VIRGÍNIA DE ALENCAR MUNIZ GONZAGA

Desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade aplicada a quitinas extraídas de gládios de lulas

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

Área de concentração: Físico-Química.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana Filho.

São Carlos
2012

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 Família, em especial aos meus pais, **Raquel e Jorge**, minha irmã **Raquel** e meu afilhado **Luis Eduardo** pelo amor incondicional, apoio e incentivo. Aos meus colegas Anderson, Jorge e Tonimar, por me ajudarem muito nesse percurso.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana Filho, pela orientação e confiança.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela bolsa concedida.

Ao Instituto de Química de São Carlos, pela infraestrutura oferecida.

Aos colegas de laboratório, Adriana, Anderson, Daniella, Jorge, Lilian, Tonimar, pela amizade, descontração, apoio e estímulo.

Aos colegas do Grupo de Materiais Macromoleculares e Fibras Lignocelulósicas, Joice, Cristina, Elaine, Talita, Érika, Rachel, Bruno, Fernando e Daiana, por compartilharem os momentos de descontração, pelas conversas e pelo companheirismo.

Aos Técnicos, André, Luiz Antônio e Márcio pelo auxílio na realização das análises.

À querida colega Daniele Soares e seu orientador Prof. Dr. Roy Edwards Bruns, pela ajuda nos resultados de quimiometria.

Aos meus colegas de pós-graduação, Amanda, Emmanuela, Leandro, Kariny, Suzy, Anderson e Peter, pela ajuda direta ou indireta na realização deste trabalho e pelos momentos alegres.

Aos meus queridos amigos: Priscilla, Thatiane, Sara, Fabyana, Ricardo, Fabiano, Wolmar, Pedro Henrique, Daniella, Glenda, Joice, Brunno, Fernanda, Carla e Guedmiller pela compreensão, carinho e principalmente amizade.

Aos meus pais, Jorge e Raquel, por sempre estarem ao meu lado com a maior dedicação e amor e por me ajudarem sempre a superar todos os problemas que surgem. À minha irmã, Raquel, por existir em minha vida tornando-a mais feliz. Ao meu afilhado Luis Eduardo e ao meu cunhado Luis.

Á todos os meus familiares, em especial minhas duas avós, Yves e Ignês, por sempre me incentivarem e me darem estímulo para querer crescer e por serem maravilhosas.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

“Porque ter a mente boa não é o bastante; o principal é aplicá-la bem. As maiores almas são capazes tanto das maiores virtudes quanto dos maiores vícios, e aqueles que marcham lentamente podem alcançar muito mais, se seguirem o caminho certo, do que os que correm porém dele se afastam.”

Descartes

RESUMO

Neste trabalho, amostras de beta-quitina extraída de gládios de lulas foram submetidas ao processo DAIUS, desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade, visando à produção de quitosanas extensivamente desacetiladas e de massa molar elevada. Para isso, os parâmetros do processo, a saber, diâmetro do reator, tempo de pulsação da irradiação do ultrassom e tempo de pré-condicionamento visando o intumescimento das partículas de beta-quitina, foram variados utilizando um planejamento fatorial fracionário (2^{3-1}). Desse planejamento resultou a execução de quatro experimentos e a triplicata do ponto central. A beta-quitina de partida e as quitosanas obtidas foram caracterizadas por espectroscopia de RMN ^1H , espectroscopia da região do infravermelho, difração de raios X, viscosimetria capilar, microscopia eletrônica de varredura e termogravimetria. O parâmetro de acetilação (PA) das quitosanas obtidas foi determinado a partir dos espectros de RMN ^1H de modo a permitir a avaliação do tipo de distribuição das unidades GlcNAc e GlcN predominante nas cadeias. As quitosanas apresentaram parâmetro de acetilação variando no intervalo $0,61 < \text{PA} < 0,82$, indicando o predomínio da distribuição randômica das unidades GlcNAc e GlcN. A determinação da solubilidade das quitosanas foi baseada na turbidez de suas soluções, sendo todas solúveis em $\text{pH} < 5$, exceto a amostra QT2 que foi insolúvel. A beta-quitina apresentou maior estabilidade térmica em comparação com as quitosanas, devido à maior porcentagem de unidades GlcNAc nas suas cadeias. As características morfológicas da beta-quitina e das quitosanas foram determinadas pelo emprego da microscopia eletrônica de varredura, foi observado que as partículas das quitosanas apresentaram certa rugosidade aparente devido à ocorrência de um acentuado processo de descamação da superfície do polímero. A partir dos espectros no infravermelho foi possível identificar e diferenciar as bandas características, tanto da beta-quitina quanto das quitosanas. Os valores de grau médio de acetilação e de massa molar viscosimétrica média das amostras de quitosana variaram nos intervalos $42\% < \overline{GA} < 62\%$ e $1,25 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1} < \overline{M}_v < 2,93 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$, respectivamente. Esses resultados revelam que o processo DAIUS foi eficiente na conversão de beta-quitina em quitosana, e que foram produzidas quitosanas com elevada massa molar viscosimétrica média, entretanto o intervalo de variação dos parâmetros do processo não resultou em variação importante do grau médio de acetilação das quitosanas produzidas.

Palavras-chave: Beta-quitina; desacetilação; ultrassom; quitosana.

ABSTRACT

In this project, β -chitin samples extracted from squid pens were submitted to the USAD, ultrasound assisted deacetylation process aiming the production of extensively deacetylated high molar mass chitosans. For that process parameters, as, diameter of the reactor, ultrasound irradiation pulsing time and pre-conditioning time seeking the swelling of the β -chitin particles, they have been varied using a fractional factorial design (2^{3-1}). From this design resulted the performance of four experiments and the central point triplicate. The β -chitin pattern and the obtained chitosans were characterized by ^1H NMR spectroscopy, infrared spectroscopy, X-ray diffraction, capillary viscometry, scanning electron microscopy and thermogravimetry. The parameter of acetylation (PA) of the obtained chitosans was determined from the ^1H NMR spectra, allowing the assessment to the distribution pattern of GlcNAc and GlcN units predominant in the chains. The chitosans presented parameter of acetylation ranging as $0,61 < \text{PA} < 0,82$, indicating the predominance of random distribution of GlcNAc and GlcN units. The determination of the chitosans solubility was based on the turbidity of its solutions, all being soluble in $\text{pH} < 5$, except for QT2 sample that was insoluble. The β -chitin showed higher thermal stability in comparison to the chitosans, probably due to the higher content of GlcNAc units in their chains. The morphological characteristics of β -chitin and chitosans were characterized by scanning electron microscopy, It was observed that the chitosans particles presented certain rugosity apparently due to the occurrence of a strong process of scaling of the polymer surface. From the infrared spectra it was possible to identify and to distinguish the characteristic bands either of the β -chitin as the chitosans. The values of the average degree of acetylation and viscosity average molar mass from the chitosans samples vary in the intervals $42\% < \overline{GA} < 62\%$ e $1,25 \times 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} < \overline{M}_v < 2,93 \times 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, respectively. These outcomes reveal that the USAD process was effective converting β -chitin in chitosan and there were generated chitosans with high viscosity average molar mass, however the process parameters variation interval did not result in an important average degree of acetylation variation from the generated chitosans.

Key words: β -chitin; deacetylation; ultrasound; chitosan.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da estrutura primária idealizada da quitina, em que n é o grau de polimerização.....	15
Figura 2 - Representação esquemática das estruturas polimórficas de quitina, sendo que as setas apresentam as cadeias poliméricas no sentido do terminal não-redutor para o redutor ^[5]	16
Figura 3 – Estrutura molecular e ligações hidrogênio de α -quitina ^[29]	17
Figura 4 – Estrutura molecular e ligações hidrogênio de β -quitina ^[29]	17
Figura 5 - Representação da estrutura primária idealizada da quitosana, em que n é o grau de polimerização.....	20
Figura 6 - Propagação do som no líquido e “demonstração” da formação e colapso das cavidades ^[38]	21
Figura 7 – Representação esquemática das sequências de unidades GlcN (●) e GlcNAc (■) em quitosana de $GA=50\%$: (a) distribuição em blocos ($PA=0$), (b) distribuição randômica ($PA=1$) e (c) distribuição alternada ($PA=2$) ^[56]	23
Figura 8 - Lula da espécie <i>Loligo sp.</i> , (a) com destaque para o gládio inserido na parte interna do molusco e (b) gládio retirado da lula.	26
Figura 9 – Esquema experimental empregado nas reações de desacetilação do processo DAIUS (a) 1) Ultrassom de Alta Intensidade; 2) sonotrodo e reator de vidro encamisado e 3) banho termostático. (b) em detalhe Ultrassom de Alta intensidade Hielscher, modelo UP400S.	27
Figura 10 - Ilustração característica dos anômeros alfa e beta dos hidrogênios H-1 das unidades acetiladas (a) anômero alfa (α -H-1-A) e (b) anômero beta (β -H-1-A).....	30
Figura 11 – Espectro de RMN 1H característico de beta-quitina ^[62]	30
Figura 12 – Espectro de RMN 1H característico de quitosana, onde $R = COCH_3$ ou $R = H$. ..	31
Figura 13 – Espectro de RMN 1H na região de ressonância dos hidrogênios da quitosana QT3 ($GA=42\%$).....	32
Figura 14 – Espectros da região do infravermelho de beta-quitina e da quitosana QT3.....	38
Figura 15 – Bandas características na região de $1800-1000\text{ cm}^{-1}$ dos espectros na região do infravermelho de beta-quitina e da quitosana QT3.	39
Figura 16 – Micrografias das amostras (a) beta-quitina e (b) QT3.	40
Figura 17 – Micrografias das amostras (a) beta-quitina e (b) QT3.	41
Figura 18– Difratoograma de beta-quitina e da quitosana QT3.	43
Figura 19 – Curvas TG/DTG de beta-quitina sob atmosfera dinâmica de ar sintético.	44
Figura 20 – Curvas TG/DTG da quitosana QT3 sob atmosfera dinâmica de ar sintético.....	44
Figura 21 - Curva de viscosidade reduzida <i>versus</i> concentração da quitosana QT3 em solução tampão ácido acético $0,3\text{ mol L}^{-1}$ / acetato de sódio $0,2\text{ mol L}^{-1}$ à temperatura de 25°C	46
Figura 22 – Espectro de RMN 1H (500MHz) de beta-quitina (DCI/D_2O 20%, 70°C).....	48
Figura 23- Espectro de RMN 1H (500MHz) da quitosana QT3 (DCI/D_2O 1%, 25°C).....	49
Figura 24 – Espectro de RMN 1H na região de ressonância dos hidrogênios anoméricos da quitosana QT3 ($GA = 42\%$).....	51
Figura 25 – Deconvolução do espectro de RMN 1H da quitosana QT3.....	52
Figura 26 – Relação entre PA e GA	53
Figura 27 – Espectro na região do infravermelho da amostra de beta-quitina.....	54
Figura 28 – Espectros na região do infravermelho das amostras QT1, QT2, QT3 e QT4.	54
Figura 29 – Espectros na região do infravermelho das amostras QT5/1, QT5/2 e QT5/3.	55
Figura 30 – Bandas características na região de $1800-1000\text{ cm}^{-1}$ dos espectros na região do infravermelho das amostras QT1, QT2, QT3 e QT4.....	55

Figura 31 - Bandas características na região de $1800\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ dos espectros na região do infravermelho das amostras QT5/1, QT5/2 e QT5/3.....	56
Figura 32 – Difratoograma da amostra de beta-quitina.....	57
Figura 33 – Difratoogramas das amostras QT1, QT2, QT3 e QT4.	58
Figura 34 – Difratoogramas das amostras QT5/1, QT5/2 e QT5/3.	58
Figura 35 – Curvas TG das quitosanas sob atmosfera dinâmica de ar sintético.	60
Figura 36 – Curvas DTG das quitosanas sob atmosfera dinâmica de ar sintético.....	61
Figura 37 – Curvas de viscosidade reduzida <i>versus</i> concentração das quitosanas em solução tampão ácido acético $0,3\text{ mol L}^{-1}$ /acetato de sódio $0,2\text{ mol L}^{-1}$ à temperatura de 25°C	63
Figura 38 – Gráfico de absorbância em $\lambda = 600\text{nm}$ versus grau médio de acetilação (GA) para as quitosanas.	65
Figura 39 – Gráfico de Pareto para os resultados referentes ao grau médio de acetilação (GA).	69
Figura 40 – Gráfico de Pareto para os resultados referentes à massa molar viscosimétrica média (Mv).....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composições químicas representativas de diversos tipos de resíduos que contém quitina ^[2]	19
Tabela 2 – Reagentes utilizados na realização dos experimentos	25
Tabela 3 – Variáveis estudadas no processo DAIUS e os valores de cada nível (-1, 0 e +1) ..	28
Tabela 4 – Níveis das variáveis estudadas em cada reação do processo DAIUS.....	28
Tabela 5 – Bandas de absorção e números de onda (ν cm ⁻¹) características de quitina e quitosana ^[60]	35
Tabela 6 – Valores de índice de cristalinidade (I_{cr})	43
Tabela 7 - Dados obtidos das curvas termogravimétricas de beta-quitina e quitosana QT3.....	45
Tabela 8 – Valores das constantes K' e α da equação de Mark-Houwink para diferentes graus médios de acetilação de beta-quitina e quitosana ^[12,66]	46
Tabela 9 – Valores de viscosidade intrínseca, massa molar viscosimétrica média e grau de polimerização das amostras	47
Tabela 10 – Valores de GA , PA e das frequências das díades (F_{AA} , F_{AD} e F_{DD}).....	52
Tabela 11– Ângulos de Bragg 2θ dos difratogramas das quitosanas	59
Tabela 12 – Valores de grau de acetilação (GA) e índice de cristalinidade (I_{cr}) das quitosanas	59
Tabela 13 - Dados obtidos das curvas termogravimétricas das quitosanas	61
Tabela 14 – Valores das constantes K' e α da equação de Mark-Houwink para diferentes graus médios de acetilação de quitosana ^[66]	63
Tabela 15 – Valores de viscosidade intrínseca $[\eta]$, massa molar viscosimétrica média (Mv), grau de polimerização (GP) e constante de Huggins (K_H) de beta-quitina e das quitosanas ...	64
Tabela 16 - Intervalos de variação dos parâmetros X_1 , X_2 e X_3	67
Tabela 17 - Resultados obtidos experimentalmente com base no planejamento fatorial fracionário.....	67
Tabela 18 - Resultados dos efeitos das três variáveis em função do GA	68
Tabela 19 - Resultados dos efeitos das três variáveis em função do Mv	69

LISTA DE SIGLAS

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

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

FPT – “freeze – pump out – thaw”;

PA – parâmetro de acetilação;

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

$\overline{GD}$ - grau médio de desacetilação;

DR – diâmetro do reator;

TP – tempo de pulsação de ultrassom;

PT – pré-tempo;

AA – (GlcNAc-GlcNAc);

DD - (GlcN-GlcN);

AD – (GlcNAc-GlcN);

DA – (GlcN-GlcNAc);

$[\eta]$ – viscosidade intrínseca;

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

GP – grau de polimerização;

DAIUS – desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade;

I_{cr} – índice de cristalinidade;

IV – espectroscopia na região do infravermelho;

TG – análise termogravimétrica;

DTG – análise termogravimétrica derivada;

MEV – microscopia eletrônica de varredura;

DRX – difração de raios X;

RMN 1H – espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio;

K_H – constante de Huggins.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Estruturas e propriedades de quitina.....	15
1.1.1 Estruturas polimórficas da quitina.....	15
1.2 Fontes e Processos de Obtenção de Quitina	18
1.3 Desacetilação da quitina para obtenção de quitosana.....	19
1.4 Utilização do Ultrassom de alta intensidade.....	20
1.5 Estruturas e propriedades da quitosana	22
2 OBJETIVOS	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1 Matéria-prima	25
3.2 Obtenção de beta-quitina	26
3.3 Desacetilação de beta-quitina assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade.....	26
4 CARACTERIZAÇÕES	29
4.1 Grau médio de acetilação (GA)	29
4.2 Parâmetro de acetilação (PA)	32
4.3 Determinação da massa molar média de quitina e quitosana por viscosimetria capilar.....	33
4.4 Espectroscopia de absorção no infravermelho	34
4.5 Difração de raios X.....	35
4.6 Estabilidade térmica	35
4.7 Microscopia eletrônica de varredura	36
4.8 Solubilidade.....	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 Caracterização de beta-quitina e quitosana	37
5.1.1 Espectroscopia vibracional na Região do Infravermelho	37
5.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	39
5.1.3 Difração de raios X.....	42
5.1.6 Termogravimetria	43
5.1.7 Massa molar viscosimétrica média.....	45
5.2 Estudos de desacetilação de quitosana	47
5.2.1 Grau médio de acetilação (GA)	48
5.2.2 Parâmetro de acetilação (PA)	50
5.2.3 Modos de vibração	53
5.2.4 Cristalinidade.....	56
5.2.5 Comportamento térmico.....	60

5.2.6 Massa molar viscosimétrica média.....	62
5.2.7 Solubilidade.....	65
6 Análise Fatorial Fracionária	66
6.1 Grau médio de acetilação (GA)	68
6.2 Massa molar viscosimétrica média (Mv)	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

1 INTRODUÇÃO

A partir de 1970, o interesse pela quitina e pela quitosana intensificou os estudos sobre as relações estruturas/propriedades destes polímeros e seus derivados, pois antes da década de 70 havia pouco conhecimento sobre suas propriedades, incluindo a reatividade química, limitando assim suas aplicações industriais^[1]

Atualmente, embora o conhecimento sobre as relações estruturas/propriedades e potenciais aplicações de quitina e quitosana tenha alcançado considerável avanço, a produção desses polímeros de maneira a assegurar a produtividade de características e propriedades e a suprir as demandas das pesquisas científicas e das indústrias continua a ser um importante desafio.

Há obstáculos a serem vencidos na produção de quitina, pois ela raramente ocorre em forma pura na natureza. São necessários investimentos em pesquisa para superar dificuldades em relação a seu grau de pureza e de como potencializar suas aplicações^[2].

A quitina é um dos biopolímeros mais abundantes na Terra, ao lado do amido, lignina e celulose^[3,4]. Assim, quitina pode ser extraída da biomassa a partir de matérias-primas abundantes e de custo relativamente baixo, principalmente os refugos da atividade pesqueira voltada para a exploração industrial de frutos do mar^[5].

As indústrias pesqueiras, no Brasil e no mundo, processam anualmente toneladas de espécies marinhas. De acordo com o Informe da Produção Pesqueira Marinha e Estuarina do Estado de São Paulo, em 2011, foram processadas 22.094,6 toneladas de diversas espécies marinhas^[6]. Parte importante dos resíduos gerados no processamento do pescado corresponde a cascas de camarões e caranguejos, ricos em quitina. O aproveitamento desses rejeitos para a obtenção de quitina vem despertando interesse em diferentes segmentos industriais, uma vez que sua produção reduz o impacto ambiental negativo gerado pelos descartes das indústrias pesqueiras. Além disso, o interesse comercial nas aplicações de quitina e de seus derivados aumentou vertiginosamente nas últimas três décadas^[7], sendo, a quitosana um dos principais focos de interesse, por ser um polímero muito versátil e sobre o qual existem atualmente diversos estudos sobre suas aplicações^[8-13]. A capacidade de interagir com variada gama de substâncias, tais como proteínas, lipídios, pesticidas, corantes, íons metálicos e radioisótopos, qualifica a utilização da quitosana para aplicações tanto na detecção e análise dessas substâncias como na sua concentração ou recuperação^[5].

A quitosana exibe atividade antimicrobiana e, devido a sua baixa toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade, tem grande potencial para aplicações na agricultura, medicina, odontologia e em formulações farmacêuticas^[2].

Nos laboratórios de pesquisa e nas indústrias, a reação para a conversão de quitina em quitosana é realizada geralmente em suspensão de solução aquosa de hidróxido de sódio, sendo que as variáveis, excesso de álcali, tempo e temperatura da reação dependem do procedimento adotado. 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^[1]. Ainda não é possível definir uma condição padronizada para a realização dessa reação, pois várias metodologias têm sido propostas para aumentar sua eficiência e minimizar a ocorrência de despolimerização^[14-21].

A execução de ciclos térmicos de congelamento à temperatura do nitrogênio líquido e aquecimento à temperatura ambiente, intercalados com sucção do reator com bomba de vácuo, procedimento definido no processo “freeze-pump out-thaw”, resulta em desacetilação eficiente e menor taxa de despolimerização^[22]. Também em 2009, Delezuk e colaboradores^[23] desenvolveram um novo processo para a obtenção de quitosana extensivamente desacetilada, denominado Processo DAIUS, o qual é definido como desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade. Os resultados deste trabalho mostram que o Processo DAIUS é mais eficiente que a maioria dos processos de desacetilação de quitina descritos na literatura, pois permite a preparação de quitosana extensivamente desacetilada, massa molecular elevada e baixa polidispersividade, pela execução de reação em tempos mais curtos e temperaturas mais baixas que as empregadas nos processos convencionais^[1]. O desenvolvimento de estudos para a adequação do Processo DAIUS é muito importante para conhecer as necessidades de ajustes do processo, visando à produção de quitosanas com características controladas, bem como a possível aplicação desse processo para a produção de quitosana em escala industrial.

O mercado mundial ainda não oferece quitina e quitosana com elevado grau de pureza a baixo custo, dadas as limitações relacionadas às suas aplicações, principalmente na área da medicina e da biotecnologia. As pesquisas, visando obtenção e padronização de metodologias que evidenciem suas características, estão evoluindo de maneira discreta. Muito depende da comunidade científica e industrial explorar as inúmeras possibilidades estruturais que esses polímeros oferecem. Para ampliar a atuação de quitina e quitosana no segmento dos

biopolímeros, é preciso encarar como sendo de extrema prioridade para a ciência e para indústria desenvolver métodos que melhorem a qualidade dos produtos^[24].

Um bom estímulo para desenvolver estudos sempre mais aprofundados que possibilitem melhorar o entendimento das relações estruturas/propriedades de quitina e quitosana e seus derivados pode ser a exploração de recursos naturais renováveis e de custo relativamente baixo^[5].

1.1 Estruturas e propriedades de quitina

A quitina (Figura 1) é um polissacarídeo de cadeia linear, constituído por unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose (GlcNAc) unidas por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$.

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

A quitina raramente ocorre como composição única, devido ao fato de ser um produto natural. Assim, ocorrem variações estruturais, incluindo o conteúdo de unidades GlcNAc e GlcN (2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose), a distribuição destas unidades ao longo das cadeias e a dimensão média das cadeias poliméricas. A quitina extraída de diatomáceas como *Thalassiosirafluviales* e *Cyrtotellacryptica*, constitui uma exceção, pois as análises confirmam que nesses casos ocorrem exclusivamente unidades GlcNAc^[2].

1.1.1 Estruturas polimórficas da quitina

A quitina tem uma estrutura altamente ordenada, como evidenciada pelos estudos de difração de raios X^[25]. Em seu estado nativo, ocorrem polimorfos, a saber, α , β e γ -quitina, que diferem no arranjo das cadeias nas regiões cristalinas^[1].

A α -quitina, mais abundante e encontrada em estruturas rígidas e resistentes, ocorre em células fúngicas, “krill”, lagostas, caranguejos, entre outras. As formas β e γ -quitina são encontradas em estruturas mais flexíveis, como nos gládios de lulas, algumas algas e protozoários^[12].

Figura 2 - Representação esquemática das estruturas polimórficas de quitina, sendo que as setas apresentam as cadeias poliméricas no sentido do terminal não-redutor para o redutor^[5].

A α -quitina corresponde a um empacotamento mais denso, resultante da disposição antiparalela das cadeias poliméricas (Figura 2), o que favorece a formação de inúmeras ligações hidrogênio intra e intermoleculares e também interfolhas (Figura 3)^[5].

Na β -quitina as cadeias pertencentes a diferentes folhas dispõem-se paralelamente (Figura 2), o que desfavorece a formação de ligações hidrogênio intermoleculares e, principalmente, interfolhas (Figura 4)^[26]. Esse arranjo resulta em um empacotamento menos denso que o observado na α -quitina^[5], por consequência, em melhor reatividade^[27], maior intumescimento em água^[25] e maior solubilidade^[28].

Em γ -quitina é proposto que ocorre uma combinação dos arranjos α e β , pois as cadeias de duas folhas em posição paralela são intercaladas por folhas em que as cadeias se dispõem antiparalelamente, sendo essa polimorfa a menos estudada e conhecida^[2,26].

Figura 3 – Estrutura molecular e ligações hidrogênio de α -quitina^[29].

Figura 4 – Estrutura molecular e ligações hidrogênio de β -quitina^[29].

A ocorrência das polimorfias de quitina na natureza está associada ao papel que desempenham nos organismos em questão. A α -quitina, a forma encontrada em maior abundância, ocorre quando é necessária extrema resistência, como na cutícula dos artrópodes. A β -quitina é encontrada em estruturas rígidas nas quais certa flexibilidade é necessária, como nos gládios dos cefalópodes e no esqueleto calcário de alguns animais marinhos^[30].

1.2 Fontes e Processos de Obtenção de Quitina

As principais fontes para preparação de quitina em laboratórios de pesquisa e em indústrias são os exoesqueletos de vários crustáceos, principalmente caranguejos e camarões, nos quais a quitina está fortemente associada a proteínas, sais de cálcio (principalmente fosfatos e carbonatos), lipídios e pigmentos (Tabela 1)^[2]. O processo de extração de quitina a partir de cascas de camarões e carapaças de caranguejos segue essencialmente três etapas: desmineralização, desproteinização e despigmentação da 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. O processo de remoção dos pigmentos (despigmentação) pode ser realizado por extração com solventes orgânicos, sendo o etanol e a acetona os mais utilizados, e por procedimentos de oxidação, sendo KMnO_4 , NaOCl , SO_2 , NaHSO_3 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ou H_2O_2 os reagentes mais utilizados^[1].

No caso de quitina obtida a partir de gládios de lulas, que apresentam baixos teores de componentes inorgânicos e de pigmentos, as etapas de desmineralização e despigmentação não são, geralmente, executadas^[31], bastando apenas o tratamento alcalino para a desproteinização da biomassa e extração de beta-quitina^[32].

Tabela 1- Composições químicas representativas de diversos tipos de resíduos que contém quitina^[2]

FONTES	TEORES			
	Proteína % ^a	Cinzas % ^a	Lipídios % ^a	Quitina % ^a
Cabeças de camarões	42,0 ± 1,8	20,5 ± 0,5	2,4 ± 0,02	35,5 ± 2,1
Cascas de camarões	58,0 ± 2,8	24,2 ± 0,3	1,4 ± 0,02	16,4 ± 1,8
Carapaças de lagostas	23,1	33,7	2,2	20,2
Resíduos de krill	41,0	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.

1.3 Desacetilação da quitina para obtenção de quitosana

A principal reação de derivatização da quitina é a desacetilação, que corresponde à hidrólise dos grupos acetamido das unidades GlcNAc para gerar grupos amino, resultando assim no polímero conhecido como quitosana. Essa reação pode ocorrer tanto pela via enzimática como pela química (sob condições ácidas ou básicas). A via química é a mais comum, porém a hidrólise ácida é evitada, devido à susceptibilidade das ligações glicosídicas. O método mais usado para desacetilação de quitina é a hidrólise alcalina, um processo heterogêneo que apresenta como variáveis a concentração do álcali, a temperatura e o tempo de reação^[1].

O produto da reação é denominado quitosana (Figura 5) somente se o conteúdo médio de unidades GlcNAc, definido como grau médio de acetilação ($\overline{GA}$), for igual ou inferior a 50% e se o polímero for solúvel em soluções aquosas diluídas de ácidos, como ácido clorídrico e ácido acético^[33]. A composição da quitosana é variável em função das condições empregadas na desacetilação da quitina, e define-se o grau médio de desacetilação do polímero ($\overline{GD}$), Equação 1, como a fração média de unidades GlcN presentes nas cadeias^[34].

$$\overline{GD} = 100 - \overline{GA} \quad [1]$$

Figura 5 - Representação da estrutura primária idealizada da quitosana, em que n é o grau de polimerização.

Várias metodologias têm sido propostas para aumentar a eficiência da reação de desacetilação de quitina e para minimizar a ocorrência de despolimerização^[14-21]. Um novo processo para a obtenção de quitosana com baixo $\overline{GA}$ e elevada massa molar foi desenvolvido por Lamarque *et al*^[22]. Nesse processo, conhecido como “freeze-pump out-thaw” (“FPT”), a quitina é suspensa em solução aquosa concentrada de hidróxido de sódio e submetida a pelo menos 7 ciclos sucessivos de congelamento, sucção com bomba de vácuo e descongelamento, visando promover a destruição dos domínios cristalinos e a exclusão do oxigênio molecular do meio reacional. A desacetilação do material tratado resulta em quitosanas de elevada massa molar e solúveis em soluções de ácidos diluídos. Apesar de ser um procedimento eficiente, este não é aplicado em escala industrial.

Em 2009, Sagheer *et al*^[35] estudaram o tratamento de suspensões de quitina em solução aquosa de hidróxido de sódio com irradiação de microondas e observaram que quitosanas de mesmo grau de desacetilação e massa molecular mais elevada foram obtidas nesse caso em comparação com o tratamento térmico químico convencional.

Em 2009, foi desenvolvido um novo processo para a obtenção de quitosana extensivamente desacetilada, denominado Processo DAIUS, desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade^[23]. Os resultados deste trabalho mostram que o Processo DAIUS é mais eficiente que a maioria dos processos de desacetilação de quitina descritos na literatura, pois permite a preparação de quitosana extensivamente desacetilada em tempos mais curtos e temperaturas mais baixas que as empregadas nos outros processos.

1.4 Utilização do Ultrassom de alta intensidade

Define-se o ultrassom como sendo o som de frequência além da sensibilidade do ouvido humano e que, assim, apresenta frequência característica entre 20kHz e 100MHz.

Diversos estudos vêm sendo publicados sobre a utilização do ultrassom, em síntese orgânica, emulsificação de soluções, degradação de polímeros, polimerização, sonoluminescência, sonólise, formação de sonogéis e preparação de catalisadores^[36-38].

O ultrassom é propagado por uma série de ondas de compressão e rarefação induzidas nas moléculas através do meio. A propagação de ondas de ultrassom, definidas por sua frequência e amplitude, através de meios líquidos, pode provocar o fenômeno conhecido como cavitação. Assim, durante a propagação das ondas acústicas, o líquido é submetido alternadamente à compressão e à rarefação. Se a energia aplicada for suficientemente elevada durante a rarefação, podem ser rompidas as forças intermoleculares que mantêm a estrutura do líquido, formando cavidades. Essas cavidades 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 das cavidades até atingir um tamanho instável e, resultando em um colapso violento, com liberação de grande quantidade de energia (Figura 6).

Existem teorias que explicam a liberação de energia no colapso cavitacional, sendo a mais aceita a abordagem conhecida como "hot spot"^[36,39]. Segundo essa teoria, durante a compressão as cavidades colapsam em menos que 10^{-6} s, liberando gases e vapores superaquecidos e, ao mesmo tempo, resultando em pressões elevadas no momento da implosão das cavidades. De acordo com essa teoria, durante o colapso das cavidades, há formação de jatos de solventes a velocidades muito elevadas que fragmentam e limpam a superfície do material suspenso.

Figura 6 - Propagação do som no líquido e “demonstração” da formação e colapso das cavidades^[38].

Assim, uma das consequências do fenômeno cavitacional é a geração de ondas de choque e de jatos acelerados que provocam colisões violentas das partículas em suspensão. Assim, a ocorrência de cavitação em suspensões, provoca importantes alterações morfológicas nas partículas, diminuindo suas dimensões médias e aumentando a área superficial e a acessibilidade aos sítios reativos^[38].

Estudos recentes do Grupo de Físico Química Orgânica^[23] sobre irradiação de quitina com o ultrassom de alta intensidade demonstraram que esse tratamento afeta positivamente a reação de desacetilação de quitina em suspensões aquosas de hidróxido de sódio 40%. Os resultados destes estudos mostraram também que quitosanas com baixo grau de acetilação ($\overline{GA} < 10\%$) e elevada massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v > 7,0 \times 10^5 \text{ g/mol}$) são obtidas em tempos curtos (até 30 minutos) e temperaturas mais brandas, (60-70°C), favorecendo assim a reação de desacetilação e minimizando a ocorrência de despolimerização.

1.5 Estruturas e propriedades da quitosana

A quitosana ocorre nas paredes celulares de alguns fungos, mas é industrialmente produzida a partir da desacetilação de quitina. De acordo com a literatura^[32,40] a beta-quitina extraída de gládios de lulas é mais atrativa para o manejo, pois esta polimorfa, tem um empacotamento menos denso que a polimorfa alfa e é mais susceptível à desacetilação do que a α -quitina.

A quitosana exibe atividades biológicas interessantes, encontrando aplicações na agricultura^[41,42], biomedicina/biotecnologia^[43,44], indústria de alimentos^[45,46] e de cosméticos^[7,47]. A quitosana é biodegradável, biocompatível e atóxica e, além disso, pode ser preparada na forma de pó, fibras, géis de viscosidade controlada, filmes e nanopartículas^[12,48]. O valor do parâmetro $\overline{GA}$ é um dos critérios empregados para diferenciar quitina e quitosana e, além disso, a solubilidade desses polímeros é diferente. A quitosana apresenta solubilidade em soluções aquosas de ácidos diluídos, mas a quitina é solubilizada apenas em sistemas solventes como N,N-dimetilacetamida/LiCl (DMA/ 5% LiCl)^[49]. Uma vez que a bioatividade da quitosana e seu comportamento em solução aquosa^[50,51] dependem fortemente de suas propriedades físico-químicas, o controle do grau médio de acetilação, massa molar média e distribuição de suas unidades repetitivas ao longo das cadeias poliméricas estimulam o interesse pelo desenvolvimento de processos de produção desse polissacarídeo^[52].

A solubilidade da quitosana está relacionada com o $\overline{GA}$ e com o solvente utilizado, e depende da quantidade de grupos amônio ($-NH_3^+$) nas cadeias poliméricas. Assim, quanto maior a quantidade de unidades GlcN, mais importantes serão as interações repulsivas, em decorrência da presença de cargas positivas ao longo das cadeias, resultando em maior grau de solubilidade. A distribuição das unidades GlcN e GlcNAc e a massa molar também afetam a solubilidade da quitosana^[53].

A distribuição alternada, randômica ou em blocos das unidades GlcN e GlcNAc ao longo das cadeias de quitosana também afeta a solubilidade do polímero. A distribuição das unidades está diretamente relacionada com as condições de preparação da quitosana, sendo que as reações executadas em condições homogêneas geram quitosanas em cujas cadeias há o predomínio da distribuição randômica, enquanto que nas quitosanas produzidas em condições heterogêneas há o predomínio da distribuição em blocos^[54].

O parâmetro de acetilação (PA) caracteriza a distribuição das unidades GlcNAc e GlcN ao longo das cadeias de quitosana, se a estatística for consistente com o modelo de Bernoulli para copolímeros^[55]. Os valores de PA de 0, 1 e 2 são associados, respectivamente, às distribuições ideais em bloco, randômica e alternada das unidades GlcNAc ao longo das cadeias de quitosana (Figura 7). O parâmetro de acetilação pode ser determinado por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN 1H), porém a análise requer uma boa resolução dos sinais^[56,57].

Figura 7 – Representação esquemática das sequências de unidades GlcN (●) e GlcNAc (■) em quitosana de $\overline{GA}$ =50%: (a) distribuição em blocos (PA=0), (b) distribuição randômica (PA=1) e (c) distribuição alternada (PA=2)^[56].

2 OBJETIVOS

O projeto está voltado para o desenvolvimento de metodologias mais eficientes visando à produção de quitosanas via desacetilação de quitina. Nesse sentido, a proposta do trabalho é estudar a aplicação do Processo de Desacetilação Assistido por Irradiação de Ultrassom de Alta Intensidade (Processo DAIUS) a beta-quitina extraída de gládios de lulas. O foco do projeto é estudar as correlações entre o diâmetro do reator, tempo de pulsação da irradiação do ultrassom e pré condicionamento de intumescimento das partículas de beta-quitina, e a eficiência da reação de desacetilação e as características dos produtos obtidos, visando à obtenção de quitosana extensivamente desacetilada e de massa molar elevada

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os reagentes empregados neste trabalho estão identificados abaixo (Tabela 2), os quais não foram purificados, a não ser quando especificado.

Tabela 2 – Reagentes utilizados na realização dos experimentos

Reagentes	Marca
Acetato de Sódio 3H ₂ O 99#%	J. T. Baker
Ácido clorídrico 36,5-38%	Synth
Óxido de Deutério 99,9%	Cambridge Isotope Laboratories, Lnc.
Ácido acético glacial 98%	Synth
Etanol 93,5%	Tec-Lab
Hidróxido de Sódio 99% (mínimo)	Chemis
Nitrato de Prata	Tec-Lab

3.1 Matéria-prima

Neste trabalho, os gládios de lulas (Figura 8) empregados para a extração de beta-quitina foram cedidos pela Empresa Miami Pescados (Cananéia/SP). Para extrair a beta-quitina, os gládios foram lavados manualmente, enxaguados em água destilada e secos em estufa com circulação e renovação de ar, durante 24 horas, a 30°C. Secos, os gládios foram transferidos para o moinho (MA-048, Micromoinho de rotor vertical com facas móveis, Marconi). Moído e peneirado, o material foi classificado de acordo com as dimensões das partículas. Utilizada na extração de beta-quitina, a fração mais abundante dos gládios triturados (85% de massa) é composta de partículas com dimensões médias no intervalo de 250 a 425µm.

Figura 8 - Lula da espécie *Loligo sp.*, (a) com destaque para o gládio inserido na parte interna do molusco e (b) gládio retirado da lula.

3.2 Obtenção de beta-quitina

De acordo com trabalho realizado por Kurita e colaboradores^[58] e trabalhos já realizados no grupo de Físico-Química Orgânica^[31], os gládios de *Loligo sp.*, não contém quantidades significativas de sais minerais, o que permite dispensar a etapa de desmineralização. Para a remoção das proteínas presentes nos gládios foi utilizado o método descrito por Chaussard^[59]. Cerca de 200g de gládios foram suspensos em 3L de uma solução aquosa de NaOH 1mol.L⁻¹, e a suspensão resultante foi mantida sob agitação mecânica (350rpm) durante 18 horas, à temperatura ambiente. Em seguida, a suspensão foi filtrada e o sólido lavado com água destilada até a neutralização 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 24 horas, a 30°C.

3.3 Desacetilação de beta-quitina assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade

A beta-quitina (aproximadamente 2,2g) foi suspensa em 70mL da solução de NaOH 40% e a suspensão foi transferida para um reator de vidro encamisado, o qual foi disposto no interior da caixa de isolamento acústico do equipamento de ultrassom (Hielscher modelo UP400S (Figura 9), frequência de 24kHz, diâmetro da sonda de 22mm e densidade de potência acústica de 85W.cm⁻²). O sonotrodo foi imerso (aproximadamente 2/3 do

comprimento) na suspensão de beta-quitina, que foi mantida sob agitação magnética constante.

Independentemente do experimento considerado, após o término da reação, a suspensão foi transferida para um béquer de polipropileno contendo cubos de gelo de água destilada para interromper a reação de desacetilação. A suspensão foi mantida a baixa temperatura e foi adicionado ácido clorídrico concentrado em pequenas porções até atingir pH = 7-8. Em seguida, a suspensão foi filtrada e o sólido abundantemente lavado com etanol 80%, até que o excesso de cloreto de sódio fosse eliminado. O sólido foi transferido para a placa de Petri e seco em estufa de circulação a 30°C por 48 horas.

Figura 9 – Esquema experimental empregado nas reações de desacetilação do processo DAIUS (a) 1) Ultrassom de Alta Intensidade; 2) sonotrodo e reator de vidro encamisado e 3) banho termostático. (b) em detalhe Ultrassom de Alta intensidade Hielscher, modelo UP400S.

O planejamento fatorial fracionário foi utilizado com o intuito de verificar quais são as variáveis que mais afetam a eficiência do processo DAIUS e as características dos produtos. Assim, de acordo com os estudos realizados no Grupo de Físico-Química Orgânica^[60], três variáveis do processo de desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade foram selecionadas, a saber, diâmetro do reator, o tempo de pulsação da irradiação e o tempo de pré-condicionamento de intumescimento das partículas de beta-quitina do processo, as duas primeiras variáveis foram escolhidas, pois no grupo não havia nenhum estudo que avaliasse a influência dessas e a última variável foi escolhida pela análise de um estudo anterior realizado com alfa-quitina, pois essa variável teve grande influência no resultado final. Os parâmetros fixados foram a temperatura (60°C), a concentração de beta-

quitina ($0,031\text{g.mL}^{-1}$), o diâmetro médio das partículas ($0,250\text{-}0,425\text{mm}^2$), a potência do ultrassom (280Watts) e o tempo de sonicação (30min). As variáveis selecionadas e os níveis utilizados em cada uma delas estão mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 – Variáveis estudadas no processo DAIUS e os valores de cada nível (-1, 0 e +1)

Variáveis	Código	Níveis		
		-1	0	+1
Diâmetro do reator (cm)	DR	4	4,5	5
Tempo de pulsação do ultrassom (s)	TP	0,5	0,7	1,0
Tempo de pré-condicionamento (min)	PT	0	15	30

Utilizando a abordagem de Teófilo e Ferreira^[61], optou-se pela utilização do planejamento fatorial fracionário (2^{n-1}) ao invés do planejamento fatorial completo (2^n), resultando na execução de quatro experimentos e a triplicata do ponto central para realizar a estimativa do erro (Tabela 4).

Tabela 4 – Níveis das variáveis estudadas em cada reação do processo DAIUS

Experimento	Código da Amostra	Variável		
		DR	TP	PT
1	QT1	-1	-1	+1
2	QT2	+1	-1	-1
3	QT3	-1	+1	-1
4	QT4	+1	+1	+1
pc1 ^a	QT5/1	0	0	0
pc2 ^a	QT5/2	0	0	0
pc3 ^a	QT5/3	0	0	0

^a Ponto Central

4 CARACTERIZAÇÕES

O grau médio de acetilação ($\overline{GA}$) e a massa molar média viscosimétrica ($\overline{Mv}$) são as principais características das amostras de quitosana e de quitina, pois afetam as propriedades físico-químicas desses polímeros. Além destas características, também são importantes a cristalinidade e a morfologia dos polímeros, que são determinadas empregando técnicas de difração de raios X e de microscopia eletrônica de varredura (MEV), bem como os teores de cinzas e de umidade, o comportamento térmico e os modos de vibração na região do infravermelho. As características citadas e os procedimentos empregados para suas determinações serão descritos a seguir.

4.1 Grau médio de acetilação ($\overline{GA}$)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de alta resolução é uma técnica muito útil para o estudo da estrutura química de quitina e quitosana. O grau médio de acetilação das amostras de beta-quitina e de quitosana foi determinado pela espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H). Os espectros foram adquiridos em espectrômetro BRUKER AC400 a 80°C; o pulso utilizado foi de 8,2mS (90°), acumulando 16 varreduras e o parâmetro LB foi de 0,2Hz. A amostra de beta-quitina foi preparada através da adição de 1mL de uma solução de DCl/D₂O 20% a 10mg de amostra, sob agitação magnética constante da suspensão, a 70°C, durante 18 horas. As amostras de quitosana foram preparadas através da adição de 1 mL de uma solução de DCl/D₂O 1% a 10mg de amostra, sob agitação magnética constante da suspensão, a temperatura ambiente, durante 24 horas. As soluções obtidas foram transferidas para tubos de vidro apropriados ($\Phi = 5\text{mm}$) para obtenção dos espectros.

Através do espectro de beta-quitina (Figura 11) é possível observar as ressonâncias características dos anômeros α ($\alpha\text{-H-1-A}$) e β ($\beta\text{-H-1-A}$) das unidades acetiladas (Figura 10) e dos sinais dos hidrogênios H-1 e H-2 das unidades desacetiladas. Onde todos os hidrogênios H-1 das unidades acetiladas são representados pelas integrais $A_{\alpha\text{H1A}}$, $A_{\beta\text{H1A}+\text{H1A}}$ e os hidrogênios H-2 das unidades desacetiladas são representados pela integral A_{H2D} . Assim, o grau médio de acetilação ($\overline{GA}$) da quitina pode ser determinado pela equação 3^[62].

(a)

(b)

Figura 10 - Ilustração característica dos anômeros alfa e beta dos hidrogênios H-1 das unidades acetiladas (a) anômero alfa (α -H-1-A) e (b) anômero beta (β -H-1-A).

Figura 11 – Espectro de RMN ^1H característico de beta-quitin^[62].

Na Figura 12 é apresentado um espectro de RMN ^1H típico de quitosana obtida em $\text{DCl}/\text{D}_2\text{O}$ 1% v/v.

Figura 12 – Espectro de RMN ^1H característico de quitosana, onde $\text{R} = \text{COCH}_3$ ou $\text{R} = \text{H}$.

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

$$\overline{GA} = \left(\frac{A_{\text{CH}_3}/3}{A_{\text{H}_2-\text{H}_6}/6} \right) * 100 \quad [2]$$

O grau médio de acetilação ($\overline{GA}$) de β -quitina foi calculado através da Equação 3.

$$\overline{GA} = \frac{(A_{\alpha\text{H}1\text{A}} + A_{\beta\text{H}1\text{A}+\text{H}1\text{D}} + A_{\text{H}1\text{A}}) - A_{\text{H}2\text{D}}}{(A_{\alpha\text{H}1\text{A}} + A_{\beta\text{H}1\text{A}+\text{H}1\text{D}} + A_{\text{H}1\text{A}})} \quad [3]$$

4.2 Parâmetro de acetilação (PA)

O parâmetro de acetilação (PA) foi determinado por espectroscopia de RMN ^1H , de acordo com o modelo descrito por Vårum e colaboradores^[63]. Para determinar o PA das amostras de quitosanas é importante que os espectros tenham boa resolução, pois é necessário conhecer as intensidade dos sinais (I_{DD} , I_{DA} , I_{AA} , I_{AD}) referentes aos núcleos de hidrogênio das sequências de díades AD-AA e DA-DD (Figura 13)^[56].

Figura 13 – Espectro de RMN ^1H na região de ressonância dos hidrogênios da quitosana QT3 ($\overline{GA}$ =42%).

Os valores experimentais das intensidades dos sinais I_{AD} , I_{AA} , I_{DA} , I_{DD} das sequências de díades das amostras de quitosana podem ser determinados usando a ferramenta de deconvolução do Programa Origin Lab. As intensidades relativas dos sinais podem ser expressas como:

$$F_{AD} = \frac{I_{AD} + I_{DA}}{I_{AD} + I_{DA} + I_{DD} + I_{AA}} \quad [4]$$

$$F_{AA} = \frac{I_{AA}}{I_{AD} + I_{DA} + I_{DD} + I_{AA}} \quad [5]$$

$$F_{DD} = \frac{I_{DD}}{I_{AD} + I_{DA} + I_{DD} + I_{AA}} \quad [6]$$

Nas equações acima, F_{AA} (F_{DD}) é a probabilidade de que duas unidades A (D) sejam adjacentes e F_{DA} é a probabilidade de que uma unidade A tenha D como vizinho e vice-versa. A partir desses dados, é possível calcular PA, pela seguinte expressão^[57]:

$$PA = \frac{F_{AD}}{2(F_{AA}) + F_{AD}} + \frac{F_{AD}}{2(F_{DD}) + F_{AD}} \quad [7]$$

4.3 Determinação da massa molar média de quitina e quitosana por viscosimetria capilar

Para determinação da viscosidade intrínseca, aproximadamente 20mg da amostra de quitosana foram suspensos em 25mL de solução de ácido acético 0,6mol.L⁻¹ sob agitação magnética constante durante 24 horas, em seguida foram adicionados 25mL de acetato de sódio 0,4mol.L⁻¹ e a agitação procedeu por mais 24 horas. A solução resultante foi filtrada sob pressão positiva em membrana com diâmetro dos poros de 0,45µm (Millipore – White SCWP). Uma alíquota de 15mL desta solução foi transferida para um viscosímetro capilar de vidro (do tipo Ubbelohde, $\phi = 0,53\text{mm}$). No caso da amostra de beta-quitina, 7,5mg foram suspensos em 30mL de N,N-dimetilacetamida/LiCl (DMA/ 5% LiCl), sob agitação magnética constante durante 24 horas. Uma alíquota de 15mL desta solução foi transferida para um viscosímetro capilar de vidro (do tipo Ubbelohde, $\phi = 0,84$).

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 $25,00 \pm 0,01^\circ\text{C}$, no caso das amostras de quitosana, tampão ácido acético 0,3mol.L⁻¹/acetato de sódio 0,2mol.L⁻¹ (pH = 4,5) foi empregado para as sucessivas diluições, de modo a assegurar que a força iônica das soluções fosse mantida constante e para a amostra de beta-quitina, N,N-dimetilacetamida/LiCl (DMA/ 5% LiCl) foi empregado para as sucessivas diluições.

Soluções de quitosana em ácido diluído ou em tampão se comportam como soluções de polieletrólitos, em tal situação, a viscosidade pode ser descrita como função de sua viscosidade intrínseca $[\eta]$ e de sua concentração, se não houver interações macromoleculares (sistema diluído) e quando existir concentração suficientemente elevada de sal. Neste caso, a relação de Huggins^[64] pode ser aplicada (Equação 8).

$$\eta_{sp}/C = [\eta] + k_H [\eta]^2 C \quad [8]$$

Sendo:

η_{sp}/C = viscosidade reduzida (mL/g);

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

K_H = constante de Huggins;

C = concentração da solução (g/mL).

Desta maneira, a viscosidade intrínseca ($[\eta]$) é determinada pela extrapolação à diluição infinita da curva de viscosidade reduzida versus concentração (Equação 8). A viscosidade determinada desta forma satisfaz a relação de Mark-Houwink^[65], logo, a massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$) pode ser determinada empregando a equação 9.

$$[\eta] = K' \overline{M}_v^\alpha \quad [9]$$

Sendo K' e α constantes para um dado solvente em uma dada temperatura e $\overline{M}_v$ é a massa molar viscosimétrica média^[12,66].

4.4 Espectroscopia de absorção no infravermelho

As pastilhas foram preparadas em KBr (grau espectroscópico) na proporção de 1:100 amostra/KBr. O KBr e as amostras foram previamente secas em estufa a vácuo, a 30°C, por 24 horas e depois misturadas e trituradas em gral de ágata e prensadas para resultar em uma pastilha, que foi seca em estufa a vácuo a 30°C por 6 horas.

As análises de espectroscopia por absorção na região do infravermelho foram feitas no aparelho BOMEM modelo MB-102 com transformada de Fourier, com acúmulo de 48 varreduras e resolução de 4cm⁻¹, no intervalo de 4000 – 500cm⁻¹.

As principais bandas de absorção características de quitina e de quitosana na região do infravermelho estão listadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Bandas de absorção e números de onda ($\bar{\nu}$ cm⁻¹) características de quitina e quitosana^[60]

Banda	$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)	Banda	$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)
Amida I	≈1650 e 1630	Amida II	≈1550 e 1560
Amida III	≈1310	-NH ₃ ⁺ (s)	≈3350 – 3100 e 2100
-N-H ₂ (s)	≈3250 – 3350	-NH ₂ (b)	≈1590 – 1630
-O-H (s)	≈3450	-O-H (b)	≈1260
-C-OH (s)	≈1030 e 1070	-CH ₂ (b, sc)	≈1410 – 1420
-NH-C(O)-C-H ₃ (s)	≈1380	-NHC(O)C-H ₃ (b)	≈2860 - 2910

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

4.5 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°, empregando varredura contínua, com velocidade de 1°/min. A tensão e a corrente utilizadas foram de 50kV e 100mA, respectivamente. Através dos resultados das análises de difração de raios X foi possível determinar o índice de cristalinidade (I_{cr}) das amostras através da equação 10^[18].

$$I_{cr} = \frac{I_{110} - I_{am}}{I_{110}} * 100 \quad [10]$$

Sendo:

I_{cr} = índice de cristalinidade;

I_{110} = intensidade máxima (em unidades arbitrárias) da difração de rede (110) em $2\theta = 20^\circ$;

I_{am} = intensidade de difração (em unidades arbitrárias) de regiões não-ordenadas; nos difratogramas obtidos, foi considerada a intensidade de difração em $2\theta = 16^\circ$.

4.6 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica das amostras de quitina e quitosana foram estudadas através de medidas termogravimétricas, utilizando o equipamento TGA-50, da Shimadzu, empregando atmosfera dinâmica de ar sintético (20% O₂ e 80% N₂) a uma vazão de 20mL.min⁻¹ e porta-

amostra de platina. As amostras foram aquecidas a uma razão de aquecimento $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ até 100°C (permanecendo a 100°C durante 20 minutos, para eliminação de água), e de 100°C até 900°C (permanecendo a 900°C por 5 minutos). A quantidade de amostra utilizada em cada análise foi de aproximadamente 8mg. As amostras de quitina e quitosana analisadas foram previamente armazenadas em um dessecador contendo sílica gel durante 10 dias.

Os dados de temperatura “onset” (T_{onset}), de degradação máxima (T_{max}), inicial (T_0) e final (T_f) dos eventos térmicos foram obtidos dos termogramas e da primeira derivada dos mesmos.

4.7 Microscopia eletrônica de varredura

A desacetilação de beta-quitina assistida por ultrassom de alta intensidade provoca alterações na morfologia das partículas desse polímero e podem ser avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As morfologias das superfícies das amostras de beta-quitina e de quitosana foram investigadas no microscópio eletrônico de varredura LEO (modelo 440), operando com faixa de elétrons de 20kV e tensão de 2,85pA. As amostras foram previamente secas em estufa a vácuo, a 60°C , por 6 horas, recobertas em ouro (10nm) em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 e mantidas em dessecador até o momento da análise.

4.8 Solubilidade

A determinação da solubilidade de quitosana em ácido clorídrico $0,05\text{mol}.\text{L}^{-1}$ foi baseada na turbidez de suas soluções. As amostras foram dissolvidas em ácido clorídrico $0,05\text{M}$ e o pH das soluções ($C_p=0,75\text{g/L}$) foi ajustado com soluções aquosas de HCl e NaOH $0,5\%$ (m/v) e a absorbância das soluções em 600nm foi registrada em um espectrômetro UV-VIS:SPECTROPHOTOMETER JASCO – modelo V-630 utilizando-se uma cela de quartzo de 1cm de caminho óptico. A solubilidade da quitosana em diferentes pHs foi estimada por medidas de absorbância da solução. As partículas em suspensão, ou seja, as partículas das amostras insolúveis em determinados pHs, difratam e espalham a radiação luminosa que, portanto, não atinge o detector que existe depois da cela que contém a solução. Assim, o equipamento registra um espectro que mostra aumento de absorção em determinados pHs, como consequência da presença de partículas (materiais insolúveis) em suspensão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, dividido em três partes, são apresentados os resultados referentes aos trabalhos desenvolvidos, bem como as discussões decorrentes de maneira a demonstrar a evolução do trabalho. A primeira parte relata as caracterizações de beta-quitina extraída de gládios de lulas e da amostra de quitosana obtida pela aplicação do processo de desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade (Processo DAIUS), empregando as seguintes técnicas: espectroscopia na região do infravermelho (IV), microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios X (DRX) e termogravimetria (TG). A segunda parte concerne os resultados da desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade, tendo como variáveis do processo o diâmetro do reator, o tempo de pulsação da irradiação e o tempo de pré-condicionamento visando o intumescimento das partículas de beta-quitina. A terceira parte refere-se à análise fatorial fracionária, que busca determinar a significância das variáveis sobre os resultados de aplicação do Processo DAIUS.

5.1 Caracterização de beta-quitina e quitosana

A beta-quitina foi utilizada como matéria-prima para a produção de quitosana por apresentar cadeias poliméricas com orientação paralela nos domínios cristalinos, característica que confere maior acessibilidade aos sítios reativos e a torna mais susceptível à desacetilação do que a alfa-quitina^[12]. As quitosanas obtidas pela aplicação do Processo DAIUS apresentam características distintas em relação à beta-quitina, as quais são evidenciadas nos espectros de infravermelho, nas análises de difração de raios X, de microscopia eletrônica de varredura, de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de termogravimetria. A seguir, as características de beta-quitina e de uma amostra representativa das quitosanas obtidas são discutidas e comparadas com o objetivo de evidenciar as alterações estruturais e morfológicas e do comportamento térmico decorrentes da conversão de beta-quitina em quitosana.

5.1.1 Espectroscopia vibracional na Região do Infravermelho

As análises de espectroscopia no infravermelho visam à identificação estrutural das amostras por seus modos de vibração característicos. A Figura 14 apresenta os espectros de beta-quitina e da quitosana QT3, sendo possível observar semelhanças, porém são observadas

diferenças atribuídas aos diferentes conteúdos de unidades GlcNAc e à ocorrência 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 C=O e N-H), $1660\text{-}1560\text{ cm}^{-1}$ (deformações axiais de C=O e angulares de N-H), $1450\text{-}1370\text{ cm}^{-1}$ (deformações angulares C-H), $1155\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$ (deformação axial de O-H em ligação hidrogênio) e $1080\text{-}1020\text{ cm}^{-1}$ (deformação angular de C-O). Os diferentes conteúdos de unidades GlcNAc, em beta-quitina ($\overline{GA} = 80\%$) em relação à quitosana QT3 ($\overline{GA} = 42\%$), determinam mudanças significativas no espectro de infravermelho.

Figura 14 – Espectros da região do infravermelho de beta-quitina e da quitosana QT3.

No espectro de beta-quitina foram identificadas as bandas de deformação angular de NH (banda de amida II, próxima de 1560 cm^{-1}), deformação axial CO (banda de amida I, próxima de 1660 cm^{-1}) atribuída apenas ao grupo C=O em ligação hidrogênio intermolecular com grupos N-H, deformação axial C=O (banda de amida I, próxima de 1630 cm^{-1}), atribuídas às ligações do grupo C=O em ligação hidrogênio, tanto com grupo –NH como com grupo OH do carbono na posição 6, e deformação axial de amida III próxima de 1315 cm^{-1} ^[67,68]. As diferenças nos espectros das amostras de beta-quitina e QT3 são evidenciadas na região de $1800\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ (Figura 15).

Figura 15 – Bandas características na região de 1800-1000 cm^{-1} dos espectros na região do infravermelho de beta-quitina e da quitosana QT3.

No espectro da quitosana QT3 as bandas de deformação angular de NH (amida II, próxima de 1560cm^{-1}) e deformação axial de amida III (próxima de 1315cm^{-1}) não são observadas devido ao baixo teor de unidades GlcNAc, decorrente da hidrólise dos grupos acetamida da beta-quitina de partida. Como mencionado, as características da quitosana QT3 são representativas do conjunto de quitosanas produzidas neste trabalho.

5.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

As alterações morfológicas provocadas pela desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade podem ser avaliadas pela análise de microscopia eletrônica de varredura, como as evidenciadas nas micrografias de beta-quitina e da amostra QT3 (Figuras 16 e 17). Assim, foi observado que as partículas de beta-quitina apresentam superfícies relativamente lisas, enquanto que as quitosanas obtidas via processo DAIUS apresentam superfícies mais rugosas, redução das dimensões médias e aumento da área superficial das partículas. A diminuição da área média das partículas está associada à energia fornecida durante a irradiação da suspensão de beta-quitina com o ultrassom de alta intensidade, sendo

tais alterações morfológicas atribuídas ao efeito de cavitação, o qual aumenta a acessibilidade aos sítios reativos do polímero^[17,69].

(a)

(b)

Figura 16 – Micrografias das amostras (a) beta-quitina e (b) QT3.

(a)

(b)

Figura 17 – Micrografias das amostras (a) beta-quitina e (b) QT3.

Analizando as micrografias apresentadas nas Figuras 16 (b) e 17 (b), pode-se observar a ocorrência de um acentuado processo de desgaste e descamação da superfície das partículas da amostra QT3, no entanto esse desgaste da superfície das partículas não é verificado nas micrografias de beta-quitina (Figuras 16 (a) e 17 (a)). Portanto, tais características podem ser associadas ao processo de desacetilação e aos efeitos de cavitação^[38].

5.1.3 Difração de raios X

A desacetilação de beta-quitina via processo DAIUS provoca mudanças estruturais e morfológicas, as quais podem ser avaliadas pela análise de difração de raios X. Assim, o padrão de difração de beta-quitina e suas alterações em função do grau de desacetilação refletem o rearranjo das cadeias poliméricas decorrentes da progressiva destruição dos domínios cristalinos, sendo que tais alterações podem ser quantificadas pela determinação do índice de cristalinidade. Assim, a intensidade e a resolução dos sinais são critérios para comparar e estimar o grau de ordem das amostras.

Através dos difratogramas (Figura 18), é possível distinguir beta-quitina e quitosana, pois o primeiro apresenta dois picos intensos e bem resolvidos em $2\theta \approx 8$ e 20° , referentes aos planos (010) e (020, 110), respectivamente. Por outro lado, o difratograma de quitosana apresenta sinais muito menos intensos, sendo aquele em $2\theta \approx 8^\circ$ deslocado para maiores valores de ângulo de Bragg, além de serem mais alargados, revelando o decréscimo de cristalinidade que acompanha a desacetilação decorrente da aplicação do processo DAIUS. Assim, o maior grau de ordem na beta-quitina é atribuído a interações intermoleculares, do tipo ligações hidrogênio envolvendo os grupos acetamido de unidades GlcNAc.

Figura 18– Difratoograma de beta-quitina e da quitosana QT3.

Os valores de índice de cristalinidade de beta-quitina e da quitosana QT3 foram calculados empregando o método descrito por Focher e colaboradores^[18] (Tabela 6), confirmando que a quitosana QT3 é menos cristalina que a beta-quitina de partida.

Tabela 6 – Valores de índice de cristalinidade (I_{cr})

Amostra	I_{cr} (%)
beta-quitina	85
QT3	59

5.1.6 Termogravimetria

A análise das curvas termogravimétricas (TG) bem como das suas derivadas (DTG) permite avaliar as estabilidades térmicas e os processos de perda de massa da beta-quitina e da quitosana QT3 (Figuras 19 e 20).

Figura 19 – Curvas TG/DTG de beta-quitina sob atmosfera dinâmica de ar sintético.

Figura 20 – Curvas TG/DTG da quitosana QT3 sob atmosfera dinâmica de ar sintético.

A partir das curvas TG/DTG das amostras de beta-quitina, é possível inferir que o primeiro evento térmico (25-105°C) refere-se ao processo de desidratação e o segundo evento térmico corresponde ao processo de decomposição dos polímeros no intervalo de 273-359°C. No caso da quitosana QT3, o primeiro evento térmico ocorre no intervalo de 25-96°C e o segundo evento térmico em 265-333°C. A temperatura *onset* (Tabela 7), do segundo evento térmico, definida como a temperatura do início do evento, é determinada pela intersecção dos segmentos lineares da curva TG e é maior na beta-quitina, evidenciando maior estabilidade térmica em comparação com a quitosana QT3, fato que está relacionado com o grau médio de acetilação e com a cristalinidade das amostras. Polímeros com baixa cristalinidade geralmente apresentam alto grau de enovelamento, e o maior enovelamento leva a maior restrição dos movimentos macromoleculares e menor dissipação da energia térmica, com maior probabilidade de quebra das ligações químicas em temperatura mais baixa^[70].

Tabela 7 - Dados obtidos das curvas termogravimétricas de beta-quitina e quitosana QT3

Amostra	T ₀ (°C)	T _f (°C)	T _{máx} (°C)	T _{onset} (°C)	Perda de massa (%)
beta-quitina	239	359	339	265	58
QT3	216	333	305	253	51

Através dos dados apresentados na Tabela 7, é observado que a perda de massa da amostra de quitosana é ligeiramente menor que da amostra de beta-quitina, sugerindo que a perda de massa esteja provavelmente relacionada com a quantidade de unidades GlcNAc presentes nas cadeias poliméricas^[79].

5.1.7 Massa molar viscosimétrica média

As massas molares viscosimétricas médias de beta-quitina e da quitosana QT3 foram determinadas a partir dos valores de viscosidade intrínseca $[\eta]$ obtidos da extrapolação das curvas de viscosidade reduzida *versus* concentração à diluição infinita (Figura 21), fazendo uso da equação de Mark-Houwink (Equação 5), sendo que os valores dos parâmetros K' e α obtidos pela literatura^[12,66] e utilizados no cálculo da massa molar viscosimétrica média de beta-quitina e da quitosana QT3 são apresentados na Tabela 8.

Figura 21 - Curva de viscosidade reduzida *versus* concentração da quitosana QT3 em solução tampão ácido acético 0,3 mol L⁻¹ / acetato de sódio 0,2 mol L⁻¹ à temperatura de 25°C.

Tabela 8 – Valores das constantes K' e α da equação de Mark-Houwink para diferentes graus médios de acetilação de beta-quitina e quitosana^[12,66]

$\overline{GA}$ (%)	K'	α
41	0,062	0,813
80	0,24	0,69

A viscosidade intrínseca é proporcional ao volume hidrodinâmico e depende da massa molar, do intumescimento no solvente, da forma e da rigidez da macromolécula^[71]. Na Tabela 9 são apresentados os valores de viscosidade intrínseca, massa molar viscosimétrica média ($\overline{M}_v$) e grau médio de polimerização ($\overline{GP}$) de beta-quitina e da quitosana QT3.

Tabela 9 – Valores de viscosidade intrínseca, massa molar viscosimétrica média e grau de polimerização das amostras

Amostra	$[\eta]$ (mL/mg)	$\overline{M}_v$ (g/mol)	$\overline{GP}$
beta-quitina	5,1971	$1,9 \times 10^6$	5885
QT3	1,2548	$1,97 \times 10^5$	1105

Pode ser observado através da comparação dos valores de viscosidade intrínseca e massa molar viscosimétrica média da quitosana QT3 que a sonicação aumentou ligeiramente a despolimerização que geralmente ocorre simultaneamente com a reação de desacetilação, foi também observado que a viscosidade intrínseca da amostra de beta-quitina é maior que da quitosana QT3, sendo as diferenças decorrentes da quantidade de unidades GlcNAc presentes nas cadeias poliméricas e da ocorrência de despolimerização. A reação de desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade provoca a hidrólise dos grupos acetamido das unidades GlcNAc da amostra de beta-quitina, e também provoca a despolimerização das cadeias poliméricas, através da clivagem das ligações glicosídicas^[17,72], isso é confirmado pelos valores do grau médio de polimerização, sendo o da quitosana QT3 menor em comparação com a beta-quitina, assim a amostra QT3 apresentou menor massa molar viscosimétrica média e menor tamanho médio das cadeias.

5.2 Estudos de desacetilação de quitosana

Nesta parte do trabalho são discutidos os resultados das reações de desacetilação de beta-quitina, das quais resultaram amostras de quitosanas com recuperação de 60-80% da massa de beta-quitina submetida ao processo DAIUS, resultando em sete amostras, das quais três foram triplicatas do ponto central para a estimativa do erro, com isso os resultados em triplicada serão apresentados como $\overline{PC}$ juntamente com seus respectivos desvios amostrais.

As amostras de quitosana desacetilada foram analisadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H), espectroscopia na região do infravermelho (IV), difração de raios X (DRX), termogravimetria, viscosimetria capilar e quanto à solubilidade.

5.2.1 Grau médio de acetilação ($\overline{GA}$)

A espectroscopia de RMN ^1H foi utilizada para a caracterização estrutural e a determinação do grau médio de acetilação ($\overline{GA}$) e parâmetro de acetilação (PA) das amostras de beta-quitina e quitosanas. Os espectros de RMN ^1H de beta-quitina e da quitosana QT3 são apresentados nas Figuras 22 e 23, respectivamente.

Figura 22 – Espectro de RMN ^1H (500MHz) de beta-quitina ($\text{DCl}/\text{D}_2\text{O}$ 20%, 70°C).

Figura 23- Espectro de RMN ^1H (500MHz) da quitosana QT3 (DCl/D $_2$ O 1%, 25°C).

Nas Figuras 22 e 23, o sinal em 2,0ppm corresponde aos hidrogênios metílicos das unidades GlcNAc para beta-quitina e quitosana, respectivamente. A partir da integração dos sinais, foram obtidos os valores de $\overline{GA}$ das amostras, sendo observado que a beta-quitina apresentou maior grau médio de acetilação ($\overline{GA} = 80\%$) em relação à quitosana (QT3, $GA = 42\%$). A diminuição do valor de integração desse sinal está relacionada com a quantidade de unidades GlcNAc presentes nas cadeias poliméricas, que diminui durante o processo de desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade, pois ocorre a hidrólise dos grupos acetamido das unidades GlcNAc.

No espectro de RMN ^1H (Figura 22) de beta-quitina são observados os sinais característicos dos anômeros α ($\alpha\text{-H-1-A}$) e β ($\beta\text{-H-1-A}$) das unidades acetiladas em 5,06 e 4,88ppm, respectivamente. O sinal do hidrogênio ligado ao carbono 1 das unidades desacetiladas (H-1-D) está sobreposto ao do β -anômero das unidades acetiladas, enquanto que os sinais entre 4,3 e 4,6ppm são referentes ao hidrogênio ligado ao carbono 1 das unidades acetiladas (H-1-A). O sinal em 2,69ppm refere-se ao hidrogênio ligado ao carbono 2 das unidades desacetiladas (H-2-D), os sinais dos hidrogênios metílicos do grupo acetamido foram observados em 2,0ppm, e os sinais observados no intervalo de 2,9 a 3,6ppm são referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos 2 a 6 do anel de glicopirranose.

No espectro de RMN ^1H da quitosana QT3 (Figura 23), foi observada a presença dos sinais dos hidrogênios metílicos do grupo acetamida (sinais em 2,0ppm), os sinais observados no intervalo de 3,0 a 4,2ppm são referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos 2 a 6 do anel de glicopiranosose e o sinal em 4,9ppm refere-se ao hidrogênio ligado ao carbono 1. Todas as amostras apresentaram os sinais característicos da quitosana. Tais evidências confirmam a eficiência do processo DAIUS para obtenção de quitosana.

5.2.2 Parâmetro de acetilação (PA)

O parâmetro de acetilação descreve a distribuição das unidades GlcNAc e GlcN ao longo das cadeias de quitosana e foi determinado através de espectroscopia de RMN ^1H , usando as integrais apropriadas. O sinal do H-1 da unidade GlcNAc tem dois picos relativamente bem resolvidos que refletem duas sequências de díades. Essas ressonâncias sugerem que o sinal do H-1 da unidade GlcNAc é sensível ao vizinho mais próximo, muito provavelmente ao resíduo que se segue da cadeia, conseqüentemente as duas sequências de díades devem ser AD (GlcNAc-GlcN) e AA (GlcNAc-GlcNAc). A sequência de díades AA predomina quando há um alto grau médio de acetilação ($\overline{GA}$) e a sequência de díades AD, quando há um menor $\overline{GA}$ ^[56,63]. Na Figura 24, é apresentada a região de ressonância dos hidrogênios anoméricos da amostra QT3.

Figura 24 – Espectro de RMN ^1H na região de ressonância dos hidrogênios anoméricos da quitosana QT3 ($\overline{GA} = 42\%$).

Para obter as intensidades dos sinais de H-1 das unidades GlcNAc e GlcN, os espectros de RMN ^1H foram tratados matematicamente, empregando-se uma função Lorentziana que permite a deconvolução dos picos componentes. Na Figura 25, é apresentado o tratamento matemático, visando a deconvolução dos sinais no espectro de RMN ^1H da quitosana QT3.

Figura 25 – Deconvolução do espectro de RMN ^1H da quitosana QT3.

Os valores das intensidades dos sinais são essenciais para calcular as frequências das díades (F_{AA} , F_{AD} , F_{DD} e F_{DA}) e para se obter o parâmetro de acetilação das amostras. Uma vez que $F_{AD} = F_{DA}$, é necessário calcular somente F_{AD} , pois se refere à probabilidade de uma unidade A ter a unidade D como vizinha e vice versa^[56].

Na Tabela 10, são apresentados os valores de $\overline{GA}$, PA e das frequências das díades (F_{AA} , F_{AD} e F_{DD}) das quitosanas.

Tabela 10 – Valores de $\overline{GA}$, PA e das frequências das díades (F_{AA} , F_{AD} e F_{DD})

Amostra	F_{AA}	F_{AD}	F_{DD}	$\overline{GA}$ (%)	PA
QT1	0,1	0,368	0,48	50	0,61
QT2	0,198	0,61	0,46	62	0,75
QT3	0,1	0,494	0,251	42	0,82
QT4	0,094	0,459	0,286	47	0,77
$\overline{PC}^{(a)}$	0,12($\pm$ 0,05)	0,432($\pm$ 0,08)	0,36($\pm$ 0,2)	50($\pm$ 3)	0,7($\pm$ 0,2)

(a)valores médios de 3 determinações independentes.

Foi verificado que os valores de PA das quitosanas variaram no intervalo 0,61 - 0,82, indicando o predomínio da distribuição randômica das unidades GlcNAc e GlcN ao longo das cadeias poliméricas (Figura 26), o que é consistente com o modelo de Bernoulli para copolímeros. Somente para valores de $PA < 0,5$ ou $PA > 1,5$ é que ocorrem os predomínios das distribuições em blocos ou alternada das unidades, as quais não foram observadas nas quitosanas^[57]. A reação de desacetilação de beta-quitina com a utilização do ultrassom ocorre em condições heterogêneas, mas a partir desses resultados, é possível inferir que a desacetilação ocorra de maneira homogênea ao longo da cadeia de beta-quitina, visto que de acordo com a literatura (1-5), quitosanas desacetiladas de maneira homogênea têm uma distribuição randômica das unidades GlcNAc e GlcN e as quitosanas desacetiladas de maneira heterogênea têm uma distribuição preferencialmente em blocos das unidades GlcNAc e GlcN.

Figura 26 – Relação entre PA e $\overline{GA}$.

5.2.3 Modos de vibração

Na Figura 27, é apresentado o espectro de beta-quitina, para comparação entre os espectros das amostras de quitosana. Nas Figuras 28 e 29, estão os espectros das quitosanas e nas Figuras 30 e 31, são evidenciadas as bandas na região $1800-1000\text{cm}^{-1}$.

Figura 27 – Espectro na região do infravermelho da amostra de beta-quitina.

Figura 28 – Espectros na região do infravermelho das amostras QT1, QT2, QT3 e QT4.

Figura 29 – Espectros na região do infravermelho das amostras QT5/1, QT5/2 e QT5/3.

Figura 30 – Bandas características na região de 1800-1000 cm^{-1} dos espectros na região do infravermelho das amostras QT1, QT2, QT3 e QT4.

Figura 31 - Bandas características na região de 1800-1000 cm^{-1} dos espectros na região do infravermelho das amostras QT5/1, QT5/2 e QT5/3.

Segundo Focher e colaboradores^[18], quando a reação de desacetilação ocorre, é observada a diminuição progressiva da intensidade das bandas de amida I (deformação axial CO em aproximadamente 1660cm^{-1}). Analisando os espectros, isto é claramente verificado para todas as quitosanas e é observado também que esta banda está desdobrada em duas bandas, sendo que esse desdobramento está geralmente associado a interações intermoleculares nos domínios cristalinos^[73]. Além disso, a banda de deformação axial CO é bem menos intensa que a observada no espectro de beta- quitina (Figuras 30 e 31).

As bandas de amida II (deformação angular NH em aproximadamente 1560cm^{-1}) e amida III (deformação axial CN em aproximadamente 1315cm^{-1}) não são observadas devido ao decréscimo do teor de unidades GlcNAc, decorrente da hidrólise dos grupos acetamido da beta-quitina de partida, o que é claramente verificado quando os espectros das amostras de beta-quitina e quitosana são comparados.

5.2.4 Cristalinidade

Ogawa e colaboradores^[74] afirmaram que as formas moleculares da quitosana (hidratada, anidra ou não cristalina) poderiam facilmente ser distinguidas pelos seus padrões

de difração de raios X. A quitosana hidratada é obtida normalmente pela desacetilação de quitina e apresenta pico intenso em $2\theta = 10,4^\circ$, referente ao plano cristalográfico (020). A forma anidra é preparada por aquecimento da quitosana hidratada a altas temperaturas ou por sua dissolução em solução de ácidos orgânicos com posterior envelhecimento da mesma^[75] e possui uma reflexão intensa em $2\theta = 15^\circ$, referente ao plano cristalográfico (120). Contudo a forma não cristalina não apresenta pico definido, apenas um pico alargado em $2\theta = 20^\circ$.

A cristalinidade das quitosanas foi avaliada a partir das análises de difração de raios X. Na Figura 32, é apresentado o difratograma da amostra de beta-quitina e nas Figuras 33 e 34, são apresentados os difratogramas das quitosanas.

Figura 32 – Difratograma da amostra de beta-quitina.

Figura 33 – Difratomogramas das amostras QT1, QT2, QT3 e QT4.

Figura 34 – Difratomogramas das amostras QT5/1, QT5/2 e QT5/3.

Os valores de ângulos de Bragg dos picos cristalinos nos difratogramas das quitosanas são destacados na Tabela 11.

Tabela 11– Ângulos de Bragg 2θ dos difratogramas das quitosanas

Amostra	2θ
QT1	$\approx 11,7^\circ, \approx 20,1^\circ$
QT2	$\approx 13,4^\circ, \approx 20,3^\circ$
QT3	$\approx 11,6^\circ, \approx 20^\circ$
QT4	$\approx 11,7^\circ, \approx 20,3^\circ$
$\overline{PC}$	$\approx 13^\circ(\pm 0,8), \approx 20^\circ(\pm 0,05)$

Analisando os difratogramas e os dados apresentados na Tabela 11, conclui-se que as quitosanas apresentam difratogramas característicos de amostras pouco cristalinas, pois existem menos reflexões comparadas à beta-quitina e os picos são mais largos. Como a quitosana anidra é obtida apenas em condições especiais, e possui reflexão intensa em $2\theta = 15^\circ$, pode-se constatar que todas as amostras obtidas têm estrutura cristalina na forma hidratada, pois possuem picos cristalinos intensos em $2\theta = 20^\circ$

Copolímeros são constituídos por dois meros diferentes na cadeia principal e podem se formar segundo vários arranjos geométricos (alternado, aleatório e bloco), quanto mais irregulares ou aleatórios os arranjos, maior a tendência a estrutura não cristalina. Os valores de índice de cristalinidade (I_{cr}) das quitosanas foram calculados empregando o método descrito por Focher e colaboradores (Tabela 12)^[18].

Tabela 12 – Valores de grau de acetilação ($\overline{GA}$) e índice de cristalinidade (I_{cr}) das quitosanas

Amostra	$\overline{GA}$ (%)	I_{cr}
QT1	50	69
QT2	62	64
QT3	42	59
QT4	47	60
$\overline{PC}$	$50(\pm 3)$	$63(\pm 2)$

Pelos dados experimentais, verifica-se que o índice de cristalinidade é praticamente o mesmo (menos de 4% de diferença, em média) para todas as quitosanas, independentemente dos valores de $\overline{GA}$. Como relatado por Kumirska e colaboradores^[56], quanto menor o grau de acetilação, menor será a intensidade do pico cristalográfico, conseqüentemente menor será o índice de cristalinidade.

Esses resultados sugerem que a aplicação do processo DAIUS provocou mudanças nos domínios cristalinos de beta-quitina, provavelmente devido à redução do tamanho dos cristalitos o que, por sua vez, resultou no aumento da área superficial exposta aos reagentes^[17].

5.2.5 Comportamento térmico

As curvas de TG/DTG das quitosanas (Figuras 35 e 36) foram obtidas em atmosfera dinâmica de ar sintético. Os valores de temperatura de decomposição térmica e perda de massa são apresentados na Tabela 13.

Figura 35 – Curvas TG das quitosanas sob atmosfera dinâmica de ar sintético.

Figura 36 – Curvas DTG das quitosanas sob atmosfera dinâmica de ar sintético.

Tabela 13 - Dados obtidos das curvas termogravimétricas das quitosanas

Amostra	T ₀ (°C)	T _f (°C)	T _{máx} (°C)	T _{onset} (°C)	Perda de massa (%)
QT1	211	339	305	259	50
QT2	213	319	285	248	54
QT3	216	333	305	265	51
QT4	208	333	293	256	50
$\overline{PC}$	212 (±6)	320(±10)	286(±10)	255(±9)	52(±0,3)

Através das curvas TG/DTG das quitosanas é possível inferir que o primeiro evento térmico (31-100°C) refere-se ao processo de desidratação e o segundo evento térmico (259-339°C) refere-se ao processo de decomposição dos polímeros. A partir da análise dos dados da Tabela 13 é possível observar que não houve diferenças significativas nos intervalos de temperatura de decomposição das amostras, mas é possível notar que a perda de massa da amostra QT2 foi ligeiramente maior quando relacionada às outras quitosanas, portanto é

provável que a perda de massa esteja relacionada com a quantidade de unidades GlcNAc presentes nas cadeias poliméricas das amostras. Assim durante o segundo evento térmico é provável que ocorra a decomposição das unidades acetiladas dos polímeros, o que justifica a perda de massa ser maior no caso da amostra QT2, visto que o seu grau médio de acetilação é igual a 62%, ou seja, essa amostra possui maior quantidade de unidades GlcNAc em relação as outras amostras.

5.2.6 Massa molar viscosimétrica média

As curvas de viscosidade das quitosanas são apresentadas na Figura 37. Pode ser observado que os pontos experimentais apresentam correlação linear elevada ($r^2 > 0,99$), mostrando que as condições experimentais empregadas para a determinação da viscosidade foram adequadas, principalmente no que diz respeito à manutenção da força iônica durante o procedimento de diluição das soluções poliméricas. A partir das constantes de Huggins (K_H) determinados no solvente estudado são relativamente baixos, indicando que soluções de boa qualidade foram obtidas pela dissolução das quitosanas, isentas de agregados (Tabela 15)^[33].

Assim, as viscosidades intrínsecas $[\eta]$ das amostras foram calculadas de acordo com a equação de Mark-Houwink (equação 5), os seguintes valores dos parâmetros K' e α , obtidos da literatura, utilizados nos cálculos da massa molar viscosimétrica média ($\overline{M}_v$), são aqueles apresentados na Tabela 14.

Figura 37 – Curvas de viscosidade reduzida *versus* concentração das quitosanas em solução tampão ácido acético 0,3 mol L⁻¹/acetato de sódio 0,2 mol L⁻¹ à temperatura de 25°C.

Tabela 14 – Valores das constantes K' e α da equação de Mark-Houwink para diferentes graus médios de acetilação de quitosana^[66]

$\overline{GA}$ (%)	K'	α
41	0,062	0,813
56	0,057	0,825
61	0,056	0,821

Na Tabela 15, são apresentados os valores de viscosidade intrínseca $[\eta]$, massa molar viscosimétrica média ($\overline{M}_v$), grau de polimerização ($\overline{GP}$) e constante de Huggins (K_H) de beta-quitina e das quitosanas.

Tabela 15 – Valores de viscosidade intrínseca $[\eta]$, massa molar viscosimétrica média ($\overline{M}_v$), grau de polimerização ($\overline{GP}$) e constante de Huggins (K_H) de beta-quitina e das quitosanas

Amostra	$[\eta]$ (mL/mg)	$\overline{M}_v$ (g/mol)	$\overline{GP}$	K_H
beta-quitina	5,1971	$1,9 \times 10^6$	5885	0,25
QT1	1,6171	$2,49 \times 10^5$	1371	0,52
QT2	1,2319	$1,94 \times 10^5$	1040	0,39
QT3	1,2548	$1,97 \times 10^5$	1105	0,84
QT4	1,7283	$2,93 \times 10^5$	1625	0,44
QT5/1	0,9154	$1,25 \times 10^5$	690	0,44
QT5/2	1,5746	$2,41 \times 10^5$	1330	0,57
QT5/3	1,4856	$2,25 \times 10^5$	1228	0,51

Analisando os dados da Tabela 15, verifica-se que, embora ocorra despolimerização, a aplicação do processo DAIUS leva à obtenção de quitosanas de elevada massa molar, essa despolimerização é confirmada pelos valores de grau médio de polimerização que na beta-quitina é bem elevado em comparação às quitosanas, comprovando que o processo causou despolimerização nas cadeias e não há diferenças significativas de grau médio de polimerização entre as quitosanas, exceto na amostra QT5/1, os erros na manipulação dessa amostra serão apresentados adiante. Não é possível notar grande diferença entre as massas molares viscosimétricas médias das quitosanas, exceto a amostra QT5/1. Nesse caso, ocorreram problemas na etapa de neutralização, pois o pH atingiu valor muito baixo ($\text{pH} < 1,5$) devido à adição de excesso de ácido e sua correção por adição de solução concentrada de NaOH resultou em força iônica mais elevada, em comparação com as outras amostras, isso pode ter causado a acentuada diminuição da massa, quando comparada às outras amostras.

Através da análise dos dados dos valores de viscosidade intrínseca e massa molar viscosimétrica média das quitosanas, pode ser observado que a sonicação promoveu a despolimerização das cadeias poliméricas. No entanto, é importante ressaltar que as condições empregadas na desacetilação de beta-quitina são relativamente brandas e a despolimerização, embora aconteça com o emprego de tratamentos sucessivos, não é tão acentuada como quando se empregam condições mais drásticas, isso é confirmado pelo grau de polimerização das amostras^[28].

5.2.7 Solubilidade

A quitosana é solúvel em meio ácido se tornando um polieletrólito devido à protonação dos grupos amino (NH_2) quando o $\text{pH} < \text{pK}_a \cong 6,5^{[76]}$. O equilíbrio abaixo descreve o estado de ionização:

As propriedades da quitosana em solução dependem não só do seu grau médio de acetilação, mas também a distribuição dos grupos acetil das unidades GlcNAc ao longo da cadeia polimérica, além da sua massa molar^[12,77].

A solubilidade das quitosanas em solução de ácido clorídrico $0,05\text{mol.L}^{-1}$, em diferentes valores de pH, foi determinada através da análise de espectroscopia de UV/vis. Na Figura 38 é apresentado o gráfico de absorvância em $\lambda = 600\text{nm}$ ($A_{600\text{ nm}}$) *versus* grau médio de acetilação ($\overline{GA}$) para as quitosanas.

Figura 38 – Gráfico de absorvância em $\lambda = 600\text{nm}$ versus grau médio de acetilação ($\overline{GA}$) para as quitosanas.

A partir do gráfico acima, é possível notar que a quitosana QT2 ($\overline{GA} = 62\%$) é a única amostra que não foi solúvel em nenhum valor de pH, todas as outras quitosanas foram

solúveis em pH 2, sendo que as quitosanas QT3 e QT5/1 também foram solúveis em pH 5 e o restante das quitosanas foram parcialmente solúveis em pH 5. A insolubilidade da quitosana QT2 está relacionada à quantidade de grupos amino protonados das unidades GlcN em sua cadeia, nesse caso, a quitosana tem um grau médio de acetilação mais alto, comparado às outras quitosanas, assim não há grande quantidade de grupos amino protonados para manter esse polímero solúvel.

A solubilidade das quitosanas em pH 2 e da quitosana QT3 em pH 5 é atribuída à protonação dos grupos amino ($\text{-NH}_2 \rightarrow \text{-NH}_3^+$) das unidades GlcN nas cadeias de quitosana. De fato, a protonação dos grupos amino resulta na quaternização do átomo de nitrogênio que se torna um polieletrólito catiônico em meios ácidos^[77] e no caso da amostra QT3, por ter o menor grau médio de acetilação, possui maior quantidade de grupos amino protonados, conferindo solubilidade em ambos os valores de pH. A solubilidade da amostra QT5/1 em pH 5 está relacionada também ao fato da protonação dos grupos amino, mas principalmente pela sua menor massa molar viscosimétrica média comparada as outras quitosanas, como já mencionado acima, a solubilidade da quitosana também depende do seu peso molecular^[12], por esse motivo, a quitosana QT5/1 foi solúvel em pH 5, enquanto que a amostra QT5/2, com o mesmo valor de $\overline{GA}$, foi parcialmente solúvel nesse pH, sendo que essa quitosana tem uma massa molar viscosimétrica média maior que da quitosana QT5/1, conferindo à ela menor solubilidade.

6 Análise Fatorial Fracionária

Quando se aplicam réplicas a um projeto, o número de ensaios aumenta bastante e, dependendo do caso, torna o experimento de alto custo ou até mesmo inviável a partir de um planejamento fatorial completo, para casos como estes, o indicado é a realização de um planejamento fatorial fracionário, cuja diferença está na redução do número de ensaios e consequentemente na redução do grau de liberdade do experimento^[78].

Desta maneira, com um número menor de experimentos, é possível obter informações daqueles efeitos mais importantes e retirar, na maioria das vezes, as mesmas conclusões caso fosse realizado um planejamento fatorial completo. Neste trabalho, foi utilizada a abordagem de Teófilo e Ferreira (12 caracterizações), como descrito na parte experimental, e realizado um planejamento fatorial fracionário (2^{3-1}) para avaliar a influência do diâmetro do reator, do tempo de pulsação da irradiação e do tempo de pré-condicionamento visando o

intumescimento das partículas de beta-quitina sobre a massa molar viscosimétrica média ($\overline{M}_v$) e o grau médio de acetilação ($\overline{GA}$) das quitosanas obtidas pelo processo DAIUS. Os intervalos de variação desses parâmetros e as respostas de interesse são apresentados na Tabela 16:

Tabela 16 - Intervalos de variação dos parâmetros X_1 , X_2 e X_3

Variáveis	Nível		
	-1	0	+1
- Diâmetro do reator (X_1)	4cm	4,5cm	5cm
- Tempo de pulsação (X_2)	0,5	0,7	1,0
- Tempo de pré-condicionamento (X_3)	0	15 min	30 min

O planejamento fatorial fracionário foi gerado utilizando o programa estatística 6.0. Os experimentos foram realizados em ordem aleatória para evitar tendências nos resultados que foram divididos em duas partes, sendo a primeira parte referente ao grau médio de acetilação ($\overline{GA}$) e a segunda parte, refere-se à massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$). Na Tabela 17 são apresentados os valores das variáveis codificadas e os resultados obtidos experimentalmente.

Tabela 17 - Resultados obtidos experimentalmente com base no planejamento fatorial fracionário

Ensaio	X_1	X_2	X_3	$\overline{GA}$ (%)	$\overline{M}_v$ (10^5 g.mol^{-1})
QT1	-1	-1	1	50	2,49
QT2	1	-1	-1	62	1,94
QT3	-1	1	-1	42	1,97
QT4	1	1	1	47	2,93
QT5/1	0	0	0	49	1,25
QT5/2	0	0	0	49	2,41
QT5/3	0	0	0	54	2,25

6.1 Grau médio de acetilação ($\overline{GA}$)

A Tabela 18 apresenta os valores dos efeitos de cada variável e o valor de p (valor que expressa a significância dos resultados) em relação ao grau médio de acetilação.

Tabela 18 - Resultados dos efeitos das três variáveis em função do $\overline{GA}$

Variáveis	Efeito	p
Diâmetro do reator	8,5	0,098
Tempo de pulsação	-11,5	0,057
Pré-tempo	-3,5	0,34

Com o erro padrão, podemos construir intervalos de confiança para os valores dos efeitos, usando a distribuição t de Student. O erro padrão (Equação 11) foi estimado a partir da triplicata do ponto central.

$$\hat{\eta} - t_{n-1} \times s(efeito) < \eta < \hat{\eta} + t_{n-1} \times s(efeito) \quad [11]$$

Onde $\hat{\eta}$ indica a estimativa do efeito obtido a partir dos ensaios realizados no experimento e η representa o verdadeiro valor de um efeito. Na prática, a equação implica que só se devem considerar estatisticamente significativos os efeitos cujas estimativas (obtidos no experimento) forem superiores em valor absoluto ao produto do erro padrão pelo ponto da distribuição de t de student, pois somente assim o intervalo de confiança não incluirá o valor zero.

De acordo com a Equação 11, serão considerados estatisticamente significativos, com 95% de confiança, os efeitos cujos valores absolutos forem superiores a $\pm 4,303 \times 2,89 = 12,44$. Aplicando esse critério aos valores da Tabela 18, é possível afirmar que todos eles não são significativos, mas a intenção de um planejamento fatorial fracionário é detectar a importância relativa dos efeitos e verificar a possibilidade de eliminar os fatores que sejam menos importantes.

O gráfico de Pareto (Figura 39) é empregado para melhor visualizar os efeitos estatisticamente importantes. Pode-se notar que, para os níveis observados, os fatores estudados não foram relevantes, visto que o valor de p, como mostrado na Tabela 18, foi

superior a 5%. Os efeitos cujos retângulos estiverem à direita da linha divisória ($p=0,05$) devem ser considerados, o que não foi o caso.

Figura 39 – Gráfico de Pareto para os resultados referentes ao grau médio de acetilação ($\overline{GA}$).

6.2 Massa molar viscosimétrica média ($\overline{M_v}$)

A Tabela 19, apresenta os valores dos efeitos de cada variável e o valor de p em relação à massa molar viscosimétrica média.

Tabela 19 - Resultados dos efeitos das três variáveis em função do $\overline{M_v}$

Variáveis	Efeito	p
Diâmetro do reator	0,205	0,853
Tempo de pulsação	0,235	0,832
Pré-tempo	0,755	0,521

De acordo com a Equação 11, serão considerados estatisticamente significativos, com 95% de confiança, um efeito cujo valor absoluto for superior $\pm 4,303 \times 0,97 = 4,17$.

Aplicando esse critério aos valores da Tabela 19, é possível afirmar que todos eles não são significativos.

O gráfico de Pareto (Figura 40) evidencia que nenhum efeito foi relevante, no nível de 95% de confiança.

Figura 40 – Gráfico de Pareto para os resultados referentes à massa molar viscosimétrica média ($\overline{M}_v$).

Em ambas as repostas obtidas experimentalmente, o grau médio de acetilação ($\overline{GA}$) e a massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$), nenhuma das variáveis mostrou-se influente nas repostas obtidas. O planejamento foi satisfatório, pois com base nesses resultados, podem-se avaliar essas variáveis em outros níveis diferentes dos analisados no presente trabalho.

Assim, o efeito do diâmetro do reator poderá ser analisado futuramente para níveis menores de diâmetro, pois com base nos resultados obtidos, observou-se que a diminuição do diâmetro irá diminuir o grau médio de acetilação. No caso do pré-condicionamento de intumescimento das partículas de beta-quitina no processo, observou-se que seu aumento, faz com que o grau médio de acetilação diminua. Para um estudo futuro, esses níveis devem ser bem controlados e estudados para evitar a despolimerização, dado que o estudo feito com a massa molar viscosimétrica média não apresentou nenhum resultado satisfatório para avaliar os efeitos das variáveis nas repostas experimentais.

6 CONCLUSÕES

A modificação e a caracterização das quitosanas obtidas via processo DAIUS^[23] foi realizada com êxito. De maneira geral, deve ser concluído que o processo apresenta potencial para ser aperfeiçoado e se constituir um processo de produção industrial de quitosanas com características controladas através do controle dos parâmetros do processo.

De fato, o uso da irradiação de ultrassom de alta intensidade para promover a desacetilação de quitina apresenta um grande diferencial quando comparado com outras metodologias apresentadas na literatura, como o método Freeze-Pump Out-Thaw “FPT”^[22], pois tal método demanda muito tempo para reação de desacetilação. O método mais conhecido, o tratamento de quitina com soluções concentradas de hidróxido de sódio em temperaturas elevadas por várias horas^[1], também é menos eficiente que o processo DAIUS, pois nesse caso ocorre acentuada despolimerização. Assim, a conversão de quitina em quitosana via processo DAIUS ocorre em tempos curtos e temperaturas brandas, gerando quitosanas com elevada massa molar.

As análises de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio comprovaram a obtenção das amostras de quitosana pelo processo DAIUS. Assim, foi observada a diminuição do valor de integração do sinal em 2ppm (hidrogênios metílicos das unidades GlcNAc) da quitosana em relação ao valor de beta-quitina, o que indica que ocorreu a hidrólise dos grupos acetamido das unidades GlcNAc.

Com base nos espectros de RMN ¹H, também foi possível determinar o parâmetro de acetilação (PA) das quitosanas, as quais apresentaram distribuição randômica das unidades GlcNAc e GlcN, o que permite inferir que a desacetilação via processo DAIUS ocorreu de forma homogênea.

A morfologia da superfície das amostras foi analisada por microscopia eletrônica de varredura, sendo observado que as partículas de beta-quitina apresentam superfícies relativamente lisas, enquanto que as quitosanas obtidas via processo DAIUS apresentam superfícies mais rugosas, sendo tais alterações morfológicas atribuídas ao efeito da cavitação.

As quitosanas adotam arranjos menos ordenados no estado sólido e também são termicamente menos estáveis em comparação à beta-quitina de partida. A reação de desacetilação de beta-quitina via processo DAIUS não evitou a ocorrência de despolimerização, conforme constatado por medidas de viscosidade, mas gerou quitosanas com massa molar viscosimétrica média relativamente elevada, variando no intervalo $1,25 \times 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} < \overline{M}_v < 2,93 \times 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, entretanto, a variação dos parâmetros do processo, a

saber, diâmetro do reator, o tempo de pulsação da irradiação e o tempo de pré-condicionamento de intumescimento das partículas de beta-quitina do processo, nos intervalos estudados não resultou em variação importante do grau médio de acetilação das quitosanas produzidas, que variaram no intervalo $42\% < \overline{GA} < 62\%$.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ROBERTS, G. A. F. **Chitin chemistry**. London: McMillan, 1992. 350 p.
2. 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.
3. JEUNIAUX, C.; VOSS-FOUCART, M. F. Chitin biomass and production in the marine environment. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 19, n. 5, p. 347-356, 1991.
4. DURKIN, C. A.; MOCK, T.; ARMBRUST, E.; V. Chitin in diatoms and its association with the cell wall. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 7, p. 1038-1050, 2009.
5. CAMPANA FILHO, S. P.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, R. F.; CARDOSO, M. B.; MARCOS, V. Extração, estruturas e propriedades da α - e β -quitina. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 644-650, 2007.
6. 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 2011**. São Paulo, 2012. Relatório Técnico. Disponível em: < <ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/1112InformePMAP.pdf> >. Acesso em: 15 de ago. 2012.
7. MAJETI, N. V.; KUMAR, R.; A. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Funcional Polymers**, v. 46, p. 1-27, 2000.
8. KOIDE, S. S. Chitin-chitosan: properties, benefits and risks. **Nutrition Research**, v. 18, n. 6, p. 1091-1101, 1998.
9. SASHIWA, H.; AIBA, S. Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 29, p. 887-908, 2004.
10. KHOR, E.; LIM, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**, v. 24, p. 2339-2349, 2003.
11. KURITA, K. Chemistry and application of chitin and chitosan. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 117-120, 1998.
12. RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 603-632, 2006.
13. 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.
14. CHEN, C.; WANG, F.; OU, Z. Deacetylation of β -chitin. I. Influence of the deacetylation conditions. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 93, n. 5, p. 2416-2422, 2004.

15. CAMPANA FILHO, S. P.; SIGININI, R. Efeito de Aditivos na Desacetilação de Quitina. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, n. 4, p. 169-173, 2001.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. TAHTAT, D.; UZUN, C.; MAHLOUS, M.; GÜVEN, O. Beneficial effect of gamma irradiation on the N-deacetylation of chitin to form chitosan. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials & Atoms**, v. 265, n.1, p. 425-428, 2007.
21. CHANG, K. L. B.; TSAI, G.; LEE, J.; FU, W. Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution. **Carbohydrate Research**, v. 303, p. 327-332, 1997.
22. 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.
23. DELEZUK, J. A. D. M.; CARDOSO, M. B.; DOMARD, A.; CAMPANA FILHO, S. P. Ultrasound-assisted deacetylation of beta-chitin: influence of processing parameters. **Polymer International**, v. 60, n. 6, p. 903-909, 2011.
24. PERSIN, K.; STANA-KLEINSCHEK, T. J.; FOSTER, J. E. G.; VANDAM, C. G.; BOERIU, P.; NAVARD. Challenges and opportunities in polysaccharides research and technology: the EPNOE views for the next decade in the áreas of materials-, food- and health care. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 22-32, 2011.
25. 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.
26. FRANCA, E. F.; LINS, R. D.; FREITAS, L. C. G.; STRAATSMA, T. P. Characterization of chitin and chitosan molecular structure in aqueous solution. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, p. 2141-2149, 2008.
27. 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, n. 6, p. 1027-1032, 1994.

28. 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) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

29. PILLAI, C. K. S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science**, v. 34, p. 641-678, 2009.

30. RATHKE, T. D.; HUDSON, S. M. Review of chitin and chitosan as fiber and film formers. **Journal of Macromolecular Science - Reviews in Macromolecular Chemistry and Physics**, v. C34, n. 3, p. 375-437, 1994.

31. 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.

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

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

34. SANTOS, J. E.; SOARES, J. P.; DOCKAL, E. R.; CAMPANA-FILHO, S. P.; CAVALHEIRO, É. T. G. Caracterização de Quitosanas Comerciais de Diferentes Origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

35. SAGHEER, F. A. A.; SUGHAYER, M. A. A.; MUSLIM, S.; ELSABEE, M. Z. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 410-419, 2009.

36. PRICE, G. J. Ultrasonically enhanced polymer synthesis. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 3, p. 229-238, 1996.

37. CONTAMINE, F.; FAID, F.; WILHELM, A. M.; BERLAN, J.; DELMAS, H. Chemical reactions under ultrasound: discrimination of chemical and physical effects. **Chemical Engineering Science**, v. 49, n. 24, p. 5865-5873, 1994.

38. MASON, T. J. Ultrasound in synthetic organic chemistry. **Chemical Society Reviews**, v. 26, n. 6, p. 443-451, 1997.

39. SUSLICK, K. S.; PRICE, G. J. Applications of ultrasound to materials chemistry. **Annual Review of Materials Science**, v. 29, p. 295-326, 1999.

40. SHEPHERD, R.; READER, S.; FALSHAW, A. Chitosan functional properties. **Glycoconjugate Journal**, v. 14, p. 535-542, 1997.

41. EL HADRAMI, A.; ADAM, L. R.; EL HADRAMI, I.; DAAYF, F. Chitosan in plant protection. **Marine Drugs**, v. 8, p. 968-987, 2010.
42. BAÑOS, S. B.; LAUZARDO, A. N. H.; VALLE, M. G. V.; LÓPEZ, M. H.; BARKA, E. A.; MOLINA, E. B.; WILSON, C. L. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. **Crop protection**, v. 25, p. 108-118, 2006.
43. GÉRENTES, P.; VACHOUD, L.; DOURY, J.; DOMARD, A. Study of chitin-based gel as injectable material in periodontal surgery. **Biomaterials**, v. 23, p. 1295-1302, 2002.
44. PRABAHARAN, M. Review paper: chitosan derivatives as promising materials for controlled drug delivery. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 23, n. 1, p. 5-36, 2008.
45. MUZZARELLI, R. A. A. Chitosan-based dietary foods. **Carbohydrate Polymers**, v. 29, p. 309-316, 1996.
46. ALISHAHI, A.; AİDER, M. Applications of chitosan in the seafood industry and aquaculture: A Review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 817-830, 2011.
47. DOMARD, A. A perspective on 30 years research on chitin and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 696-703, 2011.
48. BÉGIN, A.; CALSTEREN, M.-R. V. Antimicrobial films produced from chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 26, p. 63-67, 1999.
49. POIRIER, M.; CHARLET, G. Chitin fractionation and characterization in N,N-dimethylacetamide/lithium chloride solvent system. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, p. 363-370, 2002.
50. LAMARQUE, G.; LUCAS, J.-M.; VÍTON, C.; DOMARD, A. Physicochemical behavior of homogeneous series of acetylated chitosans in aqueous solution: role of various structural parameters. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 131-142, 2005.
51. LAMARQUE, G.; CHAUSSARD, G.; DOMARD, A. Thermodynamic aspects of the heterogeneous deacetylation of β -chitin: Reaction mechanisms. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 1942-1950, 2007.
52. SASHIWA, H.; SAIMOTO, H.; SHIGEMASA, Y.; TOKURA, S. N-acetyl group distribution in partially deacetylated chitins prepared under homogeneous conditions. **Carbohydrate Research**, v. 242, p. 167-172, 1993.
53. 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.
54. KURITA, K.; KAMIYA, M.; NISHIMURA, S.-I. Solubilization of a rigid polysaccharide: controlled partial N-acetylation of chitosan to develop solubility. **Carbohydrate Polymers**, v. 16, p. 83-92, 1991.

55. MIRAU, P. A. **A Practical guide to understanding the NMR of polymers**. New Jersey: Hardcover, 2005. 418 p.
56. KUMIRSKA, J.; CZERWICKA, M.; KACZYNSKI, Z.; BYCHOWSKA, A.; BRZOZOWSKI, K.; THÖMING, J.; STEPNOWSKI, P. Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1567-1636, 2010.
57. WEINHOLD, M. X.; SAUVAGEAU, J. C. M.; KUMIRSKA, J.; THÖMING, J. Studies on acetylation patterns of different chitosan preparations. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 4, p. 678-684, 2009.
58. 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.
59. CHAUSSARD, G.; DOMARD, A. New aspects of the extraction of chitin from squid pens. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 559-564, 2004.
60. DELEZUK, J. A. M. **Desacetilação de beta-quitina assistida por ultrassom de alta intensidade: Estudo dos efeitos da amplitude, do tempo de irradiação e da temperatura de reação**. 2009. 97 f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.
61. TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.
62. EINBU, A.; VÅRUM, K. M. Characterization of chitin and its hydrolysis to GlcNAc and GlcN. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 1870-1875, 2008.
63. VÅRUM, K. M.; ANTHONSEN, M. W.; GRASDALEN, H.; SMIDSRØD, O. Determination of the degree of N-acetylation and the distribution of N-acetyl groups in partially N-deacetylated chitins (chitosans) by high-field n.m.r. spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 211, p. 17-23, 1990.
64. HUGGINS, M. L. Theory of solutions of high polymers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 64, n. 7, p. 1712-1719, 1942.
65. KASAAI, M. R. Calculation of Mark-Houwink-Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent-temperature system using experimental reported viscometric constants data. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 477-488, 2007.
66. BRUGNEROTTO, J.; DESCRIÈRES, J.; ROBERTS, G.; RINAUDO, M. Characterization of chitosan by steric exclusion chromatography. **Polymer**, v. 42, n. 25, p. 9921-9927, 2001.

67. KURITA, K.; TOMITA, K.; 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, n. 9, p. 2393-2395, 1993.
68. KURITA, K.; TOMITA, K.; TADA, T.; ISHII, S.; NISHIMURA, S.-I.; SHIMODA, K. Squid chitin as a potencial alternative chitin source: deacetylation behavior and characteristic properties. **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer chemistry**, v. 31, n. 2, p. 485-491, 1993.
69. 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) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
70. FIAMINGO, A. **Membranas porosas de N,O-carboximetilquitosana/quitosana para aplicação na prevenção de adesões pericárdicas pós-cirúrgicas**. 2012. 141 f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
71. ANTHONSEN, M. W.; VÅRUM, K. M.; SMIDSRØD, O. Solution properties of chitosans: conformation and chain of chitosans with different degrees of N-acetylation. **Carbohydrate Polymers**, v. 22, p. 193-201, 1993.
72. POPA-NITA, S.; LUCAS, J. M.; LAVADIÈRE, C.; DAVID, L.; DOMARD, A. Mechanisms involved during the ultrasonically induced depolymerization of chitosan: characterization and control. **Biomacromolecules**, v. 10, p. 1203-1211, 2009.
73. FOCHER, B.; NAGGI, A.; TORRI, G.; COSANI, A.; TERBOJEVICH, M. Chitosans from *Euphasia superba*. 2: characterization of solid state structure. **Carbohydrate Polymers**, v. 18, p. 43-49, 1992.
74. OGAWA, K. Effect of heating na aqueous suspension of chitosan on the crystallinity and polymorphs. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, n. 9, p. 2375-2379, 1991.
75. OKUYAMA, K.; NOGUCHI, K.; HANAFUSA, Y.; OSAWA, K.; OGAWA, K. Structural study of anhydrous tendom chitosan obtained via chitosan/acetic acid complex. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 26, p. 285-293, 1999.
76. RINAUDO, M.; PAVLOV, G.; DESBRIÈRES, J. Solubilization of chitosan in strong acid medium. **International Journal of Polymer Analysis and Characterization**, v. 5, p. 267-276, 1999.
77. ABREU, F. R.; CAMPANA FILHO, S. P. Characteristics and properties of carboxymethylchitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 214-221, 2009.
78. BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Editora da Unicamp, 2001. 414 p.

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