Volume de solução de hidróxido de sódio consumido para neutralizar a quitosana (mL)

[NaOH] = Concentração da solução de hidróxido de sódio (M)

m = Massa de quitosana contida na alíquota titulada (g)

3.4.3 Determinação do grau médio de acetilação (%$\overline{GA}$) por análise elementar

As amostras de quitina e os derivados desacetilados correspondentes às amostras (Ad)1/100 e (As4d)1/100 foram secas em estufa a vácuo, a 85°C por 15 h e em seguida foram determinadas as porcentagens de C, H e N presentes utilizando equipamento EA 1110 CHNS – O CE INSTRUMENTS. O grau médio de acetilação das amostras foi determinado pela proporção nitrogênio/carbono [5] utilizando a expressão

$$\%\overline{GA} = 400 - \frac{N/C}{4{,}8x10^{-4}} \qquad \text{Eq. 13}$$

3.5 Determinação da massa molar média das amostras de quitosana por viscosimetria capilar

Para a determinação da viscosidade intrínseca [98], cerca de 50 mg de quitosana purificada (previamente seca em estufa a vácuo, a 60ºC por 6 h) foram suspensos em 25 mL de solução tampão (0,3 M ácido acético/0,2 M acetato de sódio, pH=4,5) sob agitação magnética constante durante 1 h. A solução resultante foi aquecida em banho-maria a 80ºC por 2 min e, depois de fria, foi diluída com a adição de mais 25 mL de tampão acetato à solução, a qual foi novamente aquecida por 2 min e resfriada. A solução obtida foi filtrada sob pressão positiva em membrana com diâmetro dos poros de 0,45 μm. Alíquotas de 15 mL desta solução foram transferidas para um viscosímetro capilar de vidro (do tipo Ubbelohde, ϕ=0,53 mm) e as medidas de tempo de escoamento foram determinadas em viscosímetro AVS-350 acoplado a um módulo diluidor automático AVS-20, ambos da Schott-Geräte. Todas as medidas de tempo de escoamento do solvente e das soluções de quitosana foram realizadas a 25,00 ± 0,01ºC, e o mesmo tampão foi empregado para as sucessivas diluições, de modo a assegurar que a força iônica das soluções fosse mantida constante. Os valores de

tempo de escoamento correspondem à média de 3 determinações independentes que não apresentaram variação maior que 0,09%.

Empregando as condições e os equipamentos citados e considerando os intervalos de concentração das soluções de quitosana analisadas, a seguinte aproximação é válida:

$$\eta_{rel} \cong \frac{t_c}{t_0}$$

sendo,

η_{rel} = viscosidade relativa da solução de quitosana de concentração C;

t_c = tempo de escoamento da solução de quitosana de concentração C;

t_0 = tempo de escoamento do solvente.

SÍMBOLOS UTILIZADOS

São apresentados na Tabela 4 os símbolos empregados para identificar as amostras obtidas nas etapas de extração e desacetilação de quitina.

Tabela 4. Símbolos utilizados para identificar os cefalotórax e as amostras de quitina obtidas

Amostra	Descrição
A	α-quitina, extraída de acordo com o procedimento descrito no item 2.1
B	β-quitina, extraída de acordo com o procedimento descrito por CHAUSSARD e colaboradores [65]
B_L	β-quitina, extraída de acordo com o procedimento descrito por LAVALL [94]
(Ad)1/100	Amostra A, desacetilada por 1 h, a 100° C
(Ad)6/115	Amostra A, desacetilada por 6 h, a 115° C
(As4d)1/100	Amostra A, irradiada com ultra-som durante 30 min, com potência de 32,7 W e desacetilada por 1h, a 100°C
(B_{LT}d)0,5/90	Amostra B_L submetida a ciclos térmicos e desacetilada por 30 min, a 90°C
(Bd)3/80	Amostra B_L, desacetilada de acordo com o procedimento descrito no item 2.4.1
(Bd)1/100	Amostra B, desacetilada por 1 h, a 100° C
(Bs1d)1/100	Amostra B, irradiada com ultra-som durante 10 min, com potência de 16,96 W e desacetilada por 1 h, a 100° C
(Bs2d)1/100	Amostra B, irradiada com ultra-som durante 30 min, com potência de 16,96 W e desacetilada por 1 h, a 100° C
(Bs3d)1/100	Amostra B, irradiada com ultra-som durante 10 min, com potência de 32,7 W e desacetilada por 1 h, a 100° C
(Bs4d)1/100	Amostra B, irradiada com ultra-som durante 30 min, com potência de 32,7 W e desacetilada por 1 h, a 100° C
(Bs4)	Amostra B, irradiada com ultra-som durante 30 min, com potência de 32,7 W, resfriada e neutralizada
(Bs4d)2/100	Amostra B, irradiada com ultra-som durante 30 min, com potência de 32,7 W e desacetilada por 2h, a 100°C

(**continua**)

Continuação da Tabela 4. Símbolos utilizados para identificar os cefalotórax e as amostras de quitina obtidas

(Bs4d)1/120	Amostra B, irradiada com ultra-som durante 30 min, com potência de 32,7 W e desacetilada por 1h, a 120°C
(Bs4d)2/120	Amostra B, irradiada com ultra-som durante 30 min, com potência de 32,7 W e desacetilada por 2h, a 120°C

4 Resultados e discussão

Neste capítulo são apresentados os principais resultados obtidos no desenvolvimento do trabalho, sendo que tal apresentação bem como as discussões decorrentes serão exploradas de maneira a demonstrar a evolução do trabalho. Nesse sentido, o capítulo foi organizado para abordar inicialmente a caracterização e os tratamentos das matérias-primas, a saber, cefalotórax de *M. rosenbergii* e gládios de *L. plei* e *L. sanpaulensis*, empregadas para a obtenção de α-quitina e β-quitina. A adequação dos referidos tratamentos, seus rendimentos e efeitos sobre as características das alomorfas de quitina serão brevemente abordados, sendo reservada maior ênfase aos estudos de desacetilação de quitina. Assim, as reações de desacetilação de quitina empregando diferentes condições são discutidas na última parte do capítulo, com destaque para o emprego de processos não-convencionais, especialmente a irradiação ultra-som. Nessa parte do capítulo são destacadas as principais vantagens decorrentes do uso desse método de desacetilação em comparação com outros métodos. Também são apresentados e discutidos os modelos que justificam as diferentes reatividades de α-quitina e β-quitina.

4.1 Caracterização e processamento das matérias-primas

Devido às naturezas distintas das matérias-primas empregadas para a obtenção de α-quitina e β-quitina, os cefalotórax de *M. rosenbergii* e os gládios de *L. plei* e *L. sanpaulensis* demandam tratamentos diferentes. De fato, os conteúdos de quitina e de proteínas e os teores de umidade e de cinzas dessas matérias-primas são bem diferentes (Tabela 5).

Tabela 5. Composição percentual aproximada das matérias-primas empregadas para a extração de α- e β-quitina [(a)]

Matéria-prima	Quitina (%)	Proteínas (%)	Umidade (%)	Cinzas (%)
Cefalotórax	23,5	28,2	6,0	40
Gládios	31,3	58	8,9	<2

[(a)] Estimativas efetuadas com base na massa de material recuperado após a realização dos procedimentos para extração de quitina.

Na etapa de desmineralização dos cefalotórax de *M. rosenbergii* foram eliminados sais inorgânicos, principalmente $CaCO_3$. O rendimento dessa reação, com base no material recuperado e seco, foi de aproximadamente 35%. Na desproteinização dos cefalotórax desmineralizados foi recuperada, em média, 70% da quantidade inicial de material (cefalotórax desmineralizados). Após a etapa de desproteinização, a α-quitina resultante foi submetida à extração de pigmentos com etanol em sistema soxhlet, durante 24 h. Após estes tratamentos, foi obtida α-quitina na forma de pó com uma leve coloração rosada. A remoção completa dos pigmentos também foi efetuada por suspensão do material obtido após a desproteinização em solução de peróxido de hidrogênio, mas este tratamento é mais drástico e pode apresentar como conseqüência a redução da massa molar do polímero e favorecer a ocorrência de hidrólise das ligações glicosídicas das cadeias durante desacetilação. Desta forma, o isolamento da α-quitina resultou na obtenção de um pó ligeiramente colorido, sendo que a massa quitina obtida corresponde a aproximadamente 25% da massa inicial de cefalotórax e com reduzido teor de cinzas, conforme pode ser observado na Tabela 6. As curvas TG correspondentes aos cefalotórax de *M. rosenbergii*, cefalotórax desmineralizados e gládios de molusco, como também das amostras A, B, (Ad)1/100, (Bs4), (Bs4d)1/100, (Bs4d)2/100 e (Bs4d)2/120 estão apresentadas no Apêndice A.

Tabela 6. Teor de cinzas encontrado em amostras de cefalotórax de camarão antes (amostra C) e após a desmineralização (amostra C_M)

Amostra	**Teor de cinzas (%)** [(a)]
C	32
C_M	2,4

[(a)] Determinado por termogravimetria (10°C/min, $T_{máx.}$ 800°C e atmosfera dinâmica de ar sintético a uma vazão de 30 mL/min). A estimativa do teor de cinzas corresponde à massa de resíduo presente no porta-amostras ao fim da programação de aquecimento das diferentes amostras.

Na etapa de desproteinização dos gládios de moluscos visando a obtenção de β-quitina, os rendimentos, com base na massa de material recuperado, foram de 40% (1º tratamento), 85% (2º tratamento) e 90% (3º tratamento), sendo o rendimento global próximo de 30%. Entretanto, o emprego de um tratamento menos vigoroso, como o proposto por CHAUSSARD et al.[65], resultou em maior rendimento (≈ 40%) e foi o procedimento aplicado neste trabalho para a execução dos estudos de desacetilação.

Os graus médios de acetilação de α-quitina e β-quitina foram determinados a partir dos espectros RMN ^{1}H, os quais foram adquiridos após hidrólise parcial dos polímeros por tratamento com 20% DCl /D_2O durante 12h a 70-75°C. Assim, levando em conta as atribuições de sinais mencionadas anteriormente e empregando o tratamento proposto por SHIGEMASA et al.[49], α-quitina e β-quitina apresentaram $\overline{GA}$=71,1% e $\overline{GA}$=81,1%, respectivamente. Esses resultados revelam que em ambos os casos os polímeros foram extraídos em condições que favoreceram a ocorrência de desacetilação. No caso de α-quitina a desacetilação foi mais acentuada devido ao fato que os cefalotórax foram submetidos aos tratamentos ácido e alcalino para remoção de carbonatos e proteínas, respectivamente. De fato, os grupos acetamido são susceptíveis tanto à hidrólise ácida como básica, embora a primeira ocorra mais lentamente. Assim, a desacetilação menos acentuada no caso de β-quitina deve ser atribuída ao tratamento executado durante a etapa de desproteinização que, embora brando, também promoveu a hidrólise dos grupos acetamida. Pode ser observado,

assim, que o procedimento de extração da quitina, principalmente na etapa de desproteinização, tem grande influência nas características dos polímeros obtidos. No caso de β-quitina, os tratamentos executados em temperaturas mais elevadas, mesmo que por um curto intervalo de tempo, favorecem a desacetilação das cadeias. Este efeito é indesejável quando o processo de extração visa a obtenção de quitina com grau médio de acetilação elevado (%GA ~100) e por isso não foi o procedimento aplicado neste trabalho.

As alomorfas de quitina extraídas neste trabalho também foram caracterizadas por difração de raios X (Figura 16), o que permitiu a clara distinção de α-quitina e β-quitina. Assim, pode ser observado que α-quitina exibe sinais mais intensos e mais definidos do que os apresentados por β-quitina, os quais são também mais alargados do que aqueles de α-quitina. Tais dados foram tomados como evidências que os processos de extração foram bem sucedidos e que α-quitina é mais cristalina do que β-quitina.

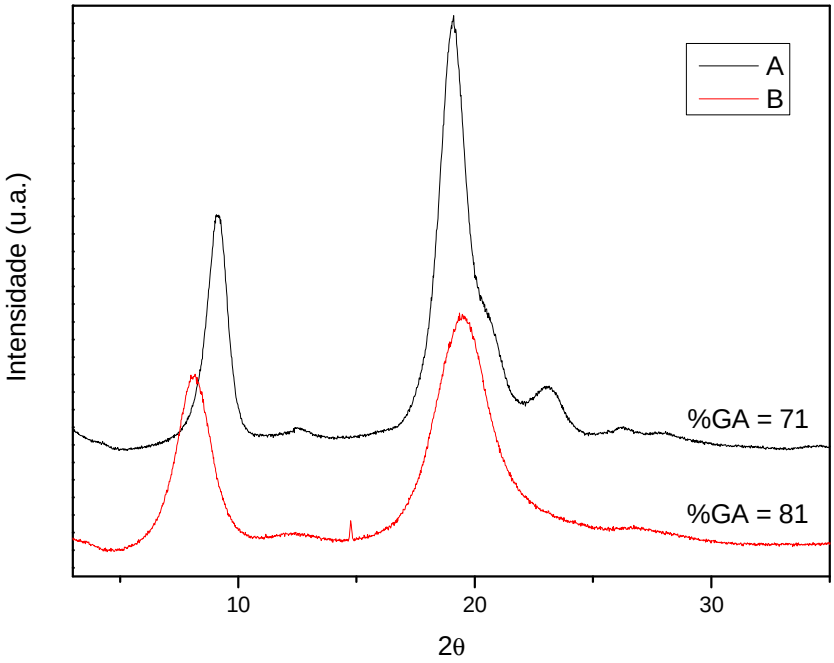


Figura 16. Difratogramas de α-quitina (A) e β-quitina (B) extraídas de cefalotórax de *M. rosenbergii* e de gládios de *L. plei* e *L. sanpaulensis*, respectivamente.

4.2 Desacetilação de quitina

Nesta parte do trabalho foi desenvolvido um estudo com o objetivo de avaliar a potencialidade de um novo processo de desacetilação, denominado desacetilação assistida por ultra-som de alta potência, frente ao processo heterogêneo, aqui denominado desacetilação convencional, e ao novo processo recentemente desenvolvido, em que a reação é precedida pela execução de ciclos térmicos consecutivos de congelamento e amornamento intercalados por sucção da atmosfera reacional para exclusão de oxigênio molecular. Entretanto, antes de apresentar e discutir os resultados desse estudo, alguns fundamentos e premissas bem aceitas acerca da reação de desacetilação são brevemente discutidos nos parágrafos que se seguem.

A desacetilação de quitina mais freqüentemente executada em laboratórios de pesquisa, e também nos processos industriais, é classificada como uma reação heterogênea, pois nem todos os sítios reativos do polímero, grupos acetamido das cadeias de quitina, são acessíveis ao reagente desacetilante. De fato, como já comentado anteriormente, o caráter semicristalino de quitina limita a acessibilidade de reagentes e solventes às regiões amorfas de sua estrutura, restringindo a ocorrência da reação a essas regiões, enquanto os domínios cristalinos, menos acessíveis, são preservados. Por outro lado, no estado sólido α-quitina e β-quitina adotam estruturas diferentes, a primeira sendo mais cristalina e densamente empacotada do que a segunda (Figura 17), o que justifica suas diferentes propriedades físico-químicas e a maior acessibilidade exibida por β-quitina.

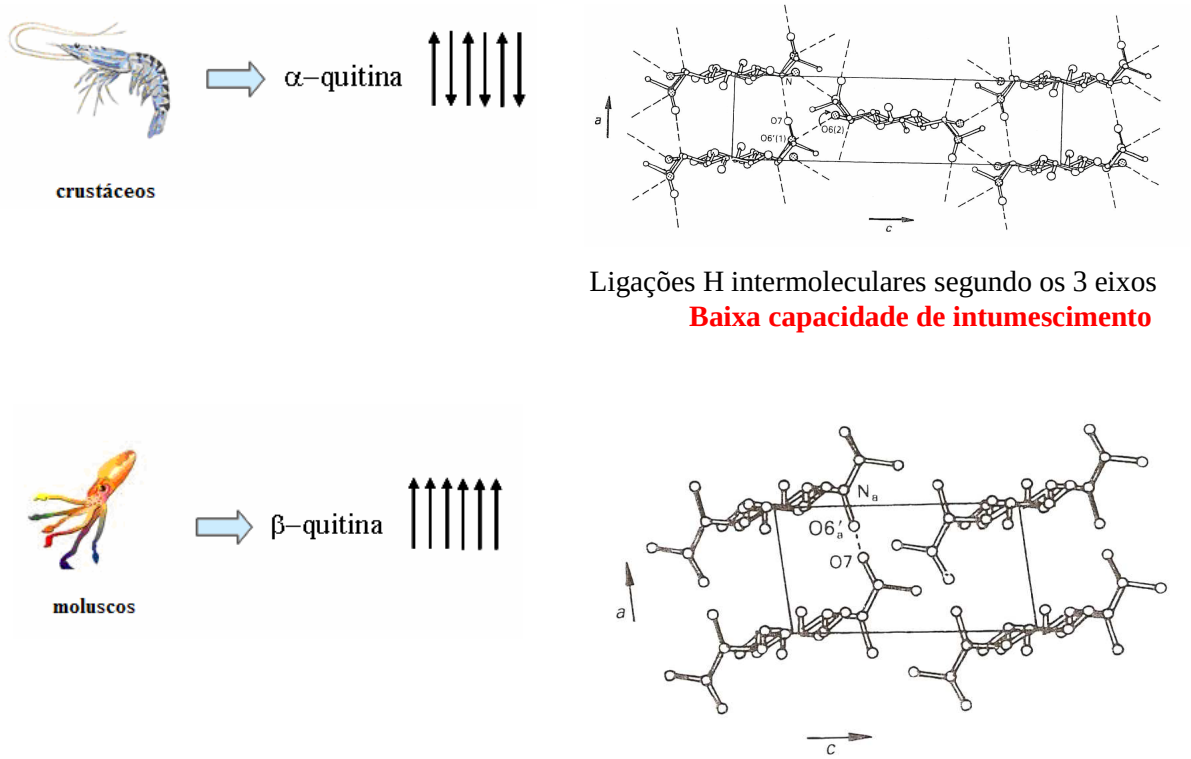


Figura 17. Representação esquemática das estruturas de α-quitina e β-quitina no estado sólido.

Quando quitina, independentemente da alomorfa considerada, é submetida à desacetilação heterogênea é preciso considerar que, inicialmente, ocorre um processo de intumescimento que permitirá maior acessibilidade aos sítios reativos na etapa seguinte, a reação de desacetilação propriamente dita. Evidentemente, α-quitina e β-quitina propiciarão diferentes acessibilidades aos reagentes, mas admitindo que o intumescimento inicial seja igualmente rápido (ou lento) em ambos os casos, uma vez que esta etapa seja superada, são as regiões amorfas, presentes em diferentes proporções nas alomorfas, que reagirão primeiramente. A desacetilação dessas frações deve ser considerada uma reação homogênea e sua ocorrência pode ser monitorada pela determinação da distribuição de unidades GlcNAc e GlcN nas cadeias desacetiladas. À medida que o processo avança a superfície dos cristalitos também passa a ser acessível, na medida em que a reação ocorra nessas regiões, a

acessibilidade às regiões cristalinas aumenta, e o processo assume seu caráter essencialmente heterogêneo. Entretanto, a acessibilidade é intrinsecamente limitada, como mostram os resultados de estudos desenvolvidos ao longo de muitos anos, e após avançar rapidamente nos momentos iniciais, a reação é desacelerada e atinge um patamar de velocidade constante (Figura 18). Conforme antecipado a partir da discussão sobre as estruturas de α-quitina e β-quitina, a primeira alomorfa reage mais rapidamente e sua reação atinge um patamar mais elevado de desacetilação. Por outro lado, as cadeias que primeiramente reagiram, em um caso como no outro, são mais expostas à ocorrência de despolimerização via hidrólise alcalina. Finalmente, como resultado os processos discutidos, as quitosanas originadas pela primeira etapa de desacetilação de α-quitina e β-quitina diferem quanto ao grau médio de acetilação, massa molar média e grau de cristalinidade, mas devem ser consideradas semelhantes, já que são heterogêneas e, geralmente, insolúveis em meios moderadamente ácidos. Assim, novas etapas de desacetilação devem ser executadas para a preparação de produtos mais desacetilados e suficientemente solúveis para serem denominados quitosanas.

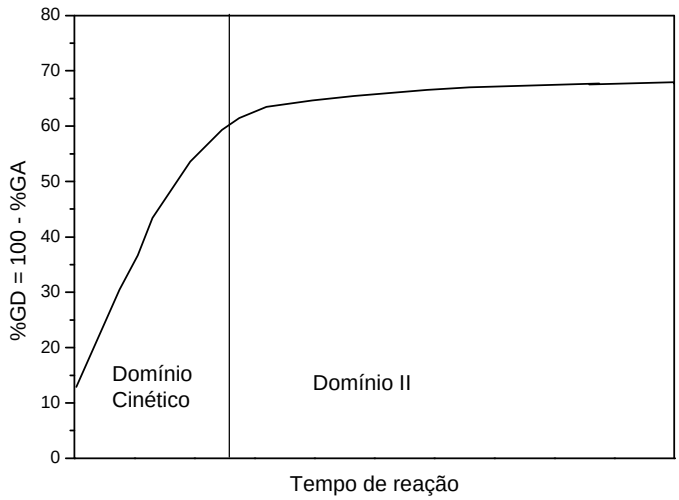


Figura 18. Avanço da reação de desacetilação destacando o domínio cinético e o patamar de velocidade de reação constante.

De fato, em função da limitada acessibilidade e da ocorrência de despolimerização, a manutenção da reação por mais tempo do que o necessário para atingir o patamar de velocidade constante resulta em produtos cujo grau de acetilação continua sendo relativamente elevado, mas que podem ser solúveis em função de suas baixas massas molares. Assim, um processo de desacetilação multietapas é mais vantajoso, pois embora as etapas subseqüentes sejam menos eficientes do que a primeira, novos patamares são atingidos e a otimização das condições pode levar à desacetilação mais completa (Figura 19). Infelizmente, embora promova uma desacetilação mais completa, o processo multietapas também favorece a despolimerização e, assim, sua execução demanda o emprego de medidas que minimizem a despolimerização, incluindo o uso de atmosferas inertes e de aditivos e, como tem sido sugerido mais recentemente, de novas metodologias de desacetilação.

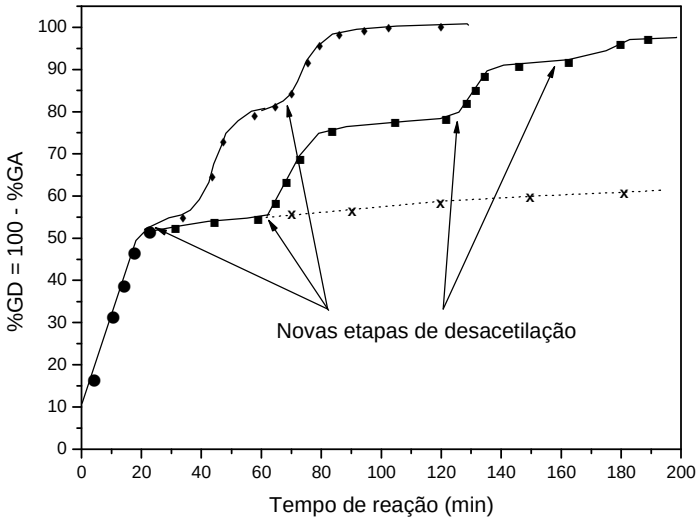


Figura 19. Representação esquemática das cinéticas de desacetilação por processo multietapas, antes e após a otimização das condições reacionais (curvas superiores), e processo contínuo (curva inferior).

Em função do exposto, o estudo proposto neste trabalho pretende avaliar o potencial de um novo processo de desacetilação no qual a irradiação de ultra-som de alta potência é empregada para permitir, via aumento de acessibilidade decorrente do fenômeno de cavitação, a preparação de quitosanas mais desacetiladas e pouco despolimerizadas em tão poucas etapas quanto possível. A proposta está baseada na experiência prévia desenvolvida no âmbito do Grupo de Físico-Química Orgânica do IQSC/USP e que resultou na conclusão de uma dissertação de Mestrado em 2003 [92], além de publicações em periódicos científicos e apresentações em congressos nacionais e internacionais.

Assim, nos tópicos que se seguem serão discutidos: 1) o processo heterogêneo e a desacetilação assistida por ultra-som de alta potência; 2) a cinética da desacetilação assistida por ultra-som de alta potência, 3) as propostas de mecanismos de desacetilação.

4.2.1 Desacetilação heterogênea versus desacetilação assistida por ultra-som

A desacetilação de quitina provoca mudanças estruturais e morfológicas que podem ser monitoradas, por exemplo, pela variação do grau médio de acetilação, por microscopia eletrônica de varredura e por difração de raios X. Nesse último caso, o padrão de difração da amostra de partida e suas alterações em função do grau de desacetilação refletem o rearranjo das cadeias poliméricas decorrentes da progressiva destruição dos domínios cristalinos. Tais evidências podem ser quantificadas pela determinação dos graus de ordem, ou cristalinidade, e dos diâmetros médios dos cristalitos, entretanto o tratamento quantitativo acurado dos dados de difração de raios X demanda a adoção de linhas de base coerentes, a normalização das curvas, a avaliação e subtração da contribuição das regiões amorfas para a intensidade dos sinais, a avaliação da intensidade dos sinais e, eventualmente, a sua deconvolução. Tais procedimentos devem ser

criteriosamente executados, o que entretanto não garante a validade das estimativas de graus de ordem resultantes de seu emprego. Adicionalmente, os padrões correspondentes à máxima cristalinidade (grau de cristalinidade de 100%) e à sua completa ausência (grau de cristalinidade de 0%) não são disponíveis, o que impede uma calibração confiável. Em função desses fatores alguns trabalhos, como é o caso deste trabalho, se limitam a fazer uma análise comparativa e semiquantitativa dos difratogramas de raios X. Assim, a intensidade e a definição dos sinais serão critérios para comparar e estimar o grau de ordem das amostras. Da mesma forma, sabendo que o diâmetro médio dos cristalitos é inversamente proporcional à largura do sinal correspondente às regiões cristalinas a meia altura do sinal, a ocorrência de alargamento de sinais em $2\theta \approx 20°$ será empregada como critério para determinar a diminuição da cristalinidade.

A avaliação dos difratogramas de α-quitina e β-quitina e de seus derivados desacetilados revela aspectos muito interessantes das desacetilações heterogênea e assistida por ultra-som de alta potência.

No primeiro caso (Figura 20), pode ser observado que os produtos de desacetilação heterogênea de α-quitina apresentam sinais menos intensos que o polímero de partida e ligeiramente deslocados para maiores valores de ângulo de Bragg, além de serem mais alargados, revelando o decréscimo de cristalinidade que acompanha a desacetilação. Também pode ser constatado que o prolongamento da reação e a sua execução em temperaturas mais elevadas contribuem para acentuar o decréscimo de cristalinidade. Por outro lado, a execução da desacetilação assistida por ultra-som de alta potência resulta na amostra menos cristalina dentre aquelas comparadas na Figura 21.

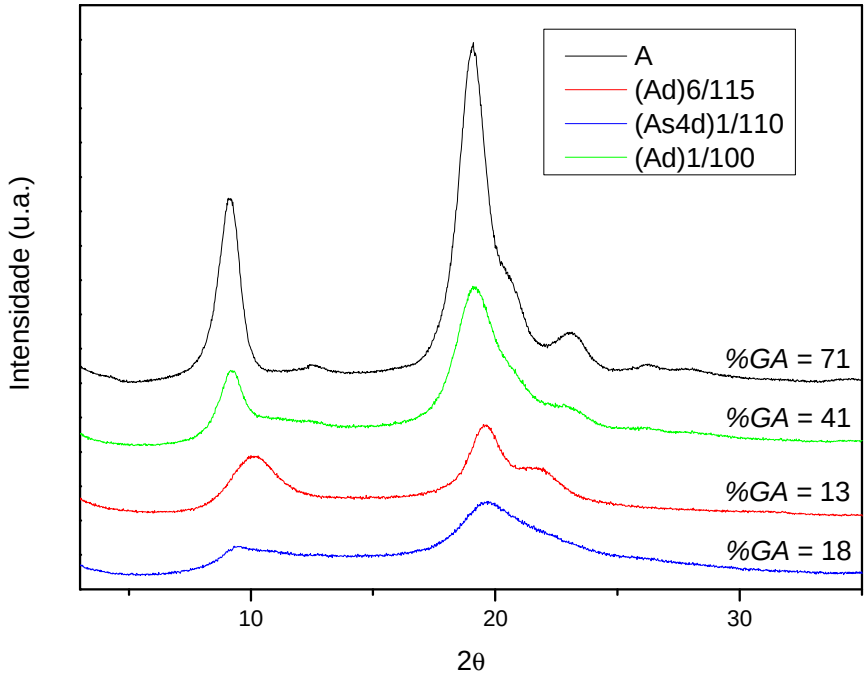


Figura 20. Difratogramas das amostras de α-quitina (A), α-quitina desacetilada por 6h, a 115°C ((Ad)6/115), α-quitina irradiada com ultra-som e em seguida desacetilada por 1h, a 100°C ((As4d)1/100) e de α-quitina desacetilada durante 1h, a 100°C ((Ad)1/100).

A comparação dos difratogramas de β-quitina e derivados desacetilados (Figura 21) corrobora as observações e conclusões apresentadas no caso de α-quitina e também mostra que temperaturas mais baixas de desacetilação não produzem uma redução significativa da cristalinidade, mesmo se a reação se prolonga por 3 h. Como observado anteriormente, a desacetilação assistida por ultra-som resulta nos produtos menos cristalinos, sendo que o prolongamento da reação resulta em produtos menos cristalinos, mesmo se a reação é executada por períodos mais curtos (Figuras 21 e 22).

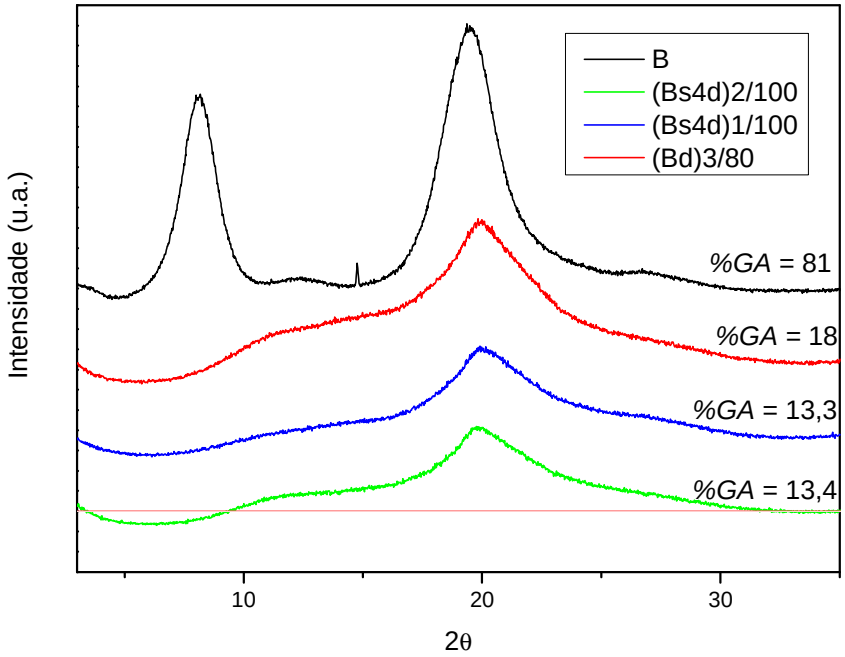


Figura 21. Difratogramas das amostras de β-quitina (B), β-quitina irradiada com ultra-som e em seguida desacetilada por 2h, a 100°C ((Bs4d)2/100), β-quitina irradiada com ultra-som e em seguida desacetilada por 1h, a 100°C ((Bs4d)1/100) e β-quitina desacetilada por 3 h, a 80°C ((Bd)3/80).

Adicionalmente, a comparação dos difratogramas apresentados na Figura 22 revela que produtos semelhantes resultam quando a desacetilação assistida por ultra-som é executada por 1 h a 100°C e se a suspensão de β-quitina em NaOH 40% é simplesmente submetida ao tratamento de ultra-som durante 30 min. É importante ressaltar que nesse último caso a execução do referido tratamento provoca o aumento da temperatura da suspensão desde a temperatura ambiente até aproximadamente 90°C após 10 min, sendo que então a temperatura se mantém até o fim do tratamento (mais 20 min). Também é relevante acrescentar que a execução da desacetilação heterogênea de β-quitina a 80°C por 3 h não produz alterações tão importantes na cristalinidade (Figura 21).

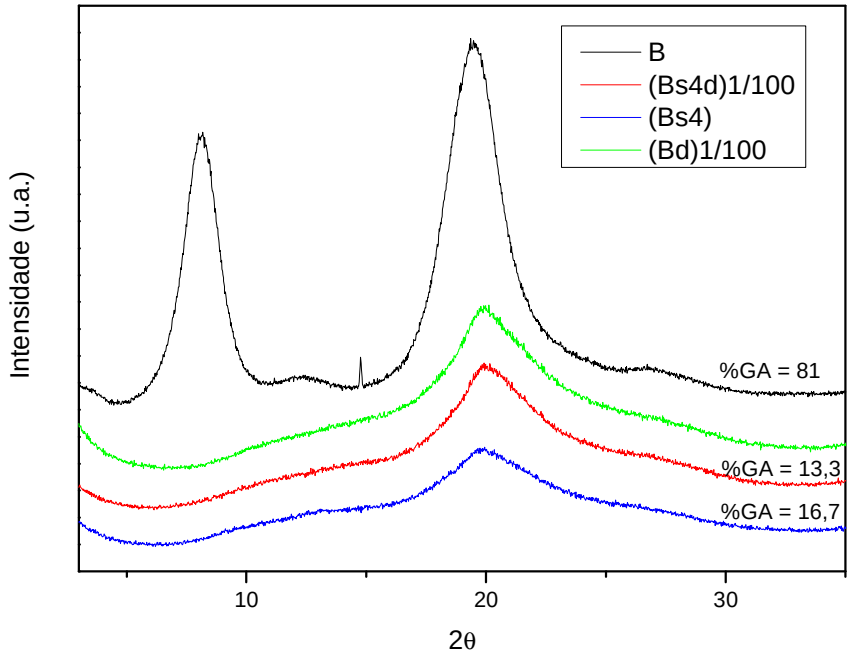


Figura 22. Difratogramas das amostras de β-quitina (B), β-quitina irradiada com ultra-som e em seguida desacetilada por 1h, a 100°C ((Bs4d)1/100), β-quitina irradiada com ultra-som e em seguida resfriada e neutralizada (Bs4) e β-quitina desacetilada por 1 h, a 100°C ((Bd)1/100).

A evolução da reação de desacetilação também foi avaliada por determinações de grau médio de acetilação e de viscosidade intrínseca e massa molar média viscosimétrica (Tabelas 8 e 9). Assim, pode ser constatado que a execução da desacetilação assistida por ultra-som, independentemente da condição empregada no tratamento de ultra-som, provoca acentuada redução (≥66%) do grau médio de acetilação da β-quitina de partida. Além disso, tal redução é ainda mais importante (>80%) se o tratamento de ultra-som é executado com potência mais elevada por 30 min. Entretanto, a eficiência da desacetilação não se altera se a reação é prolongada por mais 1 h, mas aumenta discretamente se a reação é executada a temperatura mais elevada. Também é muito importante avaliar os efeitos da reação de desacetilação assistida por ultra-som sobre a viscosidade intrínseca dos produtos desacetilados, como pode ser observado na Tabela 9 e nos gráficos apresentados no Apêndice B. Assim, pode ser observado que as condições mais vigorosas empregadas nos tratamentos de ultra-som, bem como o prolongamento da reação de desacetilação e a sua execução a temperatura mais elevada, favorecem a despolimerização dos produtos desacetilados. Entretanto, é muito importante notar que a simples execução do

tratamento de ultra-som levou à produção de quitosana com $\overline{GA}$ < 17% e com a maior massa molar dentre as amostras comparadas na Tabela 8.

Tabela 7. Valores de grau médio de acetilação ($\%\overline{GA}$) das alomorfas de α-quitina, β-quitina e dos derivados desacetilados de α-quitina

Amostra	$\%\overline{GA}$ (RMN ^{1}H) [(a)]	$\%\overline{GA}$ (Análise elementar)
A	71	89
(Ad)1/100	41	51
(As4d)1/100	18	29
B	81	85
B_L	71 [(b)]	-

[(a)] DCl/D_2O 20%, 80°C; [(b)] LAVALL, R. L., 2003 [94]

Tabela 8. Valores de viscosidade intrínseca [η], massa molar média viscosimétrica ($\overline{MM}_v$) e grau médio de acetilação ($\%\overline{GA}$) dos derivados desacetilados de α- e de β-quitina

Amostra	**[η] (mL/g)**	$\overline{MM}_v$ **(10^{-5})**	$(\%)\overline{GA}$
(Bd)3/80	2390	8,57 [(a)]	18 ± 1 [(c, d)]
(B_{LT}d)0,5/90	-	-	46 [(d)]
(Bs1d)1/100	1790	5,86 [(a)]	25 ± 4 [(d, e)]
(Bs2d)1/100	1495	4,62 [(a)]	26 ± 5 [(d, e)]
(Bs3d)1/100	1865	6,19 [(a)]	27 ± 2 [(d, e)]
(Bs4d)1/100	1634	5,02 [(b)]	13,3 [(c)]
Bs4	2401	8,33 [(b)]	16,7 [(c)]
(Bs4d)2/100	1582	4,81 [(b)]	13,4 [(c)]
(Bs4d)1/120	1115	3,04 [(b)]	10,1 [(c)]
(Bs4d)2/120	1002	2,64 [(b)]	12,8 [(c)]
(Ad)6/115	1425	4,19 [(b)]	13 ± 2 [(c, e)]

[(a)] $[\eta] = K'\overline{MM}_v^a$, sendo K' = 0,074 e *a* = 0,76;

[(b)] $[\eta] = K'\overline{MM}_v^a$, sendo K' = 0,076 e *a* = 0,76;

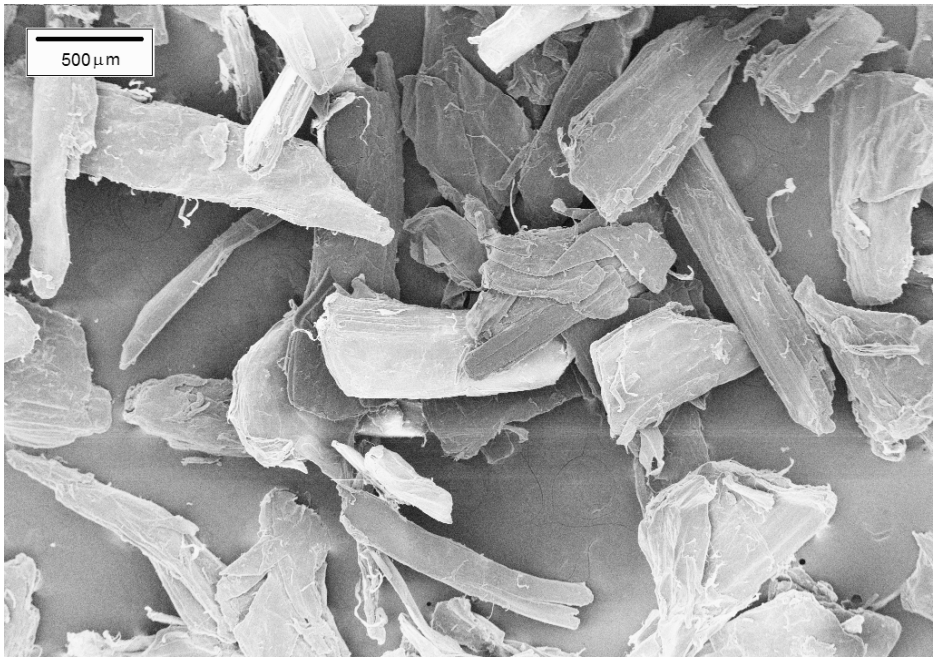
[(c)] Determinado por RMN ^{1}H (HCl/D_2O 1%, 80°C);

[(d)] Determinado por titulação condutimétrica;

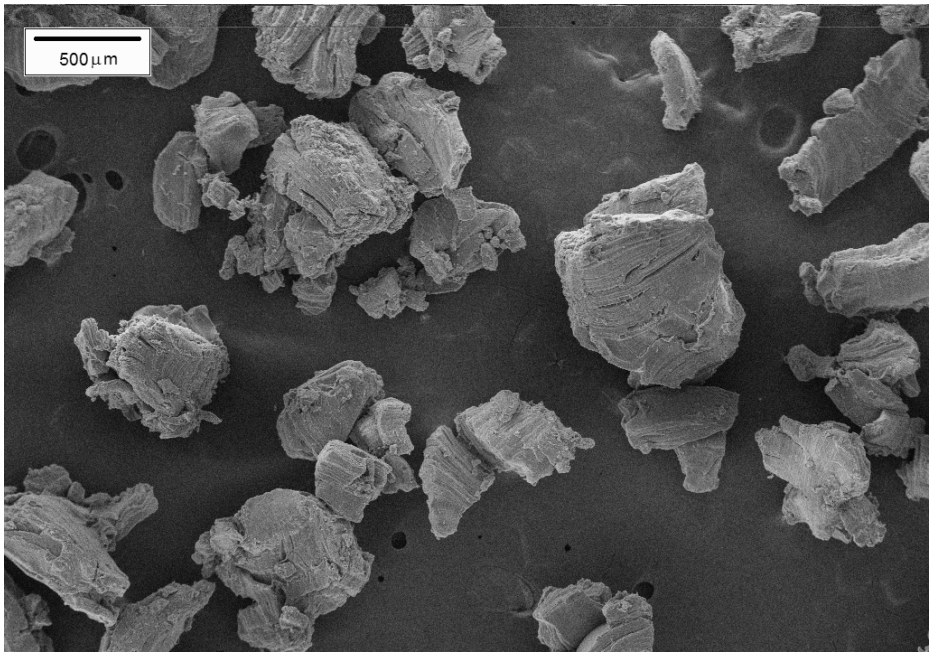
[(e)] Médias de reações realizadas em duplicata.

As alterações morfológicas provocadas pela execução da reação de desacetilação heterogênea e pela desacetilação assistida por ultra-som podem ser avaliadas por microscopia eletrônica de varredura. Os efeitos desses processos sobre as dimensões médias das partículas revelam que a desacetilação *per si* promove a redução das dimensões citadas (Figuras 23a e 23b), mas também se observa que o tratamento de ultra-som contribui para a redução das dimensões, a qual é mais importante se irradiação de potência mais elevada é aplicada no tratamento (Figuras 24a e 24b).

Assim, como já destacado quando as alterações de cristalinidade foram discutidas, os resultados desse estudo demonstram que o tratamento de ultra-som de alta potência produz efeitos marcantes sobre a eficiência da reação de desacetilação e, nas condições adequadas, permite a preparação de quitosanas com características, $\overline{GA}$ e [η], superiores quando comparadas àquelas produzidas quando a desacetilação heterogênea é executada. De fato, esses resultados demonstram que a quitosana mencionada (amostra Bs4) também é mais desacetilada (≈50%) do que aquela produzida a partir de β-quitina após a aplicação dos ciclos térmicos seguida de desacetilação por 20 min a 100^0C [62], embora sua massa molar seja ligeiramente menor (≈12%).

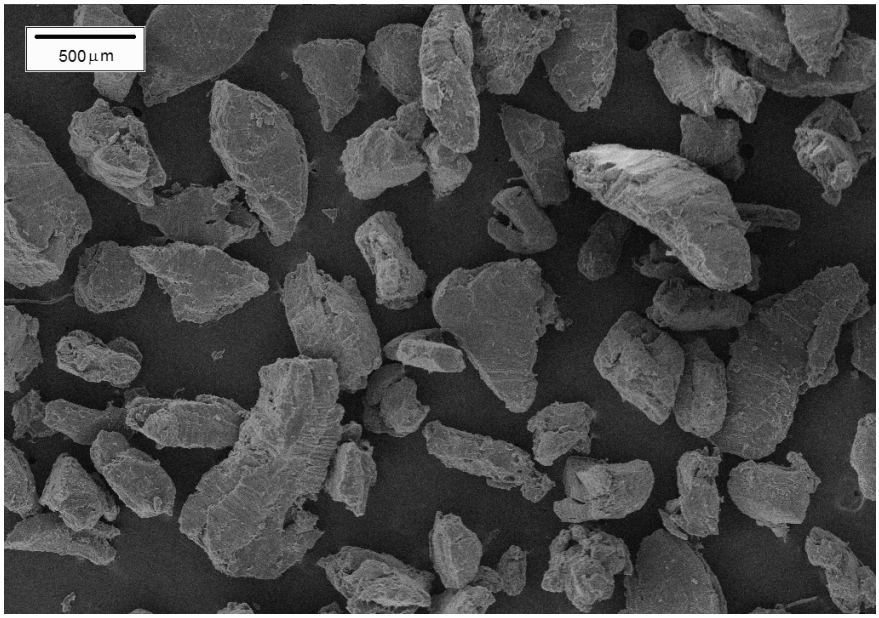


(a) amostra B

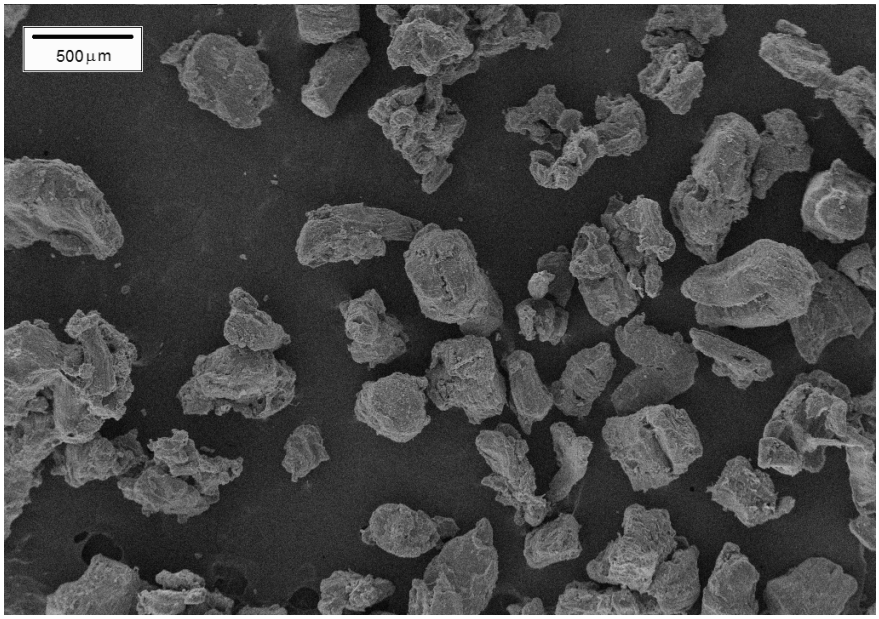


(b) amostra (Bd)1/100

Figura 23. Micrografias das amostras B (a) e (Bd)1/100 (b).



(a) amostra (Bs2d) 1/100

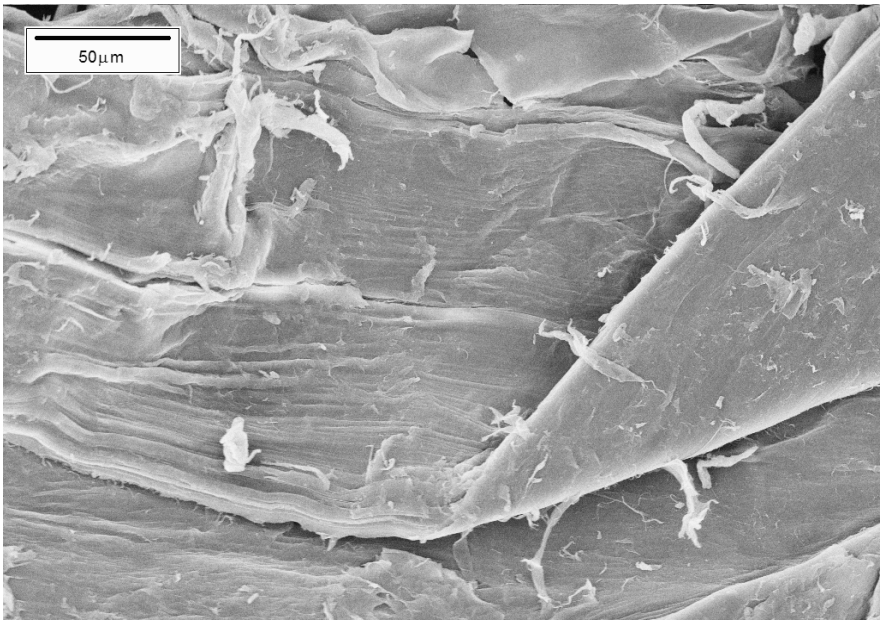


(b) amostra (Bs4d)1/100

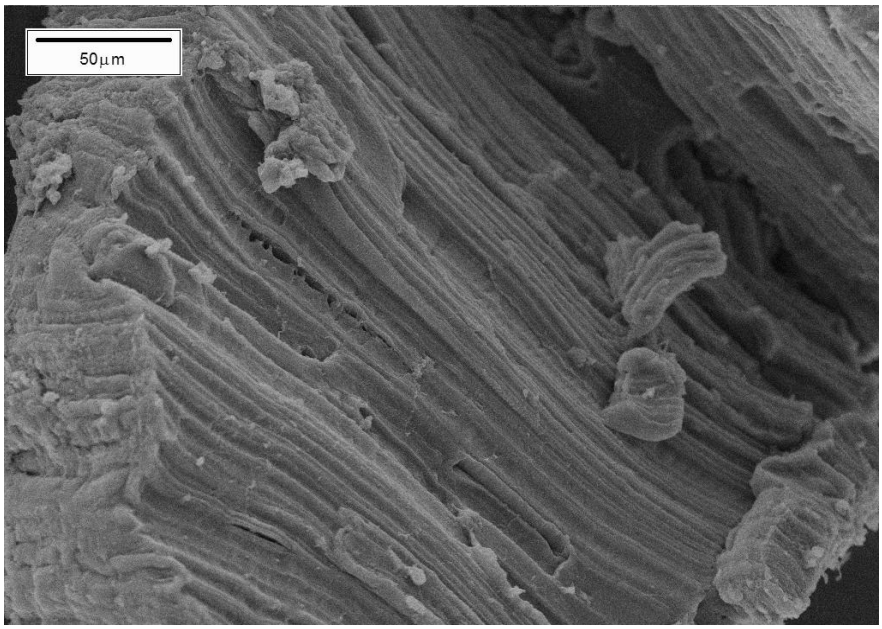
Figura 24: Micrografias das amostras (Bs2d) 1/100 (a) e (Bs4d) 1/100 (b).

Os efeitos discutidos nos parágrafos anteriores, que resultam na redução das dimensões médias das partículas, podem ser indicativos de um aumento da área superficial das partículas. Esta proposta é reforçada pelas micrografias tomadas com aproximações mais importantes. De fato, tais micrografias mostram que as superfícies das partículas de β-quitina são relativamente lisas (Figura 25a), enquanto aquelas das amostras submetidas à desacetilação heterogênea (Figura 25b) e desacetilação assistida por ultra-som (Figuras 26a e 26b) são muito mais rugosas. Ainda, pode ser observado que a superfície

da amostra submetida à desacetilação heterogênea (Figura 25b) parece conservar alguma “memória” da morfologia da quitina de partida (Figura 25a), enquanto aquelas submetidas à desacetilação assistida por ultra-som (Figuras 26a e 26b) exibem morfologias que parecem refletir a progressiva desagregação provocada por condições mais vigorosas aplicadas nos tratamentos de ultra-som.

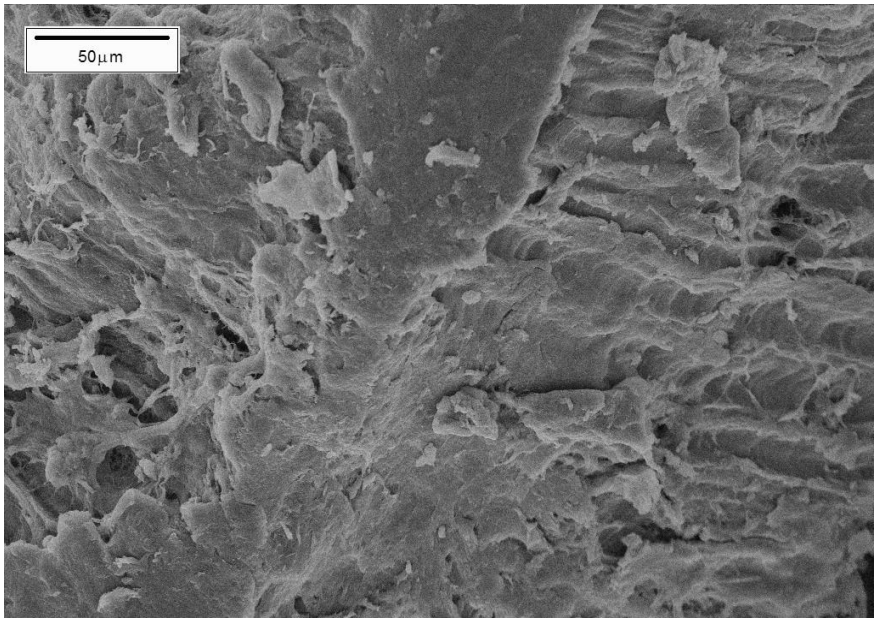


(a) amostra B

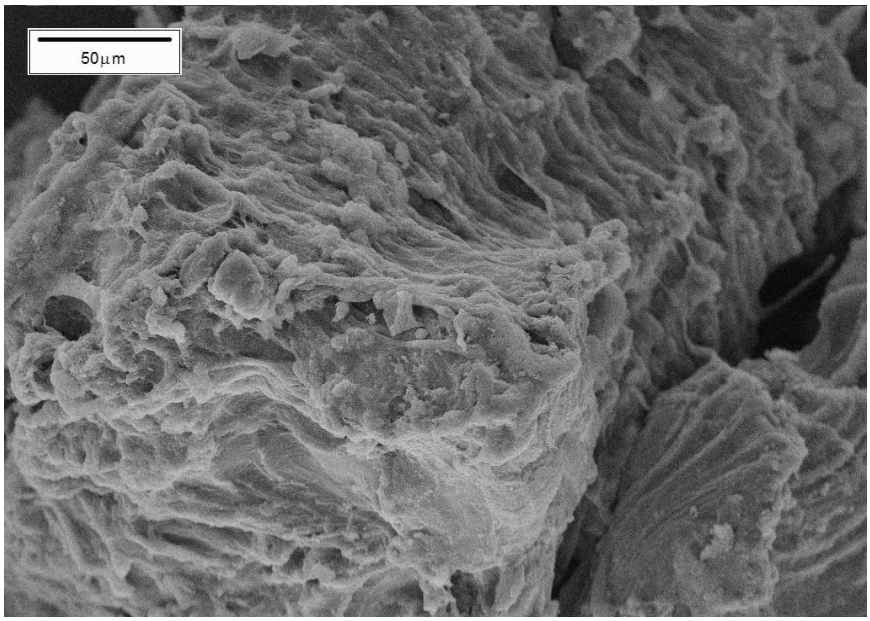


(b) amostra (Bd)1/100

Figura 25. Micrografias das amostras B (a) e (Bd)1/100 (b).



(a) amostra (Bs2d) 1/100



(b) amostra (Bs4d) 1/100

Figura 26. Micrografias das amostras (Bs2d) 1/100 (a) e (Bs4d) 1/100 (b).

De acordo com os resultados apresentados e discutidos nesse tópico, o aumento da eficiência da reação de desacetilação assistida por ultra-som em comparação com o processo heterogêneo de desacetilação pode ser atribuído, em primeira aproximação, ao fenômeno de cavitação, o qual a redução das dimensões médias e o aumento da área superficial das partículas, aumentando a acessibilidade aos sítios reativos do polímero.

4.2.2 Estudo cinético da desacetilação assistida por ultra-som

A maioria dos estudos sobre os processos de desacetilação de quitina é direcionada para a pesquisa de condições otimizadas de reação, buscando determinar as condições que propiciem o rendimento mais elevado, a desacetilação mais completa e a minimização da despolimerização. Dentre os poucos estudos focados sobre os aspectos cinéticos da reação há uma boa concordância relativamente à ordem de grandeza das energias de ativação, embora algumas discordâncias entre os valores absolutos desse parâmetro sejam encontradas em diferentes trabalhos (Tabela 9). Em geral, tais estudos também são concordantes com o fato que as energias de ativação referentes à desacetilação de α-quitina e β-quitina são semelhantes, apesar de vários trabalhos da literatura relatarem que β-quitina seria mais reativa do que α-quitina.

Tabela 9. Energia de ativação da reação de desacetilação heterogênea de quitina

Alomorfa	Temp.(°C)	[NaOH] (% m/m)	E_a (kJ/mol)	Referência
α	80-120	50	36-58	99
α	80-110	40	53	41
α	70-150	35	56	79
α	40-60	45	82	100
β	40-60	45	90	100
β	40-150	40	41	5,101

Entretanto, como discutido e esclarecido em trabalho recente [95], as diferentes reatividades das alomorfas de quitina não devem ser associadas a diferentes valores de energia de ativação, mas sim ao fator pré-exponencial da equação de Arrhenius. Assim,

enquanto a energia de ativação (E_a) se associa à fração de moléculas minimamente ativadas para reagir, i. e. à fração de moléculas com energia cinética no mínimo igual à energia de ativação, o fator pré-exponencial (A) está vinculado à taxa de colisões (Z) e a um fator estérico (p).

$$A = Z\,p \qquad \text{Eq. 14}$$

Segundo a teoria das colisões, o parâmetro A reflete a proporção de espécies que possuem a energia cinética necessária para superar a barreira energética representada pela energia de ativação e a proporção de reagentes que possuem a orientação correta para se tornarem espécies ativadas. Em resumo, o parâmetro A representa a freqüência de colisões entre duas moléculas de reagentes que possuem a energia e a orientação necessárias para reagir.

Dessa forma, como demonstrado em trabalho recente [95], o fator pré-exponencial associado à primeira etapa de desacetilação heterogênea de α-quitina é cerca de sete vezes maior do que o de β-quitina, embora as energias de ativação determinadas na mesma condição sejam praticamente iguais ($E_a \approx$. 40kJ/mol). Portanto, as diferentes reatividades das alomorfas de quitina são efetivamente associadas às diferentes acessibilidades apresentadas por α-quitina e β-quitina (Figura 27). Com base nessa mesma premissa Lamarque et al.[62] justificam a maior eficiência da desacetilação de quitina, independentemente da alomorfa considerada, quando esta é previamente submetida a ciclos de descongelamento e amornamento intercalados por sucção da atmosfera reacional para exclusão do oxigênio molecular.

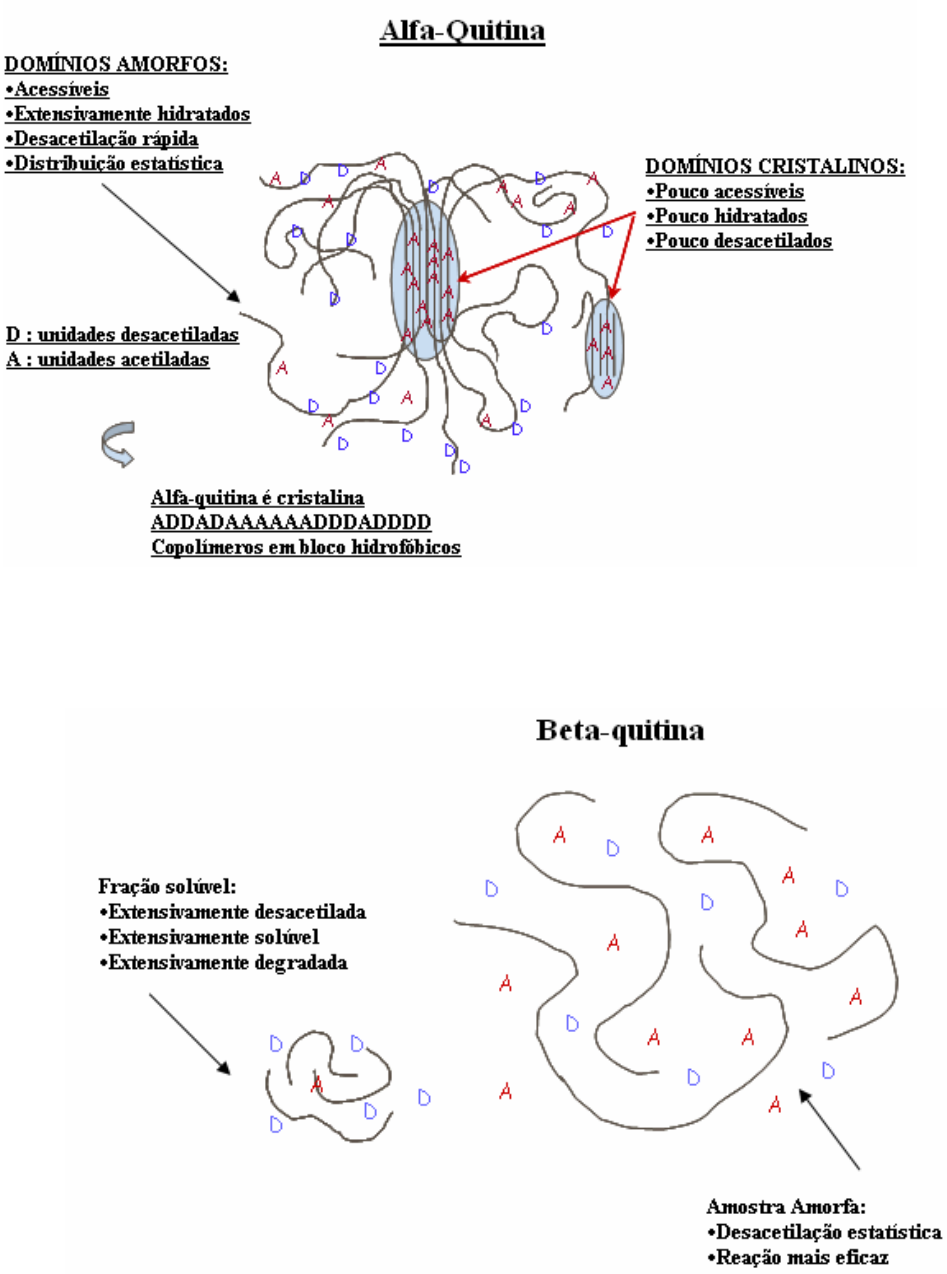


Figura 27. Representação esquemática do processo de intumescimento das cadeias de α- e β-quitina pelos reagentes, adaptada da referência 95.

O estudo cinético da desacetilação assistida por ultra-som foi executado a 100°, 110° e 120°C empregando a alomorfa β-quitina e seus resultados são mostrados na Figura 28.

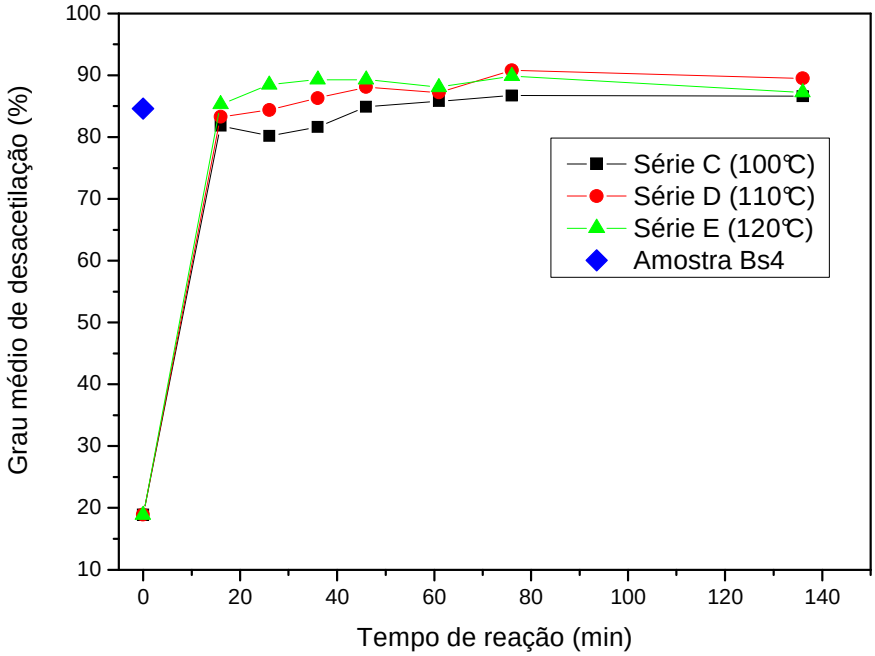


Figura 28. Curvas cinéticas da desacetilação de β-quitina assistida por ultra-som, nas quais $\overline{GD}$ representa o grau médio de desacetilação.

De acordo com os resultados desse estudo, quitosanas com 9% $< \overline{GA} <$ 20% são obtidas, independentemente da temperatura da reação, se as suspensões do polissacarídeo são submetidas a tratamento de ultra-som. De fato, quitosanas com essas características são obtidas após os primeiros trinta minutos de reação, independentemente da temperatura. Assim, pode ser concluído que o tratamento de ultra-som favorece enormemente a ocorrência de desacetilação, o que pode ser atribuído à plena acessibilidade aos sítios reativos do polímero resultante da ação desse tratamento, como já discutido. Como pode ser observado na Figura 28, o domínio cinético da reação é muito mais curto do que aquele observado no processo heterogêneo desacetilação e também no método dos ciclos térmicos desenvolvido por Lamarque et al.[62]. Dessa forma, os dados disponíveis não permitem a determinação da energia de ativação para esse processo, mas mostram que a reação é muito mais favorecida do que através do emprego de quaisquer dos métodos descritos na literatura. Adicionalmente, fica demonstrado que a execução do

tratamento de ultra-som por 30 min basta para resultar em quitosana com $\overline{GA}$≈15% (Figura 28), um resultado inédito na literatura e que demonstra a potencialidade do método proposto e a necessidade de estudos mais aprofundados serem desenvolvidos para permitir a plena compreensão dos fenômenos envolvidos e a sua exploração para a produção em larga escala de quitosanas extensivamente desacetiladas e de massa molar elevada.

5 Conclusões

Os tratamentos físicos e químicos das matérias-primas, cefalotórax de *M. rosenbergii* e gládios de *L. plei* e *L. sanpaulensis*, possibilitaram a obtenção de amostras de quitina, alomorfas α e β, com características estruturais típicas, conforme avaliado por espectroscopia RMN ^{1}H e difração de raios X. Os valores de graus médios de acetilação das alomorfas são elevados, mas revelam que os processamentos das matérias-primas resultaram na hidrólise parcial dos grupos acetamida dos polímeros. Conforme nossos resultados, pode ser concluído que a execução da etapa de desmineralização dos cefalotórax é responsável por uma taxa de hidrólise mais elevada durante a extração de α-quitina. Por outro lado, a desproteinização, embora tenha sido executada em condições brandas, também contribui para a ocorrência de hidrólise dos grupos acetamida de quitina. Outras evidências dos efeitos dos tratamentos mencionados foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura, que revelou as diferentes características morfológicas das superfícies das partículas das alomorfas de quitina. As amostras de quitina obtidas neste trabalho são nitidamente distintas pelos diferentes padrões de difração de raios X, sendo que a alomorfa α-quitina exibe um padrão mais ordenado, com sinais mais intensos e mais bem resolvidos que os exibidos por β-quitina.

As reações de desacetilação de quitina geraram produtos desacetilados, em diferentes extensões conforme as condições empregadas, cujas solubilidades dependem tanto do grau médio de acetilação como do grau de ordem, ou cristalinidade das quitosanas obtidas. Quando a desacetilação heterogênea foi executada, aqui denominada desacetilação convencional, foi constatado que a α-quitina foi menos

completamente desacetilada do que β-quitina, entretanto esta última se mostrou mais susceptível à despolimerização. Desses resultados pode ser concluído que a estrutura mais ordenada de α-quitina é responsável pela menor acessibilidade das espécies ativas de hidróxido de sódio aos grupos acetamida do polímero. Independentemente da alomorfa considerada e da temperatura, foi constatado que a reação atinge um patamar após 30 minutos, a partir do qual a reação procede muito lentamente. Por outro lado, quando processos não convencionais de desacetilação foram empregados, como aquele em que quitina é previamente submetida a ciclos térmicos e aquele em que a reação é assistida por ultra-som de alta potência, ambas as alomorfas foram mais eficientemente desacetiladas. No caso em que os ciclos térmicos foram aplicados, é proposto que tal tratamento destrói os domínios cristalinos do polímero, aumentando a acessibilidade dos reagentes e, conseqüentemente, a eficiência da desacetilação. Os efeitos da irradiação de ultra-som também se manifestam fortemente sobre a eficiência da reação de desacetilação, que atinge o patamar de velocidade constante em nível mais elevado e muito mais rapidamente do que qualquer outro processo de desacetilação relatado na literatura. De fato, a reação é dramaticamente acelerada nesse caso e o domínio cinético do processo é abreviado para tempos menores do que 30 minutos. Assim, o emprego de irradiação de ultra-som possibilitou, de um modo mais simples e rápido, a obtenção de quitosanas com características semelhantes às obtidas após o emprego do método dos ciclos térmicos. Entretanto, o conjunto de dados obtidos neste trabalho ainda não permite a formulação de um processo otimizado de desacetilação e nem a proposição de um mecanismo de ação da irradiação de ultra-som, embora seja proposto que os principais efeitos decorram do processo de cavitação. Assim, de

acordo com a experiência e as evidências acumuladas neste trabalho e em outros nos quais a irradiação de ultra-som foi empregada, é proposto que o aumento da área superficial decorrente da ação do ultra-som propicia pleno acesso das espécies ativas de hidróxido de sódio aos sítios reativos do polímero, promovendo a ocorrência da reação em condições homogêneas, a exemplo do que é proposto no caso dos tratamento térmicos. No entanto, ainda são necessários experimentos adicionais com os objetivos de corroborar essa hipótese bem como para aprofundá-la no sentido de promover uma melhor compreensão dos fenômenos envolvidos.

6 Perspectivas

Os resultados deste trabalho apontam claramente, por um lado a elevada potencialidade do processo de desacetilação assistido por ultra-som de alta potência ser empregado em larga escala e, por outro lado, a necessidade de se desenvolver estudos básicos que fundamentem propostas de mecanismos, visando compreender melhor os aspectos cinéticos e termodinâmicos de tal processo. Assim, esforços devem ser direcionados para ampliar e otimizar o processo, que é inédito, de maneira a permitir o seu registro e, portanto demanda providências no sentido de proteger o conhecimento, a propriedade intelectual e o eventual invento e aplicação industrial decorrentes de seu desenvolvimento. Do ponto de vista científico, devem ser desenvolvidos estudos que permitam: i) otimizar os parâmetros do tratamento de ultra-som; ii) avaliar *in situ* os efeitos da irradiação de ultra-som de alta potência sobre a quitina suspensa em solução de hidróxido de sódio; iii) determinar os parâmetros cinéticos da reação de desacetilação assistida por ultra-som. Essas linhas de investigação devem ser implementadas e exploradas empregando as técnicas e métodos adequados de análise. Nesse sentido, devem ser destacadas as técnicas e métodos que permitam: i) avaliar a área superficial das partículas de quitina antes e após o tratamento de ultra-som; ii) estudar os efeitos do tratamento sobre as características estruturais e morfológicas do polímero, incluindo dentre as mais importantes o diâmetro médio, a rugosidade e a porosidade das partículas, o grau médio de acetilação e a distribuição de unidades acetiladas e desacetiladas ao longo das cadeias das quitinas desacetiladas pelo processo assistido por ultra-som, as massas molares médias e distribuição de massas molares, e o grau de ordenamento dos produtos no estado sólido. Além disso, é necessário investir esforços no sentido de propiciar a execução de experimentos em que os parâmetros da irradiação de ultra-som sejam variados em amplo intervalo, principalmente no que diz

respeito à amplitude e à freqüência da irradiação, ao tempo de tratamento e ao volume e densidade das suspensões de quitina a serem tratadas.

Em função do exposto fica claro que o trabalho desenvolvido nesta tese abre amplas possibilidades de aprimoramento e para o desenvolvimento de conhecimento novo bem como de novas tecnologias em que a biomassa é a matéria-prima, contribuindo dessa maneira para ampliar as possibilidades de aproveitamento racional desses recursos naturais, abundantes e renováveis.

Em relação à área específica em que se insere, aquela dedicada aos estudos de macromoléculas naturais e/ou quimicamente modificadas, este trabalho apresenta novas perspectivas, especialmente para a produção de quitosanas de maneira mais rápida e simples em comparação com os processos atualmente disponíveis. Além disso, a partir do aprofundamento dos estudos aqui relatados, pode ser projetado o desenvolvimento de procedimentos que assegurem maior controle sobre as características e propriedades das quitosanas visando sua aplicação em nichos específicos, como a produção de biomateriais e a elaboração de dispositivos para a liberação controlada de fármacos, entre outras.

7 Referências bibliográficas

1 RIPOLI, T.C.C.; MOLINA JÚNIOR, W.F.; RIPOLI, M.L.C. Energy potencial of sugar cane biomass in Brazil. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 4, p. 677-681, 2000.

2 USO de biomassa para produção de energia. Disponível em: <www.ambientebrasil.com.br>. Acesso em: 20 jun. 2007.

3 TOKAY, B.A. Biomass Chemicals. In: GERHARTS, W. (Ed.). **Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry**. 6. ed. New York: VCH, 1986. v. A4, p. 99-105.

4 DUTTON, G.G.S. Polysaccharides. In: KROSCHWITZ, J.I. (Ed.). **Encyclopedia of polymer science and engineering**. 2. ed. New York: John Wiley, 1988. v. 13, p. 87-147.

5 ROBERTS, G.A.F. **Chitin chemistry**. London: Macmillan, 1992. 349p.

6 MUZZARELLI, R.A.A. Chitin. In: MARK, H.F.; BIKALES, N.M.; OVERBERGER, C.G.; MENGES, G. (Eds.). **Encyclopedia of polymer science and engineering**. 2. ed. New York: John Wiley, 1985. v. 3, p. 430-441.

7 PERCOT, A.; VITON, C.; DOMARD, A. Characterization of shrimp shell deproteinization. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 1380-1385, 2003.

8 RINAUDO, M.; PAVLOV, G.; DESBRIÈRES, J. Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. **Polymer**, v. 40, p. 7029-7032, 1999.

9 GARIÉPY, E.R.; CHENITE, A.; CHAPUT, C.; GUIRGUIS, S.; LEROUX, J.C. Characterization of thermosensitives chitosans gels for the sustained delivery of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 203, p. 89-98, 2000.

10 GILDBERG, A.; STENBERG, E. A new process for advanced utilisation of shrimp waste. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 809-812, 2001.

11 PETER, M.G. Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. **Journal of Macromolecular Science -** Pure & Applied Chemistry, v. A32, p. 629-640, 1995.

12 OUNGBHO, K.; MÜLLER, B.W. Chitosan sponges as sustained release drug carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 156, p. 229-237, 1997.

13 SELMER-OLSEN, E.; RATNAWEERA, H.C.; PEHRSON, R. A novel treatment process for dairy wastewater with chitosan produced from shrimp-shell waste. **Water Science and Technology**, v. 34, n. 11, p. 33-40, 1996.

14 MACHOVÁ, E.; KVAPILOVÁ, K.; KOGAN, G.; ŠANDULA, J. Effect of ultrasonic treatment on the molecular weight of carboxymethylated chitin-glucan complex from Aspergillus niger. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 5, p. 169-172, 1999.

15 HIRANO, S. Chitin and chitosan. In: GERHARTZ, W. (Ed.). **Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry**. 6. ed. New York: VCH, 1986. v. A6, p. 231-232.

16 LI, Q.; DUNN, E.T.; GRANDMAISON, E.W.; GOOSEN, M.F.A. Applications and properties of chitosan. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 7, p. 370-397, 1992.

17 BROUSSIGNAC, P. Chitosan: a natural polymer not well known by the industry. **Chimie Industrie, Génie Chimie**, v. 99, p. 1241-1247, 1968.

18 JIANG, X.; CHEN, L.; ZHONG, W. A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, p. 457-463, 2003.

19 NEUGEBAUER, W.A.; NEUGEBAUER, E.; BREZINSKI, R. Determination of the degree of N-deacetylation of chitin-chitosan with picric acid. **Carbohydrate Research**, v. 189, p. 363-367, 1989.

20 TERAYAMA, H. Method of colloid titration. A new titration between polymer ions. **Journal of Polymer Science**, v. 8, p. 243-253, 1952.

21 GUMMOW, B.D.; ROBERTS, G.A.F. Studies on chitosan-induced methachromasy, 1. Methachromatic behaviour of sodium 2'-hydroxy-1,1'-azo-naphtalene-4-sulfonate in the presence of chitosan. **Die Makromolekulare Chemie,** v. 186, p. 1239-1244, 1985.

22 DOMARD, A.; VASSEUR, V. Non-specificity of a colorimetric method for the estimation of N-acetyl-D-glucosamine. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 13, p. 366-368, 1991.

23 PROCHAZCOVA, S.; VÅRUM, K.M.; OSTGAARD, K. Quantitative determination of chitosans by ninhydrin. **Carbohydrate Polymers**, v. 38, p. 115-122, 1999.

24 AIBA, S. Studies on chitosan: 1. Determination of the degree of N-acetylation of chitosan by ultraviolet spectrophotometry and gel permeation chromatrography. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 8, p. 173-176, 1986.

25 MUZZARELLI, R.A.A.; ROCHETTI, R. The determination of the degree of acetylation of chitosans by spectrophotometry. In: MUZZARELLI, R.A.A.; JEUNIAUX, C.; GOODAY, G.W. (Eds.). **Chitin in nature and technology**. New York: Plenum Press, 1986. p. 385-388.

26 LIU, D.; WEI, Y.; YAO, P.; JIANG, L. Determination of the degree of acetylation of chitosan by UV spectrophotometry using dual standards. **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 782-785, 2006.

27 FOCHER, B.; NAGGI, A.; TORRI, G.; COSANI, A.; TERBOJEVICH, M. Chitosans from Euphausia superba. 2: Characterization of solid state structure. **Carbohydrate Polymers**, v. 18, p. 43-49, 1992.

28 DOMARD, A. Determination of N-acetyl content in chitosan samples by C.D. measurements. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 9, p. 333-336, 1987.

29 BOSSO, C.; DOMARD, A. Characterizations of glucosamine and N-acetyglucosamine oligomers by fast atom bombardment mass spectrometry. **Organic Mass Spectrum**, v. 27, p. 799-806, 1992.

30 BAHRKE, S. EINARSSOM, J.M. GISLASON, J.; HAEBEL, S.; LETZEL, M.; PETER-KATALINIC, J.; PETER, M.G. Sequence analysis of chitooligosaccharides by matrix-assisted laser desorption ionization postsource decay mass spectrometry. **Biomacromolecules**, v. 3, p. 696-704, 2002.

31 NIOLA, F.; BASORA, N.; CHORNET, E.; VIDAL, P.-F. A rapid method for the determination of the degree of N-acetylation of chitin-chitosan samples by acid hydrolysis and HPLC. **Carbohydrate Research**, v. 238, p. 1-9, 1993.

32 SATO, H.; MIZUTANI, S.; TSUGE, S.; OHTANI, H.; AOI, K.; TAKSU, A.; OKADA, M.; KOBAYASHI, S.; KIYASADA, T.; SHOODA, S. Determination of the degree of acetylation of chitin/chitosan by pyrolysis-gas chromatography in the presence of oxalic acid. **Analytical Chemistry**, v. 70, p. 7-12, 1998.

33 MUZZARELLI, R.A.A; TANFANI, F.; SCARPINI, G.; LATERZA, G. The degree of acetylation of chitins by gas chromatography and infrared spectroscopy. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 2, p. 299-306, 1980.

34 LAL, G.S.; HAYES, E.R. Determination of the amine content of chitosan by pyrolysis-gas chromatography. **Journal Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 6, p. 183-193, 1984.

35 KASAAI, M.R.; ARUL, J.; CHARLET, G. Intrinsic viscosity-molecular weight relationship for chitosan. **Journal of Polymer Science** Part B, v. 38, p. 2591-2598, 2000.

36 ALONSO, I.G.; PENICHE-COVAS, C.; NIETO, J.M. Determination of the degree of acetylation of chitin and chitosan by thermal analysis. **Journal of Thermal Analytical and Calorimetry**, v. 28, p. 189-193, 1983.

37 GUINESI, L.S.; CAVALHEIRO, E.T.G. The use of DSC curves to determine the acetylation degree of chitin/chitosan samples. **Thermochimica Acta**, v. 444, n. 2, p. 128-133, 2006.

38 NANJO, F.; KATSUMI, R.; SAKAI, K. Enzymatic method for determination of the degree of deacetylation of chitosan. **Analytical Biochemistry**, v. 193, p. 164-167, 1991.

39 CHRISTODOULIDOU, A.; TSIGOS, I.; MARTINOU, A.; TSANODASKALAKI, M. KAFETZOPOULOS, D.; BOURIOTIS, V. Enzymatic deacetylation of chitin. In: DOMARD, A.; VÅRUM, K.M.; ROBERTS, G.A.F. (Eds.). **Advances in chitin science**. Lyon: Jacques Andre Publisher, 1998. v. 2, p. 188-193.

40 DOMARD, A. pH and C.D. measurements on a fully deacetylated chitosan: application to Cu(II)-polymer interactions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 9, p. 98-104, 1987.

41 TANG, E.S.K.; HUANG, M.; LIM, L.Y. Ultrasonication of chitosan and chitosan nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 265, p. 103-114, 2003.

42 GOW, N.A.R.; GOODAY, G.W.; RUSSEL, J.D.; WILSON, M.J. Infrared and X-Ray Diffraction on chitins of variable structure. **Carbohydrate Research,** v. 165, p. 105-110, 1987.

43 STRUSZCZYK, M.H.; LOTH, F.; PETER, M.G. Analysis of the degree of acetylation in chitosans from various sources. In: DOMARD, A.; VÅRUM, K.M.; ROBERTS, G.A.F. (Eds.). **Advances in chitin science**. Lyon: Jacques Andre Publisher, 1998. v. 2, p. 71-77.

44 MOORE, G.K.; ROBERTS, G.A.F. Determination of the degree of N-acetylation of chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 2, p. 115-116, 1980.

45 BAXTER, A.; DILON, M.; TAYLOR, K.D.A.; ROBERTS, G.A.F. Improved method for I.R. determination of the degree of acetylation of chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 14, p. 66-169, 1992.

46 DOMARD, A.; RINAUDO, M. Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules,** v. 5, p. 49-52, 1992.

47 SANNAN, T.; KURITA, K.; OGURA, K.; IWAKURA, Y. Studies on chitin: 7. Infrared spectroscopic determination of degree of deacetylation. **Polymer**, v. 19, p. 458-459, 1978.

48 MIYA, M.; IWAMOTO, R.; YOSHIKAWA, S.; MIMA, S. I.R. Spectroscopic determination of -CONH content in highly deacetylated chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules,** v. 2, p. 323-324, 1980.

49 BRUGNEROTTO, J.; DESBRIÈRES, J.; HEUX, L.; MAZEAU, K.; RINAUDO, M. Overview on structural characterization of chitosan molecules in relation with their behavior in solution. **Macromolecules Symposia**, v. 168, p. 1-20, 2001.

50 BRUGNEROTTO, J.; LIZARDI, J.; GOYCOOLEA, F.-M; ARGÜELLES-MONAL, W.; DESBRIÈRES, J.; RINAUDO, M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. **Polymer**, v. 42, p. 3569-3580, 2001.

51 SHIGEMASA, Y.; MATSURA, H.; SASHIWA, H.; SAIMOTO, H. An improved I.R. spectroscopic determination of degree of deacetylation of chitin. In: DOMARD, A.; VÅRUM, K.M.; ROBERTS, G.A.F. (Eds.). **Advances in chitin science**. Lyon: Jacques Andre, 1996. v. 1, p. 204-209.

52 SHIGEMASA, Y.; MATSURA, H.; SASHIWA, H.; SAIMOTO, H. Evaluation of different absorbance ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of deacetylation in chitin. **International Journal of Biological Macromolecules,** v. 18, p. 237-242, 1996.

53 ANTHONSEN, M.W.; SMIDSRØD, O. Hydrogen ion titration of chitosans with varying degrees of N-acetylation by monitoring induced ^{1}H-NMR chemical shifts. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 303-305, 1995.

54 SIGNINI, R. **Estudos de obtenção, purificação e caracterização de quitosana**. 1998. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1998.

55 PERCOT, A.; VITON, C.; DOMARD, A. Optimization of chitin extraction from shrimp shells. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 12-18, 2003.

56 PERKINS, S.J.; JOHNSON, L.N.; PHILLIPS, D.C. High resolution ^{1}H- and ^{13}C-NMR spectra of D-glucopyranose, 2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose, and related compounds in aqueous media. **Carbohydrate Polymers**, v. 59, p. 19-34, 1997.

57 DUARTE, M.L.; FERREIRA, M.C.; MARVÃO, M.R.; ROCHA, J. Determination of the degree of acetylation of chitin materials by ^{13}C CP/MAS NMR spectroscopy. **International Journal of Biological Macromolecules,** v. 28, p. 359-363, 2001.

58 YU, G.; MORIN, F.G.; NOBES, G.A.R.; MARCHESSAULT, R.H. Degree of acetylation of chitin and extent of grafting PHB on chitosan determinated by solid state ^{15}N NMR. **Macromolecules**, v. 32, p. 518-520, 1999.

59 HUGGINS, M.L. Theory of solutions of high polymers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 64, p. 1712-1719, 1942.

60 RINAUDO, M.; MILAS, M.; LE DUNG, P. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 15, p. 281-285, 1993.

61 MINKE, R.; BLACKWELL, J. The structure of α-chitin. **Journal of Molecular Biology**, v. 120, n. 2, p. 167-181, 1978.

62 LAMARQUE, G.; CRETENET, M.; VITON, C.; DOMARD, A. New route of deacetylation of α- and β-chitins by means of freeze-pump out-thaw cycles. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 1380-1388, 2005.

63 DO SIM, P. C. **Efeitos do tratamento com ultra-som sobre a extração de quitina da biomassa e sobre a solubilidade do polissacarídeo**. 2005. 123f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

64 NOISHIKI, Y.; TAKAMI, H.; NISHIYAMA, Y.; WADA, M.; OKADA, S.; KUGA, S. Alkali-induced conversion of β-chitin to α-chitin. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 896-899, 2003.

65 CHAUSSARD, G.; DOMARD, A. New aspects of the extraction of chitin from squid pens. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 559-564, 2004.

66 SYNOWIECKI, J.; AL-KHATEEB, N.A. Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition,** v. 43, n. 2, p. 145-171, 2003.

67 KURITA, K.; TOMITA, K.; TADA, T.; ISHII, S.; NISHIMURA, S.I. Squid chitin as a potential alternative chitin source – deacetylation behavior and characteristic properties. **Journal of Polymer Science:** Part A: polymer chemistry, v. 31, n. 2, p. 485-491, 1993.

68 KJARTANSSON, G. T.; ZIVANOVIC, S.; KRISTBERGSSON, K.; WEISS, J. Sonication-assisted extraction of chitin from north Atlantic shrimps (*Pandalus borealis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 5894-5902, 2006.

69 CAMPANA FILHO, S.P. New routes for deacetylation of chitin. In: DOMARD, A.; GUIBAL, E.; VÅRUM, K.M. (Eds.). **Advances in chitin science**. Montpellier: Jacques Andre Publisher, 2006. v. 9, p. 8.

70 TOLAIMATE, A.; DESBRIÈRES, J.; RHAZI, M.; ALAGUI, A.; VINCENDON, M.; VOTTERO, P. On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin. **Polymer**, v. 41, p. 2463-2469, 2000.

71 ROBERTS, G.A.F. Chitosan production routes and their role in determining the structure and properties of the product. In: DOMARD, A.; VÅRUM, K.M.; ROBERTS, G.A.F. (Eds.). **Advances in chitin science**. Lyon: Jacques Andre, 1998. v. 2, p. 22-31.

72 CHO, Y.W.; CHO, Y.N.; CHUNG, S.H.; YOO, G.; KO, S.W. Water-soluble chitin as a wound healing accelerator. **Biomaterials**, v. 20, p. 2139-2145, 1999.

73 CHO, Y.W.; JANG, J.; PARK, C.R.; KO, S.W. Preparation and solubility in acid and water of partially deacetylated chitins. **Biomacromolecules**, v. 1, n. 4, p. 609-614, 2000.

74 FOCHER, B.; BELTRAME, P.L.; NAGGI, A.; TORRI, G. Alkaline N-deacetylation of chitin enhanced by flash treatments. Reaction kinetics and structure modifications. **Carbohydrate Polymers**, v. 12, p. 405-418, 1990.

75 ROGOVINA, S.Z.; AKOPOVA, T.A., VIKHOREVA, G.A. Investigation of properties of chitosan obtained by solid-phase and suspension methods. **Journal of Applied Polymer Science,** v. 70, p. 927-933, 1998.

76 GOYCOOLEA, F.-M.; HIGUERA-CIAPARA, I.; HERNÁNDEZ, G.; LIZARDI, J.; GARCIA, K.-D. Preparation of chitosan from squid (*Loligo* spp.) pen by microwave-accelerated thermochemical process. In: DOMARD, A.; VÅRUM, K.M.; ROBERTS, G.A.F. (Eds.). **Advances in chitin science**. Lyon: Jacques Andre Publisher, 1998. v. 2, p. 78-83.

77 CARDOSO, M.B.; SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S.P. On the sonication of chitin: effects on its structure and morphology and influence on its deacetylation. **Polymer Bulletin**, v. 47, p. 183-190, 2001.

78 CAMPANA FILHO, S.P.; SIGNINI, R.; CARDOSO, M.B. Effects of sonication on the reactivity of chitin towards its deacetylation. **International Journal of Polymeric Materials**, v. 51, n. 8, p. 695-700, 2002.

79 CHANG, K.L.B.; TSAI, G.; LEE, J.;FU, W.R. Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution. **Carbohydrate Research**, v. 303, n. 3, p. 327-332, 1997.

80 CHEN, R.H.; HWA, H.D. Effect of molecular weight of chitosan with the same degree of deacetylation on the thermal, mechanical, and permeability properties of the prepared membrane. **Carbohydrate Polymers**, v. 29, p. 353-358, 1996.

81 LI, J.; REVOL, J.F.; MARCHESSAULT, R.H. Effect of degree of deacetylation of chitin on the properties of chitin crystallites. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 65, n. 2, p. 373-380, 1997.

82 MUZZARELLI, R.A.A. **Chitin**. New York: Pergamon Press, 1977. 326p.

83 CARDOSO, M.B.; SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S.P. Estudos de desacetilação de quitina: influência do grau de pulverização das partículas e da presença de boro hidreto de sódio ($NaBH_4$). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 39., 1999, Goiânia. **Livro de resumos…** Goiânia: Associação Brasileira de Química, 1999. p. 358.

84 SANNAN, T.; KURITA, K.; IWAKURA, Y. Studies on chitin, 1. Solubility change by alkaline treatment and film casting. **Die Makromolekulare Chemie,** v. 176, p. 1191-1195, 1975.

85 SANNAN, T.; KURITA, K.; IWAKURA, Y. Studies on chitin, 2. Effect of deacetylation on solubility. **Die Makromolekulare Chemie,** v. 177, p. 3589-3600, 1976.

86 MASON, T.J. A general introduction to sonochemistry. In: MASON, T. J. (Ed.). **Sonochemistry**: the uses of ultrasound in chemistry. London: The Royal Society of Chemistry, 1990, p. 1-18.

87 MASON, T.J. Ultrasound in synthetic organic chemistry. **Chemical Society Reviews**, v. 26, p. 443-451, 1997.

88 SUSLICK, K.S.; HAMMERTON, D.A.; CLINE Jr., R.E. The sonochemical hot spot. **Journal of the American Chemical Society**, v. 108, p. 5641-5642, 1986.

89 KARDOS, N.; LUCHE, J.-L. Sonochemistry of carbohydrate compounds. **Carbohydrate Research**, v. 332, p. 115-131, 2001.

90 PRICE, G.J.; WHITE, A.J.; CLIFTON, A.A. The effect of high-intensity ultrasound on solid polymers. **Polymer**, v. 36, n. 26, p. 4919-4925, 1995.

91 KJARTANSSON, G.T.; ZIVANOVIC, S.; KRISTBERGSSON, K.; WEISS, J. Sonication-assisted extraction of chitin from shells of fresh water prawns (*Macrobrachium rosenbergii*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 3317-3323, 2006.

92 CARDOSO, M.B. **Estudo dos efeitos da irradiação de quitina com ultra-som sobre sua desacetilação.** 2003. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

93 BATTISTI, M.V. **Obtenção e caracterização de quitina e quitosana de *Macrobrachium rosenbergii***. 2002. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

94 LAVALL, R.L. **Estudos de obtenção, desacetilação e caracterização físico-química de β-quitina dos gládios de lulas do gênero Loligo**. 2003. 151f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

95 LAMARQUE, G.; VITON, C.; DOMARD, A. Comparative study of the first heterogeneous deacetylation of α- and β-chitins in a multistep process. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 992-1001, 2004.

96 CARASCHI, J.C.; CAMPANA FILHO, S.P.; CURVELO, A.A . Preparação e caracterização de polpas obtidas da dissolução a partir de bagaço de cana-de-açúcar. **Polímeros**: Ciência e Tecnologia, v. 3, p. 24-29, 1996.

97 HIRAI, A.; ODANI, H.;NAKAJIMA, A. Determination of degree of deacetylation of chitosan by ^{1}H NMR spectroscopy. **Polymer Bulletin**, v. 26, p. 87-94, 1991.

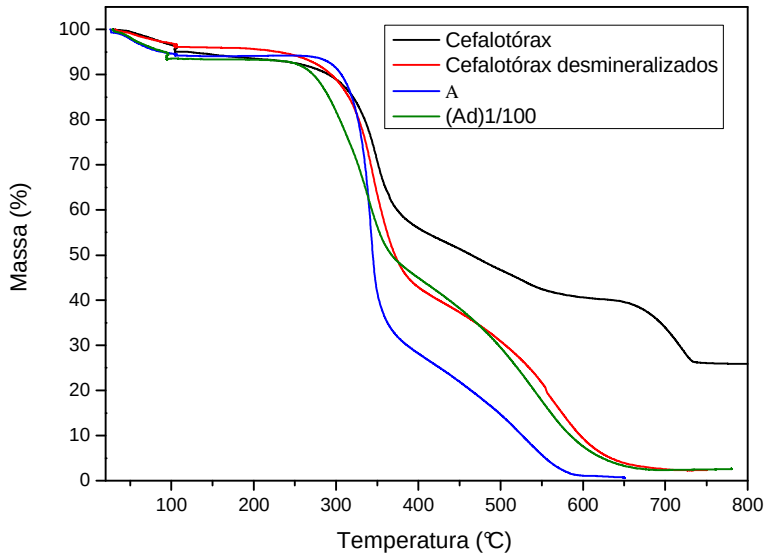
98 SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S.P. Purificação e caracterização de quitosana comercial. **Polímeros**: Ciência e Tecnologia, n. 4, p. 63-68, 1998.

99 CASTELLI, A.; BERGAMASCO, L.; BELTRAME, P.L.; FOCHER, B. Some insights into the kinetics of non-conventional alkaline deacetylation of chitin. In: DOMARD, A.; JEUNIAUX, C.; MUZZARELLI, R.A.A.; ROBERTS, G.A.F. (Eds.). **Advances in chitin science**. Lyon: Jacques Andre Publisher, 1996. v. 1, p. 198-203.

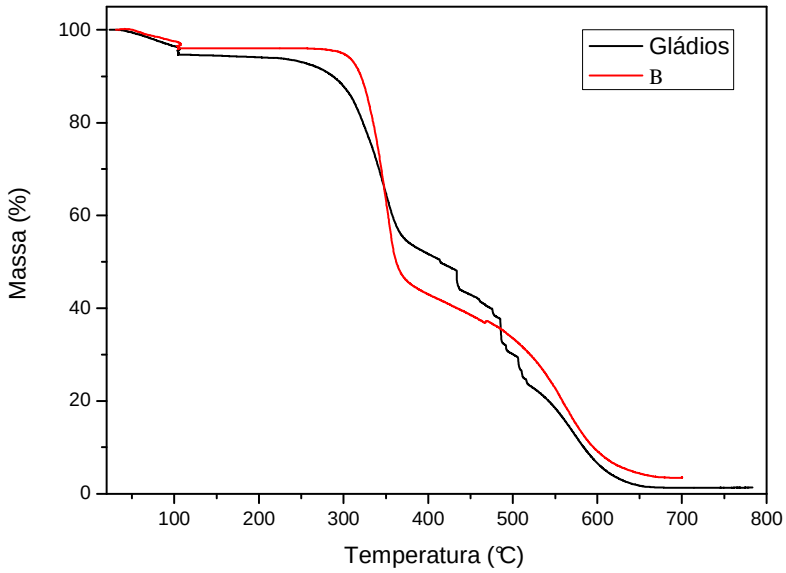
100 ROBERTS, G.A.F.; WOOD, F.A. Inter-source reproducibility of the chitin deacetylation process. In: PETER, M.G.; DOMARD, A.; MUZZARELLI, R.A.A. (Eds.). **Advances in chitin science**. Potsdam: Universitat Potsdam, 2000. v. 4, p. 34-39.

101 METHACANON, P.; PRASITSILP, M.; POTHSREE, T.; PATTARAARCHACHAI, J. Heterogeneous N-deacetylation of squid chitin in alkaline solution. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, p. 119-123, 2003.

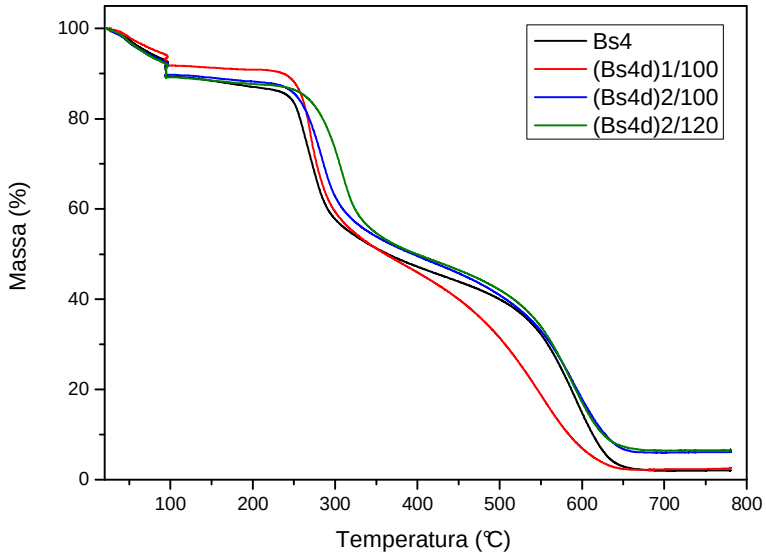
APÊNDICE A



Curvas TG dos cefalotórax de camarão, cefalotórax desmineralizados e das amostras A e (Ad)1/100 (10°C/min, atmosfera dinâmica de ar sintético – 30mL/min).

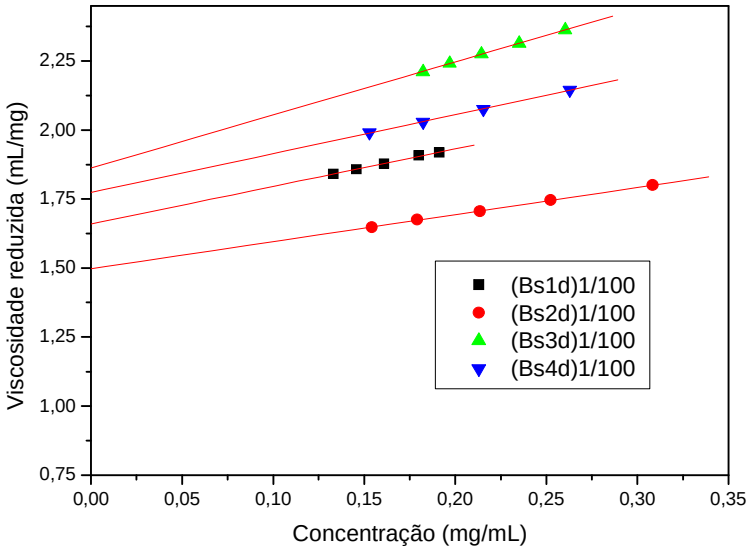


Curvas TG dos gládios de moluscos e da amostra B (10°C/min, atmosfera dinâmica de ar sintético – 30mL/min).

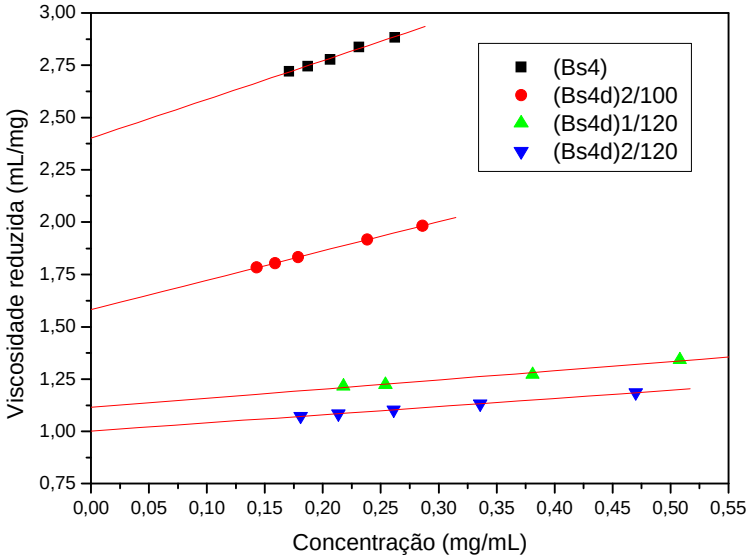


Curvas TG das amostras (Bs4), (Bs4d)1/100, (Bs4d)2/100 e (Bs4d)2/120 (10°C/min, atmosfera dinâmica de ar sintético – 30mL/min).

APÊNDICE B



Curvas de viscosidade reduzida em função da concentração das amostras (Bs1d)1/100, (Bs2d)1/100, (Bs3d)1/100 e (Bs4d)1/100. (Solução tampão ácido acético 0,3 M / acetato de sódio 0,2 M)



Curvas de viscosidade reduzida em função da concentração das amostras (Bs4), (Bs4d)2/100, (Bs4d)1/120 e (Bs4d)2/120. (Solução tampão ácido acético 0,3 M / acetato de sódio 0,2 M).