UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**DESACETILAÇÃO DE BETA-QUITINA ASSISTIDA POR ULTRA-
SOM DE ALTA INTENSIDADE: ESTUDO DOS EFEITOS DA
AMPLITUDE E DO TEMPO DE IRRADIAÇÃO E DA
TEMPERATURA DA REAÇÃO.**

JORGE AUGUSTO DE MOURA DELEZUK

SÃO CARLOS

2009

JORGE AUGUSTO DE MOURA DELEZUK

**DESACETILAÇÃO DE BETA-QUITINA ASSISTIDA POR ULTRA-
SOM DE ALTA INTENSIDADE: ESTUDO DOS EFEITOS DA
AMPLITUDE E DO TEMPO DE IRRADIAÇÃO E DA
TEMPERATURA DA REAÇÃO.**

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

Área de concentração: Físico-Química.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana Filho.

SÃO CARLOS

2009

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.

Dedico este trabalho à minha noiva, amiga, confidente e mulher, Yanayne, que sempre está ao meu lado e me completa. Dedico também a meus pais, Paulo e Marina, a minha avó, Nenzinha e minhas irmãs Ana Paula e Vivian, pelo apoio incondicional e por acreditarem e me ensinarem o valor dos estudos e da dedicação.

AGRADECIMENTOS

Minha maior gratidão ao Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana Filho pela orientação, companheirismo e por acreditar no meu trabalho.

A Márcia B. Cardoso, pela amizade e auxílio durante o trabalho.

Aos amigos do Grupo de Físico-Química Orgânica: Maurício, Leonardo, Fernando, Alexandre, Bianca, Cristina, Daniella, Daniele, Elaine, Érika, Franciéle, Juliana, Cassandra e à Talita, pela ajuda nos momentos mais decisivos, pela camaradagem e por tornarem, com as suas presenças, o laboratório um ambiente tão agradável e favorável à pesquisa.

Aos técnicos: Luiz Antônio, Márcia, Sylvana, Márcio, e Mauro, pelas análises realizadas, competência e paciência.

Aos amigos pós-graduandos que direta ou indiretamente auxiliaram nesta jornada.

Ao Instituto de Química de São Carlos pelo apoio institucional e infra-estrutura necessária a realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

“Ninguém pode construir em teu lugar as pontes que precisarás passar, para atravessar o rio da vida – ninguém, exceto tu, só tu. Existem, por certo, atalhos sem números, e pontes, e semi-deuses que se oferecerão para levar-te além do rio; mas isso te custaria a tua própria pessoa; tu te hipotecarias e te perderias. Existe no mundo um único caminho por onde só tu podes passar. Onde leva? Não pergutes, segue-o.”

FRIEDRICH WILHELM NIETZSCHE

RESUMO

A reação de desacetilação da beta-quitina assistida por ultra-som de alta intensidade foi estudada e os efeitos da amplitude e da duração da irradiação e da temperatura sobre a eficiência da reação e as características das quitosanas obtidas foram avaliadas. As espectroscopias de ressonância magnética nuclear e no infravermelho foram empregadas para a caracterização estrutural das amostras, enquanto que a difração de raios X e a microscopia eletrônica de varredura permitiram avaliar as suas características morfológicas. As titulações condutimétricas, as medidas de viscosidade e a cromatografia de exclusão por tamanho foram empregadas para as determinações de grau médio de acetilação e massas molares médias ponderal e viscosimétrica, respectivamente. As quitosanas do Conjunto I foram obtidas nos experimentos em que a amplitude (baixa, intermediária e alta) e a duração (30, 45 e 60 minutos) da irradiação foram variadas, enquanto aquelas do Conjunto II resultaram dos experimentos em que a temperatura (50, 60, 70 e 80°C) e a amplitude (baixa, intermediária e alta) de irradiação foram variadas, sendo o tempo de irradiação fixado em 30 minutos. Os valores de grau médio de acetilação e a massa molar média viscosimétrica das amostras do Conjunto I variaram nos intervalos $7\% < \overline{GA} < 25\%$ e $1,0 \times 10^5 < \overline{M}_v < 6,5 \times 10^5$ g/mol, respectivamente. Esses resultados revelam forte correlação entre a amplitude e o tempo de irradiação e as características estruturais das quitosanas, sendo os valores de $\overline{GA}$ e $\overline{M}_v$ tanto menores quanto maiores a amplitude e a duração da irradiação. O intervalo de variação de $\overline{GA}$ das amostras do Conjunto II foi muito semelhante àquele das amostras do Conjunto I, porém quitosanas com massas molares mais elevadas foram obtidas no caso do Conjunto II ($4,5 \times 10^5 < \overline{M}_v < 7,1 \times 10^5$ g/mol). De acordo com os resultados desses experimentos, a temperatura exerce efeito mais importante do que o tempo de irradiação, principalmente sobre o caráter macromolecular das quitosanas obtidas. Independentemente do conjunto

considerado (Conjunto I ou Conjunto II), os rendimentos (R) das reações foram elevados e variaram no intervalo $72\% < R < 90\%$, entretanto as análises de cromatografia de exclusão por tamanho revelaram que amostras do Conjunto II contêm produtos de baixa massa molar.

Os resultados obtidos mostram que a desacetilação da beta-quitina assistida por ultra-som de alta intensidade se constitui em uma nova metodologia mais eficiente do que as convencionalmente empregadas nas indústrias e laboratórios de pesquisa para a produção de quitosanas. Assim, a escolha adequada dos parâmetros do processo permite a produção de quitosanas com massas molares elevadas ($5,0-7,0 \times 10^5$ g/mol) e baixos graus de acetilação ($<10\%$) em tempos mais curtos (30-60 minutos) e temperaturas mais baixas ($<80^\circ\text{C}$) do que as necessárias nos processos convencionais de desacetilação.

Palavras-Chave: Beta-Quitina; Desacetilação; Ultra-Som; Quitosana.

ABSTRACT

The deacetylation of beta-chitin assisted by high intensity ultrasound was studied and the effects of the irradiation amplitude and duration and of the temperature on the reaction efficiency as well as on the chitosan characteristics were evaluated. The nuclear magnetic resonance and infrared spectroscopies were employed for the structural characterization while the X ray diffraction and the scanning electron microscopy allowed the evaluation of morphological characteristics. The average degree of acetylation was determined by titrimetry while the weight average molecular weight and the viscosity average molecular weight were determined by size-exclusion chromatography and viscometry, respectively. The chitosan samples pertaining to Group I were produced by carrying out the experiments in which the irradiation amplitude (low, intermediate and high) and the time (30, 45 and 60 minutes) were varied, while those of Group II resulted from experiments in which the temperature (50, 60, 70 e 80°C) and the irradiation amplitude (low, intermediate and high) were varied, the irradiation time being fixed at 30 minutes. In Group I the values of average degree of acetylation and viscosity average molecular weight of the chitosans ranged as $7\% < DA < 25\%$ and $1,0 \times 10^5 < Mv < 6,5 \times 10^5$ g/mol, respectively. These results evidenced a strong relationship between the irradiation amplitude and duration and the structural characteristics of chitosans, the values of DA and Mv being lower the higher the irradiation amplitude and duration. The chitosans of Group II exhibited a DA range similar to that of the samples of Group I however the molecular weights of the chitosans were higher in Group II ($4,5 \times 10^5 < Mv < 7,1 \times 10^5$ g/mol). According to the results of such experiments, the temperature effect is more important than the irradiation duration effect, mainly on the macromolecular character of the chitosans. Regardless of the Group (Group I or II), the reaction yields (Y) were high and they were inserted in the range $72\% < Y < 90\%$. However, the size-exclusion chromatography analyses showed that the chitosans of Group II contained low molecular weight products.

The results of this investigation showed that the high intensity ultrasound-assisted beta-chitin deacetylation is a novel process more efficient than those commonly used to produce chitosan in industries and in research laboratories. Thus, if the parameters process are adequately chosen, chitosans with high molecular weights ($5,0-7,0 \times 10^5$ g/mol) and low average degrees of acetylation (<10%) are produced in shorter times and at lower temperatures than those typically of the commonly used processes.

Keywords: Beta-Chitin; Deacetylation; Ultrasound; Chitosan.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da estrutura primária idealizada da quitina, onde n é o grau de polimerização.....	22
Figura 2 - Representação da estrutura da celulose, onde n é o grau de polimerização.	22
Figura 3 - Estrutura proposta para a α -quitina: (a) projeção do eixo b e c e (b) projeção do eixo a e b. as linhas tracejadas representam ligações hidrogênio ⁽¹⁶⁾	24
Figura 4 - Estrutura proposta para a β -quitina: (a) projeção do eixo a e b, (b) projeção do eixo a e (c) projeção do eixo b e c. As linhas tracejadas representam ligações de hidrogênio ⁽¹⁷⁾	25
Figura 5 - Representação esquemática das estruturas polimórficas de quitina, sendo que as setas representam as cadeias poliméricas no sentido do terminal não-redutor para o redutor.	26
Figura 6 - Representação da estrutura primária idealizada da quitosana, onde n é o grau de polimerização.....	27
Figura 7 - Propagação do som no líquido e demonstração da formação e colapso da bolha de cavitação ⁽⁴³⁾	31
Figura 8 - Lula da espécie <i>Loligo</i> , com destaque para o gládio inserido na parte interna do molusco.....	36
Figura 9 - Esquema experimental empregado nas reações de desacetilação com: 1) sonotrodo e 2) reator de vidro encamisado.....	39
Figura 10 - Ajuste da imagem, com a função ‘Threshold’. a) sem o ‘Threshold’ b) com ‘Threshold’.....	41
Figura 11 - Curva de titulação condutimétrica característica de uma amostra de quitosana....	42
Figura 12 - Curva da viscosidade reduzida em função da concentração.....	45

Figura 13 - Estrutura do polimaltotriose (pullulan).....	48
Figura 14 - Espectro de ^1H -RMN característico de uma amostra de quitosana, onde $\text{R} = \text{COCH}_3$ ou $\text{R} = \text{H}^{(63)}$	50
Figura 15 - Espectro no infravermelho das amostras de β -quitina e QAb_30_70.	19
Figura 16 - Espectro no infravermelho ampliado na região de 1800 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} , de beta-quitina e das amostras QAb_30, QAb_45 e QAb_60.....	56
Figura 17 - Micrografias das amostras a) Beta-Quitina, b) QAb_30, com ampliação de 75x.	57
Figura 18 - Micrografias das amostras (a) Beta-Quitina e (b) QAb_30, com ampliação de 500x.	58
Figura 19 - Variação da área média por partícula em função do tempo e da amplitude da irradiação utilizadas na reação de desacetilação de beta-quitina assistida por ultra-som de alta intensidade, para o Conjunto I.	59
Figura 20 - Variação da área média por partícula em função de temperatura e da amplitude da irradiação utilizadas na reação de desacetilação de beta-quitina assistida por ultra-som de alta intensidade, para o Conjunto II.....	60
Figura 21 - Micrografias das amostras (a) QAa_30_60 e da (b) QAa_30_70, com ampliação de 1000x.	62
Figura 22 - Espectro de ^1H -RMN da amostra QAi_30_80.....	63
Figura 23 - Difrátogramas da beta-quitina e da amostra QAb_30_60.	64
Figura 24 - Variação do grau médio de acetilação das amostras do Conjunto I em função da amplitude e do tempo de irradiação.....	66
Figura 25 - Variação da massa molar média viscosimétrica das amostras do Conjunto I em função da amplitude e do tempo de irradiação.	66

Figura 26 - Variação do rendimento da reação de obtenção das amostras do Conjunto I em função da amplitude e do tempo de irradiação.	67
Figura 27 - Cromatograma típico para o Conjunto I, representadas pelas amostras QAa_30, QAa_45 e QAa_60.	71
Figura 28 - Curva de Calibração (padrões de polimaltotriose) do sistema cromatográfico empregado nas análises por CET.....	71
Figura 29 - Porcentagens das curvas CET das amostras do Conjunto I acima do limite da curva de calibração (Mexc) em função da amplitude e do tempo de irradiação.	73
Figura 30 - Correlação entre as porcentagens das curvas CET das amostras do Conjunto I que extrapolam o limite da curva de calibração das colunas cromatográficas, o grau médio de acetilação (a) e a massa molar média ponderal (b).....	74
Figura 31 - Índice de polidispersividade das amostras do Conjunto I, determinado por CET.	76
Figura 32 - Variação da massa molar média ponderal das amostras do Conjunto I em função da amplitude e do tempo de irradiação.	76
Figura 33 - Variação do grau médio de acetilação das amostras do Conjunto II em função da amplitude de irradiação e da temperatura da reação.....	79
Figura 34 - Variação da massa molar média viscosimétrica das amostras do Conjunto II em função da amplitude de irradiação e da temperatura da reação.	79
Figura 35 - Cromatograma típico para o Conjunto II, representado pela amostra QAb_30_60.	82
Figura 36 - Porcentagens das curvas CET das amostras do Conjunto II acima do limite da curva de calibração (Mexc) em função da amplitude de irradiação e da temperatura.	83

Figura 37 - Porcentagens das curvas CET das amostras do Conjunto II abaixo do limite da curva de calibração (BBM) em função da amplitude de irradiação e da temperatura.....	84
Figura 38 - Correlação entre os maiores valores de BMM e $\overline{M}_w$ a partir das curvas CET das amostras do Conjunto II.	84
Figura 39 - Variação da polidispersividade das amostras do Conjunto II em função da amplitude da irradiação e da temperatura.....	86
Figura 40 - Variação da massa molar média ponderal das amostras do Conjunto II em função da amplitude da irradiação e da temperatura.	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção pesqueira marinha registrada, em quilogramas, das principais espécies que contém quitina, São Paulo, 2004	20
Tabela 2 - Composição química representativa de diversos tipos de resíduos que contém quitina	21
Tabela 3 - Reagentes utilizados na realização dos experimentos.....	35
Tabela 4 - Bandas de absorção e números de onda ($\bar{\nu} \text{ cm}^{-1}$) características de quitina e quitosana ⁽²⁹⁾	51
Tabela 5 - Variação da área média (μm^2) das partículas do Conjunto I e II.....	61
Tabela 6 - Os valores do grau médio de acetilação ($\overline{GA}$), massa molar viscosimétrica média ($\overline{M_v}$) e rendimento da reação (R) das reações de obtenção das amostras do Conjunto I.....	65
Tabela 7 - Resultados das análises das amostras do Conjunto I por CET.....	70
Tabela 8 - Valores de grau médio de acetilação ($\overline{GA}$), massa molar média viscosimétrica ($\overline{M_v}$) e de rendimento (R) das reações de obtenção das amostras do Conjunto II.....	77
Tabela 9 - Intervalos de temperatura da reação de desacetilação de beta-quitina que favoreceram a obtenção das quitosanas mais desacetiladas e com maior $\overline{M_v}$ em função da amplitude de irradiação	80
Tabela 10 - Resultados das análises das amostras do Conjunto II por CET	81

LISTA DE SIGLAS

GlcNAc - 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranoose;

GlcN - 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranoose;

FPT - “Freeze - pump out - thaw”;

$\overline{GA}$ - Grau médio de acetilação;

$\overline{M}_v$ - Massa molar média viscosimétrica;

$\overline{M}_n$ - Massa molar média numérica;

$\overline{M}_w$ - Massa molar média ponderal;

$\overline{M}_w / \overline{M}_n$ - Polidispersividade;

$\overline{AM}$ - Área média por partícula;

R - Rendimento da reação;

MEV - Microscopia eletrônica de varredura;

CET - Cromatografia de exclusão por tamanho;

^1H -RMN - Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio;

BMM - Produtos de baixa massa molar.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS.....	15
LISTA DE SIGLAS.....	16
1 INTRODUÇÃO	19
1.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE QUITINA E QUITOSANA	21
1.1.1 Polimorfos de Quitina	23
1.2 FONTES E PROCESSOS DE OBTENÇÃO DA QUITINA	26
1.3 DESACETILAÇÃO DA QUITINA	27
1.4 UTILIZAÇÃO DO ULTRA-SOM DE ALTA INTENSIDADE	30
OBJETIVOS	34
2 PARTE EXPERIMENTAL	35
2.1 MATÉRIA-PRIMA	35
2.2 OBTENÇÃO DA BETA-QUITINA.....	36
2.3 DESACETILAÇÃO DE BETA-QUITINA ASSISTIDA POR IRRADIAÇÃO DE ULTRA-SOM DE ALTA INTENSIDADE	37
3 CARACTERIZAÇÕES.....	40
3.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	40
3.2 DIFRAÇÃO DE RAIOS X.....	41
3.3 GRAU MÉDIO DE ACETILAÇÃO ($\% \overline{GA}$).....	41
3.3.1 Titulação Condutimétrica.....	41
3.4 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLAR MÉDIA DE QUITOSANA POR VISCOSIMETRIA CAPILAR.....	43
3.5 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLAR MÉDIA POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO (CET). 47	
3.6 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO ($^1\text{H-RMN}$).....	49
3.7 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO	50
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52

4.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS	53
4.1.1	<i>Espectroscopia no Infravermelho.....</i>	53
4.1.2	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	56
4.1.3	<i>Espectroscopia de Ressonância Nuclear de Hidrogênio ¹H-RMN.....</i>	63
4.1.4	<i>Difração de Raios X.....</i>	64
4.2	ESTUDOS DA DESACETILAÇÃO DE BETA-QUITINA ASSISTIDA POR ULTRA-SOM DE ALTA INTENSIDADE	64
4.2.1	<i>Influência da Amplitude e do Tempo de Irradiação de Ultra-Som Sobre a Desacetilação de Beta-Quitina.....</i>	65
4.2.2	<i>Influência da Amplitude de Irradiação de Ultra-Som e da Temperatura Sobre a Desacetilação de Beta-Quitina</i>	77
4.3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
5	CONCLUSÕES.....	91
	REFERÊNCIAS	92

1 Introdução

A quitina foi descrita pela primeira vez pelo francês Henri Braconnot, em 1811, que a extraiu de fungos superiores, e deu o nome de “fungina”. A denominação quitina foi proposta por Odier, em 1823, que a isolou das carapaças de insetos (besouros e escaravelhos). O termo quitina deriva do grego “chiton” (χιτων), que significa túnica ou cobertura ⁽¹⁻²⁾.

Entre as substâncias orgânicas mais abundantes na natureza, encontra-se em primeiro lugar a celulose, presente em todos os vegetais e também microorganismos, e em segundo vem a quitina, que é um componente dos exoesqueletos de invertebrados e de paredes celulares de alguns fungos e algas. A quitina é produzida por biossíntese nos organismos já mencionados e apresenta uma taxa de reposição na biosfera que é aproximadamente o dobro da taxa de reposição da celulose ⁽¹⁾.

As indústrias pesqueiras processam anualmente toneladas de espécies marinhas ⁽³⁾ (Tabela 1), grande parte desta produção vira resíduo, que possui uma biodegradação lenta, sendo que estes resíduos contêm uma grande quantidade de quitina, além de outros compostos tais como proteínas, sais minerais e lipídeos. Pode ser observado na Tabela 2, a composição média de diferentes resíduos da indústria pesqueira. O descarte de tais resíduos diretamente em córregos, rios ou mares ocasiona o aumento da demanda bioquímica de oxigênio (DBO), devido à grande carga orgânica dos resíduos. Isto pode acarretar um desequilíbrio na vida aeróbia, pondo em risco todos os seres vivos que dependem de tais ecossistemas. Dessa maneira, a redução do descarte desses resíduos é muito importante do ponto de vista da preservação do meio ambiente e do lucro que pode resultar para as empresas se tais resíduos forem empregados para a obtenção de quitina, quitosana e/ou proteínas.

Tabela 1 - Produção pesqueira marinha registrada, em quilogramas, das principais espécies que contém quitina, São Paulo, 2004

Espécie	Quantidade (Kg)	% em Relação à produção total ^(a)
Caranguejo Vermelho	1.098.467	4,0
Camarão Sete Barbas	1.749.866	6,3
Lula	646.150	2,3

(a) - A produção total de espécimes marinhas no ano de 2004 no estado de São Paulo foi de $27,7 \times 10^5$ Kg.

Estudos recentes mostram que as alterações e os fenômenos ambientais gerados pelas atividades da indústria pesqueira são decorrentes da falta de planejamento e da falta de interesse das indústrias em adequarem-se aos procedimentos atuais de saúde, segurança e meio ambiente ⁽⁴⁾. Por outro lado, como mencionado acima, a obtenção da quitina e quitosana a partir dos rejeitos da indústria pesqueira é de grande interesse econômico e ambiental. De fato, a produção desses polímeros a partir da biomassa pode contribuir para reduzir drasticamente o acúmulo de resíduos no meio ambiente.

Existem atualmente diversos estudos sobre as aplicações da quitosana ^(1-2,5-15). Muitos dos estudos realizados com a quitosana levam em consideração a sua capacidade de interagir com uma variada gama de substâncias, tais como proteínas, lipídeos, pesticidas, corantes, íons metálicos e radioisótopos. Destacam-se também algumas de suas propriedades que a distinguem de outros polímeros, como a sua atoxicidade, atividade antimicrobiana, biodegradabilidade e biocompatibilidade. O fato de a quitosana ser um polieletrólito linear com alta densidade de carga positiva e com a capacidade de aderir a superfícies carregadas negativamente resulta que o polímero é um excelente agente floculante, liga-se a superfícies celulares, forma géis com poliânions e tem a capacidade de formar filmes e membranas ^(1-2, 5-15).

Tabela 2 - Composição química representativa de diversos tipos de resíduos que contêm quitina

FONTES	TEORES			
	Proteína % ^(a)	Cinzas % ^(a)	Lipídios % ^(a)	Quitina % ^(a)
Cabeça de camarão	42,0 ± 1,8	20,5 ± 0,5	2,4 ± 0,02	35,5 ± 2,1
Casca de camarão	58,0 ± 2,8	24,2 ± 0,3	1,4 ± 0,02	16,4 ± 1,8
Carapaça de lagosta	23,1	33,7	2,2	20,2
Resíduos de krill	41	23,0	11,6	24,0
Gládios de lulas	55,3 ± 3,1	0,9 ± 0,04	0,6 ± 0,03	43,2 ± 2,4

(a) - % em base seca.

As quitosanas são atualmente utilizadas ⁽¹¹⁾ no tratamento de águas, atuando na remoção dos íons metálicos e como agente floculante eliminando substâncias tais como proteínas e lipídeos. A indústria papeleira utiliza a quitosana para o tratamento da superfície do papel com a finalidade de aumentar a sua resistência sem afetar o seu brilho. Devido a sua propriedade de formar filmes ⁽¹³⁾, a quitosana é utilizada em formulações de cremes e loções que tem por finalidade a hidratação da pele, e a indústria têxtil vê a quitosana como uma grande aliada no desenvolvimento de novos tecidos mais resistentes e biodegradáveis.

1.1 Características Físico-Químicas de Quitina e Quitosana

A quitina é um polímero linear cuja estrutura primária é formada por um dissacarídeo de unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose (GlcNAc) e 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose (GlcN), unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1→4) (Figura 1).

Figura 1 - Representação da estrutura primária idealizada da quitina, onde n é o grau de polimerização.

Devido ao fato da quitina ser um produto natural, não deve ocorrer como composição única. Entende-se por isso, que ocorram variações estruturais. Tais variações incluem a dimensão das cadeias poliméricas, o conteúdo de grupos amino e acetamido e a distribuição destes ao longo das cadeias. A quitina obtida a partir de diatomáceas (*Thalassiosira fluviales* e *Cylotella cryptica*) constitui uma exceção, pois as análises confirmam que nesse caso ocorrem exclusivamente as unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose ⁽¹⁾. A estrutura química da quitina é semelhante a da celulose (Figura 2), sendo que a principal diferença encontra-se no carbono 2 do anel de glicopiranosose, que contém o grupo hidroxila (-OH) na celulose e o grupo acetamida (-NHCOCH₃) na quitina.

Figura 2 - Representação da estrutura da celulose, onde n é o grau de polimerização.

1.1.1 Polimorfos de Quitina

A quitina apresenta três polimorfos, α , β e γ -quitina, que diferem quanto ao arranjo do polímero no estado cristalino. A quitina é um polímero semicristalino cujas cadeias se organizam em folhas (ou lamelas) que estão dispostas paralelamente umas às outras nos domínios cristalinos. As cadeias de quitina apresentam extremidades redutora e não-redutora e a disposição relativa destas cadeias nas folhas é o que diferencia o arranjo das polimorfos de quitina. Na α -quitina as cadeias poliméricas estão dispostas de forma antiparalela, o que favorece o estabelecimento de numerosas ligações hidrogênio inter e intramoleculares e também inter e intrafolhas, conforme mostra a Figura 3, resultando em um empacotamento denso. Pode-se observar através das Figura 3 (a) e 3(b) que existem quatro tipos de ligações hidrogênio presentes na estrutura da α -quitina⁽¹⁶⁾: ligações de hidrogênio intramoleculares O(3')-H...O(5) (como na celulose) e O(6')-H...O(7), ao longo do eixo c; ligações de hidrogênio intermoleculares C=O(7)...H-N-C(2), ao longo do eixo a; e ligações de hidrogênio intermoleculares O(6)-H...O(6'), ao longo do eixo b. Devido ao fato dos grupamentos CH₂OH apresentarem conformações diferentes, estes formam ligações hidrogênio distintas (O(6')-H...O(7) e O(6)-H...O-(6')). Todas as carbonilas dos grupamentos amida, na α -quitina, participam da ligação de hidrogênio intermolecular C=O(7)...H-N-C(2), sendo que uma fração destes grupos também participa da ligação hidrogênio intramolecular O(6')-H...O(7). Todos os grupos hidroxila, no estado cristalino, estabelecem ligações hidrogênio, e as formadas entre cadeias de diferentes folhas são as responsáveis pela insolubilidade da α -quitina na maioria dos solventes.

Figura 3 - Estrutura proposta para a α -quitina: (a) projeção do eixo b e c e (b) projeção do eixo a e b. as linhas tracejadas representam ligações hidrogênio ⁽¹⁶⁾.

Na β -quitina as cadeias estão dispostas paralelamente, o que prejudica o estabelecimento de ligações de hidrogênio intermoleculares e interfolhas, resultando em empacotamento menos denso que o observado no caso da α -quitina. Semelhantemente a α -quitina, as cadeias da β -quitina possuem ligações de hidrogênio intramoleculares $O(3')\cdots H\cdots O(5)$ ao longo do eixo c, como pode ser observado na Figura 4(c). Ao longo do eixo a (Figura 4(b) e Figura 4(c)) ⁽¹⁷⁾, as cadeias sucessivas estão unidas por ligações de hidrogênio intermoleculares $C=O(7)\cdots H-N-C(2)$ e todos os grupamentos CH_2OH formam ligações de hidrogênio intermoleculares adicionais $O(6')\cdots H\cdots O(7)$, unindo as cadeias na mesma folha. Ao longo do eixo b, ao contrário da α -quitina, não há formação de ligações de hidrogênio intermoleculares entre cadeias de diferentes folhas. A β -quitina consequentemente exibe uma

melhor reatividade ⁽¹⁷⁻²²⁾, intumescimento em água ⁽²³⁻²⁴⁾ e uma solubilidade ⁽²²⁾ maior do que a α -quitina. Na γ -quitina ocorre uma combinação dos arranjos da α - e da β -quitina, pois duas cadeias em disposição antiparalela são intercaladas por uma cadeia disposta de maneira paralela ⁽¹⁻²⁾ (Figura 5).

Figura 4 - Estrutura proposta para a β -quitina: (a) projeção do eixo a e b , (b) projeção do eixo a e (c) projeção do eixo b e c . As linhas tracejadas representam ligações de hidrogênio⁽¹⁷⁾.

A Figura 5 ⁽²⁵⁾ apresenta as disposições das cadeias de quitina nas diferentes polimorfos conforme explicado acima.

Figura 5 - Representação esquemática das estruturas polimórficas de quitina, sendo que as setas representam as cadeias poliméricas no sentido do terminal não-redutor para o redutor.

1.2 Fontes e Processos de Obtenção da Quitina

A quitina é o componente orgânico mais abundante na estrutura esquelética de muitas das classes que formam o grupo dos invertebrados. As principais fontes para a produção industrial de quitina são as cascas de camarões e carapaças de caranguejos, que possuem composições variadas quanto aos teores de proteínas, sais de cálcio (principalmente fosfatos e carbonatos), lipídios e pigmentos (Tabela 2). O processo de extração da quitina a partir de cascas de camarões e carapaças de caranguejos segue essencialmente três etapas: desmineralização, desproteinização e despigmentação. Estas etapas se destinam a eliminar o carbonato e fosfato de cálcio e/ou magnésio, as proteínas e os pigmentos contidos na biomassa. Os procedimentos mais utilizados para a extração da quitina geralmente compreendem a utilização de soluções ácidas na desmineralização, que tem por finalidade a eliminação dos sais minerais, e de soluções alcalinas na etapa de desproteinização, o que resulta na eliminação das proteínas. A eliminação dos pigmentos ocorre via extração destes por solventes orgânicos. Entretanto, é importante observar que as condições reacionais empregadas nessas etapas devem ser brandas, no sentido de evitar a despolimerização e também a desacetilação da quitina.

Estudos demonstraram que para a extração da beta-quitina de gládios de lula apenas a etapa de desproteinização é necessária, pois nesta matéria-prima a existência de sais minerais e pigmentos é extremamente baixa⁽²²⁾.

1.3 Desacetilação da Quitina

Uma das principais reações de derivatização da quitina é a hidrólise dos grupos acetamido, originando grupos amino, para gerar o polímero conhecido como quitosana. As amidas em princípio podem hidrolisar tanto em condições ácidas quanto alcalinas, mas a hidrólise em meio ácido não é comumente empregada devido à susceptibilidade das ligações glicosídicas da quitina a hidrólise ácida. Geralmente a reação é realizada em solução aquosa alcalina, um processo heterogêneo que apresenta como variáveis a concentração do álcali, a temperatura e o tempo de reação. O produto obtido da reação é denominado quitosana (Figura 6) somente se a porcentagem média de grupos amino for igual ou superior a 40% e, principalmente, se for solúvel em soluções aquosas diluídas de ácidos, como ácido clorídrico e ácido acético.

Figura 6 - Representação da estrutura primária idealizada da quitosana, onde n é o grau de polimerização.

De fato, em soluções diluídas de ácidos a quitosana comporta-se como um polieletrólito catiônico devido à protonação dos grupos amino das unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose. Como raramente a quitosana completamente desacetilada é preparada, os polímeros obtidos por desacetilação parcial de quitina são considerados

copolímeros constituídos de unidades GlcN e GlcNAc. A composição das quitosanas é variável em função das condições empregadas na desacetilação de quitina, define-se portanto o grau médio de acetilação do polímero ($\overline{GA}$) como a fração média de unidades GlcNAc presente nas cadeias. A massa molar média, o grau médio de acetilação e a distribuição das unidades GlcN e GlcNAc nas cadeias têm efeito marcante sobre a solubilidade da quitosana⁽²⁶⁾. O valor do parâmetro $\overline{GA}$ é um dos critérios empregados para diferenciar quitina e quitosana e, além disso, a solubilidade dos polímeros é diferente. De fato, a quitosana é solúvel em soluções aquosas de ácidos diluídos e a quitina é insolúvel, sendo solúvel apenas em sistemas solventes como N,N-dimetilacetamida/LiCl. A solubilidade da quitosana está relacionada com $\overline{GA}$, pois depende da quantidade de grupos aminos protonados ($-NH_3^+$) na cadeia polimérica. Assim, quanto maior a quantidade destes grupos, maior será a repulsão eletrostática entre as cadeias e maior a solubilidade⁽²⁷⁾.

Alguns autores consideram que a denominação quitosana se aplica aos produtos de desacetilação de quitina que apresentam $\overline{GA} \leq 40\%$ ⁽²⁸⁻²⁹⁾. O valor $\overline{GA}$ depende fortemente das condições em que a reação de desacetilação da quitina foi realizada e também das condições em que a quitina foi obtida. Além disso, também deve ser considerado que as polimorfos de quitina, pelo fato de adotarem diferentes arranjos no estado sólido, apresentam solubilidade, capacidade de intumescimento em solventes e reatividades, inclusive em relação à desacetilação, diferentes. Assim a hidrólise alcalina dos grupos acetamido é mais favorecida no caso da β -quitina como consequência da maior acessibilidade aos sítios reativos nas cadeias dessa polimorfa quando comparada à α -quitina^(22, 30-31).

Um dos métodos de desacetilação mais empregado nos laboratórios de pesquisa e também nas indústrias é o tratamento de quitina com soluções concentradas de hidróxido de sódio em temperaturas elevadas por várias horas. Em tais condições apenas a hidrólise parcial dos grupos acetamido de quitina é alcançada, mas acentuada despolimerização ocorre

simultaneamente se a temperatura for elevada e o tempo de reação for longo. Além disso, como a reação se processa heterogeneamente, os produtos desacetilados apresentam heterogeneidades em termos de suas características estruturais e variações importantes de propriedades. Várias metodologias têm sido propostas para aumentar a eficiência da reação e para minimizar a ocorrência de despolimerização. Assim, a realização da reação em atmosfera inerte ⁽³²⁾, a diluição com solventes ⁽³³⁾, a introdução de mudanças nas condições de processamento com o uso de extrusão reativa ⁽³⁴⁾, de explosão de vapor (processo “flash”) ⁽³⁵⁾, de irradiação de ultra-som ⁽³⁶⁾ e de microondas ⁽³⁷⁾, o uso de agentes redutores ⁽³⁸⁾ e a execução de tratamentos sucessivos de desacetilação ⁽³⁹⁾ têm sido propostos. Recentemente foi proposto o método conhecido como “freeze – pump out – thaw” (“FPT”) no qual a suspensão de quitina em solução aquosa concentrada de hidróxido de sódio é submetida a sucessivos ciclos de congelamento à temperatura do nitrogênio líquido, sucção com bomba de vácuo e aquecimento lento até atingir a temperatura ambiente ⁽⁴⁰⁾. Ao menos seis ciclos devem ser executados e então a suspensão de quitina é submetida à desacetilação em temperaturas no intervalo 80°C – 110°C por tempos curtos (até 60 minutos). Dessa maneira, a execução de 3-4 processamentos sucessivos permite a obtenção de quitosana extensivamente desacetilada ($\overline{GA} < 0,2\%$) e de massa molar elevada ($\overline{M}_v \cong 4,5 \times 10^5$ g/mol). A comparação dos resultados obtidos pelo emprego da metodologia “FPT” e da metodologia convencional de desacetilação de quitina revela que a primeira é muito mais eficiente. De fato, o emprego da metodologia “FPT” resulta na diminuição do número de reações sucessivas, e então do tempo total de reação, a serem executadas para resultar em quitosana completamente desacetilada a qual, além disso, apresenta grau médio de polimerização 1,7 vezes aquele de quitosana obtida por via de desacetilação convencional. Conforme os autores desse estudo, o método “FPT” promove a destruição das regiões cristalinas de quitina, aumentando a acessibilidade aos sítios reativos, renova a concentração das espécies mais reativas de hidróxido de sódio (mono e

diidrato) no interior das partículas de quitina e exclui o oxigênio molecular do meio reacional, minimizando a despolimerização via hidrólise alcalina oxidativa ⁽⁴¹⁾. Tais conclusões são baseadas nos estudos da cinética da reação de desacetilação e de difração de raios X das polimorfos de quitina antes e após aplicação da metodologia “FPT”, e nas características das quitinas desacetiladas empregando esse método ⁽⁴⁰⁻⁴¹⁾.

1.4 Utilização do Ultra-Som de Alta Intensidade

Defini-se o ultra-som como sendo o som de frequência além da sensibilidade do ouvido humano. O ultra-som apresenta frequência característica entre 20kHz e 100MHz. Diversos estudos vêm sendo publicados sobre a sonoquímica, sendo suas principais utilizações em síntese orgânica, emulsificação de soluções, degradação de polímeros, polimerização, sonoluminescência, sonólise (formação de radicais livres), formação de sonogéis e preparação de catalisadores ⁽⁴²⁾.

O ultra-som, como toda energia sonora, é propagado via uma série de ondas de compressão e rarefação induzidas nas moléculas através do meio. Assim, é proposto que a propagação de ondas acústicas, definidas por sua frequência e amplitude, através de meios líquidos provoca o fenômeno conhecido como cavitação. Durante a propagação das ondas acústicas o líquido é submetido alternadamente à compressão e rarefação, e se a energia aplicada for suficientemente elevada, durante a rarefação, ela pode superar as forças intermoleculares que mantêm a estrutura do líquido, formando bolhas cavitacionais. Estas bolhas crescerão durante os ciclos seguintes, adquirindo vapor ou gás do meio. Se a amplitude atinge um valor crítico, dependendo da frequência, ocorre um processo de expansão súbita até atingir um tamanho instável e, conseqüentemente, um colapso violento, com liberação de grande quantidade de energia ⁽⁴³⁾ (Figura 7).

Durante a compressão as bolhas cavitacionais colapsam em menos que 10^{-6} s, e segundo uma das teorias mais aceitas ⁽⁴⁴⁻⁴⁵⁾, denominada “Hot Spot”, gases e vapores nas cavidades são superaquecidos ($\cong 5000^{\circ}\text{C}$) e, ao mesmo tempo, submetidos a pressões elevadas ($\cong 2000$ atm). De acordo com esta teoria, no colapso de cada bolha cavitacional, há formação de jatos de solventes a velocidades muito elevadas que fragmentam e limpam a superfície do material. Portanto, os parâmetros que podem influenciar a cavitação são muito importantes, sendo os principais: a frequência, a intensidade da irradiação, o tipo de solvente utilizado, a temperatura e a pressão externa. Uma relação entre estes parâmetros deve ser buscada para atingir os efeitos desejados quando se utiliza o ultra-som.

Figura 7 - Propagação do som no líquido e demonstração da formação e colapso da bolha de cavitação

(43)

Nas reações químicas heterogêneas onde o acesso aos sítios reativos é limitado, faz-se o uso do ultra-som de alta frequência para que o acesso a estes sítios reativos seja facilitado. Esse é o caso, por exemplo, das reações de desacetilação de quitina, nas quais o polímero em fase sólida é suspenso na fase líquida que contém os outros reagentes. Assim, um aumento da

área superficial das partículas sólidas e do acesso aos sítios reativos é alcançado através da trituração do material via cavitação.

Sabe-se que a exposição prolongada de soluções contendo macromoléculas à radiação de ultra-som reduz a viscosidade da solução, pois há a degradação dos polímeros. Evidências experimentais sugerem que a degradação é causada por: (i) forças hidrodinâmicas da cavitação (isto é a energia de onda de choque produzida na implosão da bolha), (ii) tensão de cisalhamento na interface das bolhas pulsando, ou (iii) efeito térmico associado com efeito químico tanto da cavitação estável como da transitória ⁽⁴⁶⁾.

A utilização do ultra-som de alta intensidade, também conhecida como sonicação, foi recentemente empregada como tratamento prévio da quitina a ser desacetilada em solução aquosa de NaOH 40%, resultando em maior eficiência da reação e permitindo a obtenção, com apenas uma etapa de reação, de quitosanas bastante desacetiladas ($\overline{GA} < 10\%$) ⁽⁴⁷⁾. Também foi constatado que o tratamento prévio de quitina em suspensão aquosa com ultra-som não parece afetar a cristalinidade do polissacarídeo, mas tem acentuado efeito sobre a morfologia da superfície do material particulado ⁽⁴⁸⁻⁴⁹⁾.

A sonicação, no caso da quitina e quitosana, também tem sido usada para acelerar a degradação em ácido clorídrico concentrado visando à produção de oligossacarídeos (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Neste caso a quitina é suspensa no meio ácido concentrado, que é resfriado a 5°C para minimizar a simultânea ocorrência de desacetilação. Esta suspensão é submetida à sonicação por tempos variáveis (até 3 horas) com temperatura controlada (37-40°C) e os oligossacarídeos resultantes são isolados com o auxílio de cromatografia líquida de alto desempenho.

Estudos mais recentes do Grupo de Físico Química Orgânica ⁽⁵¹⁾, sobre a irradiação de quitina com o ultra-som de alta intensidade se demonstraram extremamente atrativos, pois em

vez da utilização da irradiação do ultra-som como um pré-tratamento da matéria-prima, a irradiação foi empregada diretamente na reação de desacetilação de quitina (suspensões aquosas de quitina em hidróxido de sódio 40% são irradiadas com o ultra-som de alta intensidade). O resultado deste estudo mostrou que quitosanas de baixo grau de acetilação ($\overline{GA} \approx 5\%$) e de elevada massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v \approx 7,0 \times 10^5$ g/mol) são obtidas com tempos inferiores (30 minutos) e temperatura mais brandas (60°C) do que as reações de desacetilação anteriormente citadas.

OBJETIVOS

O presente trabalho visa estudar as correlações entre a amplitude e a duração da irradiação e a temperatura do processo, e a eficiência da reação de desacetilação da beta-quitina assistida por ultra-som de alta intensidade. A obtenção de quitosanas extensivamente desacetiladas e de massas molares média elevadas é almejada, através da otimização dos parâmetros do processo.

2 PARTE EXPERIMENTAL

Os reagentes empregados neste trabalho são os identificados abaixo (Tabela 3), os quais não foram purificados, a não ser quando especificado.

Tabela 3 - Reagentes utilizados na realização dos experimentos

Reagente	Marca
Acetato de Sódio 3H ₂ O	J. T. Baker
Ácido clorídrico 36,5-38%	Synth
Ácido clorídrico Deuterado 20%	Cambridge Isotope Laboratories, Lnc.
Óxido de Deutério	Cambridge Isotope Laboratories, Lnc.
Ácido Acético Glacial	Synth
Etanol	Tec-Lab
Hidróxido de Sódio 99% (mínimo)	Chemis
Nitrato de Prata	Tec-Lab
N ₂	White Martins

2.1 Matéria-Prima

A beta-quitina foi extraída de gládios, também denominados penas ou plumas, de lula de duas espécies: *Loligo plei* e *Loligo sampaulensis*, cedidos pela Empresa Miami Pescados

(Cananéia/SP). As espécies foram identificadas pelo Instituto de Pesca de São Paulo (base de Cananéia). Os gládios (Figura 8) foram armazenados a -20°C até a sua utilização.

Figura 8 - Lula da espécie *Loligo*, com destaque para o gládio inserido na parte interna do molusco.

2.2 Obtenção da Beta-quitina

Para efetuar a extração da beta-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 24h, a 30°C . Uma vez secos, os gládios foram transferidos para um moinho (MA-048, Micromoinho de rotor vertical com facas móveis, Marconi) e depois da moagem, o material foi peneirado (peneiras de 10, 12, 35, 48, 170 e 200Mesh) e classificado de acordo com as dimensões das partículas. Os gládios triturados utilizados na extração de beta-quitina foram aqueles que apresentavam a maior porcentagem de massa (89%), correspondente a partículas com dimensões médias no intervalo de 0,250 a 0,425mm.

De acordo com Kurita e colaboradores ⁽⁵²⁾ e trabalhos já realizados no grupo de Físico-Química Orgânica ⁽²²⁾, os gládios não contêm sais minerais em quantidades significativas, o que permite dispensar a etapa de desmineralização do material. Para a remoção das proteínas

presentes nos gládios foi utilizado o método descrito por Chaussard ⁽⁵³⁾. Assim, cerca de 200g de gládios moídos foram suspensos em 3L de uma solução aquosa de NaOH 1M, e a suspensão resultante foi mantida sob agitação mecânica (350 rpm), durante 18 h à temperatura ambiente. Em seguida, a suspensão foi filtrada e o sólido lavado com água destilada até a neutralidade das águas de lavagem. A beta-quitina foi então transferida para placas de Petri e seca em estufa com circulação e renovação de ar durante 24h, a 30°C.

2.3 Desacetilação de Beta-Quitina Assistida por Irradiação de Ultra-Som de Alta Intensidade

Inicialmente a solução de NaOH 40% foi borbulhada com N₂ por aproximadamente 30 minutos com agitação magnética constante. A beta-quitina (aproximadamente 1,1g), foi suspensa em 25mL da solução de NaOH 40%, e a suspensão foi transferida para um béquer, que foi disposto no interior da caixa de isolamento acústico do equipamento de ultra-som (BRANSON Sonifier modelo 450, frequência de 20kHz). O sonotrodo foi imerso (aproximadamente 2/3 do comprimento) na suspensão de beta-quitina, que foi mantida sobre sob agitação magnética constante.

No primeiro conjunto de experimentos as variáveis controladas foram a amplitude da irradiação de ultra-som e o tempo de irradiação (30, 45 e 60 minutos). A temperatura da suspensão não foi mantida constante e variou no intervalo 25-90°C, conforme a amplitude e a duração da irradiação. A execução desses experimentos resultou em nove amostras, as quais foram identificadas como QA_t.

Onde

- A é a amplitude da irradiação do ultra-som de alta intensidade, expressa por baixa (Ab), intermediária (Ai) e alta amplitude (Aa).
- t designa o tempo de irradiação expresso em minutos.

No segundo conjunto de experimentos o tempo de irradiação foi mantido constante (30 minutos), as amplitudes de irradiação foram as mesmas dos experimentos já descritos e a temperatura foi mantida constante. Assim, nesses experimentos foi empregado um reator de vidro encamisado acoplado a banho termostático de circulação (Figura 9), o que permitiu que a temperatura da reação fosse controlada (50, 60, 70 e 80 °C $\pm 3^{\circ}\text{C}$). A execução desses experimentos resultou em doze amostras, as quais foram identificadas como: QA_t_T.

Onde

- T é a temperatura (expressa em graus Celsius) da suspensão durante a execução do experimento.
- Os fatores A e t são os mesmos utilizados anteriormente.

Independentemente do conjunto de experimentos considerado, após o término da reação a suspensão foi transferida para um béquer de polipropileno contendo cubos de gelo de água destilada, que foi imerso em uma mistura de gelo, água e etanol ($T = -10^{\circ}\text{C}$) para interromper a reação de desacetilação. A suspensão foi mantida à baixa temperatura e foi adicionado ácido clorídrico concentrado em pequenas porções até atingir $\text{pH} = 7-8$. Em seguida a suspensão foi filtrada e o sólido foi abundantemente lavado com etanol 80% até que o excesso de cloreto de sódio fosse eliminado. O sólido foi transferido para placa de Petri e seco em estufa de circulação a 30°C por 48h e mais 24h em estufa a vácuo a 30°C .

Figura 9 - Esquema experimental empregado nas reações de desacetilação com: 1) sonotrodo e 2) reator de vidro encamisado.

3 Caracterizações

As principais características das amostras de quitosana são o grau médio de acetilação ($\overline{GA}$), a massa molar média ponderal ($\overline{M}_w$), a massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$), a massa molar média numérica ($\overline{M}_n$) e a polidispersividade ($\overline{M}_w / \overline{M}_n$). Além destas também podemos citar a cristalinidade e a morfologia das quitosanas obtidas, que são determinados empregando técnicas de difração de raios X e de microscopia eletrônica de varredura (MEV), respectivamente. Tais características exercem grande influência sobre as propriedades do polímero. As características estruturais citadas e suas determinações são descritas a seguir.

3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das superfícies dos gládios, das amostras de beta-quitina e de quitosanas foi investigada empregando microscópio eletrônico de varredura LEO-440. As amostras foram previamente secas em estufa a vácuo a 60°C por 6h e recobertas com uma camada de ouro de 20nm de espessura. A tensão e a corrente do feixe utilizados nas análises foram de 20kV e 2,85pA, respectivamente. As imagens obtidas foram tratadas digitalmente utilizando o programa image J.

Existem vários programas disponíveis no mercado para análise de imagens, porém, em geral, eles são muito caros e sua utilização muito complexa, muitas vezes necessitando de treinamento específico⁽⁵⁴⁾. O programa image J foi o escolhido, pois além de possuir código-fonte livre, existe também a possibilidade de desenvolver adaptações que se adéquem a necessidade do usuário. Para analisar as micrografias com o image J, inicialmente foi realizado a calibração da imagem, utilizando como padrão a barra de escala fornecida nas micrografias. Após a calibração a imagem foi ajustada com a opção “Threshold”, a qual atua

como um filtro para a imagem eliminando os espaços vazios entre as partículas (Figura 10), para a determinação da área total (μm^2) e do número de partículas. Obtendo por fim uma área média ($\overline{AM} \mu\text{m}^2$) das partículas.

Figura 10 - Ajuste da imagem, com a função 'Threshold'. a) sem o 'Threshold' b) com 'Threshold'.

3.2 Difração de Raios X

As medidas de difração de raios X foram realizadas em difratômetro RIGAKU com tubo de cobre ($\lambda = 1,54\text{\AA}$), no intervalo de $3-50^\circ$, empregando varredura contínua com velocidade de $1^\circ/\text{min}$. A tensão e a corrente utilizadas foram de 50kV e 100mA, respectivamente.

3.3 Grau Médio de Acetilação ($\% \overline{GA}$)

Os valores de grau médio de acetilação de quitosana foram determinados por titulações, conforme descrito a seguir.

3.3.1 Titulação Condutimétrica

A amostra de quitosana (aproximadamente 0,1000 g), previamente seca em estufa a vácuo a 30°C por 6 h, foi suspensa em 50mL de solução de HCl 0,05M e mantida sob agitação magnética constante durante 15h à temperatura ambiente. A solução resultante foi

transferida para balão volumétrico de 110mL e o seu volume foi ajustado com água destilada e desionizada. Alíquotas de 50mL da solução resultante foram tituladas com solução de hidróxido de sódio 0,1M (previamente padronizada com biftalato de potássio). A neutralização da solução de quitosana foi acompanhada através de medidas de condutividade, utilizando um condutivímetro modelo Handylab LF1 e titulador automático Titronic Universal, ambos da Schott-Geräte. As medidas de condutividade durante as titulações foram efetuadas à temperatura de $25,0 \pm 0,1$ °C.

A curva de condutividade em função do volume de titulante adicionado, representativo para titulações de amostras de quitosana, é apresentada na Figura 11.

Figura 11 - Curva de titulação condutimétrica característica de uma amostra de quitosana.

A curva apresentada na Figura 11 é típica da titulação de uma mistura contendo ácido forte e ácido fraco, utilizando como titulante uma base forte. Inicialmente, ocorre a neutralização do ácido clorídrico empregado em excesso para garantir a solubilização de quitosana. Assim, os íons H^+ provenientes do ácido clorídrico 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 amônio da quitosana, promovendo ligeiro aumento da condutividade do meio. Uma vez concluída a neutralização do ácido fraco, grupos $-\text{NH}_3^+$ de quitosana (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 pontos de equivalência (V_2 e V_1), o grau médio de acetilação das amostras de quitosana analisadas pode ser determinado através da equação 1 ⁽²⁶⁾:

$$\% \overline{GA} = \left(1 - \frac{161 * (V_2 - V_1) * [\text{NaOH}]}{m} \right) * 100 \quad (1)$$

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);

$[\text{NaOH}]$ = Concentração da solução de hidróxido de sódio (M);

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

3.4 Determinação da Massa Molar Média de Quitosana por Viscosimetria

Capilar

Quando se trata de solução de polieletrólitos, como uma solução de quitosana em ácido diluído ou em tampão, a viscosidade pode ser descrita como função de sua viscosidade intrínseca e de sua concentração, quando não ocorrerem interações macromoleculares (sistema diluído) e quando existir a presença de um excesso de sal. A relação de Huggins ⁽⁵⁵⁾ pode ser então usada (equação 2):

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] + k_H \cdot [\eta]^2 \cdot C \quad (2)$$

onde:

$\frac{\eta_{sp}}{C}$ = viscosidade reduzida (mL/g);

$[\eta]$ = viscosidade intrínseca (mL/g);

k_H = constante de Huggins;

C = concentração da solução (g/mL).

Desta forma, a viscosidade intrínseca ($[\eta]$) é determinada pela extrapolação à diluição infinita da curva de viscosidade reduzida versus concentração (Equação 2) (Figura 12). A viscosidade assim determinada satisfaz a relação de Mark-Houwink (Equação 3)⁽⁵⁶⁻⁵⁸⁾ e, desta forma, a massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$) do polieletrólito pode ser determinada empregando a equação 3.

$$[\eta] = K' \overline{M}_v^\alpha \quad (3)$$

Onde K' e α são constantes para um dado solvente e temperatura.

Figura 12 - Curva da viscosidade reduzida em função da concentração.

Para a quitosana, os valores de α e de K' dependem do grau médio de acetilação do polímero ^(28,59). Para a determinação da viscosidade intrínseca, cerca de 20mg de quitosana (previamente seca em estufa a vácuo, a 30°C por 6h) foram suspensos em 25mL de solução de ácido acético 0,6M sob agitação magnética constante durante 24h. Em seguida foram adicionados 25ml de acetato de sódio 0,4M e a agitação procedeu por mais 24 horas. A solução resultante foi filtrada sob pressão positiva em membrana com diâmetro dos poros de 0,45 μ m (Millipore – White SCWP). Alíquotas de 15mL desta solução foram transferidas para um viscosímetro capilar de vidro (do tipo Ubbelohde, $\phi=0,53$ 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 foram realizadas a $25,00 \pm 0,01^\circ\text{C}$ e tampão ácido acético 0,3M/acetato de sódio 0,2M (pH = 4,5) 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 três determinações independentes que não apresentaram variação maior que 0,5%. Foi feita

a correção de Hagenbach ⁽⁶⁰⁾ para os valores de tempo de escoamento da solução (t_c) e tempo de escoamento do solvente (t_0), conforme a equação 4.

$$\Delta t_{HC} = \frac{E}{K t_2} \quad (4)$$

Sendo:

Δt_{HC} = correção de Hagenbach para o tempo de escoamento;

t = tempo de escoamento médio;

E/K = constante relacionada com o diâmetro do capilar utilizado.

Assim, após a correção, os tempos de escoamento utilizados (t') foram obtidos por (equação 5):

$$t' = t - \Delta t_{HC} \quad (5)$$

Empregando as condições e os equipamentos citados e considerando os intervalos de concentração das soluções de quitosana analisadas, a seguinte aproximação é válida (equação 6):

$$\eta_{rel} \cong \frac{t'_c}{t'_0} \quad (6)$$

sendo,

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

t'_c = tempo de escoamento da solução de quitosana de concentração C (corrigido);

t'_0 = tempo de escoamento do solvente (corrigido).

Para a determinação da viscosidade intrínseca das amostras, a viscosidade relativa (η_{rel}) (Equação 6) das soluções foi mantida no intervalo de 1,2 - 1,8, caracterizando o sistema diluído.

As massas molares médias viscosimétricas das amostras obtidas, foram determinadas pelo emprego da equação 5, utilizando os valores das constantes de Mark-Houwlin (α e K') propostos por Rinaudo e colaboradores⁽⁵⁹⁾, a partir dos valores de viscosidade intrínseca ($[\eta]$) das amostras e de acordo com o valor de grau médio de acetilação ($\overline{GA}$).

3.5 Determinação da Massa Molar Média por Cromatografia de Exclusão por Tamanho (CET)

A cromatografia de exclusão por tamanho foi usada na determinação da massa molar média das amostras de quitosanas. O equipamento utilizado foi um sistema cromatográfico Shimadzu (CTO – 10A), com detecção por índice de refração, modelo RID – 6A. As condições para as análises foram: Pré-coluna Shodex Ohpak SB-G (50 X 6mm) (10 μ) + Shodex Ohpak SB-803-HQ (8mm DI x 300mm) (6 μ) + Shodex Ohpak SB-805-HQ (8mm DI x 300mm) (13 μ), fase estacionária: gel de polihidroximetacrilato; eluente: tampão ácido acético 0,3M/acetato de sódio 0,2M (pH=4,5), fluxo: 0,6 mL/min; pressão: 28 Kg/cm²; temperatura: 35°C. A concentração das amostras injetadas no cromatógrafo foi de 4mg/mL em tampão ácido acético 0,3M/acetato de sódio 0,2M.

A curva de calibração das colunas foi construída a partir da injeção com soluções de padrões monodispersos de polimaltotriose (pullulan) de massas molares 1.600.000, 788.000, 404.000, 212.000, 112.000, 47.300, 22.800, 11.800, 5.900, 738, 342 e 180 g/mol.

O polimaltotriose (pullulan) é um polissacarídeo linear, constituído de unidades de maltotriose unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo $\alpha(1\rightarrow4)$, conforme mostra a (Figura 13):

Figura 13 - Estrutura do polimaltotriose (pullulan).

As massas molares médias obtidas pela cromatografia de exclusão por tamanho são: a massa molar numérica média $\overline{M}_n$ e a massa molar ponderal média $\overline{M}_w$, além da relação entre $\overline{M}_w / \overline{M}_n$, é conhecida como a polidispersividade da amostra. Os dados sobre a polidispersividade propiciam avaliar a amplitude da distribuição das massas molares de um polímero. As expressões matemáticas da $\overline{M}_w$, da $\overline{M}_n$ e da $\overline{M}_v$ são apresentadas abaixo ⁽⁶¹⁾.

Massa molar numérica média ($\overline{M}_n$).

A $\overline{M}_n$ (equação 7) é definida como sendo a massa molar de todas as cadeias (M_i), dividido pelo número total de cadeias (N_i), isto é, uma média numérica. Esta massa molar leva em conta mais fortemente o número de cadeias.

$$\overline{M}_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i} \quad (7)$$

Massa molar ponderal Média ($\overline{M}_w$).

A $\overline{M}_w$ (equação 8) é outra maneira de se calcular a massa molar média, onde a massa das cadeias poliméricas presentes em cada fração é levada em conta. De outra forma, pode se dizer que a massa molar de cada fração contribui de maneira ponderada para o cálculo da média total.

$$\overline{M}_w = \frac{\sum w_i N_i}{\sum w_i} \quad (8)$$

Onde w_i é a massa da fração i .

Massa molar viscosimétrica média ($\overline{M}_v$).

A viscosidade de soluções diluídas é função do volume hidrodinâmico do soluto na solução, isto é, sua massa molar. Quanto maior o volume hidrodinâmico, mais viscosa será a solução. Medidas da viscosidade de soluções poliméricas diluídas permitem o cálculo de uma massa molar média dita viscosimétrica ($\overline{M}_v$) equação 9.

$$\overline{M}_v = \left(\frac{\sum N_i (M_i)^{1+\alpha}}{\sum N_i M_i} \right)^{1/\alpha} \quad (9)$$

Onde α é uma constante (Mark-Houwink) que depende do polímero, do solvente e da temperatura.

3.6 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (^1H -RMN)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de alta resolução é um método muito útil para o estudo da estrutura química de quitosana ^(35,62), um espectro típico de quitosanas é apresentado na Figura 14. Para a aquisição dos espectros as amostras de quitosana (aproximadamente 10mg) foram solubilizadas em 1mL de solução de HCl/D₂O 1% (v/v), sob agitação magnética constante, durante 24h, à temperatura ambiente. As soluções obtidas foram transferidas para tubos de quartzo (Aldrich 527-PP, $\phi = 5\text{mm}$) e os espectros foram obtidos em espectrômetro BRUKER AC200 a 80°C; o pulso utilizado foi de 8,2mS

(90°), acumulando 16 varreduras e o parâmetro LB foi de 0,2Hz. Os espectros foram calibrados a partir dos sinais da água em 4,1ppm ⁽⁶⁰⁾.

Figura 14 - Espectro de ¹H-RMN característico de uma amostra de quitosana, onde R = COCH₃ ou R = H ⁽⁶³⁾.

3.7 Espectroscopia na Região do Infravermelho

As pastilhas foram preparadas em KBr (grau espectroscópico) na proporção de 1:100 amostra/KBr. Tanto o KBr como as amostras foram previamente secas em estufa a vácuo a 30°C por 24 h e depois foram misturadas e trituradas em gral de ágata. As amostras trituradas com KBr foram novamente secas em estufa a vácuo a 30°C, por 24h. Após este período as amostras com KBr foram prensadas e novamente colocadas em estufa nas mesmas condições. As análises foram realizadas em equipamento BOMEM modelo MB-102 com transformada de Fourier, com acúmulo de 48 varreduras e resolução de 4cm⁻¹, no intervalo de 4000 – 500cm⁻¹.

A espectroscopia na região do infravermelho é comumente utilizada na caracterização de quitinas e quitosanas, tanto quantitativamente quanto qualitativamente, devido as suas bandas de absorção características na região do infravermelho (Tabela 4).

Tabela 4 - Bandas de absorção e números de onda ($\bar{\nu}$ cm⁻¹) características de quitina e quitosana ⁽²⁹⁾

Banda	$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)	Banda	$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)
Amida I (-C=O-NH ₂)	≈ 1 650 e 1 630	Amida II (-C=O-NH ₂)	≈ 1 550 e 1 560
Amida III (-C=O-NH ₂)	≈ 1 310	-N-H ₃ ⁺ (s)	≈ 3 350-3 100 e 2 100 ⁽⁶⁴⁾
-N-H ₂ (s)	≈ 3 250-3 350	-N-H ₂ (b)	≈ 1 590-1 630
-O-H (s)	≈ 3 450	-O-H (b)	≈ 1 260 ⁽⁶⁵⁾
-C-OH (s)	≈ 1 030 e 1 070	-C-H ₂ (b, sc)	≈ 1410-1 420
-NH-C(O)-C-H ₃ (s)	≈ 1 380	-NH-C(O)-C-H ₃ (b)	≈ 2 860-2 910

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

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os principais resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho, bem como as discussões decorrentes serão exploradas de maneira a demonstrar a evolução do trabalho. Nesse sentido, o capítulo foi dividido em três partes. A primeira parte consiste na caracterização das quitosanas obtidas, utilizando as seguintes técnicas: espectroscopia no infravermelho, microscopia eletrônica de varredura, difração por raios X e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio. A segunda parte concerne os resultados obtidos na desacetilação assistida por irradiação de ultra-som de alta intensidade, tendo como variáveis a amplitude e o tempo da irradiação de ultra-som, sendo que a temperatura da suspensão de beta-quitina em solução aquosa de hidróxido de sódio 40% aumentou desde a temperatura ambiente até 90°C do início até o final do experimento. O aumento da temperatura ocorre como consequência da dissipação de energia devido ao fenômeno de cavitação, a taxa de aquecimento e a temperatura final da suspensão são funções da amplitude e do tempo de irradiação. Os experimentos executados nessas condições resultaram em nove amostras de quitosana que constituem o Conjunto I, as quais são identificadas pela simbologia QA_t, sendo A a amplitude da irradiação do ultra-som de alta intensidade, expressa por baixa (Ab), intermediária (Ai) e alta amplitude (Aa) e o t designa o tempo de irradiação expresso em minutos. A terceira parte apresenta os resultados dos experimentos de desacetilação de beta-quitina assistida por irradiação de ultra-som de alta intensidade nos quais as variáveis foram a amplitude da irradiação e a temperatura da suspensão, sendo o tempo de irradiação fixado em 30 minutos. Assim, nesses experimentos a temperatura da suspensão de beta-quitina em solução aquosa de hidróxido de sódio 40% foi mantida constante e resultaram em doze amostras de quitosana que constituem o Conjunto II. As amostras resultantes da execução desses experimentos foram designadas QA_tT, sendo A a amplitude da irradiação do ultra-

som de alta intensidade, expressa por baixa (Ab), intermediária (Ai) e alta amplitude (Aa), t designa o tempo de irradiação expresso em minutos (fixado em 30 minutos) e T a temperatura (expressa em graus Celsius) da suspensão durante a execução do experimento.

4.1 Características Gerais

4.1.1 Espectroscopia no Infravermelho

As análises de espectroscopia no infravermelho, visam à caracterização das amostras por seus modos de vibração característicos na região do infravermelho. Os espectros de beta-quitina ⁽²²⁾ e da amostra QAb_30_70, representativa do conjunto de quitosanas obtidas neste trabalho, apresentam semelhanças (Figura 15), porém são observadas diferenças atribuídas aos diferentes conteúdos de grupos acetamida e à existência de interações (ligações hidrogênio) nesses polímeros. Em ambos os espectros as principais bandas ocorrem nos intervalos $3600\text{-}3000\text{cm}^{-1}$ (deformações axiais de O-H e N-H), $2980\text{-}2800\text{cm}^{-1}$ (deformações axiais de C-H), $1660\text{-}1550\text{cm}^{-1}$ (deformações axiais de C=O e angulares de N-H), $1450\text{-}1370\text{cm}^{-1}$ (deformações angulares de C-H), $1300\text{-}1315\text{cm}^{-1}$ (deformação axial de CN), $1150\text{-}1155\text{cm}^{-1}$ (deformação axial de O-H em ligação hidrogênio) e $1020\text{-}1080\text{cm}^{-1}$ (deformação angular de C-O). A diminuição dos grupos acetamida, da beta-quitina ($\overline{GA} = 81,1$) ⁽⁵¹⁾ em relação à amostra QAb_30_70 ($\overline{GA} = 9,4$), determina mudanças significativas no espectro de infravermelho. Na amostra de beta-quitina foi identificado as bandas de deformação axial NH ^(35,66) (por volta de 3264 e 3106cm^{-1}) correspondente às ligações hidrogênio intermoleculares $\text{C=O}\cdots\text{H-N}$, a deformação angular de NH (amida II, por volta de 1550cm^{-1}) e a deformação axial CO (amida I, por volta de 1660cm^{-1}) atribuídas apenas ao grupo C=O em ligação hidrogênio intermolecular com grupos N-H ^(18,67). Destas bandas a única que aparece para o espectro da amostra QAb_30_70 é a da deformação axial CO (amida I, por volta de 1650cm^{-1}), a qual apresenta-se deslocada, demonstrando modificações das ligações hidrogênio

intermoleculares entre o grupo $C=O \cdots H-N$, decorrentes da derivatização da beta-quitina para a quitosana.

O espectro da amostra QAb_30_70 é mostrado como um exemplo representativo de todos os demais, já que todos foram semelhantes, evidenciando que todas as amostras apresentam basicamente os mesmos grupos funcionais. As principais bandas observadas para as amostras de quitosana no espectro no infravermelho foram: deformação axial de amida I ($-C=O-NH_2$) entre 1630 cm^{-1} a 1650 cm^{-1} , deformação angular de $N-H_2$ entre 1590 cm^{-1} a 1620 cm^{-1} , deformação angular simétrica de $C-H_3$ entre 1379 cm^{-1} a 1383 cm^{-1} , deformação axial amida II ($-C=O-NH_2$) entre 1540 cm^{-1} a 1560 cm^{-1} , deformação axial de amida III ($-C=O-NH_2$) por volta de 1315 cm^{-1} , além das bandas de estruturas polissacarídicas entre 890 cm^{-1} a 1156 cm^{-1} .

De fato, a comparação dos espectros de beta-quitina ($\overline{GA} = 81,1$)⁽⁵¹⁾ e das amostras QAb_30, ($\overline{GA} = 25$), QAb_45 ($\overline{GA} = 22$) e QAb_60 ($\overline{GA} = 20,8$) na região onde ocorrem as bandas de amida I, II, III e de deformações angulares de CH_3 (Figura 16) permitem observar que a intensidade dessas bandas diminui concomitantemente com o decréscimo do conteúdo de grupos acetamida, expresso pelo valor de $\overline{GA}$. Todas as amostras, Conjunto I e II, apresentam a mesma tendência da Figura 16, quando comparamos os seus espectros no infravermelho, elas apresentam uma menor intensidade na banda de deformação axial de amida I, II, III e de deformação angular simétrica de $C-H_3$, mostrando uma relação intrínseca dessas bandas com seus respectivos $\overline{GA}$.

Figura 15 - Espectro no infravermelho das amostras de β -quitina e QAb_30_70.

Figura 16 - Espectro no infravermelho ampliado na região de 1800 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} , de beta-quitina e das amostras QAb_30, QAb_45 e QAb_60.

4.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

Através das micrografias (Figura 17 e Figura 18), obtidas em microscópio de varredura eletrônica (MEV), foi observado que as partículas de beta-quitina apresentam uma superfície relativamente lisa (Figura 17(a) e Figura 18(a)), enquanto que as amostras obtidas pela reação de desacetilação assistida pelo ultra-som de alta frequência, representadas pela amostra QAb_30 (Figura 17(b) e Figura 18 (b)), são mais rugosas e apresentam uma redução das dimensões médias e um aumento da área superficial das partículas. Estas características são atribuídas ao efeito da cavitação, o qual aumenta a acessibilidade aos sítios reativos do polímero ^(47-49,51,68-69).

(a)

(b)

Figura 17 - Micrografias das amostras a) Beta-Quitina, b) QAb_30, com ampliação de 75x.

(a)

(b)

Figura 18 - Micrografias das amostras (a) Beta-Quitina e (b) QAb_30, com ampliação de 500x.

Pode ser observado nas Figura 17(b) e Figura 18(b), a ocorrência de um acentuado processo de desgaste e descamação da superfície das partículas da amostra QAb_30, este processo é observado de modo geral para as amostras do Conjunto I e II.

Fazendo uso do programa image J, foi determinada a área média ($\overline{AM}$) das partículas (Tabela 5) a qual foi correlacionada com a amplitude e o tempo para o primeiro conjunto na Figura 19.

Figura 19 - Variação da área média por partícula em função do tempo e da amplitude da irradiação utilizadas na reação de desacetilação de beta-quitina assistida por ultra-som de alta intensidade, para o Conjunto I.

A diminuição da área média das partículas, ocorrida pelo aumento do tempo e da amplitude está associada à energia fornecida durante a irradiação da suspensão de beta-quitina com ultra-som de alta intensidade. Assim, a energia fornecida aumenta com o aumento da amplitude e do tempo de irradiação, favorecendo a pulverização das partículas através da cavitação.

No caso do Conjunto II (Figura 20) a tendência é diferente os menores valores da $\overline{AM}$ estão localizados entre 50-60°C para as amplitudes baixas (Ab) e elevadas (Aa), e na faixa de 60-70°C para a amplitude intermediária (Ai). A constatação de áreas médias menores em determinadas faixas de temperatura sugere que o efeito da cavitação foi mais efetivo nesses casos.

Figura 20 - Variação da área média por partícula em função de temperatura e da amplitude da irradiação utilizadas na reação de desacetilação de beta-quitina assistida por ultra-som de alta intensidade, para o Conjunto II.

Tabela 5 - Variação da área média (μm^2) das partículas do Conjunto I e II

Amostras	AM (μm^2)	Amostras	AM (μm^2)
Q Ab_30	1977,22	QAb_30_50	731,28
Q Ab_45	304,18	QAb_30_60	467,59
Q Ab_60	143,37	QAb_30_70	1681,07
QAi_30	950,71	QAb_30_80	1111,76
QAi_45	902,46	QAi_30_50	965,70
QAi_60	495,45	QAi_30_60	588,73
QAa_30	372,57	QAi_30_70	714,76
QAa_45	181,47	QAi_30_80	1377,45
QAa_60	83,59	QAa_30_50	632,53
		QAa_30_60	1105,59
		QAa_30_70	1228,70
		QAa_30_80	2003,82

Nas micrografias das amostras do Conjunto II, foi observado a presença de cavidades (Figura 21) presentes na superfície das partículas.

(a)

(b)

Figura 21 - Micrografias das amostras (a) QAa_30_60 e da (b) QAa_30_70, com ampliação de 1000x.

Estas cavidades são evidências das “Hot Spot”⁽⁴³⁾ causadas pelo efeito da cavitação, o qual foi notadamente favorecido com o controle da temperatura. Os diâmetros das cavidades, que foram medidos com o auxílio do programa image J, variaram entre 0,5 a 50µm.

4.1.3 Espectroscopia de Ressonância Nuclear de Hidrogênio ^1H -RMN

Nos espectros de ^1H -RMN das amostras obtidas pela reação de desacetilação de beta-quitina assistida por ultra-som de alta intensidade, foi observado à presença dos sinais dos hidrogênios metílicos do grupo acetamida (sinais em 2,0 ppm), os hidrogênios ligados aos carbonos 2 a 6 do anel de glicopirranose. (cujos sinais foram observados no intervalo de deslocamento químico 3 - 4,2 ppm) e os sinais do hidrogênio ligado ao carbono 1 (em aproximadamente 4,9ppm), tais sinais caracterizam o polímero quitosana. Todas as amostras do Conjunto I e II apresentaram os sinais característicos de quitosana, o espectro da amostra QAi_30_80 é apresentado na Figura 22.

Figura 22 - Espectro de ^1H -RMN da amostra QAi_30_80.

4.1.4 Difração de Raios X

A beta-quitina dos gládios de lulas apresenta dois picos cristalinos em aproximadamente 8 e 20°, referente aos planos (010) e (020,110) respectivamente. A comparação do difratograma de beta-quitina ⁽⁵¹⁾ com a amostra QAb_30_60 (Figura 23), fornece um indicativo de que a reação de desacetilação assistida por ultra-som de alta intensidade resulta em amostras menos cristalinas, este fato é observado em todas as amostras do Conjunto I e II.

Figura 23 - Difratogramas da beta-quitina e da amostra QAb_30_60.

4.2 Estudos da Desacetilação de Beta-Quitina Assistida por Ultra-Som de Alta Intensidade

4.2.1 Influência da Amplitude e do Tempo de Irradiação de Ultra-Som Sobre a Desacetilação de Beta-Quitina.

A importância da amplitude e do tempo de irradiação de ultra-som sobre a desacetilação de beta-quitina pode ser avaliada analisando os dados da Tabela 6 e as Figura 24, Figura 25 e Figura 26.

Tabela 6 - Os valores do grau médio de acetilação ($\overline{GA}$), massa molar viscosimétrica média ($\overline{M}_v$) e rendimento da reação (R) das reações de obtenção das amostras do Conjunto I

Amostras	$\overline{GA}$ (%) ^(a)	$\overline{M}_v$ (g/mol) ^(b)	R (%) ^(c)
Q Ab_30	25,0	645.116	88
Q Ab_45	22,0	563.166	84
Q Ab_60	20,8	412.622	80
Q Ai_30	15,7	494.189	89
Q Ai_45	14,0	312.865	83
Q Ai_60	8,6	232.052	78
Q Aa_30	12,5	385.467	80
Q Aa_45	7,7	145.241	74
Q Aa_60	7,5	117.456	73

a) média de 2 determinações independentes por titulação, b) determinado por viscosimetria capilar e c) determinado por diferença de massa.

Figura 24 - Variação do grau médio de acetilação das amostras do Conjunto I em função da amplitude e do tempo de irradiação.

Figura 25 - Variação da massa molar média viscosimétrica das amostras do Conjunto I em função da amplitude e do tempo de irradiação.

Figura 26 - Variação do rendimento da reação de obtenção das amostras do Conjunto I em função da amplitude e do tempo de irradiação.

Analisando a variação do grau médio de acetilação das amostras de quitosana em função do tempo de irradiação é observado que, independentemente da amplitude de irradiação, o aumento do tempo de irradiação provoca a diminuição de $\overline{GA}$ (Figura 24). Quando a variação do grau médio de acetilação das amostras de quitosana em função da amplitude de irradiação é analisada, também é observada a diminuição do $\overline{GA}$, independentemente do tempo de irradiação, o aumento da amplitude de irradiação provoca a diminuição de $\overline{GA}$ (Figura 24). Entretanto, tal análise revela que a amplitude e o tempo de irradiação não têm a mesma importância, pois o valor de $\overline{GA}$ diminui significativamente com o aumento da amplitude enquanto o aumento da duração da irradiação não provoca diminuição tão acentuada de $\overline{GA}$. Como exemplo a comparação dos valores de $\overline{GA}$ das amostras QAb_30 e QAb_45 revela que quando o tempo de irradiação é aumentado em 15 minutos, mantendo fixa a amplitude de irradiação, o valor de $\overline{GA}$ diminui aproximadamente 12%. Entretanto, quando as amostras QAb_30 e QAI_30 são comparadas é constatado que o

aumento da amplitude de irradiação provoca acentuada diminuição (aproximadamente 37 %) no valor de $\overline{GA}$.

A eficiência da reação de desacetilação de beta-quitina assistida por ultra-som de alta intensidade, evidenciada pela diminuição de $\overline{GA}$, está claramente associada à energia fornecida pela irradiação da suspensão de beta-quitina com ultra-som. Assim, a energia fornecida aumenta com o aumento da amplitude e do tempo de irradiação, favorecendo a reação de desacetilação e resultando na obtenção de quitosana mais desacetilada.

A variação da massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$) em função do tempo e da amplitude de irradiação mostra tendência semelhante àquela observada no caso da variação de $\overline{GA}$. De fato, os dados da Tabela 6 e da Figura 25 mostram que o aumento da amplitude e o prolongamento do tempo de irradiação resultam no decréscimo de $\overline{M}_v$ e que a variação da amplitude é mais importante do que a do tempo de irradiação. Assim, a comparação dos valores de $\overline{M}_v$ das amostras QAb_30 e QAb_45 demonstram que quando o tempo da irradiação é aumentado em 15 minutos, mantendo fixa a amplitude de irradiação, o valor de $\overline{M}_v$ diminui de aproximadamente 13%. Por outro lado, quando as amostras QAb_30 e QAi_30 são comparadas é constatado que o aumento da amplitude de irradiação provoca diminuição mais acentuada (aproximadamente 23%) no valor de $\overline{M}_v$.

Os rendimentos das reações de desacetilação de beta-quitina assistida por irradiação de ultra-som de alta intensidade foram elevados, variando no intervalo 72-85% (Tabela 6), sendo que a sua variação em função da amplitude e do tempo de irradiação (Figura 25) apresentou tendência semelhante, em termos gerais, àquelas observadas nos casos do grau médio de acetilação e da massa molar média viscosimétrica. Dessa maneira, é observado que o aumento da amplitude e o prolongamento do tempo de irradiação resultam na diminuição do

rendimento da reação, sendo a amplitude o fator mais importante a afetar o rendimento. Entretanto, as variações de rendimento da reação não são tão importantes quanto às observadas no grau médio de acetilação e na massa molar média viscosimétrica, principalmente nos casos das amplitudes mais baixa e intermediária. O rendimento foi determinado por diferença entre a massa inicial de beta-quitina e a massa recuperada após a reação, refletindo as perdas de massa por manipulação (principalmente nas transferências e lavagens) e também aquelas associadas à formação de produtos de baixa massa molar. Nesse último caso se enquadram os íons acetato provenientes da hidrólise dos grupos acetamida das unidades GlcNAc de beta-quitina, que leva à formação de quitosana, e também os oligômeros formados via ruptura das ligações glicosídicas. Considerando que os procedimentos experimentais foram padronizados e cuidadosamente executados, é assumido que as perdas de massa por manipulação foram semelhantes em todas as reações. Por outro lado, é constatado que a queda de rendimento da reação (Tabela 6) acompanha o decréscimo de grau médio de acetilação, que reflete a ocorrência de hidrólise dos grupos acetamida, e a diminuição de massa molar média viscosimétrica, que reflete a ocorrência de ruptura das ligações glicosídicas.

A técnica de cromatografia de exclusão por tamanho (CET) foi empregada para a determinação dos valores de $\overline{M}_w$ e $\overline{M}_n$ das amostras obtidas por desacetilação de beta-quitina assistida por irradiação de ultra-som (Tabela 7). Uma análise típica e representativa das amostras do Conjunto I é mostrada na Figura 27.

Tabela 7 - Resultados das análises das amostras do Conjunto I por CET

Amostra	GA (%)	$\overline{M}_w \times 10^{-6}$ (g/mol)	$\overline{M}_n \times 10^{-5}$ (g/mol)	$\overline{M}_w / \overline{M}_n$
QAb_30	25,0	3,80	8,05	4,7
QAb_45	22,0	3,19	7,46	4,3
QAb_60	20,8	3,69	6,82	5,4
QAI_30	15,7	2,28	4,29	5,3
QAI_45	14,0	2,64	5,89	4,5
QAI_60	8,6	1,57	4,05	3,9
QAa_30	12,5	1,58	4,15	3,8
QAa_45	7,7	1,40	4,50	3,1
QAa_60	7,5	1,21	3,13	3,9

Figura 27 - Cromatograma típico para o Conjunto I, representadas pelas amostras QAa_30, QAa_45 e QAa_60.

Inicialmente cabe ressaltar que as colunas utilizadas no sistema cromatográfico foram calibradas empregando padrões monodispersos de polimaltotriose (Figura 28). Entretanto, a polimaltotriose (Figura 13) possui as seguintes características estruturais diferentes da quitosana: i - as ligações que unem suas unidades são do tipo $\alpha(1\rightarrow4)$, o que confere maior flexibilidade às cadeias de polimaltotriose e ii - suas cadeias não possuem cargas, e portanto não têm caráter de polieletrólito.

Figura 28 - Curva de Calibração (padrões de polimaltotriose) do sistema cromatográfico empregado nas análises por CET.

Tais diferenças estruturais afetam os resultados das análises por CET, visto que cadeias de quitosana e polimaltotriose que possuam o mesmo grau de polimerização terão interações com o meio solvente e volumes hidrodinâmicos diferentes e, conseqüentemente, também terão tempos de retenção diferentes nas colunas cromatográficas. De fato, as cadeias de polimaltotriose têm a tendência a se enovelar, adotando a conformação de esferas compactas, enquanto que as cadeias de quitosana tendem a ser estendidas, se aproximando da conformação do bastonete rígido. Assim, o volume hidrodinâmico da polimaltotriose é menor quando comparado à quitosana de mesmo grau de polimerização, o que resulta em maior tempo de retenção nas colunas cromatográficas no caso da polimaltotriose ⁽⁶⁰⁾. Portanto, os valores das massas molares médias das amostras de quitosana determinados por CET estão superestimados e devem ser considerados com reservas. De fato, os dados da Tabela 7 mostram que todas as amostras de quitosana possuem massa molar média ponderal acima de 10^6 g/mol, sendo que algumas excedem 3×10^6 g/mol. É importante observar que a massa molar média viscosimétrica de beta-quitina extraída de gládios de lulas pelo emprego de condições semelhantes às utilizadas neste trabalho atinge aproximadamente $1,5-2,0 \times 10^6$ g/mol ^(20-21, 53) e que a reação de desacetilação de quitina resulta em despolimerização parcial das cadeias ^(47, 60). Além disso, em todos os casos há uma fração da curva de eluição, variável em função da amostra considerada, que extrapola os limites da curva de calibração do sistema (Figura 29).

Figura 29 - Porcentagens das curvas CET das amostras do Conjunto I acima do limite da curva de calibração (Mexc) em função da amplitude e do tempo de irradiação.

De acordo com os dados da Figura 29, a fração da curva CET acima do limite da curva de calibração das colunas cromatográficas é mais importante quanto menor a amplitude e o tempo de irradiação de ultra-som empregados na reação de obtenção da amostra. Conforme os dados da Tabela 7, a amplitude e o tempo de irradiação também afetam o grau médio de acetilação e a massa molar média ponderal das quitosanas obtidas por desacetilação de beta-quitina assistida por irradiação de ultra-som de alta intensidade. Portanto, as porcentagens das curvas CET que extrapolam o limite da curva de calibração das colunas cromatográficas podem ser relacionadas ao grau médio de acetilação (Figura 30(a)) e à massa molar média ponderal (Figura 30(b)) das amostras do Conjunto I, o que revela tendência semelhante de variação e que se traduz pelo aumento de Mexc com o aumento de $\overline{GA}$ e de $\overline{M}_w$.

Figura 30 - Correlação entre as porcentagens das curvas CET das amostras do Conjunto I que extrapolam o limite da curva de calibração das colunas cromatográficas, o grau médio de acetilação (a) e a massa molar média ponderal (b).

Dessa maneira, os valores de massas molares médias determinados por CET são empregados, em vista das reservas mencionadas, para estabelecer uma comparação qualitativa entre as amostras de quitosana.

A variação da polidispersividade ($\overline{M}_w / \overline{M}_n$) das amostras de quitosana do Conjunto I (Tabela 7) é função da amplitude e do tempo de irradiação empregados nas reações de obtenção dessas amostras (Figura 31), entretanto não há uma tendência clara de variação como as observadas nos casos do grau médio de acetilação e da massa molar média viscosimétrica, exceto no caso da amplitude de irradiação intermediária.

Nos polímeros monodispersos e nos casos em que a polidispersividade se aproxima de um, os valores da massa molar média ponderal e da viscosimétrica tendem a se aproximar. Entretanto, as amostras do Conjunto I apresentam polidispersividade superior a três e as variações de $\overline{M}_w$ em função da amplitude e do tempo de irradiação de ultra-som (Figura 31) não apresentam a mesma tendência observada no caso de $\overline{M}_v$ (Figura 25), exceto quanto ao efeito do tempo de irradiação quando a amplitude mais elevada (Aa) foi empregada na reação. Por outro lado, deve ser ressaltado que o efeito da amplitude de irradiação é mais importante do que o do tempo de irradiação, como observado nos casos das variações do grau médio de acetilação, da massa molar média viscosimétrica e do rendimento das reações de obtenção das amostras do Conjunto I.

Figura 31 - Índice de polidispersividade das amostras do Conjunto I, determinado por CET.

Figura 32 - Variação da massa molar média ponderal das amostras do Conjunto I em função da amplitude e do tempo de irradiação.

4.2.2 Influência da Amplitude de Irradiação de Ultra-Som e da Temperatura Sobre a Desacetilação de Beta-Quitina

A importância da amplitude de irradiação de ultra-som e da temperatura sobre a desacetilação de beta-quitina pode ser avaliada analisando os dados da Tabela 8 e a Figura 33 e Figura 34.

Tabela 8 - Valores de grau médio de acetilação ($\overline{GA}$), massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$) e de rendimento (R) das reações de obtenção das amostras do Conjunto II

Amostra	$\overline{GA}(\%)$	$\overline{M}_v \times 10^{-5} \text{ (g/mol)}$	R (%)
QAb_30_50	25,4	4,52	85,0
QAb_30_60	6,2	4,79	77,0
QAb_30_70	9,4	6,83	75,5
QAb_30_80	12,4	6,03	85,4
QAI_30_50	21,1	6,85	76,0
QAI_30_60	22,7	7,19	78,0
QAI_30_70	17,1	6,13	75,0
QAI_30_80	12,2	6,12	79,0
QAa_30_50	14,1	7,08	78,0
QAa_30_60	8,2	6,37	80,0
QAa_30_70	7,2	6,63	75,0
QAa_30_80	9,5	4,48	74,0

De acordo com os dados da Tabela 8, a temperatura exerce importante influência sobre a reação de desacetilação de beta-quitina assistida por ultra-som, afetando as características estruturais das quitosanas obtidas e o rendimento da reação. De fato, tais dados revelam que a escolha adequada da temperatura permite a obtenção de quitosanas com baixos graus médios de acetilação e com massas molares médias viscosimétricas e rendimentos elevados.

Assim, analisando a variação de $\overline{GA}$ em função da amplitude de irradiação e da temperatura da reação (Figura 33), é constatado que uma vez fixada a amplitude de irradiação o aumento da temperatura tende inicialmente a favorecer a desacetilação de beta-quitina, porém a variação de $\overline{GA}$ é menor quanto maior a temperatura, exceto no caso da amplitude intermediária (A_i) de irradiação. Também pode ser constatada a tendência de aumento de $\overline{GA}$ com o aumento da temperatura no intervalo 60°-80°C, exceto no caso da amplitude intermediária (A_i) de irradiação.

Figura 33 - Variação do grau médio de acetilação das amostras do Conjunto II em função da amplitude de irradiação e da temperatura da reação.

Figura 34 - Variação da massa molar média viscosimétrica das amostras do Conjunto II em função da amplitude de irradiação e da temperatura da reação.

Relativamente à variação de $\overline{M}_v$ em função da amplitude de irradiação e da temperatura da reação (Figura 34) não parece haver uma correlação simples entre as condições reacionais e as características das quitosanas obtidas, embora seja constatada a tendência de diminuição de $\overline{M}_v$ com o aumento da temperatura quando as amplitudes de irradiação intermediária e a mais elevada foram empregadas. Levando em consideração as variações tanto de $\overline{GA}$ como de $\overline{M}_v$ em função da amplitude de irradiação e da temperatura da reação, pode ser constatado que a reação de desacetilação de beta-quitina assistida por irradiação de ultra-som de alta intensidade não é favorecida e amostras com massa molar média viscosimétrica elevada não são obtidas até que uma temperatura crítica ($\geq 60^\circ\text{C}$) seja atingida (Tabela 9).

Tabela 9 - Intervalos de temperatura da reação de desacetilação de beta-quitina que favoreceram a obtenção das quitosanas mais desacetiladas e com maior $\overline{M}_v$ em função da amplitude de irradiação

Amostra	Faixa de Temperatura ($^\circ\text{C}$)	
	Menor $\overline{GA}$	Maior $\overline{M}_v$
QAb_30	60-70	70-80
QAi_30	70-80	50-60
QAa_30	60-80	50-70

O emprego de cromatografia de exclusão por tamanho (CET) permitiu a determinação dos valores de massas molares médias ponderal ($\overline{M}_w$) e numérica ($\overline{M}_n$) das amostras obtidas por desacetilação de beta-quitina assistida por irradiação de ultra-som (Tabela 10).

Tabela 10 - Resultados das análises das amostras do Conjunto II por CET

Amostra	$\overline{GA}$ (%)	$\overline{M}_w \times 10^{-6}$ (g/mol)	$\overline{M}_n \times 10^{-5}$ (g/mol)	$\overline{M}_w / \overline{M}_n$
QAb_30_50	25,4	2,91	6,17	4,7
QAb_30_60	6,2	1,28	4,16	3,1
QAb_30_70	9,4	2,00	4,54	4,4
QAb_30_80	12,4	1,97	4,75	4,1
QAI_30_50	21,1	2,30	5,24	4,4
QAI_30_60	22,7	2,17	3,01	7,2
QAI_30_70	17,1	2,09	4,96	4,2
QAI_30_80	12,2	1,88	3,19	5,9
QAa_30_50	14,1	2,25	4,39	5,1
QAa_30_60	8,2	1,84	3,79	4,9
QAa_30_70	7,2	1,95	4,58	4,3
QAa_30_80	9,5	1,55	2,88	5,4

Inicialmente é importante ressaltar que todas as amostras do Conjunto II apresentaram curvas como aquela mostrada na Figura 35, com dois picos principais, e que os valores de massa molar média expressos na Tabela 10 correspondem aos resultados do tratamento dos dados do pico 1. Também nesses casos uma fração do pico 1, correspondente ao produto de

maior massa molar e considerado o mais importante já que o objetivo do experimento é produzir um polímero, a quitosana, extrapola o limite da curva de calibração das colunas cromatográficas. Conforme mostrado na Figura 36, essa fração (Mexc) é maior quando a reação é executada a 50°C e tende a diminuir com o aumento da temperatura, independentemente da amplitude de irradiação. Além disso, em comparação com as amostras do Conjunto I (Figura 29), as amostras do Conjunto II apresentam valores de Mexc inferiores.

Figura 35 - Cromatograma típico para o Conjunto II, representado pela amostra QAb_30_60.

Figura 36 - Porcentagens das curvas CET das amostras do Conjunto II acima do limite da curva de calibração (Mexc) em função da amplitude de irradiação e da temperatura.

O pico 2, que está presente em todas as amostras do Conjunto II, exceto na amostra QAa_30_50, ocorre em um intervalo de tempo de retenção além do extremo inferior da curva de calibração e corresponde a produtos de baixa massa molar (BMM), incluindo oligômeros cujo grau médio de polimerização não pode ser estimado no sistema cromatográfico empregado nessas análises. A dependência da porcentagem da fração BMM com a temperatura indica a ocorrência de um máximo que varia em função da amplitude de irradiação (Figura 37).

Figura 37 - Porcentagens das curvas CET das amostras do Conjunto II abaixo do limite da curva de calibração (BBM) em função da amplitude de irradiação e da temperatura.

Também pode ser constatado que esses máximos de BMM correspondem aos menores valores de $\overline{M}_w$ (amostras QAb_30_60, QAi_30_80 e QAa_30_80 da Tabela 10) e que o decaimento exponencial de ordem um se ajusta à variação observada (Figura 38).

Figura 38 - Correlação entre os maiores valores de BMM e $\overline{M}_w$ a partir das curvas CET das amostras

do Conjunto II.

A área sob o pico 2 indica a concentração dos oligômeros originados da despolimerização que ocorre concomitantemente à desacetilação, sendo que produtos de baixo grau médio de polimerização (GP), incluindo monômeros, dímeros e oligômeros com $GP < 6$, mesmo que tenham sido formados, muito provavelmente foram eliminados na etapa de isolamento das amostras. Assim, assumindo que a formação de produtos de baixa massa molar (BBM) ocorre como consequência da despolimerização das cadeias de quitosana, é proposto o seguinte mecanismo para explicar a sua relação com a temperatura e a amplitude de irradiação: 1) quando a reação ocorre a 50°C a fração BMM é pouco importante independentemente da amplitude de irradiação, pois a despolimerização não é favorecida nessas condições e quanto maior a amplitude de irradiação menor a fração BMM, pois os produtos formados nesse caso tendem a ter baixo GP e são eliminados; 2) quando a reação ocorre a 60°C a despolimerização é mais importante e a fração BMM é maior no caso em que baixa amplitude de irradiação é aplicada, pois a maior parte dos oligômeros não sofre degradação tão acentuada nessa condição quanto a que ocorre na mesma temperatura mas aplicando as amplitudes de irradiação mais elevadas; 3) quando a reação ocorre a 70° e 80°C a despolimerização é ainda mais importante e nos casos em que as amplitudes de irradiação intermediária e elevada são aplicadas isso se traduz na produção de maior quantidade de oligômeros com GP mais elevado e que não são completamente eliminados durante o isolamento da amostra.

Os valores de polidispersividade das amostras do Conjunto II, e que dizem respeito apenas ao pico 1 (Tabela 10), estão inseridos no intervalo $3 < \overline{M}_w / \overline{M}_n < 6$ (exceto a amostra QAi_30_60), o qual é aproximadamente o mesmo observado no caso das amostras do Conjunto I obtidas após o mesmo tempo de irradiação (30 minutos). As médias dos valores de $\overline{M}_w / \overline{M}_n$ das amostras do Conjunto II que foram obtidas pela aplicação das amplitudes de irradiação baixa e intermediária são muito próximas daqueles das amostras do Conjunto I

resultantes da aplicação das mesmas amplitudes de irradiação, e trinta minutos de irradiação. Entretanto, a média dos valores de $\overline{M_w} / \overline{M_n}$ das amostras do Conjunto II que foram obtidas pela aplicação da amplitude de irradiação mais elevada é superior aos valores das amostras do Conjunto I obtidas com a aplicação da mesma amplitude e trinta minutos de irradiação. Conforme mostrado na Figura 39, os valores de $\overline{M_w} / \overline{M_n}$ das amostras do Conjunto II tendem a ser maiores quanto maior a temperatura, mas a variação com a amplitude de irradiação não apresenta um padrão simples.

A influência da amplitude de irradiação e da temperatura sobre as massas molares médias das amostras do Conjunto II (análise restrita ao pico 1) é mostrada na Figura 40. Tais dados mostram a tendência de diminuição de $\overline{M_w}$ com aumento da temperatura e da amplitude de irradiação. Assim, a despolimerização foi favorecida pelo aumento da temperatura e da amplitude de irradiação.

Figura 39 - Variação da polidispersividade das amostras do Conjunto II em função da amplitude da irradiação e da temperatura.

Figura 40 - Variação da massa molar média ponderal das amostras do Conjunto II em função da amplitude da irradiação e da temperatura.

4.3 Considerações Finais

A eficiência da reação de desacetilação de beta-quitina assistida por ultra-som de alta intensidade deve ser avaliada em termos do conteúdo de grupos acetamida e da massa molar média da quitosana obtida, e também do rendimento, do tempo e da energia despendida na obtenção do produto. Assim, inicialmente é muito importante destacar que o processo estudado neste trabalho é mais eficiente do que aqueles já descritos na literatura, e empregados em indústrias e laboratórios de pesquisa, pois produz quitosanas mais desacetiladas e de massa molar mais elevada com rendimentos comparáveis, mas em tempos mais curtos e temperaturas mais baixas. Adicionalmente, é também muito importante compreender como os parâmetros do processamento por irradiação de ultra-som de alta intensidade afetam a eficiência do processo estudado.

Conforme mencionado anteriormente ⁽⁴³⁾, a irradiação de meios líquidos com ultra-som de alta intensidade pode resultar na ocorrência da cavitação, a qual produz intenso aquecimento local ($\approx 5000\text{K}$), pressões elevadas ($\approx 2000\text{atm}$), taxas elevadas ($>10^9\text{K/s}$) de aquecimento e resfriamento, e na formação de jatos de líquidos muito acelerados. O impacto da cavitação durante o processamento de suspensões depende da intensidade superficial (I [W/mm^2]), definida como a potência liberada por área superficial (S) do sonotrodo, a qual depende da amplitude da irradiação (A), da pressão (P), do volume do reator (V_r), da viscosidade do meio (η [cP]) e da temperatura (T [$^\circ\text{C}$]). A intensidade superficial (I) é tanto maior quanto maiores a amplitude da irradiação, a pressão e a viscosidade, mas é menor quanto maior o volume do reator e a temperatura. A potência total liberada pelo sonotrodo (P_T [W]) é o produto da intensidade superficial (I) e da área superficial (S), e o resultado do processamento da suspensão com irradiação de ultra-som é uma função direta da energia liberada (E) por volume processado, sendo a energia liberada (E) o produto da potência total liberada pelo sonotrodo (P_T) e do tempo de irradiação (t).

Os experimentos de irradiação de suspensões de beta-quitina em solução aquosa de NaOH 40% foram executados com: i) variação de amplitude e tempo de irradiação, gerando as quitosanas do Conjunto I, e ii) variação de amplitude de irradiação e temperatura de processamento, gerando as quitosanas do Conjunto II. Em todos os experimentos foram empregados o mesmo sonotrodo (a área superficial é constante) e o mesmo reator (aberto, e portanto a pressão é constante, assim como o volume do reator), sendo também constantes o volume processado de suspensão e a viscosidade da suspensão. Nos experimentos que geraram as amostras do Conjunto I a energia liberada (E) aumentou com o aumento da amplitude (A) e do tempo de irradiação (t), enquanto que naqueles que geraram as amostras do Conjunto II a energia liberada (E) aumentou com o aumento da amplitude (A), sendo o tempo de irradiação fixado em 30 minutos. A temperatura da suspensão de beta-quitina não

foi controlada durante os processamentos que resultaram nas amostras do Conjunto I, e em todos esses experimentos aumentou desde a temperatura ambiente ($\approx 25^{\circ}\text{C}$) até aproximadamente 90°C nos primeiros 5 minutos de experimento, se mantendo constante até o final do experimento. Por outro lado, durante a execução dos experimentos que resultaram nas amostras do Conjunto II a temperatura foi mantida constante.

A variação de eficiência dos processamentos executados para produzir as amostras do Conjunto I pode ser relacionada diretamente à energia total fornecida em cada caso, sendo evidenciado nas discussões anteriores que as diminuições de grau médio de acetilação ($\overline{GA}$), massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$) e rendimento do processo (R) acompanham o aumento da energia total liberada à medida que a amplitude e o tempo da irradiação aumentaram. Entretanto, é importante destacar que a queda de $\overline{M}_v$, atribuída à ocorrência de clivagem de ligações glicosídicas que unem as unidades repetitivas nas cadeias poliméricas, deve ser associada tanto ao aumento da energia total liberada pela irradiação de ultra-som de alta intensidade e, portanto ao impacto da cavitação, como também ao favorecimento da despolimerização por hidrólise, mais acentuada quanto maior a temperatura e o tempo de reação.

No que diz respeito aos processamentos executados para produzir as amostras do Conjunto II, as tendências gerais são semelhantes às aquelas observadas no Conjunto I no que diz respeito ao efeito da amplitude da irradiação, porém são constatadas variações de $\overline{GA}$ e $\overline{M}_v$ mais complexas que sugerem a ocorrência de combinações mais favoráveis de amplitude de irradiação e de temperatura para a produção de quitosanas mais desacetiladas e de massas molares elevadas. Assim, nesses casos é necessário considerar os efeitos da temperatura sobre a cavitação e sobre a reação de hidrólise das ligações glicosídicas. Assim, os resultados indicam haver um intervalo de temperatura ($60\text{-}80^{\circ}\text{C}$) que favorece a ocorrência da

desacetilação, porém a despolimerização é favorecida se a temperatura for superior a 70°C. Adicionalmente, nesses experimentos foi constatada a produção de oligômeros e outros produtos de baixa massa molar, diminuindo a eficiência do processamento em termos da produção de quitosana, cuja quantidade é mais importante quanto maior a amplitude da irradiação e a temperatura do processamento. Apesar disso, os resultados desses experimentos mostram que são produzidas quitosanas de massas molares mais elevadas que aquelas do Conjunto I, e com graus médios de acetilação comparáveis. Adicionalmente, tais resultados indicam um novo caminho de investigação, voltado para o estudo de produção de oligômeros de quitosana por irradiação de suspensões de beta-quitina em solução aquosa de NaOH 40% com ultra-som de alta intensidade.

De maneira geral, deve ser concluído que o processo de desacetilação de beta-quitina assistida por irradiação de ultra-som de alta intensidade apresenta potencial para ainda ser otimizado e se constituir em um processo de produção industrial de quitosanas com características controladas através do controle dos parâmetros do processamento. Também deve ser ressaltada a necessidade de desenvolvimento de estudos que contribuam para aumentar a compreensão acerca dos mecanismos envolvidos no processo tanto em termos da cinética como dos aspectos termodinâmicos da reação.

Assim, a otimização do processo de desacetilação de beta-quitina assistida por irradiação de ultra-som de alta intensidade deve considerar a continuidade do estudo aqui descrito e a investigação dos efeitos da pressão em reatores fechados, propiciando também o melhor controle da temperatura e da taxa de evaporação de água. Por outro lado, o estudo dos efeitos da irradiação de ultra-som de alta intensidade sobre a morfologia das partículas de beta-quitina em suspensão de solução aquosa de NaOH 40% e sobre a cinética da reação de desacetilação devem contribuir para esclarecer os mecanismos que levam a aumentar a eficiência do processo.

5 Conclusões

A utilização do ultra-som de alta intensidade na reação de desacetilação de beta-quitina, colocou em evidência uma nova tecnologia para a obtenção de quitosanas. O uso do ultra-som de alta intensidade apresenta um grande diferencial, quando comparado com outras metodologias apresentadas na literatura. As amostras de quitosana, obtidas com o auxílio do ultra-som de alta intensidade, apresentaram um baixo grau médio de acetilação ($\overline{GA} < 10\%$) e elevada massa mola média ($\overline{M}_v > 7,0 \times 10^5$). A produção de quitosanas com essas características é de grande interesse para a indústria e para os pesquisadores que trabalham com esse biopolímero.

A energia total liberada durante o processamento das suspensões de beta-quitina com irradiação de ultra-som de alta intensidade afeta diretamente a eficiência do processo de desacetilação do polímero e as características estruturais das quitosanas obtidas. Assim, quitosanas mais desacetiladas, porém de menor massa molar, são obtidas quando o processo emprega amplitudes de irradiação intermediária e alta e processamentos mais prolongados. Os efeitos da temperatura de processamento afetam diretamente o impacto da cavitação e também a ocorrência de hidrólise das ligações glicosídicas, sendo nesse caso muito importante determinar a combinação correta de parâmetros de processamento de maneira a obter o resultado desejado. De maneira geral e para processamentos curtos (até 30 minutos), temperaturas de processamento no intervalo 60-70°C favorecem a reação de desacetilação e minimizam a ocorrência de despolimerização. Nesse intervalo de temperatura é preferível empregar amplitude da irradiação intermediária ou elevada, minimizando a produção de oligômeros e produtos de baixa massa molar.

REFERÊNCIAS

- 1 AGULLÓ, E.; PENICHE, C.; TAPIA, C.; HERAS, Á.; ROMÁN, J. S.; ARGÜLLES, W.; GOYCOOLEA, F.; MAYORGA, A.; NAKAMATSU, J.; ABRAM, A. P. **Quitina y Quitosano**: obtención, caracterización y aplicaciones. Perú: Pontificia Universidad Católica Del Perú/ Fondo Editorial, 2004. 312 p.
- 2 ROBERTS, G. A. F. **Chitin chemistry**. London: Mc Millan Press, 1992. 350 p.
- 3 ÁVILA, A. O. S.; CARNEIRO, M. H.; MENDONÇA, J. T.; SERVO, G. J. M.; BASTOS, G. C. C.; OKUBO, S. S.; BATISTA, P. A. **Produção pesqueira marinha do Estado de São Paulo no ano de 2004**. Relatório Técnico, São Paulo, n. 20, 2005. Disponível em: <ftp://ftp.sp.gov.br/ftp pesca/20_serreltec.pdf>. Acesso em: 08 jan.09.
- 4 SPILLERE, L. C.; BEAUMORD, A. C. Formulação de uma hipótese global de situação de impacto para o parque industrial pesqueiro instalado em Itajaí e Navegantes – SC. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 11, n. 4, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/esa/v11n4/a11v11n4.pdf>>. Acesso em: 01 fev. 09.
- 5 KOIDE, S. S. Chitin-chitosan: properties, benefits and risks. **Nutrition Research**, v. 18, n. 6, p. 1091-1101, 1998.
- 6 SASHIWA, H.; AIBA, S. Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 29, p. 887-908, 2004.
- 7 KHOR, E.; LIM, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**, v. 24, p. 2339-2349, 2003.
- 8 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, p. 145-171, 2003.
- 9 MAJETI, N. V. KUMAR, R. A. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Funcional Polymers**, v. 46, p. 1-27, 2000.
- 10 KURITA, K. Chemistry and application of chitin and chitosan. **Polymer Degradation and Stability**, v. 46, p. 117-120, 1998.
- 11 RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 603-632, 2006.
- 12 PRASHANTH, H. K. V.; THARANATHAN, R. N. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential - an overview. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 117-131, 2007.
- 13 DEVLIEGHERE, F.; VERMEULEN, A.; DEBEVERE, J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. **Food Microbiology**, v. 21, p. 703-714, 2004.

- 14 KUMAR, M. N.; MUZZARELLI, R. A.; MUZZARELLI, C.; SASHIWA, H.; DOMB, A. J. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. **Chemical Reviews**, v. 104, p. 6017-6084, 2004.
- 15 ŞENEL, S.; MCCLURE, S. J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 1467– 1480, 2004.
- 16 MINKE, R.; BLACKWELL, J. The structure of α -chitin. **Journal of Molecular Biology**, v. 120, n. 2, p. 167-181, 1978.
- 17 GARDNER, K. H.; BLACKWELL, J. Refinement of structure of β -chitin. **Biopolymers**, v. 14, n. 8, p. 1581-1595, 1975.
- 18 KURITA, K.; TOMITA, K.; ISHI, S.; NISHIMURA, S. I.; SHIMODA, K. β -chitin as a convenient starting material for acetolysis for efficient preparation of *N*-acetylchitooligosaccharides. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 31, p. 2393-2395, 1993.
- 19 KURITA, K.; ISHII, S.; TOMITA, K.; NISHIMURA, S. I.; SHIMODA, K. J. Reactivity characteristics of squid β -chitin as compared with those of shrimp chitin: High potentials of squid chitin as a starting material for facile chemical modifications. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 32, p. 1027-1032, 1994.
- 20 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.
- 21 LAMARQUE, G.; VITON, C.; DOMARD, A. Comparative Study of the Second and Third Heterogeneous Deacetylations of α - and β -Chitins in a Multistep Process. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 1899-1907, 2004.
- 22 LAVAL, R. L. **Estudos de Obtenção, Desacetilação e Caracterização Físico-Química de β -Quitina dos Gládios de Lulas do Gênero *Ioligo***. 2003. 151 f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) - Departamento de Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.
- 23 SAITO, Y.; PUTAUX, J. L.; OKANO, T.; GAILL, F.; CHANZY, H. Structural aspects of the swelling of β -chitin in HCl and its conversion into α -chitin. **Macromolecules**, v. 30, p. 3867-3873, 1997.
- 24 SAITO, Y.; OKANO, T.; GAILL, F.; CHANZY, H.; PUTAUX, J. L. Structural data on the intra-crystalline swelling of β -chitin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 28, p. 81-88, 2000.
- 25 CAMPANA FILHO, S. P.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R. L. Extração, estruturas e Propriedades de α - e β -quitina. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 644-650, 2007.
Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v30n3/25.pdf>>. Acesso em: 23 jan. 09.

- 26 CAMPANA FILHO, S. P.; CAVALHEIRO, É. T. G.; SANTOS, J. E.; SOARES, J. P.; DOCKAL E. R. Caracterização de Quitosanas Comerciais de Diferentes Origens. **Polímeros: Ciências e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/po/v13n4/19880.pdf>>. Acesso em: 23 jan. 09.
- 27 SIGNINI, R.; DESBRIÈRES, J.; CAMPANA FILHO, S. P. On the stiffness of chitosan hydrochloride in acid-free aqueous solutions. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, p. 351-357, 2000.
- 28 SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S. P. On the preparation and characterization of chitosan hydrochloride. **Polymer Bulletin**, v. 42, p. 159-166, 1999. Disponível em: <<http://springerlink.metapress.com/content/u99yf9ycqcpb3y2/fulltext.pdf>>. Acesso em: 23 jan. 09.
- 29 BRUGNEROTTO, J.; LIZARDI, J.; GOYCOOLEA, F. M.; ARGUÈELLES-MONAL, W.; DESBRIÈRES, J.; RINAUDO, M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. **Polymer**, v. 42, p. 3569-3580, 2001.
- 30 LAVALL, R. L.; ASSIS, B. G. O.; CAMPANA FILHO S. P. β -Chitin from the pens of *Loligo sp.*: Extraction and characterization. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2465-2472, 2007.
- 31 CHEN, C.; WANG, F.; OU, Z. Deacetylation of β -Chitin. I. Influence of the Deacetylation Conditions. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 93, p. 2416-2422, 2004.
- 32 CAMPANA FILHO, S. P.; SIGNINI, R. Efeito de Aditivos na Desacetilação de Quitina. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, p. 169-173, 2001.
- 33 SANNAN, T.; KURITA, K.; IWAKURA, Y. Studies on chitin, 2. Effect of deacetylation on solubility. **Die Makromolekulare Chemie**, v. 176, p. 3589-3600, 1975.
- 34 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.
- 35 FOCHER, B.; BELTRAME, P. L.; NAGGI, A.; TORRI, G. Alkaline N-deacetylation of chitin enhanced by flash treatments. reaction kinetics and structure modifications. **Carbohydrate Polymer**, v. 12, p. 405-418, 1990.
- 36 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. Disponível em: <<http://springerlink.metapress.com/content/puxhuudumgb5c25v/fulltext.pdf>>. Acesso em: 23 jan. 09.
- 37 GOYCOOLEA, F. M.; HIGUERA-CIAPARA, I.; HERNÁNDEZ, G.; LIZARDI, J.; GARCIA, K. D. Preparation of chitosan from quid (*Loligo spp.*) pen by microwave-accelerated thermochemical process. In: DOMARD, A.; ROBERTS, G. A. F.; VÅRUM, K. M. (Eds.). **Advances in chitin science**. Lyon: Jacques Andre publisher, 1998. v. 2, p. 78-83.

- 38 CAMPANA FILHO, S. P.; SIGNINI, R. Effects of additives and inert gas bubbling on the deacetylation of chitosan. **International Journal of Polymeric Materials**, v. 51, p. 701-709, 2002.
- 39 ROBERTS, G. A.; 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.
- 40 LAMARQUE, G.; CRETENET, M.; VITON, C.; DOMARD, A. New route for deacetylation of α - and β -chitins by means of freeze-pump out-thaw cycles. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 1380-1388, 2005.
- 41 LAMARQUE, G.; CHAUSSARD, G.; DOMARD, A. Thermodynamic aspects of the heterogeneous deacetylation of β -chitin: Reaction mechanisms. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 1942-1950, 2007.
- 42 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. cap. 1, p. 1-18.
- 43 MASON, T. J. Ultrasound in synthetic organic chemistry. **Chemical Society Reviews**, v. 26, p. 443-451, 1997.
- 44 SUSLICK, K. S.; HAMMERTON, D.A.; CLINE JUNIOR, R. E. The sonochemical hot spot. **Journal of the American Chemical Society**, v. 108, p. 5641-5642, 1986.
- 45 PETERS, D. Ultrasound in material chemistry. **Journal of Materials Chemistry**, v. 6, n. 10, p. 1605-1618, 1996.
- 46 PRICE, G. J. Ultrasonically enhanced polymer synthesis. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 3, p. 229-238, 1996.
- 47 CARDOSO, M. B. **Estudo dos efeitos da irradiação de quitina com ultra-som sobre sua desacetilação** 2003. 67 f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) - Departamento de Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.
- 48 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.
- 49 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.
- 50 BISKUPA, R.C.; ROKITAA, B.; LOTFY, S.; ULANSKIA, P.; ROSIAK, J. M. Degradation of chitosan and starch by 360-kHz ultrasound. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p. 175-184, 2005.
- 51 CARDOSO, M. B. **Contribuição ao estudo da reação de desacetilação de quitina: Estudos da desacetilação assistida por ultra-som de alta potência**. 2008. 96 f. Tese (Doutorado em Físico-Química) - Departamento de Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

- 52 KURITA, K.; NISHIMURA, S. I.; ISHII, S.; TOMITA, K.; TADA, T.; SHIMODA, K. Characteristic properties of squid chitin. In: BRINE, C. J.; SANDFORD, P. A.; ZIKAKIS, J. P. (Ed.). **Advances in chitin and chitosan**. London: Elsevier Applied Science, 1992. p. 188-195.
- 53 CHAUSSARD, G.; DOMARD, A. New Aspects of the Extraction of Chitin from Squid Pens. **Biomacromolecules**, p. 559-564, 2004.
- 54 DIAS, F. C. **Uso do software image j para análise quantitativa de imagens de microestruturas de materiais**. 2008. 148 f. Dissertação (Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia) - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São José dos Campos, 2008.
- 55 HUGGINS, M. L. Theory of Solutions of High Polymers. **Journal American Chemistry Society**, v. 64, p. 1712-1719, 1942.
- 56 SLADE JUNIOR, P. E. Polymer molecular weights. Part II. In: SLADE JUNIOR, P. E.; JENKINS, L. T. (Eds.). **Techniques and methods of polymer evaluation**. New York: Marcel Dekker, 1975. 592p.
- 57 SEYMOR, R. B. **Polymer chemistry**. New York: Marcel Dekker, 1988. 690p.
- 58 FLORY, P. J. **Principles of polymer chemistry**. New York: Cornell University Press, 1953. 672p.
- 59 RINAUDO, M.; MILAS, M.; LÊ 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.
- 60 SIGNINI, R. **Estudos das relações estruturas/propriedades de quitina e quitosana**. 2002. 168 f. Tese (Doutorado em Físico-Química) - Departamento de Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.
- 61 CANEVAROLO JÚNIOR, S. V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber Editora, 2004. cap. 6.
- 62 MUZZARELLI, R. A. A.; ROCHETTI, R.; STANIC, V.; WECKX, M. Methods for the determination of the degree of acetylation of chitin and chitosan. In: MUZZARELLI, R.A.A.; PETER, M.G. (Eds.). **Chitin handbook**. Ancona: European Chitin Society, Italy, 1997. p. 109-119.
- 63 SIGNINI, R. **Estudos de obtenção, purificação e caracterização de quitosana**. 110f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1998.
- 64 TANG, E. S. K.; HUANG, M. LIM, L. Y. Ultrasonication of chitosan and chitosan nanoparticles. **International Journal Pharmaceutics**, v. 265, p. 103-114, 2003.
- 65 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.

66 PEARSON, F. G.; MARCHESSAULT, R. H.; LIANG, C. Y. Infrared spectra of crystalline polysaccharides. V. Chitin. **Journal of Polymer Science**, v. 43, n. 141, p. 101-116, 1960.

67 MUZZARELLI, R. A. A. Chitin. In: ASPINAL, G. O. (Ed.). **The Polysaccharides**. New York: Academic Press, 1985. v. 3. p. 417-450.

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 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.