UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**PRODUÇÃO DE QUITOSANAS COM CARACTERÍSTICAS CONTROLADAS
UTILIZANDO A IRRADIAÇÃO DE ULTRASSOM DE ALTA INTENSIDADE**

Jorge Augusto de Moura Delezuk

São Carlos
2013

JORGE AUGUSTO DE MOURA DELEZUK

**PRODUÇÃO DE QUITOSANAS COM CARACTERÍSTICAS CONTROLADAS
UTILIZANDO A IRRADIAÇÃO DE ULTRASSOM DE ALTA INTENSIDADE**

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

Área de concentração: Físico-Química.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana Filho

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos

2013

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

Delezuk, Jorge Augusto de Moura

Produção de quitosanas com características controladas utilizando a
irradiação de ultrassom de alta intensidade. / Jorge Augusto de Moura
Delezuk. -- São Carlos, 2013.

210 p.

Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos / Universidade de
São Paulo, 2013.

Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana Filho.

1. Beta-Quitina. 2. Quitosana com características controladas. 3.
Ultrassom de alta intensidade. I. Título.

*Referências Bibliográficas
conferidas pelo SBI/IQSC*

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 querida amada, amiga, confidente, namorada, esposa, minha mulher e o amor da minha vida, Yanayne, que sempre está ao meu lado e me completa. Dedico também aqueles que me amam e me apoiam incondicionalmente, meus pais Paulo e Marina, minha avó Nenzinha e minhas irmãs Ana Paula e Vivian.

AGRADECIMENTOS

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, assim como para o meu crescimento profissional e pessoal, gostaria de expressar aqui os meus sinceros agradecimentos:

A minha esposa Yanayne, que surgiu em minha vida e me tornou o homem mais feliz do mundo, palavras não são suficientes para descrever o que sinto por você, saiba que sempre te amarei.

Aos meus pais, Paulo e Marina, por acreditarem em mim e me mostrarem o valor dos estudos e da dedicação, por terem me ensinado a ser uma pessoa justa e honesta. As minhas irmãs Vivian e Ana Paula pelos bons momentos que passamos juntos, não poderíamos ter tido uma infância melhor. A minha avó Nenzinha, uma mulher à frente de seu tempo, que sempre me apoiou nos estudos e em todas minhas decisões. Aos meus cunhados Fernando, Petterson, Gefferson e Willian que se tornaram meus irmãos e a minha sogra Cheila por todo apoio. A toda minha família, tenho muito orgulho de vocês.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana Filho pela excelente orientação desde o meu mestrado, pela disponibilidade constante e pelo entusiasmo demonstrado ao longo destes anos. Por tudo o que me ensinou, por acreditar e confiar em mim e nas minhas capacidades, muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Laurent Paul Christian David, por me receber em seu grupo e a todos os que estavam presentes durante o período em que trabalhei no laboratório de Ingénierie des Matériaux Polymères, na Université Claude Bernard Lyon 1, em especial o técnico Jean Michel Lucas que além de me ensinar todos os segredos da cromatografia foi meu melhor amigo na França.

A Profa. Dra. Elisabete Frollini, pelos ensinamentos e amizade.

Aos técnicos do grupo de Físico-Química Orgânica, Márcia Dib Zambon e Luís Antônio Ramos pelo profissionalismo e pelas ótimas conversas durante o café.

Aos meus amigos do Grupo de Físico-química Orgânica e do Grupo de Materiais Macromoleculares e Fibras Lignocelulósicas: Marcinha, Adriana, Willian, Bruna, Mário, Tonimar, Érika, Anderson, Virgínia, Daniella, Sara, Lilian, Bruno, Rachel, Fernando, Maurício, Elaine, Bibi, Fran, Dani, Cris, Aline, Nádia, Talita, Joice, Daiana e Leandro (espero não ter esquecido ninguém), que se tornaram uma extensão da minha família. Ao longo dos anos que passamos juntos dividimos mais que bancadas, estufas e vidrarias, dividimos muitas alegrias e momentos felizes. O bom humor e o profissionalismo de cada um de vocês foram fundamentais para tornar minha jornada até aqui muito mais prazerosa.

Aos técnicos da central de análises químicas do IQSC: Márcio, Sylvana, André, Carlos e Thiago pela eficiência e dedicação no trabalho realizado.

Aos funcionários do CEFER: Alexandre, Gizele e Evert, que me ensinaram a importância da prática esportiva "*Mens sana in corpore sano*".

A todos os meus amigos, que independentemente da cidade, país ou continente em que se encontram hoje, me acolheram e acompanharam durante todo ou parte deste percurso, um muito obrigado a vocês por proporcionarem momentos únicos de alegria, por me ouvirem e apoiarem sempre.

A minha cachorra Paris, pela companhia durante nossas infinitas caminhadas de reflexão.

Desejo ainda expressar o meu agradecimento à Universidade de São Paulo e ao Instituto de Química de São Carlos, a todos os membros do Departamento de Físico-Química (DFQ) que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, e a FAPESP pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa de doutorado e a CAPES pela bolsa de doutorado no exterior.

*“Quero dizer agora o oposto do que eu disse antes
Eu prefiro ser essa metamorfose ambulante
Do que ter aquela velha opinião formada sobre tudo...”*
RAUL SEIXAS

“O conhecimento nos faz responsáveis.”
CHE GUEVARA

*“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas;
é quem faz as verdadeiras perguntas.”*
CLAUDE LÉVI-STRAUSS

*“ Cada um que passa em nossa vida passa sozinho...
Porque cada pessoa é única para nós, e nenhuma substitui a outra...
Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai só...
Levam um pouco de nós mesmos e deixam um pouco de si mesmos.
Há os que levam muito, mas não há os que não levam nada.
Há os que deixam muito, mas não há os que não deixam nada.
Esta é a mais bela realidade da vida...
A prova tremenda de que cada um é importante
e que ninguém se aproxima do outro por acaso!”*
ANTOINE DE SAINT-EXUPERY

RESUMO

A principal reação de derivatização da quitina é a hidrólise dos grupos acetamido, que gera o polímero conhecido como quitosana. O foco do presente estudo é desenvolver um processo eficiente, reprodutivo e versátil para produção de quitosanas com características controladas. Nesse sentido, o processo de desacetilação de quitina assistida por irradiação do ultrassom de alta intensidade, denominado processo DAIUS, foi estudado. Para o desenvolvimento do estudo proposto, as seguintes etapas foram realizadas: i) extração, fracionamento e caracterização de beta-quitina extraída de gládios de lulas; ii) estudo quimiométrico visando determinar as variáveis mais importantes do processo DAIUS; iii) estudo quimiométrico visando a otimização do processo DAIUS empregando gráficos de superfícies de resposta e iv) estudo cinético da desacetilação de beta-quitina via processo DAIUS. A caracterização das quitosanas, obtidas pelo processo DAIUS com o auxílio do planejamento fatorial de experimentos revelou que a intensidade da irradiação de ultrassom é a variável menos importante durante a desacetilação da beta-quitina, e que a temperatura e o tempo de reação são as variáveis que mais afetam a despolimerização da beta-quitina. Desse estudo resultaram quitosanas com elevados $\overline{GD}$ (92%) e $\overline{M}_v$ ($5,42 \times 10^5$ g/mol), enquanto o parâmetro de acetilação (PA) apresentou valores próximos de 1,0, que corresponde ao padrão randômico ideal de distribuição de unidades GlcN e GlcNAc, sugerindo que o processo DAIUS ocorre homogeneamente. A análise dos gráficos de superfícies de resposta permitiu observar que o aumento da temperatura e do tempo de sonicação gera quitosanas mais desacetiladas, porém com menores massas molares. Esta análise também permitiu avaliar os efeitos do processo DAIUS sobre $\overline{GD}$, $\overline{M}_v$ e PA, sendo que nesse estudo quitosanas com elevada $\overline{M}_v$ ($9,83 \times 10^5$ g/mol) foram obtidas, porém o aumento da temperatura e do tempo de sonicação resultou em quitosanas mais despolimerizadas, e também mais desacetiladas. A seleção das principais variáveis do processo DAIUS, temperatura de reação e do tempo de sonicação, permitiu uma melhor compreensão da variação do $\overline{GD}$ e da $\overline{M}_v$, e permitiu a obtenção de quitosanas que apresentaram valores de $PA \approx 1,0$, correspondente ao padrão randômico ideal de distribuição de unidades GlcN e GlcNAc. O estudo da cinética da desacetilação da beta-quitina via processo DAIUS revelou a ocorrência de duas etapas bem distintas quantos às suas velocidades, sendo a primeira, atuante nos

primeiros 20 minutos, mais rápida ($k=29,4 \text{ min}^{-1} 10^3$) quando comparada com a segunda etapa ($k=7,6 \text{ min}^{-1} 10^3$). As quitosanas geradas no desenvolvimento do estudo cinético do processo DAIUS foram analisadas por difração de raios X, revelando que durante o processo DAIUS ocorre perda de água do retículo cristalino da beta-quitina, fato atribuído à cavitação gerada pela irradiação de ultrassom de alta intensidade. Assim, é proposto que o fenômeno da cavitação, que resulta em importantes alterações morfológicas, reduzindo as dimensões médias das partículas e aumentando sua rugosidade e uniformidade, também atue no interior do retículo cristalino da beta-quitina, resultando na expulsão de moléculas de água e facilitando o acesso do hidróxido de sódio aos grupamentos acetamido da beta-quitina mesmo nos domínios cristalinos. A utilização do ultrassom de alta intensidade na desacetilação de beta-quitina coloca em destaque a obtenção de quitosanas com características controladas.

Palavras chave: Beta-Quitina; Quitosana com Características Controladas; Ultrassom de Alta Intensidade; Desacetilação;

“PRODUCTION OF CHITOSAN WITH CONTROLLED CHARACTERISTICS BY IRRADIATION OF HIGH INTENSITY ULTRASOUND”

ABSTRACT

The main reaction of chitin is the hydrolysis of its acetamido groups, which generates a polymer known as chitosan. The focus of the present study is the development of an efficient, reproductive and versatile process for chitosan production with controlled characteristics. In this sense, the chitin deacetylation assisted by high intensity ultrasound irradiation, called USAD process, was studied. The development of the proposed study was carried out in four steps: i) the extraction, fractionation and characterization of beta-chitin, extracted from squid pens; ii) the chemometric approach, aiming to determine the most important variables of the USAD process; iii) the chemometric approach aiming to the USAD process optimization, employing response surface and iv) the deacetylation kinetics studies of beta-chitin via USAD process. The characterization of the chitosans obtained by the USAD process, supported by factorial design, showed that the intensity of the ultrasound irradiation is the least important variable in the beta-chitin deacetylation, and the temperature and reaction time are the variables that most affect the beta-chitin depolymerization. From this study, chitosans with high $\overline{DD}$ (92%) and $\overline{M}_v$ (5.42×10^5 g/mol) were produced, with acetylation parameter (AP) values close to 1.0, which corresponds to an ideal random pattern of distribution of GlcNAc and GlcN units, suggesting that the USAD process occurs homogeneously. The analysis of response surfaces allowed to observe that the increase of temperature and sonication time generates more deacetylated chitosans, but with lower average molecular weights. This analysis also allowed us to evaluate the effects of USAD process in $\overline{DD}$, $\overline{M}_v$, and AP variations: chitosans with high $\overline{M}_v$ (9.83×10^5 g/mol) were obtained, but the increase of temperature and sonication time resulted in more degraded and more deacetylated chitosans. The selection of the main USAD process variables, temperature and sonication time, allowed a better understanding of $\overline{DD}$ and $\overline{M}_v$ variation, and allowed to obtain chitosan with $PA \approx 1.0$, which corresponds to an ideal random pattern of distribution of GlcNAc and GlcN units. The study of beta-chitin deacetylation kinetics via USAD process revealed the occurrence of two stages: the

first step, active in the first 20 minutes, is faster ($k = 29.4 \text{ min}^{-1} 10^3$) when compared with the second one ($k = 7.6 \text{ min}^{-1} 10^3$). The chitosans generated in the kinetic study of the USAD process were analyzed by X-ray diffraction, which revealed some water loss in the crystalline structure during the USAD process, which is attributed to the cavitation generated by irradiation of high intensity ultrasound. Thus, it is suggested that the phenomenon of cavitation, which results in significant morphological changes by reducing average particle size and increase uniformity and roughness, also act within the crystalline structure of beta-chitin, resulting in the expulsion of water molecules and facilitating the access of sodium hydroxide to beta-chitin acetamido groups even in the crystalline domains. The use of high intensity ultrasound in deacetylation of beta-chitin highlight the production of chitosans with controlled characteristics.

Keywords: Beta-Chitin; Chitosan with Controlled Characteristics; High-Intensity Ultrasound; Deacetylation;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Evolução anual das publicações de artigos relacionados com o termo “chitosan”.	36
Figura 2 - Representação da estrutura primária idealizada de quitina, onde n é o grau de polimerização.	37
Figura 3 - Rota biossintética de produção de quitina em insectos a partir de glicogênio, trealose, e quitina reciclada ¹¹	39
Figura 4 - Representação da estrutura de celulose, onde n é o grau de polimerização.	39
Figura 5 - Estrutura proposta para a α -quitina: (a) projeção do eixo b-c e (b) projeção do eixo a-b. As linhas tracejadas representam ligações hidrogênio ³³	44
Figura 6 - Estrutura (a) ortorrômbica encontrada no retículo cristalino de alfa-quitina e (b) monoclinica encontrada no retículo cristalino de beta-quitina.	44
Figura 7 - Estrutura proposta para a beta-quitina: (a) projeção do eixo a e b, (b) projeção do eixo a e (c) projeção do eixo b e c. As linhas tracejadas representam ligações de hidrogênio ³¹	46
Figura 8 - Representação esquemática das estruturas polimórficas de quitina, sendo que as setas representam as cadeias poliméricas no sentido “terminal não-redutor → terminal redutor”.	46
Figura 9 - Reação de hidrólise dos grupos acetamido da quitina gerando grupos amino e o polímero conhecido como quitosana (representado por sua estrutura primária idealizada, onde n é o grau de polimerização).	48
Figura 10 - Propagação das ondas ultrassônicas no líquido e demonstração da formação e colapso da bolha de cavitação.	55

Figura 11 - Lula da espécie *Loligo*, (a) com destaque para o gládio inserido na parte interna do molusco e (b) gládio retirado da lula.61

Figura 12 - 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) detalhe transversal do ultrassom de alta intensidade Hielscher modelo UP400S.63

Figura 13 - Espectros de RMN de ^1H da solução de DCl/D₂O 20%, da solução de DCl/D₂O 20% com adição de DSS e de uma amostra de quitina.....68

Figura 14 - Espectro de RMN de ^1H característico de uma amostra de quitosana (amostra TT01 em HCl/D₂O 1%, 80°C), onde R = COCH₃ ou R = H.69

Figura 15 - Curva de titulação condutimétrica característica de uma amostra de quitosana (amostra TT01).70

Figura 16 - Espectro de RMN de ^1H na região de ressonância dos hidrogênios da amostra de quitosana TT01 ($\overline{GD}$ =45%).72

Figura 17 - Curva da viscosidade reduzida em função da concentração da amostra TT05, a extrapolação à diluição infinita (■) fornece a viscosidade intrínseca $[\eta]$74

Figura 18 - Interface do programa imageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).77

Figura 19 - Ajuste da imagem (amostra CH1), com a função 'Threshold'; (a) sem o 'Threshold' (b) com 'Threshold'.....78

Figura 20 - Micrografia da amostra TT09 com ampliação de 5000 vezes, (a) superfície da amostra em 2D e (b) topografia em 3D, utilizada no cálculo da rugosidade.....78

Figura 21 - Termograma representativo, da amostra CH2, para a determinação temperatura onset (Tonset), de máxima degradação (Tmax), inicial

(T_0) e final (T_f) do primeiro evento de degradação e os teores de umidade e cinzas.
.....81

Figura 22 - Variação da massa molar média viscosimétrica (■) e do grau médio de desacetilação (●) em relação à variação dos intervalos de tamanho de partículas apresentados pela beta-quitina.....86

Figura 23 - Espectro de infravermelho das frações de beta-quitina, entre 4000 e 450 cm^{-1}87

Figura 24 - Espectro de infravermelho das frações de beta-quitina, entre 1800 cm^{-1} e 800 cm^{-1} 90

Figura 25 - Difrátogramas das frações de beta-quitina com diferentes tamanhos de partícula.....91

Figura 26 - Variação do Índice de cristalinidade (■) e do diâmetro aparente dos cristalitos (●) na direção perpendicular ao plano (110) em função do tamanho de partícula para a beta-quitina.....92

Figura 27 - Micrografias das frações de beta-quitina (a) 0,425-0,250mm, (b) 0,250-0,125mm, (c) 0,125-0,075mm e (d) <0,075mm.....93

Figura 28 - Curvas termogravimétricas sendo: (a) variação da perda de massa (%) e (b) primeira derivada em relação ao aumento da temperatura ($^{\circ}\text{C}$), apresentada pelas frações de beta-quitina.....95

Figura 29 - Espectro no infravermelho na região de 1700 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} das amostras de beta-quitina (0,425-0,250mm), CH.01, TT06 e Q-05.98

Figura 30 - Difrátogramas das amostras de beta-quitina (0,425-0,250mm), CH.01, TT06 e Q-13.....99

Figura 31 - Variação da perda de massa (%) em relação ao aumento da temperatura (°C), apresentada pelas amostras de beta-quitina (0,425-0,250mm), CH.01, TT04 e Q-06.....	100
Figura 32 - Microscopia da amostra (a) beta-quitina (0,250-0,125mm) e (b) CH4 com ampliação de 100x.	101
Figura 33 - Microscopia da amostra (a) beta-quitina (0,250-0,125mm) e (b) CH4 com ampliação de 5000x.	102
Figura 34 - Relação entre o parâmetro de acetilação (PA) e as amostras do Grupo I.	104
Figura 35 - Relação entre o parâmetro de acetilação (PA) e as amostras do Grupo II.	108
Figura 36 - Gráfico de superfície de resposta para a variação do $\overline{GD}$, das quitosanas do Grupo II, em relação à variação da temperatura e do tempo de sonicação.	110
Figura 37 - Gráfico de superfície de resposta para a variação da $\overline{M_v}$, das quitosanas do Grupo II, em relação à variação da temperatura e do tempo de sonicação.	112
Figura 38 - Gráfico de superfície de resposta para a variação do PA, das quitosanas do Grupo II, em relação à variação da temperatura e do tempo de sonicação.	114
Figura 39 - Curva cinética da desacetilação de beta-quitina assistida por ultrassom de alta intensidade para as amostras do Grupo III - Testes Exploratórios.	116
Figura 40 - Curva cinética da desacetilação de beta-quitina assistida por ultrassom de alta intensidade, grau médio de desacetilação (RMN de ^1H) <i>versus</i> tempo de sonicação, para as amostras do Grupo III - Estudos Cinéticos.	119

Figura 41 - Variação da massa molar média viscosimétrica em função do tempo de sonicação, para as amostras Q-14, Q-15, Q-16 e Q-17.....	121
Figura 42 - Relação entre o parâmetro de acetilação (PA) e as amostras do Grupo III - Estudos Cinéticos.....	122
Figura 43 - Espectro no infravermelho ampliado na região de 1800 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} das amostras do Grupo III - Estudos Cinéticos.	123
Figura 44 - Difrátogramas da beta-quitina e das amostras do Grupo III - Estudos Cinéticos.....	126
Figura 45 - Difrátogramas da beta-quitina e das amostras do Grupo III - Estudos Cinéticos, ampliado na região entre $2\theta=3^\circ$ e $2\theta=20^\circ$	127
Figura 46 - Variação do índice de cristalinidade (■) e do diâmetro aparente dos cristalitos (●) em relação ao tempo de sonicação para as amostras do Grupo III - Estudos Cinéticos.....	129
Figura 47 - Variação da temperatura “onset” (■) e da temperatura de máxima degradação (●) em função do tempo de sonicação (min.), para as amostras do Grupo III - Estudos Cinéticos.....	131
Figura 48 - Microscopia da beta-quitina e das amostras Q-01 e Q-10, (a) ampliação de 100x; (b) ampliação de 500x e (c) ampliação de 1000x;	132
Figura 49 - Microscopia da beta-quitina e das amostras Q-01 e Q-10, (a) ampliação de 5000x e (b) topografia em 3D utilizada para o cálculo da rugosidade superficial.	133
Figura 50 - Variação da área média por partícula (■) e da circularidade (●) em função do tempo de sonicação (min.), para as amostras do Grupo III - Estudos Cinéticos.....	135

Figura 51 - Curvas de comprimento de onda (cm^{-1}) <i>versus</i> a absorbância as amostras do Grupo III - Estudos Cinéticos em HCl 0,05 mol/L.	136
Figura 52 - Curva de absorbância em $\lambda = 600 \text{ nm}$ ($A_{600\text{nm}}$) para as amostras do Grupo III - Estudos Cinéticos em HCl 0,05 mol/L <i>versus</i> o tempo de sonicação (min.).	137
Figura 53 - Espectro no infravermelho ampliado na região de 1700cm^{-1} a 1200cm^{-1} , (a) beta-quitina $> 0,425 \text{ mm}$ e as amostras CH1, CH3, CH5 e CH7; (b) beta-quitina $0,250\text{-}0,125\text{mm}$ e as amostras CH2, CH4, CH6 e CH8 e (c) beta-quitina $0,425\text{-}0,250\text{mm}$ e as amostras CH.01, CH.02 e CH.03.....	147
Figura 54 - Difrátogramas da beta-quitina de partida e quitosanas do Grupo I, (a) beta-quitina $> 0,425\text{mm}^2$ e as amostras CH1, CH3, CH5 e CH7; (b) beta-quitina $0,250\text{-}0,125\text{mm}^2$ e as amostras CH2, CH4, CH6 e CH8 e (c) beta-quitina $0,425\text{-}0,250\text{mm}^2$ e as amostras CH.01, CH.02 e CH.03.	149
Figura 55 - Relação entre a variação do índice cristalinidade (%) para as quitosanas do Grupo I e (a) temperatura “onset” (T_{onset} , $^{\circ}\text{C}$) e (b) temperatura de máxima degradação (T_{max} , $^{\circ}\text{C}$).	152
Figura 56 - Microscopia da amostra CH4, (a) ampliação de 100x; (b) ampliação de 500x; (c) ampliação de 1000x; (d) ampliação de 5000x e (e) topografia em 3D utilizada para o cálculo da rugosidade superficial.....	154
Figura 57 - Espectro no infravermelho ampliado na região de 1800cm^{-1} a 1200cm^{-1} das quitosanas obtidas durante os experimentos de otimização (Grupo II) do processo DAIUS.	157
Figura 58 - Difrátogramas da beta-quitina de partida e quitosanas obtidas durante os experimentos de otimização do processo DAIUS.....	158
Figura 59 - Relação entre a variação do I_{cr} (%) para as quitosanas do Grupo II e (a) T_{onset} , ($^{\circ}\text{C}$) e (b) T_{max} , ($^{\circ}\text{C}$).	160

Figura 60 - Microscopia da amostra TT07, (a) ampliação de 100x; (b) ampliação de 500x; (c) ampliação de 1000x; (d) ampliação de 5000x e (e) topografia em 3D utilizada para o cálculo da rugosidade superficial..... 162

Figura 61 - Espectro no infravermelho ampliado na região de 1800cm^{-1} a 1200cm^{-1} das amostras do Grupo III - Testes Exploratórios. 164

Figura 62 - Difractogramas da beta-quitina de partida e das amostras do Grupo III - Testes Exploratórios..... 165

Figura 63 - Variação do índice de cristalinidade (■) e do diâmetro aparente dos cristalitos (●) em relação ao tempo de sonicação para as amostras do Grupo III - Testes Exploratórios..... 166

Figura 64 - Variação da temperatura “onset” (■) e da temperatura de máxima degradação (●) em função do tempo de sonicação (min.), para as amostras do Grupo III - Testes Exploratórios..... 167

Figura 65 - Microscopia da amostra Q-7e, (a) ampliação de 100x; (b) ampliação de 500x; (c) ampliação de 1000x; (d) ampliação de 5000x e (e) topografia em 3D utilizada para o cálculo da rugosidade superficial..... 169

Figura 66 - Variação da área média por partícula (■) e da circularidade (●) em função do tempo de sonicação (min.), para as amostras do Grupo III - Testes Exploratórios. 170

Figura 67 - Estrutura do ácido hialurônico, formada por ácido glucurônico e a N-acetilglicosamina, unidas por ligações glicosídicas alternadas do tipo β -(1→4) e β -(1→3), onde $2n' = n$, sendo n o número de unidades repetitivas. 174

Figura 68 - Estrutura do alginato, formado por blocos homopoliméricos de ligações glicosídicas (1→4) constituídos por resíduos de ácido β -D-manuronila e ácido α -L-guluronila, onde m e n são o número de resíduos. 174

Figura 69 - Reator de forma tronco-cônica utilizado na despolimerização via ultrassom.....176

Figura 70 - Evolução do grau médio de polimerização numérico *versus* o tempo de sonicação, para a despolimerização do ácido hialurônico (AH3).181

Figura 71 - Relação entre $1/GP_n(t)-1/GP_n(0)$ *versus* o tempo de sonicação, para a variação da concentração de ácido hialurônico durante a reação de despolimerização via ultrassom, onde (■)0,05%, (●)0,10% e (▲)0,25%.182

Figura 72 - Relação entre $1/GP_n(t)-1/GP_n(0)$ *versus* o tempo de sonicação, para a variação da temperatura durante a reação de despolimerização via ultrassom, onde (■)25°C, (●)45°C e (▲)5°C.....183

Figura 73 - Gráfico de Arrhenius, mostrando a dependência da constante de velocidade da reação de despolimerização via ultrassom em função da temperatura absoluta ($1000/T$).184

Figura 74 - Relação entre $1/GP_n(t)-1/GP_n(0)$ *versus* o tempo de sonicação, para a variação da frequência do ultrassom durante a reação de despolimerização via ultrassom, onde (■)20KHz e (●)39KHz.....186

Figura 75 - Relação entre o $\log(GP_n)$ *versus* o índice de polidispersividade (I_p), para a variação da frequência do ultrassom durante a reação de despolimerização via ultrassom, onde (■)20KHz e (●)39KHz.186

Figura 76 - Relação entre $1/GP_n(t)-1/GP_n(0)$ *versus* o tempo de sonicação, para a variação do tipo de geometria do reator durante a reação de despolimerização via ultrassom, onde (■) reator tronco-cônico e (●) reator Erlenmeyer.....187

Figura 77 - Relação entre $1/GP_n(t)-1/GP_n(0)$ *versus* o tempo de sonicação, para a variação do grau médio de desacetilação da quitosana durante a reação de despolimerização via ultrassom, onde (■) $\overline{GD}=50\%$ e (●) $\overline{GD}=99\%$188

Figura 78 - Relação entre $1/GPn(t)-1/GPn(0)$ versus o tempo de sonicação para a variação do tipo de polímero natural utilizado durante a reação de despolimerização via ultrassom, onde (■) ácido hialurônico, (●) alginato e (▲) quitosana.....189

Figura 79 - Relação entre o $\log(GPn)$ versus o índice de polidispersividade (I_p), para a variação do tipo de polímero natural utilizado durante a reação de despolimerização via ultrassom, onde (■) ácido hialurônico, (●) alginato e (▲) quitosana.....190

Figura 80 - Curvas cromatográficas (CPG) do oligômero do ácido hialurônico e suas frações, obtidas pela CLAE.191

Figura 81 - Quitosanas obtidas pelo uso do processo DAIUS: (■) Grupo I, (●) Grupo II e (▲) Grupo III – EC, e pela despolimerização via ultrassom de alta intensidade: (▼) CH2.194

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química representativa de diversos tipos de resíduos que contêm quitina ³	40
Tabela 2 - Algumas das principais aplicações de quitosana ^{6-9, 41, 49, 53-76}	50
Tabela 3 - Parâmetros que influenciam a cavitação e os efeitos da irradiação com ultrassom ^{125, 126}	56
Tabela 4 - Principais aplicações do ultrassom	58
Tabela 5 - Reagentes utilizados na realização dos experimentos	60
Tabela 6 - Variáveis estudadas no processo DAIUS e os valores de cada nível (-1, 0 e +1)	63
Tabela 7 - Níveis das variáveis estudadas em cada reação do processo DAIUS	64
Tabela 8 - Variáveis estudadas no processo DAIUS e os valores de cada nível (-1,41,-1, 0 ,+1 e +1,41)	64
Tabela 9 - Níveis das variáveis estudadas em cada reação do processo DAIUS	65
Tabela 10 - Bandas de absorção e números de onda ($\bar{\nu}$ cm ⁻¹) características de quitina e quitosana	80
Tabela 11 - Dados de intervalo de partícula, porcentagem de beta-quitina, viscosidade intrínseca, massa molar média viscosimétrica e grau médio de desacetilação para as frações de beta-quitina de diferentes tamanhos de partículas	85

Tabela 12 - Modos de vibração e respectivos números de onda para as diferentes frações de beta-quitina tendo como referência os dados encontrados na literatura para a alfa-quitina ¹⁵⁹⁻¹⁶¹	88
--	----

Tabela 13 - Teores de cinzas, valores de área média por partícula, umidade, intervalo da 1ª degradação, perda de massa durante a 1ª degradação e temperatura de máxima degradação para as frações de beta-quitina.....	96
--	----

Tabela 14 - Solubilidade das frações de beta-quitina em HCl 0,55mol/L, ácido fórmico concentrado e água.....	97
--	----

Tabela 15 - Valores do grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$), massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$), grau médio de polimerização ($\overline{GP}_v$) e parâmetro de acetilação (PA) para as quitosanas do Grupo I	103
---	-----

Tabela 16 - Planilha para cálculos do planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} para as amostras do Grupo I em relação ao grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$), apresentando a estimativa do erro através de replicatas no ponto central.....	105
--	-----

Tabela 17 - Planilha para cálculos do planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} para as amostras do Grupo I em relação a massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$), apresentando a estimativa do erro através de replicatas no ponto central.....	106
---	-----

Tabela 18 - Valores do grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$), massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$), grau médio de polimerização ($\overline{GP}_v$) e parâmetro de acetilação (PA) para as quitosanas do Grupo II	107
--	-----

Tabela 19 - Planejamento composto central (modelo quadráticos de duas variáveis) para a variação do $\overline{GD}$ das quitosanas do Grupo II	109
--	-----

Tabela 20 - Planejamento composto central (modelo quadráticos de duas variáveis) para a variação do $\overline{M}_v$ das quitosanas do Grupo II	111
---	-----

Tabela 21 - Planejamento composto central (modelo quadráticos de duas variáveis) para a variação do PA das quitosanas do Grupo II.....	113
--	-----

Tabela 22 - Valores do grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$) para as amostras do Grupo III - Testes Exploratórios.....	115
--	-----

Tabela 23 - Valores do grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$), da massa molar média viscosimétrica ($\overline{M_v}$), do grau médio de polimerização ($\overline{GP_v}$) e do parâmetro de acetilação (PA) das amostras obtidas a partir da reação de desacetilação de beta-quitina via processo DAIUS para os estudos cinéticos	117
--	-----

Tabela 24 - Comparação entre os valores de constante de velocidade do processo DAIUS e outros processos propostos na literatura	119
---	-----

Tabela 25 - Dados de I_{cr} e D_{ap} para as amostras do Grupo III - Estudos Cinéticos.....	128
---	-----

Tabela 26 - Dados obtidos com o auxílio da termogravimetria para as amostras do Grupo III - Estudos Cinéticos.....	130
--	-----

Tabela 27 - Dados de área média por partícula (mm^2), rugosidade superficial (%) e circularidade (u.a.) para as amostras do Grupo III - Estudos Cinéticos, obtidos com o auxílio do programa imageJ	134
---	-----

Tabela 28 - Solubilidade das amostras Grupo III - Estudos Cinéticos em HCl 0,05 mol/L e em H_2O	136
---	-----

Tabela 29 - Amostras do Grupo III - Estudos Cinéticos produzidas em duplicadas e seus respectivos valores de $\overline{GD}$ e $\overline{M_v}$	138
---	-----

Tabela 30 - Valores dos índices de cristalinidade (I_{cr}) e no diâmetro aparente dos cristalitos (D_{ap}) para as beta-quitinas de partida e a quitosanas do Grupo I ...	150
---	-----

Tabela 31 - Dados obtidos com o auxílio da termogravimetria para as quitosanas do Grupo I	151
---	-----

Tabela 32 - Dados de área média por partícula (mm^2), rugosidade superficial (%) e circularidade (u.a.) para as quitosanas do Grupo I, obtidos com o auxílio do programa imageJ	153
Tabela 33 - Solubilidade das amostras do Grupo I em HCl 0,05 mol/L e em H_2O	155
Tabela 34 - Valores dos índices de cristalinidade (I_{cr}) e diâmetro aparente dos cristalitos (D_{ap}) para as beta-quitinas de partida e a quitosanas do Grupo II	159
Tabela 35 - Dados obtidos com o auxílio da termogravimetria para as quitosanas do Grupo II	160
Tabela 36 - dados de área média por partícula (mm^2), rugosidade superficial (%) e circularidade (u.a.) para as quitosanas do Grupo II, obtidos com o auxílio do programa imageJ	161
Tabela 37 - Solubilidade das amostras do Grupo II em HCl 0,05 mol/L e em H_2O	163
Tabela 38 - Dados obtidos com o auxílio da termogravimetria para as amostras do Grupo III - Testes Exploratórios	167
Tabela 39 - Dados de área média por partícula (mm^2), rugosidade superficial (%) e circularidade (u.a.) para as amostras do Grupo III - Testes Exploratórios, obtidos com o auxílio do programa imageJ	168
Tabela 40 - Solubilidade das amostras Grupo III - Testes Exploratórios em HCl 0,05 mol/L e em H_2O	171
Tabela 41 - Características dos equipamentos de ultrassom utilizados	176
Tabela 42 - Parâmetros de reação para a despolimerização via ultrassom do ácido hialurônico, alginato e quitosana.....	178

Tabela 43 - Valores de fator pré-exponencial (n_0) e constante de velocidade de degradação (k) para todas as reações de degradação estudadas.....	181
---	-----

Tabela 44 - Dados, obtidos pela CPG, de massa molar média ponderal ($\overline{M_w}$), índice de polidispersividade (I_p) e massa coletada, para a amostra de oligômero do ácido hialurônico e suas frações.	192
---	-----

LISTA DE SIGLAS

DAIUS - Desacetilação assistida por ultrassom de alta intensidade.

GlcNAc - 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose.

GlcN - 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose.

DMAc - N,N-dimetilacetamida.

$\overline{GD}$ - Grau médio de desacetilação.

$\overline{M_v}$ - Massa molar média viscosimétrica.

$\overline{M_w}$ - Massa molar média ponderal.

$\overline{GP_v}$ e $\overline{GP_n}$ Grau médio de polimerização viscosimétrico e numérico, respectivamente.

I_p - Índice de polidispersividade.

k - constante de velocidade.

FPT - “freeze – pump out – thaw”.

MEV - Microscopia eletrônica de varredura.

RMN de ¹H - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio.

PA - Parâmetro de Acetilação.

[η] - viscosidade intrínseca (mL/g).

C_{irc} - Circularidade.

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

RS - Rugosidade superficial estatística.

I_{cr} - Índice de cristalinidade.

D_{ap} - diâmetro aparente dos cristalitos.

T_{onset} - Temperatura “onset”.

T_{max} - Temperatura de máxima degradação.

TP - Tamanho de partícula.

TE – Teste Exploratório.

EC – Estudos Cinéticos.

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO	32
2	MOTIVAÇÃO	33
PARTE 1 - PROCESSO DAIUS		34
3	INTRODUÇÃO	34
3.1	QUITINA: PASSADO, PRESENTE E FUTURO	34
3.2	OCORRÊNCIA	37
3.3	PROCESSOS DE OBTENÇÃO DE QUITINA	41
3.4	POLIMORFISMO DE QUITINA	42
3.5	SOLUBILIDADE DE QUITINA	47
3.6	QUITOSANA	47
3.7	PROPRIEDADES DA QUITOSANA	49
3.8	DESACETILAÇÃO DE QUITINA	51
3.9	ULTRASSOM	54
4	OBJETIVOS	59
5	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	60
5.1	REAGENTES	60
5.2	MATÉRIA-PRIMA	60
5.3	OBTENÇÃO DE BETA-QUITINA	61
5.4	DESACETILAÇÃO DE BETA-QUITINA ASSISTIDA POR IRRADIAÇÃO DE ULTRASSOM DE ALTA INTENSIDADE	62
5.5	PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM O PROCESSO DAIUS	63
5.6	OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DAIUS	64
5.7	CINÉTICA DO PROCESSO DAIUS	65
5.7.1	TESTES EXPLORATÓRIOS	65
5.7.1	ESTUDOS CINÉTICOS	66
6	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	67

6.1	GRAU MÉDIO DE DESACETILAÇÃO ($\overline{GD}$)	67
6.1.1	DETERMINAÇÃO DO $\overline{GD}$ POR ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (RMN DE ^1H)	67
6.1.2	DETERMINAÇÃO DO $\overline{GD}$ POR TITULAÇÃO CONDUTIMÉTRICA	70
6.2	DETERMINAÇÃO DO PARÂMETRO DE ACETILAÇÃO (PA)	71
6.3	DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLAR MÉDIA POR VISCOSIMETRIA CAPILAR	73
6.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	76
6.5	DIFRAÇÃO DE RAIOS X	78
6.6	ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO	79
6.7	ESTABILIDADE TÉRMICA	80
6.8	TEOR DE CINZAS	81
6.9	SOLUBILIDADE	82
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
7.1	BETA-QUITINA	84
7.1.1	OBTENÇÃO, FRACIONAMENTO E CARACTERIZAÇÃO	84
7.1.2	SEPARAÇÃO POR TAMANHO DE PARTÍCULA	84
7.1.3	GRAU MÉDIO DE DESACETILAÇÃO ($\overline{GD}$) E MASSA MOLAR MÉDIA VISCOSIMÉTRICA ($\overline{M}_v$)	84
7.1.4	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO	86
7.1.5	DIFRAÇÃO DE RAIOS X	90
7.1.6	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	93
7.1.7	DEGRADAÇÃO TÉRMICA	94
7.1.8	SOLUBILIDADE	97
7.2	QUITOSANAS	98
7.2.1	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS REPRESENTATIVAS DAS AMOSTRAS DOS GRUPOS I, II E III	98
7.2.1.1	Espectroscopia no Infravermelho e Difração de Raios X	98
7.2.1.2	Difração de Raios X	99
7.2.1.3	Termogravimetria	100
7.2.1.4	Solubilidade	100
7.2.1.5	Microscopia Eletrônica de Varredura	101
7.3	PROCESSO DAIUS	103
7.3.1	GRUPO I – EFEITOS DOS PARÂMETROS DO PROCESSO	103

7.3.1.1	Variação do Grau Médio de Desacetilação, Massa Molar Média Viscosimétrica e Parâmetro de Acetilação	103
7.3.2	GRUPO II - OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO	107
7.3.2.1	Variação do Grau Médio de Desacetilação, Massa Molar Média Viscosimétrica e Parâmetro de Acetilação	107
7.3.3	GRUPO III - CINÉTICA DO PROCESSO	115
7.3.3.1	Grupo III - Testes Exploratórios (TE)	115
7.3.3.1.1	Variação do Grau Médio de Desacetilação	115
7.3.3.2	Grupo III - Estudos Cinéticos (EC)	116
7.3.3.2.1	Variação do Grau Médio de Desacetilação e da Massa Molar Média Viscosimétrica.	117
7.3.3.2.2	Espectroscopia no Infravermelho e Difração de Raios X	122
7.3.3.2.3	Termogravimetria	129
7.3.3.2.4	Microscopia Eletrônica de Varredura e Solubilidade	131
7.3.4	REPRODUTIBILIDADE DAS CARACTERÍSTICAS	138
8	CONCLUSÕES	139
9	MODELO DE AÇÃO DO PROCESSO DAIUS	144
	PARTE 2 - CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES DAS QUITOSANAS	146
10	RESULTADOS E DISCUSSÃO	146
10.1	GRUPO I	146
10.1.1	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO E DIFRAÇÃO DE RAIOS X	146
10.1.2	TERMOGRAVIMETRIA	150
10.1.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E SOLUBILIDADE	152
10.2	GRUPO II	156
10.2.1	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO E DIFRAÇÃO DE RAIOS X	156
10.2.2	TERMOGRAVIMETRIA	159
10.2.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E SOLUBILIDADE	160
10.3	GRUPO III - TESTES EXPLORATÓRIOS	164
10.3.1	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO E DIFRAÇÃO DE RAIOS X	164
10.3.2	TERMOGRAVIMETRIA	166
10.3.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E SOLUBILIDADE	168

11 CONCLUSÕES	172
PARTE 3 - DESPOLIMERIZAÇÃO VIA ULTRASSOM	173
12 INTRODUÇÃO	173
12.1 ÁCIDO HIALURÔNICO	174
12.2 ALGINATO	175
13 OBJETIVOS	175
14 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	176
14.1 PARÂMETROS DO ULTRASSOM	176
14.2 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES	177
14.2.1 QUITOSANA	177
14.2.2 ÁCIDO HIALURÔNICO	177
14.2.3 ALGINATO	177
14.3 PARÂMETROS DA REAÇÃO	178
14.4 DESPOLIMERIZAÇÃO VIA ULTRASSOM	178
14.5 SEPARAÇÃO DE OLIGÔMEROS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	179
15 RESULTADOS E DISCUSSÕES	180
15.1 ÁCIDO HIALURÔNICO	180
15.2 QUITOSANA	188
15.3 ALGINATO	189
15.4 SEPARAÇÃO DOS OLIGÔMEROS POR CLAE	191
16 CONCLUSÕES	193
17 QUITOSANAS COM CARACTERÍSTICAS CONTROLADAS	194
18 REFERÊNCIAS	196

1 APRESENTAÇÃO

Com o intuito de facilitar a compreensão e destacar os principais pontos do trabalho desenvolvido, a tese foi dividida em três partes, sendo que na primeira parte estão inseridos os resultados da utilização do ultrassom de alta intensidade na desacetilação de beta-quitina para a produção de quitosanas com características controladas.

Na segunda parte é discutida a relação entre as características e as propriedades das quitosanas obtidas na primeira parte. Todos os dados obtidos na primeira e na segunda parte foram adquiridos no laboratório de Físico-Química Orgânica do Instituto de Química de São Carlos na Universidade de São Paulo - Brasil.

Na terceira parte estão inseridos os resultados da utilização do ultrassom de alta intensidade na despolimerização dos biopolímeros quitosana, ácido hialurônico e alginato. Todos os dados obtidos na segunda parte foram adquiridos no laboratório de “Ingénierie des Matériaux Polymères” na “Université Claude Bernard Lyon 1 - France” durante o estágio de doutorado no exterior (2010/2011). Os resultados obtidos durante o estágio no exterior demonstram a importância no sentido de expandir o conhecimento sobre a utilização do ultrassom de alta intensidade, trabalhar com polímeros naturais diferentes e aprender novas técnicas de caracterização de polímeros, como a cromatografia de permeação em gel com detectores de espalhamento de luz.

2 MOTIVAÇÃO

A maioria dos estudos relacionados com quitina e quitosana, publicados nas últimas três décadas, tiveram como objetivo principal as aplicações destes polímeros, e, geralmente, estudos que servem de base, tanto para a obtenção de quitina quanto para a produção de quitosana são deixados em segundo plano. Apesar da descoberta da quitina ter ocorrido 30 anos antes da celulose, é nítida a divergência ocorrida durante trajetória da utilização destes dois polímeros naturais, pois a utilização da celulose no panorama mundial supera e muito a utilização da quitina e seus derivados. A descoberta de novas aplicações envolvendo a quitosana é muito importante no cenário atual, pois através destas podemos agregar maior valor econômico a este biopolímero, além de subsidiar novas pesquisas e aumentar o interesse por parte da indústria. Porém de nada vai adiantar a descoberta de novas aplicações se não existir um método confiável que forneça quitosanas com características controladas e de elevado padrão de qualidade. Neste contexto inserimos a utilização do ultrassom de alta intensidade na desacetilação de quitina (processo DAIUS), o qual tem como principal objetivo padronizar a obtenção de quitosanas, gerando em cada reação, onde os parâmetros utilizados são os mesmos, quitosanas com características controladas (principalmente, $\overline{GD}$ e $\overline{M}_v$), e com elevados graus de desacetilação e elevadas massas molares. Além da produção de quitosanas o ultrassom de alta intensidade pode ser utilizado na reação de despolimerização, desta forma atuando no controle e na distribuição da massa molar das quitosanas. A importância da produção de quitosanas com características controladas ($\overline{GD}$, $\overline{M}_v$ e distribuição das unidades GlcN e GlcNAc) advém do fato que tais características influenciam as suas propriedades (solubilidade, interação com outras substâncias e atividade biológica), as quais estão diretamente relacionadas com suas aplicações (biomateriais, liberação controlada de fármacos, remoção de íons metálicos, entre outras).

3 INTRODUÇÃO

3.1 Quitina: Passado, Presente e Futuro

A quitina foi descrita pela primeira vez pelo francês Henri Braconnot, na época Diretor do Jardim Botânico de Nancy/França, que a extraiu de fungos superiores em 1811. O produto, que recebeu o nome de “fungina”, apresentava certas impurezas, provavelmente outros polissacarídeos, e as análises descritas por Braconnot indicavam uma mistura equivalente de quitina e um poligluconato que não continha nitrogênio. Braconnot também relatou a formação de ácido acético derivado da “fungina” e concluiu que esta era uma nova e distinta substância. Henri Braconnot foi indicado, em 1820, para se tornar membro da “Royal Medical Academy” pelo Rei Louis XVIII e no ano de 1824 se tornou “Chevalier de la Légion d’Honneur”¹. Em 1823 Antoine Odier isolou um resíduo insolúvel através do tratamento de carapaças de insetos (besouros e escaravelhos) com soluções aquecidas de KOH, e tal resíduo recebeu o nome de quitina, que deriva do grego e significa túnica ou cobertura. Odier falhou em detectar a presença de nitrogênio na composição da quitina e devido a este fato considerou inicialmente que a quitina era proveniente de fontes vegetais e não animais. Tal equívoco levou Odier a considerar que a quitina assemelhava-se quimicamente mais à lignina do que à “fungina” descrita por Braconnot, desta maneira nos trabalhos publicados por Odier não existe nenhuma referência à “fungina” descrita por Braconnot. Nos anos seguintes as considerações feitas por Odier foram traduzidas para o inglês por Children, o qual adicionou em tal publicação alguns de seus próprios resultados com a quitina. Duvidando dos resultados que negavam a presença de nitrogênio na fórmula estrutural da quitina, Children refez os experimentos de Odier e, assim, determinou a composição elementar da quitina confirmando a presença de nitrogênio. A fórmula empírica proposta por Children e Odier ($C_{11}H_{17}O_7N_2$) é considerada a mais próxima da unidade repetitiva da quitosana ($C_{12}H_{22}O_8N_2$) do que da unidade repetitiva da quitina

($C_{16}H_{26}O_{10}N_2$), portanto durante o processo de extração de quitina utilizado por Children formou-se também quitosana. Entretanto a quitosana foi descrita pela primeira vez em 1859 por Rouget, o qual descreveu o tratamento de quitina com soluções concentradas de KOH, e denominou o produto da reação como sendo “quitina modificada”, sendo esta solúvel em soluções diluídas de ácidos orgânicos e com coloração diferente da quitina em soluções ácidas de iodo. Em 1894 Hoppe-Seyler relatou que a partir do aquecimento de quitina, provinda de carapaças de camarões, escorpiões e aranhas, em KOH a 180°C resultava um produto solúvel em soluções diluídas de ácido acético ou ácido clorídrico, tendo também observado que ao adicionar álcali ao meio ocorria a precipitação do produto. Hoppe-Seyler não se referiu ao produto obtido como sendo a “quitina modificada” de Rouget, entretanto ele propôs o nome de quitosana, o qual é utilizado até os dias atuais. No final do século XIX existia grande discrepância e confusão entre os termos celulose, quitina e quitosana. Fremy declarou em 1887 a existência de três variedades de celulose, uma delas denominada metacelulose (quitina) era encontrada principalmente em algas e líquens. Em 1894, Winterstein se referiu a “celulose fúngica”, que continha nitrogênio, obtida a partir de fungos tratados com KOH a 180°C. Fica evidente que Winterstein obteve quitina, porém insistiu em denominá-la celulose².

A obtenção de quitina na sua forma mais pura a partir de fungos por Tarret (1887) foi muito importante para a diferenciação entre quitina, quitosana e celulose. Nas primeiras décadas do século XX diversos cientistas confirmaram através de técnicas como difração de raios X e espectroscopia no infravermelho, as diferenças estruturais entre quitina e celulose³.

Embora a descoberta da quitina por Braconnot preceda a descoberta da celulose por Payen em quase 30 anos, e apesar de que a quantidade de quitina produzida anualmente por biossíntese não é muito menor do que a de celulose, as aplicações industriais da celulose são maiores quando comparadas com as aplicações de quitina e de quitosana. As possíveis razões para isto são: i) facilidade de obtenção de grandes quantidades industriais de celulose; ii) complexidade da molécula de quitina/quitosana quando comparada com a celulose. De acordo com trabalho recente⁴ estamos apenas começando a compreender realmente a

quitosana e talvez estejamos finalmente próximos de sua plena exploração comercial.

O avanço de pesquisas relacionadas com quitosana fica evidenciado quando analisamos a Figura 1, pois as publicações de artigos relacionados com o termo “chitosan” vêm sofrendo aumento exponencial a partir da última década do século XX. A base de dados Scopus possui até o presente momento (Abril/2013) o registro de 28.981 artigos relacionados com o termo “chitosan”, 98,0% deste total publicados a partir da última década do século XX. O aumento no interesse de pesquisas sobre quitina, quitosana e seus derivados, advém de trabalhos sérios e de qualidade desenvolvidos nos últimos trinta anos por pesquisadores reconhecidos internacionalmente, os quais forneceram os princípios fundamentais para as novas direções a serem tomadas pelos jovens pesquisadores.

Fonte: <http://www.scopus.com> (Abril/2013)

Figura 1 - Evolução anual das publicações de artigos relacionados com o termo “chitosan”.

3.2 Ocorrência

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

Figura 2 - Representação da estrutura primária idealizada de quitina, onde n é o grau de polimerização.

A quitina é o componente orgânico mais abundante na estrutura esquelética de muitas das classes que formam o grupo dos invertebrados como, por exemplo, os artrópodes, os anelídeos, os moluscos e os celenterados. A quitina está presente em fungos como os ascomicetos, zigomicetos, basidiomicetos e os deuteromicetos, e em algas como as diatomáceas. Segundo alguns autores⁵⁻⁸, a quitina é considerada como sendo a segunda substância mais abundante na natureza depois da celulose, e apresenta uma taxa de reposição duas vezes superior a da celulose, porém esta afirmação já foi contestada⁹. O crescimento e a morfogênese dos insetos são estritamente dependentes da capacidade de remodelar a quitina presente em suas estruturas. Para este efeito, os insetos produzem frequentemente sintetases de quitina e enzimas quitinolíticas¹⁰. A rota biossintética de produção da quitina em insetos é mostrada na Figura 3¹¹.

A quitina encontrada na natureza não apresenta composição única, ocorrendo algumas variações estruturais em suas cadeias, sendo que as principais diferenças apresentadas pelas diferentes quitinas dizem respeito ao tamanho da cadeia, à quantidade de grupos GlcNAc e GlcN, à distribuição destes ao longo das cadeias poliméricas e à disposição das cadeias nos domínios ordenados. A quitina extraída de diatomáceas (*Thalassiosira fluviales* e *Cyrtolotella cryptica*) constitui uma exceção,

pois as análises confirmam que nesse caso ocorrem exclusivamente unidades GlcNAc³. A estrutura da quitina (Figura 2) apresenta elevada similaridade com a de celulose (Figura 4). A diferença entre elas encontra-se no carbono 2, o qual apresenta um grupo hidroxila no caso da celulose e um grupo acetamido na quitina. A celulose, assim como a quitina, apresenta diferentes estruturas cristalinas, as quais resultam da ocorrência de diferentes ligações hidrogênio intra- e inter-cadeias, de acordo com a disposição relativa das cadeias nos domínios ordenados. Na celulose nativa as cadeias estão dispostas de forma paralela, isto é com as extremidades redutoras orientadas na mesma direção, sendo este tipo de arranjo conhecido como celulose I, enquanto na celulose II as cadeias estão dispostas de forma antiparalela¹². Curiosamente na quitina também existem duas formas cristalinas principais, as quais serão detalhadas a seguir, a alfa-quitina muito semelhante à celulose II e a beta-quitina, a qual possui um arranjo paralelo das cadeias, comparável ao da celulose I. Funções semelhantes são desempenhadas pela quitina e por celulose na natureza, pois ambas atuam como materiais de suporte e de defesa nos organismos que as contém.

Figura 3 - Rota biossintética de produção de quitina em insectos a partir de glicogênio, trealose, e quitina reciclada¹¹.

CELULOSE

Figura 4 - Representação da estrutura de celulose, onde n é o grau de polimerização.

As principais fontes de obtenção de quitina são as carapaças e os exoesqueletos de invertebrados e crustáceos, pois anualmente as indústrias pesqueiras processam toneladas destas espécies marinhas¹³. A quitina é encontrada na natureza geralmente associada com outras substâncias (Tabela 1) como, por exemplo, sais minerais (carbonatos e fosfatos de cálcio e/ou magnésio), lipídios, proteínas e pequenas concentrações de pigmentos, sendo que a associação de quitina com tais substâncias possui a finalidade de favorecer os organismos vivos dos quais ela faz parte.

Tabela 1 - Composição química representativa de diversos tipos de resíduos que contêm quitina³

FONTES	TEORES				
	Proteína % (a)	Cinzas % (a)	Lipídios % (a)	Quitina % (a)	Astaxantina (mg/Kg)
Cabeça de camarão	42,0 ± 1,8	20,5 ± 0,5	2,4 ± 0,02	35,5 ± 2,1	88,2
Casca de camarão	58,0 ± 2,8	24,2 ± 0,3	1,4 ± 0,02	16,4 ± 1,8	n.d.
Carapaça de lagosta	23,1	33,7	2,2	20,2	983
Resíduo de krill	41	23,0	11,6	24,0	n.d.
Gládio de lula	55,3 ± 3,1	0,9 ± 0,04	0,6 ± 0,03	43,2 ± 2,4	-

(a) - % em base seca.

As principais fontes de obtenção de quitina provêm de resíduos da indústria pesqueira (Tabela 1) os quais apresentam biodegradação relativamente lenta¹⁴ e elevada carga orgânica. Devido a estes fatores o descarte indiscriminado de tais resíduos em corpos d'água gera o aumento da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) acarretando o desequilíbrio da vida aeróbia e pondo em risco todos os seres vivos que fazem parte de tais ecossistemas. Este impacto (gerado pelo descarte incorreto dos resíduos) não se resume apenas aos aspectos ambientais, mas também aos aspectos socioeconômicos, pois os pescadores que dependem de tais ecossistemas como forma de subsistência também são afetados. Por outro lado, a utilização dos resíduos da indústria pesqueira para a produção de quitina e/ou

proteínas, é uma alternativa para atenuar o impacto ambiental devido ao descarte desses resíduos, e também uma maneira de agregar valor ao produto que seria descartado.

O estudo desenvolvido por SPILLERE e BEAUMORD (2006)¹⁵ mostrou que os fenômenos ambientais e as alterações geradas pelas atividades da indústria pesqueira decorrem, principalmente, da falta de planejamento e de interesse das indústrias em adequarem-se aos procedimentos atuais de saúde, segurança e meio ambiente. Estas indústrias só tendem a perder com a falta de adequação, pois como mencionado acima, a obtenção de quitina e/ou proteínas é uma solução prática, eficaz e lucrativa para a utilização dos rejeitos provindos da indústria pesqueira.

3.3 Processos de Obtenção de Quitina

A quitina é um polissacarídeo de alta massa molecular encontrada abundantemente na natureza e responsável por conferir sustentação aos exoesqueletos de crustáceos e insetos, e às paredes celulares de fungos e outros organismos. Estima-se que, mundialmente, o processamento de crustáceos e moluscos (lagostas, camarões caranguejos e lulas) pela indústria pesqueira e pela atividade de carcinicultura gere 1.440.000 toneladas/ano de resíduos sólidos que contém quitina. Considerando que o rendimento médio do processo de extração de quitina de tais resíduos é aproximadamente 15%, a quantidade potencial de quitina a ser obtida é de aproximadamente 216.000 toneladas/ano. Esta quantidade de quitina excede notavelmente a demanda atual de quitosana, principal derivado da quitina, que é de 10.000 toneladas/ano³. Segundo FALCONE (2007)¹⁶ a área de polímeros biodegradáveis no Brasil, apesar de recente e em desenvolvimento, apresenta grande potencial frente o panorama atual de consumo dos materiais poliméricos no mais variados setores. Os preços médios de quitina e de quitosana (principal derivado de quitina) para pequenas quantidades é de R\$394,0/100,0g¹⁷, demonstrando desta maneira o alto valor agregado aos resíduos da indústria pesqueira.

Vários procedimentos têm sido propostos para a extração de quitina a partir de resíduos da indústria pesqueira^{9, 18-28}, empregando métodos químicos e

enzimáticos. As cascas de camarões e as carapaças de caranguejos são as principais fontes para a produção industrial de quitina, sendo que tais matérias-primas possuem composições variadas no que diz respeito aos teores de quitina, proteínas, sais (principalmente fosfatos e carbonatos de cálcio e/ou magnésio), lipídios e astaxantina (Tabela 1). Devido à composição química apresentada pelas cascas de camarões e carapaças de caranguejos, principais matérias-primas para a produção de quitina, o processo de obtenção de quitina da biomassa segue essencialmente três etapas: desmineralização, desproteínização e despigmentação. A necessidade destas etapas está relacionada com a eliminação dos sais, das proteínas e dos pigmentos contidos na biomassa utilizada para a extração de quitina. Os procedimentos amplamente utilizados para a extração de quitina da biomassa geralmente compreendem a utilização de soluções ácidas (HCl ou H₂SO₄) na desmineralização, que tem por finalidade a eliminação dos sais através da sua solubilização, e de soluções alcalinas (NaOH ou KOH) na etapa de desproteínização, o que resulta na hidrólise das proteínas. A eliminação dos pigmentos (principalmente astaxantina) ocorre via processo de extração utilizando solventes orgânicos, mas agentes oxidantes também podem ser empregados. Entretanto, é importante salientar que todas as condições reacionais empregadas durante as etapas de obtenção de quitina devem ser brandas, evitando desta maneira que ocorra a despolimerização e também a desacetilação da quitina. Estudos realizados no âmbito do Grupo de Físico-Química Orgânica (GFQO/IQSC) demonstraram que a extração de quitina provinda de gládios de lulas demanda apenas a execução da etapa de desproteínização, pois nesta matéria-prima a ocorrência de sais minerais e pigmentos é extremamente baixa²⁹.

3.4 Polimorfismo de Quitina

A quitina é um polímero semicristalino cujas cadeias organizam-se na forma de lamelas (folhas) as quais estão dispostas paralelamente umas às outras, no retículo cristalino. A cadeia de quitina apresenta dois tipos de extremidades, sendo uma redutora e a outra não-redutora, e a disposição relativa das cadeias nas lamelas é o que diferencia as polimorfos de quitina. As cadeias de quitina estão ligadas, na mesma lamela, por ligações hidrogênio as quais envolvem os grupos

amida ($\text{N-H}\cdots\text{O}=\text{C}$)³⁰⁻³². Através de estudos de difração de raios X, três polimorfos de quitina foram reconhecidas na natureza: α -, β -, e a γ -quitina.

A estrutura da α -quitina é decorrente da disposição antiparalela das cadeias de quitina, favorecendo desta maneira o estabelecimento de inúmeras ligações hidrogênio inter e intramoleculares e também inter e intralamelas (Figura 5), o que resulta em um empacotamento denso e um arranjo cristalino ortorrômbico (Figura 6(a)). Quatro tipos de ligações hidrogênio presentes na estrutura da α -quitina³³ podem ser observados na Figura 5(a) Figura 5(b): ligações hidrogênio intramoleculares $\text{O}(3')\text{-H}\cdots\text{O}(5)$ e $\text{O}(6')\text{-H}\cdots\text{O}(7)$, ao longo do eixo c; ligações hidrogênio intermoleculares $\text{C}=\text{O}(7)\cdots\text{H-N-C}(2)$, ao longo do eixo a; e ligações hidrogênio intermoleculares $\text{O}(6)\text{-H}\cdots\text{O}(6')$, ao longo do eixo b. Os grupamentos CH_2OH adotam diferentes conformações e, sendo assim, estes formam ligações hidrogênio distintas ($\text{O}(6')\text{-H}\cdots\text{O}(7)$ e $\text{O}(6)\text{-H}\cdots\text{O}(6')$), uma mistura estatística de duas conformações possíveis, com 50% de ocorrência para cada uma tendo sido proposta³³. Todas as carbonilas dos grupamentos amida, na α -quitina, participam da ligação hidrogênio intermolecular $\text{C}=\text{O}(7)\cdots\text{H-N-C}(2)$, sendo que uma fração destes grupos também participa da ligação hidrogênio intramolecular $\text{O}(6')\text{-H}\cdots\text{O}(7)$. Todos os grupos hidroxilas, nos domínios cristalinos, estabelecem ligações hidrogênio, e as formadas entre cadeias de diferentes lamelas são as responsáveis pela insolubilidade da α -quitina na maioria dos solventes^{2, 32, 33}.

Figura 5 - Estrutura proposta para a α -quitina: (a) projeção do eixo b-c e (b) projeção do eixo a-b. As linhas tracejadas representam ligações hidrogênio³³.

Figura 6 - Estrutura (a) ortorrômbica encontrada no retículo cristalino de alfa-quitina e (b) monoclinica encontrada no retículo cristalino de beta-quitina.

Na β -quitina a disposição paralela das cadeias poliméricas prejudica o estabelecimento de ligações hidrogênio intermoleculares e interlamelares (Figura 7), resultando em empacotamento menos denso que o observado no caso da α -quitina e um arranjo cristalino monoclinico (Figura 6(b)). Na β -quitina são encontradas ligações hidrogênio intramoleculares O(3')-H...O(5) ao longo do eixo c, como pode ser observado na Figura 7(c), semelhante as encontradas na α -quitina. Analisando as interações ao longo do eixo a (Figura 7(a) e Figura 7 (b))³¹, nota-se que as

cadeias sucessivas interagem por ligações hidrogênio intermoleculares $C=O(7)\cdots H-N-C(2)$ e todos os grupamentos CH_2OH formam ligações hidrogênio intermoleculares adicionais $O(6')-H\cdots O(7)$, desta maneira promovendo interações entre cadeias na mesma lamela. Na β -quitina, ao contrário da α -quitina, não ocorrem ligações hidrogênio intermoleculares entre cadeias de diferentes lamelas, ao longo do eixo b. Devido a esta diminuição no número de interações, a β -quitina exibe uma melhor reatividade³³⁻³⁷, maior intumescimento em água^{38, 39} e solubilidade superior a da α -quitina²⁹. A γ -quitina ocorre como sendo uma combinação entre os arranjos da α - e da β -quitina, pois duas cadeias em disposição antiparalela são intercaladas por uma cadeia disposta de maneira paralela^{2, 3}. Porém, estudos sugerem que a γ -quitina seja uma distorção das formas α e β , e não se caracteriza como sendo uma terceira estrutura polimórfica de quitina².

Na Figura 8 estão representadas as disposições das cadeias de quitina nas polimorfas, conforme discutido acima.

Figura 7 - Estrutura proposta para a beta-quitina: (a) projeção do eixo a e b, (b) projeção do eixo a e (c) projeção do eixo b e c. As linhas tracejadas representam ligações de hidrogênio³¹.

Figura 8 - Representação esquemática das estruturas polimórficas de quitina, sendo que as setas representam as cadeias poliméricas no sentido "terminal não-redutor $\rightarrow$ terminal redutor".

A polimorfa α -quitina é considerada a forma mais estável, pois quando β e γ -quitinas sofrem a ação de ácidos minerais concentrados estas são convertidas em α -quitina^{38, 39}. Além disso, estudos com o intuito de observar a conversão de α -quitina nas formas de β e γ não obtiveram sucesso⁴⁰.

A ocorrência das polimorfos de quitina na natureza está associada ao papel que o polissacarídeo desempenha no organismo em questão. A α -quitina, a forma encontrada em maior abundância, ocorre onde é necessária extrema dureza (resistência), como nas cutículas dos artrópodes, enquanto a β -quitina é encontrada onde é preciso flexibilidade, como nos gládios de lulas, na “coluna vertebral” de diátomos marinhos (algas) e em tubos de vertimentiferanas (vermes de mares de águas profundas)^{41, 42}.

3.5 Solubilidade de Quitina

A quitina é insolúvel em água, soluções aquosas ácidas ou alcalinas e na maioria dos solventes orgânicos. A dissolução de quitina ocorre em ácidos minerais concentrados (H_3PO_4 , H_2SO_4 e HCl) e ácido fórmico anidro, mas simultaneamente à dissolução também ocorre a degradação das cadeias poliméricas. Com o intuito de solubilizar a quitina também são utilizadas soluções concentradas de sais neutros com altos graus de hidratação (LiCNS , $\text{Ca}(\text{CNS})_2$, CaI_2 , CaBr_2 e CaCl_2), em elevadas temperaturas (95°C)⁴³. Contudo o sistema solvente mais empregado na dissolução tanto da β quanto da α -quitina é a solução de N,N-dimetilacetamida contendo 5% de cloreto de lítio ($\text{DMAc}/5\%\text{LiCl}$), sendo que tal sistema solvente é escolhido na maioria das vezes em que existe a necessidade da dissolução de quitina sem que ocorram modificações nas cadeias poliméricas⁴⁴⁻⁴⁶.

3.6 Quitosana

A principal reação de derivatização da quitina é a hidrólise dos grupos acetamido (gerando grupos amino), que gera o polímero conhecido como quitosana² (Figura 9). A hidrólise das amidas, em princípio, pode ocorrer tanto em condições ácidas quanto alcalinas, mas na grande maioria dos casos a hidrólise em meio ácido não é

comumente empregada na desacetilação de quitina, devido à susceptibilidade das ligações glicosídicas à hidrólise ácida. Assim, os procedimentos mais amplamente utilizados na desacetilação de quitina, tanto em laboratórios quanto em indústrias, empregam meios alcalinos para promover a hidrólise dos grupos acetamido. A desacetilação de quitina em meio alcalino é caracterizada como sendo um processo heterogêneo que apresenta como principais variáveis a concentração do álcali, a temperatura e o tempo de reação^{36, 37}. Como a reação ocorre em meio heterogêneo e a hidrólise dos grupos acetamido pode ocorrer de forma parcial e quitosanas extensivamente desacetiladas raramente são obtidas, os produtos obtidos por desacetilação parcial de quitina são considerados copolímeros constituídos de unidades GlcN e GlcNAc. O produto obtido através da reação de desacetilação é denominado quitosana (Figura 9) somente se a porcentagem média de unidades GlcN for igual ou superior a 60%. A composição das quitosanas é variável em função das condições empregadas na desacetilação de quitina, e define-se o grau médio de desacetilação do polímero ($\overline{GD}$) como a fração média de unidades GlcN presente nas cadeias. A massa molar média, o grau médio de desacetilação e a distribuição das unidades GlcN e GlcNAc nas cadeias têm efeito marcante sobre a solubilidade da quitosana^{47, 48}, e por consequência nas suas propriedades e aplicações^{7, 49}.

Figura 9 - Reação de hidrólise dos grupos acetamido da quitina gerando grupos amino e o polímero conhecido como quitosana (representado por sua estrutura primária idealizada, onde n é o grau de polimerização).

Outro parâmetro utilizado como critério prático para diferenciar quitina de quitosana é a solubilidade dos polímeros. A quitosana é solúvel em soluções aquosas diluídas de ácidos (ácido clorídrico e ácido acético são os mais comuns), pois é considerada uma base fraca devido aos grupos amino primários que possuem o pKa próximo de 6,3. Assim, em meios ligeiramente ácidos ($\text{pH} < 6$), a maioria dos grupos aminos está protonado e, por consequência, estão carregados positivamente, tornando a quitosana um polieletrólito catiônico solúvel em água. Por outro lado, com o aumento do pH ($\text{pH} > 6$), os grupos amônio se dissociam, o que implica na perda das cargas positivas, tornando o polímero insolúvel em meios neutros e alcalinos. A transição solúvel-insolúvel ocorre em pH próximo ao valor de pKa, e como este depende fortemente do grau médio de desacetilação, a solubilidade da quitosana irá depender da quantidade de grupos amônios ($-\text{NH}_3^+$) nas cadeias poliméricas⁵⁰. Assim, para uma dada massa molar, quanto maior a quantidade destes grupos, maior será a repulsão eletrostática entre as cadeias e maior a solubilidade da quitosana⁵¹. Portanto, a solubilidade de diferentes quitosanas está intrinsecamente relacionada com o método de desacetilação utilizado em sua obtenção.

3.7 Propriedades da Quitosana

A quitosana é um polímero versátil, frente à quitina, pois pode ser manipulada na forma de pó, fibra, géis de viscosidade controlada, filmes e nanopartículas. Além destas inúmeras formas de manipulação, a quitosana também é biodegradável, biocompatível, proveniente de fonte renovável, eficiente contra bactérias, vírus e fungos, agente hidratante, tem natureza policationica e apresenta baixa toxicidade^{8, 52}. Tais características conferem grande potencial de aplicação à quitosana em diversas áreas (Tabela 2)^{6-9, 41, 49, 53-76}.

Tabela 2 - Algumas das principais aplicações de quitosana^{6-9, 41, 49, 53-76}

Área	Aplicação
Agricultura e indústria Alimentícia	Recobrimento de sementes e frutas, estimulante no crescimento de plantas. Remoção de pigmentos, sólidos e substâncias ácidas de sucos de laranja, maçã e cenoura;
Tratamento de água	Remoção de íons metálicos (por exemplo, Cu^{2+} , Pb^{2+} , U^{+}) de efluentes industriais; Clareamento d'água atuando como agente floculante e na redução de odores
Polpa e papel	Tratamento da superfície da polpa, aumentando sua resistência sem afetar o brilho; Melhorar as propriedades antiestáticas e resistência a abrasão do papel fotográfico;
Medicina e biotecnologia	Lentes de contato, curativos, tratamento de acne, pele artificial e em pomadas contra queimaduras e dispositivos para liberação controlada de drogas; Imobilização de células e enzimas; eletrodos para glicose;
Cosmética	Creme dental, hidrogéis, cremes hidratantes para o corpo, rosto e cabelos.

Quitina e quitosana são biopolímeros com inúmeras possibilidades estruturais para modificações químicas com o intuito de gerar novas propriedades, funções e aplicações⁷⁷, mas junto a estas possibilidades surgem algumas limitações relacionada às aplicações de quitina e de quitosana, as quais são observadas principalmente na área de medicina e biotecnologia, pois o mercado mundial não oferece produtos (quitina e quitosana) com elevado grau de pureza⁷⁸. De fato, embora a necessidade por tais seja conhecida, as pesquisas tanto no sentido de obtenção quanto na padronização de metodologias de caracterização desses estão evoluindo de maneira discreta. De acordo com KHOR (2002)⁷⁸ a promessa de quitina e quitosana como biomateriais não está em dúvida, mas a efetiva aplicação destes polímeros para a produção de biomateriais depende da comunidade científica e industrial explorarem as oportunidades extraordinárias que estes materiais oferecem.

Dentre as opções apresentadas para suprir a deficiência de quitinas e quitosanas de elevado grau de pureza é destacada a execução de reações de derivatização para gerar bases de Schiff, N,N,N trimetilquitosana e carboximetilquitosana^{79, 80}. O trabalho discutido por Cavalheiro et al. (2009)⁷⁹ coloca em destaque os métodos termoanalíticos para caracterizar estes polímeros derivados de quitosana.

A variedade de características e propriedades de quitina e quitosana comerciais podem ser atribuídas à heterogeneidade da matéria-prima utilizada na indústria para a produção destes polímeros. Além disso, o desenvolvimento de métodos que melhorem a qualidade dos produtos obtidos deve ser encarado como sendo de extrema prioridade para os cientistas e indústrias da área, aumentando, desta maneira, a atuação de quitina e quitosana no segmento dos biopolímeros⁸⁰. A exploração de recursos naturais renováveis e relativamente baratos é um estímulo primordial para a elaboração de novos estudos que visem a melhor compreensão das relações estruturas/propriedades de quitina, quitosanas e seus derivados¹⁹.

3.8 Desacetilação de Quitina

Durante a reação de hidrólise dos grupos acetamida da quitina (Figura 9) o grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$) aumenta nos minutos iniciais da reação em função do tempo e da temperatura até atingir um valor limite, a partir do qual se observa um patamar nos valores de $\overline{GD}$ em função do tempo de reação. O intervalo de tempo de reação limite, onde a eficiência do processo de desacetilação é reduzida, é estimado por diversos autores como sendo inferior a 1 h de reação^{2, 36, 81}.

A reação de desacetilação da quitina corresponde a uma hidrólise, sendo que o íon hidróxido, nucleófilo forte, ataca a amida mediante um mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular (S_n2). Na prática os processos termoquímicos convencionais de desacetilação de quitina utilizam grandes volumes de álcali concentrado, que têm a função de atuar como reagente e meio reacional. Como o íon hidróxido está em grande excesso em relação à concentração de quitina, a

reação procede de acordo com um mecanismo de pseudo-primeira ordem, que é governado pela Equação 1³⁶.

$$-\frac{d[GlcNAc]}{dt} = k[NaOH][GlcNAc] = k'[GlcNAc] \text{ (Equação 1)}$$

A Equação 1 representa o grau de conversão de grupos acetamidos em grupos amino do processo, expresso como mols de glucosamina por mols de N-acetilglucosamina. O valor de k , constante de velocidade observada, depende da temperatura, concentração de álcali, da relação entre a massa de quitina e o volume da solução de álcali e do tipo do processo utilizado.

Desta forma, a determinação dos graus médios de desacetilação de amostras de quitina desacetilada em um determinado conjunto de intervalos de tempo de reação e de temperatura possibilita a determinação da energia de ativação da reação, utilizando a equação de Arrhenius (Equação 2).

$$k' = Ae^{-E_a/RT} \text{ (Equação 2)}$$

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

O método de desacetilação mais empregado nos laboratórios de pesquisa e nas indústrias é o tratamento de quitina com soluções concentradas de hidróxido de sódio em temperaturas elevadas por várias horas. Em tais condições apenas a hidrólise parcial dos grupos acetamido de quitina é alcançada e um severo processo de despolimerização ocorre simultaneamente. Além disso, como a reação se processa heterogeneamente, os produtos desacetilados apresentam heterogeneidades em termos de suas características estruturais e variações importantes de propriedades. Várias metodologias têm sido propostas para aumentar a eficiência da reação e para minimizar a ocorrência de despolimerização. Assim, a realização da reação em atmosfera inerte, o uso de soluções alcalinas menos concentradas, a diluição com solventes⁸², a introdução de mudanças nas condições de processamento com o uso de extrusão reativa⁸³, de explosão de

vapor⁸⁴, de irradiação de ultrassom^{85, 86} e de microondas⁸⁷, o uso de agentes redutores⁸⁸ e a execução de tratamentos sucessivos de desacetilação³⁷ têm sido propostos. Recentemente foi proposto o processo conhecido como “freeze – pump out – thaw” (“FPT”) no qual a suspensão de quitina em solução aquosa concentrada de hidróxido de sódio é submetida a sucessivos ciclos de congelamento à temperatura do nitrogênio líquido, sucção com bomba de vácuo e aquecimento lento até atingir a temperatura ambiente⁸⁹. Ao menos seis ciclos devem ser executados e então a suspensão de quitina é submetida à desacetilação em temperaturas no intervalo 80°C – 110°C por tempos curtos (até 60 minutos). Dessa maneira, a execução de 3-4 processamentos sucessivos permite a obtenção de quitosana extensivamente desacetilada ($\overline{GD} > 98,0\%$) e de massa média molar elevada ($\overline{M} \approx 4,5 \times 10^5 \text{ g/mol}$). A comparação dos resultados obtidos pelo emprego do processo “FPT” e de processo convencional de desacetilação de quitina revela que o primeiro é muito mais eficiente. De fato, o emprego do processo “FPT” resulta na diminuição do número de reações sucessivas, e então do tempo total de reação, a serem executadas para resultar em quitosana completamente desacetilada a qual, além disso, apresenta grau médio de polimerização 1,7 vezes aquele de quitosana obtida por via de desacetilação convencional. Conforme os autores desse estudo, o processo “FPT” promove a destruição das regiões cristalinas de quitina, aumentando a acessibilidade aos sítios reativos, renova a concentração das espécies mais reativas de hidróxido de sódio (mono e diidrato) no interior das partículas de quitina e exclui o oxigênio molecular do meio reacional, minimizando a despolimerização via hidrólise alcalina oxidativa^{89, 90}.

O Grupo de Físico-Química Orgânica do Instituto de Química de São Carlos (USP) vem desenvolvendo ao longo dos últimos 15 anos trabalhos relacionados à obtenção, caracterização e aplicação de quitina e quitosana^{19, 47, 48, 51, 79, 80, 91-96}, também sendo desenvolvidos trabalhos com a utilização do ultrassom de alta intensidade^{85, 86, 97-99}.

Nos estudos iniciais realizados no Grupo de Físico-Química Orgânica, o ultrassom foi utilizado na irradiação de quitina comercial em solução aquosa e as quitinas tratadas foram então desacetiladas por meio de processos convencionais,

resultando em produtos mais desacetilados e de massa molar média semelhante à dos produtos obtidos a partir de quitina bruta. Os efeitos observados foram atribuídos à remoção de partículas inertes da superfície da quitina, provocando a sua ativação, e ao aumento da área superficial das partículas^{85, 97}. Os estudos mais recentes consideraram a utilização do ultrassom como parte da reação de desacetilação de quitina^{86, 98, 99} e não apenas como um pré-tratamento. Quando o ultrassom de alta intensidade é utilizado durante a reação de desacetilação de quitina, as quitosanas obtidas apresentam elevadas massas molares ($\overline{M} \approx 7,0 \times 10^5 \text{ g/mol}$) e elevados graus de desacetilação ($\overline{GD} > 90,0\%$), características altamente desejáveis tanto por pesquisadores quanto por indústrias.

3.9 Ultrassom

O ultrassom é definido como sendo o som de frequência que está além da sensibilidade do ouvido humano. A frequência característica do ultrassom está compreendida entre 20kHz e 100MHz. Com o desenvolvimento de equipamentos de ultrassom cada vez mais confiáveis, o número de estudos publicados envolvendo a sonoquímica vem aumentando. Assim, as principais utilizações do ultrassom são na síntese orgânica, emulsificação de soluções, degradação de polímeros, polimerização, sonoluminescência, sonólise (formação de radicais livres), formação de sonogéis e preparação de catalisadores¹⁰⁰⁻¹¹³.

Por ser uma forma de energia mecânica, as ondas ultrassônicas não são absorvidas pelas moléculas. Assim, o ultrassom como toda energia sonora, é propagado via uma série de ondas de compressão e rarefação induzidas nas moléculas através do meio que atravessa. A propagação de ondas acústicas, definidas por sua frequência e amplitude, através de meios líquidos provoca o fenômeno conhecido como cavitação, fenômeno que ocorre quando, durante o ciclo de rarefação, a energia aplicada for suficientemente elevada podendo assim superar as forças intermoleculares que mantêm a estrutura do líquido formando as bolhas cavitacionais. Estas bolhas crescerão durante os ciclos seguintes adquirindo vapor ou gás do meio até atingirem um ponto de equilíbrio, em que a frequência de ressonância da bolha é próxima à frequência aplicada. As ondas ultrassônicas não

geram um campo acústico estável para a bolha formada, devido à interferência de outras bolhas (em formação ou em ressonância) ao seu redor, tais condições podem causar a expansão súbita da bolha até um tamanho instável e seu colapso violento ocorre em menos que 10^{-6} s, com liberação de grande quantidade de energia, temperaturas e pressões elevadas (Figura 10). Das teorias elaboradas para explicar a liberação de energia no colapso cavitacional, é a abordagem conhecida como "hot spot" a que está entre as mais aceitas^{100, 114}. De acordo com essa teoria, cada bolha cavitacional atuaria como um microrreator no qual os gases e vapores formados nas cavidades são superaquecidos ($\cong 5000^{\circ}\text{C}$) e, ao mesmo tempo, submetidos a pressões elevadas ($\cong 2000\text{atm}$) no momento da sua implosão. De acordo com esta teoria, no colapso de cada bolha cavitacional, há formação de jatos de solventes a velocidades muito elevadas ($\cong 100\text{m/s}$) que fragmentam e limpam a superfície do material. Portanto, os parâmetros que podem influenciar a cavitação são muito importantes, sendo que os principais deles estão listados na Tabela 3 e correlacionados com os efeitos que podem causar na cavitação. Uma relação entre estes parâmetros deve ser buscada para atingir os efeitos desejados quando se utiliza o ultrassom.

Figura 10 - Propagação das ondas ultrassônicas no líquido e demonstração da formação e colapso da bolha de cavitação.

A geração de ondas de choque é uma das consequências do fenômeno cavitacional, tais ondas induzem efeitos mecânicos, os quais ocorrem muito rápido

para alterar moléculas “pequenas”, mas favorecem a ruptura de polímeros em fragmentos menores devido à ação de forças de cisalhamento, além de favorecer o processo de mistura de reagentes e o aquecimento do meio reacional ¹¹⁵. Devido a essas características grande parte dos estudos envolvendo irradiação de polímeros com ultrassom tem como objetivo principal a despolimerização ^{109, 116-122}, enquanto os estudos de irradiação de polímeros em meio heterogêneo para provocar alterações morfológicas nas partículas são menos frequentes ^{123, 124}.

Tabela 3 - Parâmetros que influenciam a cavitação e os efeitos da irradiação com ultrassom ^{125, 126}

Parâmetro	Influência na Cavitação
Frequência	Baixa: ciclos longos, é necessária baixa amplitude para induzir cavitação; Ciclos curtos, é necessária amplitude alta; como o ciclo de rarefação é muito curto para criar bolhas, praticamente não é observada cavitação na faixa de frequência de MHz;
Solvente	O colapso cavitacional é menos intenso em solventes de pressão de vapor mais elevada; A indução de cavitação é mais difícil em solventes com baixa pressão de vapor; A cavitação ocorre mais facilmente em solventes com baixa viscosidade e baixa tensão superficial;
Borbulhamento de gases	Gases dissolvidos (e também pequenas bolhas) servem como núcleos para cavitação, facilitando sua ocorrência; O aumento na quantidade de gás dissolvido promove a redução de intensidade das ondas de choque;
Temperatura	O aumento de temperatura eleva a pressão de vapor e o colapso é menos violento, é necessária baixa intensidade para induzir cavitação; A uma temperatura próxima do ponto de ebulição do solvente aumenta dramaticamente a quantidade de bolhas que podem servir como barreiras sonoras.
Pressão Externa	O aumento da pressão externa irá produzir uma maior intensidade no colapso cavitacional
Intensidade	Em geral, o aumento da intensidade aumenta os efeitos sonoquímicos; Uma intensidade mínima é necessária para atingir o limiar de cavitação.
Tensão Superficial	A adição de um agente tensoativo facilita a cavitação.

O principal tipo de transdutor usado na maioria dos equipamentos de ultrassom é baseado no efeito piezelétrico, este fenômeno é observado em alguns materiais cristalinos como, por exemplo, o quartzo. O efeito piezelétrico ocorre quando uma diferença de potencial entre duas faces cristalinas é produzida quando o material é submetido à compressão súbita. Para a construção de um transdutor ultrassônico é empregado o efeito piezelétrico inverso, no qual a aplicação de um potencial através de duas faces de um cristal piezelétrico provoca mudanças nas dimensões do cristal, e assim a energia elétrica é convertida em energia vibracional^{100, 126}. Algumas das principais aplicações do ultrassom, em diversas áreas do conhecimento, estão inseridas na Tabela 4^{100, 102, 103, 113, 124, 126-136}.

Tabela 4 - Principais aplicações do ultrassom

Área	Aplicação
Biologia/bioquímica	Homogeneização e ruptura de células Transferência de genes Biosensores e Biossínteses
Odontologia	Limpeza e perfuração dos dentes
Engenharia	Perfuração, corte e pulverização de materiais Processamento de vidro e cerâmicas Testes não-destrutivos de materiais
Plásticos e polímeros	Moldagem de termoplásticos Iniciação da polimerização Degradação polimérica Determinação de taxas de cura em resinas
Química	Impregnação de catalisadores sobre suportes sólidos; Preparação de organometálicos; Proteção ambiental; Extração de produtos naturais; Obtenção de nanopartículas; Sonocristalização.
Processamento de materiais	Redução do tamanho de partículas Perfuração e corte de precisão em materiais cerâmicos.
Indústria alimentícia	Homogeneização de misturas para preparação de molhos, cremes e processamento de suco de frutas.
Indústria Têxtil	Aumento da qualidade de dispersão de corantes, da solubilidade do corante em água, e da absorção de corante para materiais têxteis. Lavagens ultrassônicas são realizadas para remover materiais naturais ou impurezas da superfície das fibras.
Indústria do Petróleo	Dessulfurização oxidativa;

Segundo CRAVOTTO e CINTAS(2011)¹²⁶ a utilização do ultrassom em reações químicas, que constitui o domínio da sonoquímica, resulta na aceleração das reações, permite que reações sejam executadas em condições mais brandas, torna o processo mais econômico, reduz, na maioria dos casos, o número de etapas necessárias, reduz o tempo de iniciação em reações de polimerização e melhora a eficiência dos catalisadores.

4 OBJETIVOS

O presente estudo visa desenvolver e aprimorar uma metodologia original para aumentar a eficiência e a reprodutibilidade da reação de desacetilação de quitina, de maneira a permitir a obtenção de quitosanas com características controladas. Assim o foco desta pesquisa foi estudar os efeitos da irradiação de suspensões de quitina em solução aquosa de hidróxido de sódio com ultrassom de alta intensidade. A variação das características das quitosanas obtidas, por este processo, foi relacionada com os parâmetros utilizados em cada reação e com a cinética da reação de desacetilação de quitina.

5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.1 Reagentes

Os reagentes empregados neste trabalho são os identificados abaixo (Tabela 5), os quais não foram purificados, a não ser quando especificado.

Tabela 5 - Reagentes utilizados na realização dos experimentos

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

5.2 Matéria-Prima

A beta-quitina foi extraída de gládios, também denominados penas ou plumas, de lula da espécie: *Loligo sampauiensis*, cedidos pela Empresa Miami Pescados (Cananéia/SP). As espécies foram identificadas pelo Instituto de Pesca de São Paulo (base de Cananéia). Os gládios (Figura 11) foram armazenados a -20°C até a sua utilização.

Figura 11 - Lula da espécie *Loligo*, (a) com destaque para o gládio inserido na parte interna do molusco e (b) gládio retirado da lula.

5.3 Obtenção de Beta-Quitina

Para efetuar a extração da beta-quitina, inicialmente os gládios foram lavados manualmente para remoção de resíduos de carne, enxaguados com água destilada e secos em estufa com circulação e renovação de ar durante 24h, a 30°C. Uma vez secos, os gládios foram transferidos para o moinho de facas (MA-048, Micromoinho de rotor vertical com facas móveis, Marconi). Os gládios triturados foram utilizados na extração de beta-quitina.

De acordo com KURITA et al. (1992)¹³⁷ e trabalhos já realizados no Grupo de Físico-Química Orgânica^{29, 138}, os gládios não contêm sais minerais em quantidades significativas, o que permite dispensar a etapa de desmineralização dos gládios. Para a remoção das proteínas presentes nos gládios foi utilizado o método descrito por CHAUSSARD et al. (2004)²². Assim, cerca de 200g de gládios moídos foram suspensos em 3L de uma solução aquosa de NaOH 1M, e a suspensão resultante foi mantida sob agitação mecânica (350 rpm), durante 18 h à temperatura ambiente. Em seguida, a suspensão foi filtrada e o sólido lavado com água destilada até a neutralidade das águas de lavagem. A beta-quitina foi então transferida para placas de Petri e seca em estufa com circulação e renovação de ar durante 24h, a 30°C. O material obtido foi triturado em moinho de facas (MA-048, Micromoinho de rotor vertical com facas móveis, Marconi), em seguida peneirado (utilizando peneiras com aberturas de 0,062, 0,075, 0,090, 0,125, 0,250, 0,425mm²) e classificado de acordo com as dimensões das partículas.

5.4 Desacetilação de Beta-Quitina Assistida por Irradiação de Ultrassom de Alta Intensidade

O estudo da desacetilação de beta-quitina assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade, processo DAIUS⁸⁶, foi realizado em três etapas: i) variáveis que influenciam o processo DAIUS, ii) otimização do processo DAIUS e iii) cinética do processo DAIUS.

Em todas as etapas a beta-quitina, foi suspensa em 100mL de solução de NaOH 40% (m/m), e a suspensão foi transferida para um reator de vidro encamisado, o qual estava disposto no interior da caixa de isolamento acústico do equipamento de ultrassom (Hielscher modelo UP400S (Figura 12), frequência de 24kHz, diâmetro da sonda de 22mm e densidade de potência acústica de 85 W/cm²). O sonotrodo foi imerso (aproximadamente 2/3 do comprimento) na suspensão de beta-quitina, que foi mantida sob agitação magnética constante. As variáveis utilizadas em cada etapa estão descritas abaixo. Independentemente da etapa de experimentos considerada, após o término da reação a suspensão foi transferida para um béquer de polipropileno contendo cubos de gelo de água destilada, que foi imerso em uma mistura de gelo, água e etanol (T= -10°C) para interromper a reação de desacetilação. A suspensão foi mantida à baixa temperatura e foi adicionado ácido clorídrico concentrado em pequenas porções até atingir pH= 7-8. Em seguida a suspensão foi filtrada e o sólido foi abundantemente lavado com etanol 80% até que o excesso de cloreto de sódio fosse eliminado. O sólido foi transferido para placa de Petri e seco em estufa de circulação a 30°C por 48h e mais 24h em estufa a vácuo a 30°C.

Figura 12 - 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) detalhe transversal do ultrassom de alta intensidade Hielscher modelo UP400S.

5.5 Parâmetros que Influenciam o Processo DAIUS

Com o intuito de verificar quais são os parâmetros que mais influenciam o processo DAIUS, cinco variáveis foram selecionadas, os critérios para a seleção de tais variáveis advêm de estudos prévios realizados pelo Grupo de Físico-Química Orgânica, os quais envolveram a desacetilação de beta-quitina por ultrassom de alta intensidade^{86, 98, 139}. As variáveis selecionadas e os níveis utilizados de cada uma delas estão mostrados na Tabela 1

Tabela 6 - Variáveis estudadas no processo DAIUS e os valores de cada nível (-1, 0 e +1)

Variável	Código	Níveis		
		-1	0	+1
Concentração de beta-quitina (mg/mL)	[]	0,022	0,033	0,044
Temperatura (°C)	T	50	60	70
Potência do ultrassom (Watts) ^a	P	200	280	360
Tempo de sonicação (min.)	TS	20	30	40
Diâmetro da beta-quitina (mm)	D	0,125-0,250	0,250-0,425	>0,425

^a Potência nominal apresentada pelo ultrassom

Utilizando a abordagem de TEOFILO e FERREIRA (2006)¹⁴⁰ optamos pela a utilização do planejamento fatorial fracionário (2^{5-2}) ao invés do planejamento fatorial completo (2^5), resultando na execução de 11 experimentos (Tabela 7).

Tabela 7 - Níveis das variáveis estudadas em cada reação do processo DAIUS

Experimento	Código da Amostra	Variável				
		[]	T	P	TS	D
1	CH1	-1	-1	-1	+1	+1
2	CH2	+1	-1	-1	-1	-1
3	CH3	-1	+1	-1	-1	+1
4	CH4	+1	+1	-1	+1	-1
5	CH5	-1	-1	+1	+1	+1
6	CH6	+1	-1	+1	-1	-1
7	CH7	-1	+1	+1	-1	+1
8	CH8	+1	+1	+1	+1	-1
pc1 ^a	CH.01	0	0	0	0	0
pc2 ^a	CH.02	0	0	0	0	0
pc3 ^a	CH.03	0	0	0	0	0

^a Ponto Central.

5.6 Otimização do Processo DAIUS

Após o estudo inicial para avaliar os parâmetros que mais influenciam o processo DAIUS, foram selecionadas as duas variáveis que se mostraram mais importantes (temperatura e tempo de reação). Nesta etapa foi utilizado o planejamento composto central a fim de se obter os gráficos de superfície de resposta para a variação das características principais da quitosana ($\overline{GD}$ e $\overline{Mv}$). Com duas variáveis, conforme Tabela 8, são necessários quatro experimentos no planejamento fatorial, quatro experimentos nos pontos axiais e mais a realização de duplicatas no ponto central (Tabela 9).

Tabela 8 - Variáveis estudadas no processo DAIUS e os valores de cada nível (-1,41, -1, 0, +1 e +1,41)

Variável	Nível				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Temperatura (°C)	45,9	50,0	60,0	70,0	74,2
Tempo de Sonicação (min.)	25,9	30,0	40,0	50,0	54,2

As outras variáveis estudadas durante o processo foram mantidas constantes: diâmetro da beta-quitina = 0,125-0,250mm, potência do ultrassom = 280 watts e concentração de beta-quitina = 0,033mg/mL.

Os gráficos de superfície de resposta foram elaborados com a ajuda do programa “Origin 8.5.2”. Inicialmente os dados obtidos foram convertidos na forma de matriz utilizando a ferramenta “XYZ Gridding” e após a elaboração das matrizes os gráficos “3D surface” foram obtidos.

Tabela 9 - Níveis das variáveis estudadas em cada reação do processo DAIUS

Reação	Código da Amostra	Temperatura	Tempo de Sonicação
1	TT01	-1	-1
2	TT02	1	-1
3	TT03	-1	1
4	TT04	1	1
5	TT05	-1.41	0
6	TT06	+1.41	0
7	TT07	0	-1.41
8	TT08	0	+1.41
9	TT09	0	0
10	TT10	0	0

5.7 Cinética do Processo DAIUS

5.7.1 Testes Exploratórios

Com base nos dados obtidos nos experimentos anteriores, foi realizado o estudo cinético exploratório do processo DAIUS, o qual objetivava a compreensão da participação das ondas ultrassônicas na reação de desacetilação de beta-quitina através da avaliação das características dos produtos obtidos e dos rendimentos resultantes.

Neste caso o tempo de sonicação foi à única variável estudada, as outras variáveis foram mantidas constantes: temperatura (60°C), diâmetro das partículas de beta-quitina (0,250-0,425mm), potência do ultrassom (280watts), volume de NaOH 40% (m/m) igual a 100mL e concentração de beta-quitina (0,033g/mL). Os tempos de cada reação submetida ao ultrassom de alta intensidade foram de 5, 10, 15, 20,

25, 30, 40, 50 e 60 minutos, gerando um total de nove amostras, as quais receberam os seguintes códigos: Q-1e, Q-2e, Q-3e, Q-4e, Q-5e, Q-6e, Q-7e, Q-8e e Q-9e, respectivamente. Sendo Q de quitosana, o número respectivo a cada tempo de reação e a letra “e” de exploratório.

5.7.1 Estudos Cinéticos

Analizando os resultados iniciais obtidos através da cinética do processo DAIUS (testes exploratórios), foi delineada uma nova abordagem sobre os experimentos envolvendo a cinética deste processo. Mantivemos as seguintes variáveis iguais aos testes iniciais: a temperatura (60°C), o diâmetro das partículas de beta-quitina (0,250-0,425mm) e potência do ultrassom (280watts), porém o volume da solução de NaOH 40% (m/m) foi de 50mL e concentração de beta-quitina foi (0,044g/mL), estes dois parâmetros foram ajustados a fim de facilitar e otimizar a obtenção das amostras.

Os tempos de cada reação submetida ao ultrassom de alta intensidade foram de 1, 3, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5, 20, 25, 30, 40, 50 e 60, 90, 120 e 180 minutos, gerando um total de dezessete amostras, as quais receberam os seguintes códigos: Q-01, Q-02, Q-03, Q-04, Q-05, Q-06, Q-07, Q-08, Q-09, Q-10, Q-11, Q-12, Q-13, Q-14, Q-15, Q-16 e Q-17 respectivamente. Sendo Q de quitosana e o número respectivo a cada tempo de reação. As amostras Q-15, Q16 e Q17 foram obtidas em duplicata.

A amostra Q-17 foi obtida na etapa final do trabalho e serviu apenas para confirmar a tendência da curva de cinética de desacetilação, por tanto as únicas análises realizadas com esta amostra foram a determinação do grau médio de desacetilação e da massa molar média viscosimétrica.

6 Caracterização das Amostras

As principais características das amostras de quitosana e de beta-quitina (parcialmente desacetilada) são o grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$) e a massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$). Tais características são importantes, pois através delas foi possível relacionar diretamente as variáveis empregadas na reação de desacetilação de quitina assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade com as melhores condições para obtenção de quitosanas com elevados $\overline{GD}$ e elevadas $\overline{M}_v$. Além destas características também podemos citar a cristalinidade e a morfologia das quitosanas obtidas, que são determinadas empregando técnicas de difração de raios X e de microscopia eletrônica de varredura (MEV), respectivamente. As características adicionais determinadas foram os teores de cinzas, umidade, metais (beta-quitina), comportamento térmico e os modos de vibração na região do infravermelho. As características citadas e suas determinações são descritas a seguir.

6.1 Grau Médio de Desacetilação ($\overline{GD}$)

6.1.1 Determinação do $\overline{GD}$ por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H)

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 desacetilação das amostras de quitina parcialmente desacetilada e de quitosana foram determinados através de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H). Os espectros foram adquiridos em espectrômetro AGILENT 400/54 a 70°C; o pulso utilizado foi de 4,45mS (45°), acumulando 256 varreduras e o parâmetro LB foi de 0,2Hz. As amostras de quitina parcialmente desacetilada foram preparadas 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 18h. As amostras de quitosana foram preparadas através da adição de 1mL de uma solução de HCl/D₂O 1% a 10mg de amostra, sob

agitação magnética constante da suspensão, a temperatura ambiente, durante 24h, as soluções obtidas foram transferidas para tubos de vidro apropriados ($\Phi = 5\text{mm}$) e os respectivos espectros foram obtidos. O sinal correspondente ao hidrogênio (HOD) observado no espectro do solvente (DCI/D₂O 20%), ao qual foi adicionado ácido 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfônico (DSS) como padrão, em 6,95ppm, foi usado como referência para atribuição dos deslocamentos químicos referentes à quitina (Figura 13). Os espectros de quitosana foram calibrados a partir dos sinais correspondentes aos hidrogênios (CH₃) observado no espectro do solvente (HCl/D₂O 1%) em 2,1ppm¹³⁹.

Figura 13 - Espectros de RMN de ¹H da solução de DCI/D₂O 20%, da solução de DCI/D₂O 20% com adição de DSS e de uma amostra de quitina.

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

Figura 14 - Espectro de RMN de ^1H característico de uma amostra de quitosana (amostra TT01 em $\text{HCl}/\text{D}_2\text{O}$ 1%, 80°C), onde $\text{R} = \text{COCH}_3$ ou $\text{R} = \text{H}$.

O grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$) foi calculado a partir da razão entre as áreas dos prótons metílicos do grupo acetamida (sinais 2,1ppm) e da soma das áreas dos prótons ligados aos carbonos 2 a 6 do anel glicopiranosídico. (cujos sinais foram observados na região de deslocamento químico de 3 a 4,2ppm), conforme a Equação 3¹⁴¹.

$$\% \overline{GD} = 100 - \left[\left(\frac{\frac{A_{\text{CH}_3}}{3}}{\frac{A_{\text{H}_2-\text{H}_6}}{6}} \right) \right] * 100 \text{ (Equação 3)}$$

Como demonstrado por VARUM (1990)¹⁴² e empregado por VEIGA (2011)¹⁴³, o modelo estatístico de Bernoulli para copolímeros pode ser utilizado para caracterizar as amostras de quitosana quando consideramos a possibilidade que as unidades GlcNAc (A) ou GlcN (D) podem ser adicionadas a uma unidade não especificada (A ou D). Assim, adicionando uma unidade A (ou unidade D) a outra unidade A (ou D), quatro diferentes sequências de díades podem ser identificadas: F_{AD} , F_{AA} , F_{DD} e F_{DA} . Os valores da intensidade dos sinais (I_{AD} , I_{DD} , I_{AA} e I_{DA}) das sequências de díades das amostras de quitosana podem ser obtidos experimentalmente por

espectroscopia de RMN de ^1H e o tratamento dos dados foi realizado empregando a ferramenta “deconvolução” do programa Origin Lab¹⁴⁴.

6.1.2 Determinação do $\overline{GD}$ por Titulação Condutimétrica

Para as amostras de quitosana o $\overline{GD}$ também foi determinado através da titulação condutimétrica. A amostra de quitosana (aproximadamente 0,1000g), previamente seca em estufa a vácuo a 30°C por 6h, foi suspensa em 50mL de solução de HCl 0,05mol/L e mantida sob agitação magnética constante durante 15h à temperatura ambiente. A solução resultante foi transferida para balão volumétrico de 110mL e o seu volume foi ajustado com água destilada e deionizada. Alíquotas de 50mL da solução resultante foram tituladas com solução de hidróxido de sódio 0,1mol/L (previamente padronizada com biftalato de potássio). A neutralização da solução de quitosana foi acompanhada através de medidas de condutividade, utilizando um condutivímetro modelo Handylab LF1 e titulador automático Titronic Universal, ambos da Schott-Geräte. As medidas de condutividade durante as titulações foram efetuadas à temperatura de $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. A curva de condutividade em função do volume de titulante adicionado, representativo para titulações de amostras de quitosana, é apresentada na Figura 15.

Figura 15 - Curva de titulação condutimétrica característica de uma amostra de quitosana (amostra TT01).

A curva apresentada na Figura 15 é típica da titulação de uma mistura contendo ácido forte e ácido fraco, utilizando como titulante uma base forte. Inicialmente, ocorre a neutralização do ácido clorídrico empregado em excesso para garantir a solubilização de quitosana. Assim, os íons H^+ provenientes do ácido clorídrico são substituídos pelos íons Na^+ , resultando na redução brusca da condutividade da solução. Após a neutralização do ácido forte (V_1), a adição do hidróxido de sódio promove a desprotonação dos Grupos amônio da quitosana, promovendo ligeiro aumento da condutividade do meio. Uma vez concluída a neutralização do ácido fraco, Grupos $-NH_3^+$ de quitosana (V_2), a adição de excesso de base resulta no aumento de concentração de íons hidroxila na solução e na elevação mais acentuada da condutividade. Desta forma, a partir da determinação dos volumes nos pontos de equivalência (V_2 e V_1), o grau médio de desacetilação das amostras de quitosana pode ser determinado através da Equação 4⁴⁷.

$$\% \overline{GD} = 100 - \left[\left(1 - \frac{161 * (V_2 - V_1) * [NaOH]}{m} \right) * 100 \right] \text{ (Equação 4)}$$

sendo:

$\overline{GD}$ = Grau médio de desacetilação;

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

$(V_2 - V_1)$ = Volume de solução de hidróxido de sódio consumido para neutralizar a quitosana (mL);

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

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

6.2 Determinação do Parâmetro de Acetilação (PA)

O parâmetro de acetilação (PA) foi determinado por espectroscopia de RMN de 1H , de acordo com o método descrito por VARUM (1991)¹⁴⁵. Para determinar o

PA das amostras é importante que os espectros tenham boa resolução, pois é necessário conhecer as intensidades dos sinais (I_{DD} , I_{DA} , I_{AA} , I_{AD}) referentes aos núcleos de hidrogênio das sequencia de diades AD-AA e DA-DD (Figura 16)¹⁴⁶, onde A é para acetilado e D para desacetilado.

Figura 16 - Espectro de RMN de ^1H na região de ressonância dos hidrogênios da amostra de quitosana TT01 ($\overline{GD}$ =45%).

Os valores experimentais das intensidades dos sinais I_{AD} , I_{AA} , I_{DA} e 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 devem ser normalizadas de acordo com a estatística de Bernoulli¹⁴⁷ e podem ser expressas como as Equações 5, 6 e 7:

$$F_{AD} = \frac{I_{AD}+I_{DA}}{I_{AD}+I_{DA}+I_{DD}+I_{AA}} \text{ (Equação 5)}$$

$$F_{AA} = \frac{I_{AA}}{I_{AD}+I_{DA}+I_{DD}+I_{AA}} \text{ (Equação 6)}$$

$$F_{DD} = \frac{I_{DD}}{I_{AD}+I_{DA}+I_{DD}+I_{AA}} \text{ (Equação 7)}$$

Nas Equações 5, 6 e 7 o F_{AA} (F_{DD}) é considerado como sendo a probabilidade que duas unidades A (D) sejam adjacentes e F_{DA} é a probabilidade que uma unidade A tenha D como um vizinho, e vice-versa. A partir desses dados é possível calcular o PA pela seguinte Equação 8.

$$PA = \frac{F_{AD}}{2(F_{AA}) + F_{AD}} + \frac{F_{AD}}{2(F_{DD}) + F_{AD}} \text{ (Equação 8)}$$

6.3 Determinação da Massa Molar Média por Viscosimetria Capilar

Quando se trata de solução de polieletrólitos, como a solução de quitosana em ácido diluído/tampão ou a de quitina em N,N-dimetilacetamida/LiCl-5%, a viscosidade pode ser descrita como função de sua viscosidade intrínseca e de sua concentração, quando não ocorrerem interações macromoleculares (sistema diluído) e quando existir a presença de um excesso de sal. A relação de Huggins¹⁴⁸, Equação 9, pode ser empregada.

$$\eta_{sp}/C = [\eta] + K_H \cdot [\eta]^2 \cdot C \text{ (Equação 9)}$$

onde:

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

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

K_H = constante de Huggins;

C = concentração da solução (g/mL).

Desta forma, a viscosidade intrínseca ($[\eta]$) é determinada pela extrapolação à diluição infinita da curva de viscosidade reduzida versus concentração (Figura 17). A

viscosidade assim determinada satisfaz a relação de Mark-Houwink, Equação 10¹⁴⁹⁻¹⁵¹ e, assim, a massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$) do polieletrólito pode ser determinada.

$$[\eta] = K' M_v^\alpha \text{ (Equação 10)}$$

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

Figura 17 - Curva da viscosidade reduzida em função da concentração da amostra TT05, a extrapolação à diluição infinita (■) fornece a viscosidade intrínseca $[\eta]$.

Para a quitosana, os valores de α e de K' dependem do grau médio de desacetilação do polímero^{8, 152}. As massas molares médias viscosimétricas das amostras obtidas foram determinadas utilizando os valores das constantes de Mark-Houwin (α e K') propostos por RINAUDO (1993)¹⁵², a partir dos valores de viscosidade intrínseca ($[\eta]$) das amostras e de acordo com o valor de grau médio de desacetilação.

Para a determinação da viscosidade intrínseca, cerca de 20mg de quitosana (previamente seca em estufa a vácuo, a 30°C por 6h) foram suspensos em 25mL de solução de ácido acético 0,6M sob agitação magnética constante durante 24h. Em seguida foram adicionados 25mL de acetato de sódio 0,4M e a agitação procedeu por mais 24h. A solução resultante foi filtrada sob pressão positiva em membrana

com diâmetro dos poros de 0,45µm (Millipore – White SCWP). As soluções diluídas de beta-quitina foram preparadas com a adição de 7,5mg de amostras em 30mL da solução de N,N-dimetilacetamida com 5% de cloreto de lítio. Os valores de K' e α utilizados¹⁵³ para determinar a massa molar média das amostras de quitina foram $2,4 \times 10^{-4}$ dL e 0,69, respectivamente. Alíquotas de 15mL desta solução foram transferidas para um viscosímetro capilar de vidro (do tipo Ubbelohde, $\Phi=0,53$ mm) e as medidas de tempo de escoamento foram determinadas em viscosímetro AVS-350 acoplado a um módulo diluidor automático AVS-20, ambos da Schott-Geräte. Todas as medidas de tempo de escoamento foram realizadas a $25,00 \pm 0,01^\circ\text{C}$ e tampão ácido acético 0,3M/acetato de sódio 0,2M (pH=4,5) foi empregado para as sucessivas diluições de quitosana e a solução de N,N-dimetilacetamida com 5% de cloreto de lítio para a beta-quitina, de modo a assegurar que a força iônica das soluções fosse mantida constante.

Os valores de tempo de escoamento correspondem à média de três determinações independentes que não apresentaram variação maior que 0,5%. Foi feita a correção de Hagenbach¹⁵⁴ para os valores de tempo de escoamento da solução (t_c) e tempo de escoamento do solvente (t_0), conforme a Equação 11.

$$\Delta t_{HC} = \frac{E}{Kt_2} \text{ (Equação 11)}$$

Sendo:

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

t = tempo de escoamento médio;

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

Assim, após a correção, os tempos de escoamento utilizados (t') foram obtidos utilizando a Equação 12.

$$t' = t - \Delta t_{HC} \text{ (Equação 12)}$$

Empregando as condições e os equipamentos citados e considerando os intervalos de concentração das soluções de quitosana analisadas, a seguinte aproximação é válida (Equação 13).

$$\eta_{rel} \cong \frac{t'_c}{t'_0} \text{ (Equação 13)}$$

sendo,

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

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

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

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

6.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura foi empregada para analisar qualitativamente e quantitativamente as mudanças ocorridas na morfologia das amostras de quitinas. As amostras foram mantidas em dessecador com sílica gel durante 2 dias e depois colocadas em porta-amostra de alumínio sobre fita adesiva de carbono e então recobertas com ouro (espessura de recobrimento de aproximadamente 20nm).

A morfologia das superfícies das amostras foi investigada empregando microscópio eletrônico de varredura LEO-440. A tensão e a corrente do feixe utilizados nas análises foram de 20kV e 2,85pA, respectivamente. As imagens obtidas foram tratadas digitalmente utilizando o programa image J.

Existem vários programas disponíveis no mercado para análise de imagens, porém, em geral, eles são muito caros e sua utilização muito complexa, muitas vezes necessitando de treinamento específico¹⁵⁵. O programa imageJ (Figura 18) foi o escolhido para tratar as micrografias, pois além de possuir código-fonte livre, existe também a possibilidade de desenvolver adaptações que se adéquem a necessidade do usuário. Para analisar as micrografias com o imageJ, inicialmente foi realizado a calibração da imagem, utilizando como padrão a barra de escala fornecida nas micrografias. Após a calibração a imagem foi ajustada com a opção “Threshold”, a qual atua como um filtro para a imagem eliminando os espaços vazios entre as partículas (Figura 19), em seguida a função “Watershed” foi utilizada para facilitar a determinação da área total (mm²) e do número de partículas. Obtendo por fim uma área média por partículas ($\overline{AM}$), para o cálculo das áreas médias foram utilizadas as micrografias com ampliações de 100 vezes. Utilizando a ferramenta “Roughness Calculation” foi possível determinar a rugosidade das amostras, esta ferramenta fornece a rugosidade superficial estatística (RS), com base na topografia das imagens (Figura 20). O cálculo da rugosidade é feito através da determinação dos valores de cada pixel com relação a sua distância z, em uma superfície plana. Para o cálculo das rugosidades foram utilizadas as micrografias com ampliação de 5000 vezes, para cada conjunto de amostras foi atribuído o valor 0,0% ao menor valor de rugosidade obtido. Outro dado fornecido pelo programa imageJ é o valor da circularidade (C_{irc}) das partículas, este valor diz respeito ao quanto a partícula se aproxima de uma circunferência perfeita, neste caso para a circunferência perfeita é atribuído o valor padrão de circularidade igual 1,000 e o valor calculado para as amostras é proporcional a este valor padrão.

Figura 18 - Interface do programa imageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Figura 19 - Ajuste da imagem (amostra CH1), com a função 'Threshold'; (a) sem o 'Threshold' (b) com 'Threshold'.

Figura 20 - Micrografia da amostra TT09 com ampliação de 5000 vezes, (a) superfície da amostra em 2D e (b) topografia em 3D, utilizada no cálculo da rugosidade.

6.5 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 $3-50^\circ$, empregando varredura contínua com velocidade de $1^\circ/\text{min}$. 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 14^{156, 157}.

$$I_{cr} = \frac{I_c - I_a}{I_c} \cdot 100 \text{ (Equação 14)}$$

Onde:

I_{cr} = índice de cristalinidade

I_c = intensidade do sinal referente às regiões cristalinas

I_a = intensidade do sinal referente às regiões amorfas.

A partir desses resultados, também foi possível, estimar o valor do diâmetro aparente dos cristalitos (D_{ap}) em Å, através da seguinte equação³².

$$D_{ap} = \frac{K\lambda}{\beta_0 \cos \theta} \text{ (Equação 15)}$$

Onde:

D_{ap} = diâmetro médio dos cristalitos (Å) em uma direção perpendicular ao plano (110)

β_0 = largura da banda referente ao sinal das regiões cristalinas, no ponto de média intensidade (radianos)

K = constante

θ = metade do ângulo de Bragg correspondente ao sinal mais intenso (radianos)

λ = comprimento de onda da radiação empregada (Å).

6.6 Espectroscopia na Região do Infravermelho

As pastilhas foram preparadas em KBr (grau espectroscópico) na proporção de 1:100 amostra/KBr. Tanto o KBr como as amostras foram previamente secas em

estufa a vácuo a 30°C por 24 h e depois foram misturadas e trituradas em gral de ágata. As amostras trituradas com KBr foram novamente secas em estufa a vácuo a 30°C, por 24h. Após este período as amostras com KBr foram prensadas e novamente colocadas em estufa nas mesmas condições. As análises foram realizadas em equipamento BOMEM modelo MB-102 com transformada de Fourier, com acúmulo de 48 varreduras e resolução de 4cm⁻¹, no intervalo de 4000 – 450cm⁻¹. A espectroscopia na região do infravermelho é comumente utilizada na caracterização de quitinas e quitosanas, tanto quantitativamente quanto qualitativamente, devido as suas bandas de absorção características na região do infravermelho (Tabela 10).

Tabela 10 - Bandas de absorção e números de onda ($\bar{\nu}$ cm⁻¹) características de quitina e quitosana

Banda	$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)	Banda	$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)
Amida I (-C=O-NH ₂)	≈ 1 650 e 1 630	Amida II (-C=O-NH ₂)	≈ 1 550 e 1560
Amida III (-C=O-NH ₂)	≈ 1 310	-N-H ₃ ⁺ (s)	≈ 3 350-3100
-N-H ₂ (s)	≈ 3 250-3 350	-N-H ₂ (b)	≈ 1590-1630
-O-H (s)	≈ 3 450	-O-H (b)	≈ 1260
-C-OH (s)	≈ 1 030 e 1 070	-C-H ₂ (b, sc)	≈ 1410-1420
-NH-C(O)-C-H ₃ (s)	≈ 1 380	-NH-C(O)-C-H ₃ (b)	≈ 2860-2910

s = estiramento ("stretching"); b = torção ("bending"); sc = ("scissor")

6.7 Estabilidade Térmica

A estabilidade térmica das amostras foi estudada por análises termogravimétricas, utilizando o equipamento TGA-50, da Shimadzu, atmosfera dinâmica de ar sintético (vazão= 50 mL/min) e porta amostra de platina. As amostras foram aquecidas a uma razão de 10^o/min até 100°C (permanecendo a 100°C durante 20min. para eliminação de água), e de 100°C até 900°C (permanecendo a 900°C por 20min.). A quantidade de amostra utilizada em cada análise foi de aproximadamente 7mg. As amostras foram previamente trituradas em grau de ágata e armazenadas em dessecador contendo sílica gel durante 2 dias. Os dados de temperatura onde a partir da qual se inicia a degradação térmica com perda de produtos voláteis (T_{onset}), de máxima degradação (T_{max}), inicial (T₀) e final (T_f) do primeiro evento de

degradação, além dos teores de umidade e cinzas foram obtidos dos termogramas e da primeira derivada dos mesmos, como mostrado na Figura 21.

Figura 21 - Termograma representativo, da amostra CH2, para a determinação temperatura onset (T_{onset}), de máxima degradação (T_{max}), inicial (T_0) e final (T_f) do primeiro evento de degradação e os teores de umidade e cinzas.

6.8 Teor de Cinzas

As amostras de beta-quitina obtidas através do fracionamento por tamanho de partículas foram analisadas quanto ao teor de cinzas e de metais. O método utilizado para determinação do teor de cinzas em celulose, que segue a norma TAPPI T211 om-85 (ASH in wood and pulp T211 om-85), foi adaptado¹⁵⁸ para as análises das amostras de quitina, conforme descrito a seguir.

Foram adicionados, em cadinhos de porcelana previamente tarados, 1g de amostra (triplicata). Os cadinhos foram então submetidos a aquecimento com bico de Bunsen, promovendo desta forma a combustão lenta da amostra, até que o desprendimento de gases não fosse mais observado. Em seguida os cadinhos foram colocados em mufla, a 650°C, por 4 horas. Após a calcinação, os cadinhos foram transferidos para dessecador com sílica por aproximadamente 1 hora e pesados em seguida. As pesagens foram repetidas após 15 minutos para verificar se os valores de massa permaneciam constantes (a diferença entre as massas durante as

sucessivas pesagens foi menor que 0,1 mg). O teor de cinzas foi calculado utilizando a Equação 15.

$$\% \text{ de Cinzas} = \frac{m_1}{m_2} \cdot 100 \text{ (Equação 15)}$$

onde,

% de Cinzas = teor percentual de cinzas

m_1 = massa de cinzas (g)

m_2 = massa de quitina seca (g)

6.9 Solubilidade

A solubilidade das amostras de quitina foi verificada em água, ácido fórmico e solução aquosa de ácido clorídrico 0,55 mol/L. A solubilidade das amostras de quitina parcialmente desacetilada e de quitosana foi verificada em água e solução aquosa de ácido clorídrico 0,05 mol/L. Os testes foram realizados em tubos de ensaio com a proporção de 1 mg da amostra para 1 mL do solvente.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os principais resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho, bem como as discussões decorrentes, serão exploradas de maneira a demonstrar a sua evolução. Nesse sentido, como descrito na parte experimental (Item 5), a discussão dos resultados foi dividida em quatro etapas. A primeira etapa aborda a extração da beta-quitina dos gládios de lula e sua caracterização. A segunda etapa explora os resultados dos testes que tiveram como finalidade definir os principais parâmetros do processo DAIUS (Grupo I). A terceira etapa concerne os resultados obtidos visando à otimização do processo DAIUS (Grupo II) e a quarta etapa foca nos resultados do estudo da cinética de desacetilação de beta-quitina assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade (Grupo III), a qual está dividida em testes exploratórios (TE) e estudos cinéticos (EC). A fim de melhor visualizar a evolução do estudo do processo DAIUS os resultados de espectroscopia no infravermelho, microscopia eletrônica de varredura, difração de raios X, análise térmica e solubilidade das amostras dos Grupos I, II e III, as quais apresentaram tendências semelhantes de variação, serão apresentados em uma discussão inicial e representativa de todos os Grupos. Para o Grupo III - Estudos Cinéticos todos os resultados serão apresentados, pois neste caso o esclarecimento da cinética do processo DAIUS envolve, em sua maioria, todas as características apresentadas pelas amostras.

7.1 BETA-QUITINA

7.1.1 Obtenção, Fracionamento e Caracterização

A razão beta-quitina:proteínas nos gládios de *Loligo sanpaulensis* foi de 35%:65%, bem próxima da relatada na literatura^{27, 138}, que é de aproximadamente uma parte de beta-quitina para duas partes de proteínas. Diferentemente de outras fontes de quitina, como por exemplo os exoesqueletos de camarões (ricos em alfa-quitina), os gládios de lulas não apresentam quantidades significativas de pigmentos e de sais mineiras.

7.1.2 Separação por Tamanho de Partícula

Após trituração a beta-quitina foi classificada por tamanho médio de partícula (Tabela 11), sendo observado que a fração mais abundante (57,90%) é composta por partículas com tamanho médio no intervalo 0,250mm-0,125mm. As perdas de massa durante a trituração e o fracionamento foram de $\approx 1,0\%$, relacionadas com a manipulação e a transferência das amostras.

7.1.3 Grau Médio de Desacetilação ($\overline{GD}$) e Massa Molar Média Viscosimétrica ($\overline{M}_v$)

Os dados obtidos através da viscosimetria capilar ($[\eta]$ e $\overline{M}_v$) e ressonância magnética de hidrogênio ($\overline{GD}$) para as frações de beta-quitina estão inseridos na Tabela 11.

Tabela 11 - Dados de intervalo de partícula, porcentagem de beta-quitina, viscosidade intrínseca, massa molar média viscosimétrica e grau médio de desacetilação para as frações de beta-quitina de diferentes tamanhos de partículas

Amostra	Intervalo de tamanho de partícula (mm)	% de Massa	$[\eta]$ mL/mg	M_v (g/mol) $\times 10^6$	GD (%) $^1\text{H-RMN}$
Beta-01	0,425-0,250	28,30	4,858	1,74 $\pm$ 0,05	15,0 $\pm$ 0,4
Beta-02	0,250-0,125	57,90	4,827	1,73 $\pm$ 0,04	31,0 $\pm$ 0,3
Beta-03	0,125-0,075	9,40	4,153	1,39 $\pm$ 0,02	31,5 $\pm$ 0,4
Beta-04	<0,075	4,50	2,745	0,76 $\pm$ 0,03	40,1 $\pm$ 0,2

Analisando a variação das massas molares médias viscosimétricas para a beta-quitina (Figura 22) em função do tamanho de partícula, foi observado que quanto maior o tamanho da partícula maior a $\overline{M}_v$, fato associado ao processo de trituração da beta-quitina, pois para a obtenção de partículas menores, necessariamente estas permaneceram por um tempo maior no interior do moinho de facas, causando desta maneira maior degradação nas cadeias poliméricas. Fica compreendido que a degradação do polímero pode ter ocorrido termicamente, devido à energia gerada por atrito, ou mecanicamente em decorrência de forças de cisalhamento. Comparando a variação da $\overline{M}_v$ do maior para o menor tamanho de partícula, foi constatado nas partículas maiores (Beta01 e Beta02) a diminuição da $\overline{M}_v$ não ocorreu, mas no caso das partículas menores (Beta03 e Beta04) a diminuição de $\overline{M}_v$ foi acentuada (Figura 22).

Figura 22 - Variação da massa molar média viscosimétrica (■) e do grau médio de desacetilação (●) em relação à variação dos intervalos de tamanho de partículas apresentados pela beta-quitina.

Os valores de grau médio de desacetilação (Tabela 11) mostram que além da degradação também ocorre desacetilação de beta-quitina. Analisando a variação do $\overline{GD}$ (Figura 22) em função do tamanho médio de partículas, foi constatada tendência semelhante à observada na variação da $\overline{M}_v$, pois concomitantemente com a diminuição do tamanho de partículas ocorreu o aumento do $\overline{GD}$, evidenciando a ocorrência de desacetilação. Relacionando a variação de $\overline{GD}$ com a da $\overline{M}_v$, foi observada a existência de três situações distintas: i- aumento do $\overline{GD}$ com $\overline{M}_v$ constante (Beta01→Beta02), ii- diminuição da $\overline{M}_v$ com $\overline{GD}$ constante (Beta02→Beta03) e iii- aumento do $\overline{GD}$ e diminuição da $\overline{M}_v$ (Beta03→Beta04). A variação do $\overline{GD}$ e da $\overline{M}_v$ não apresenta um relação trivial em cada caso.

7.1.4 Espectroscopia no Infravermelho

Comparando os espectros no infravermelho das frações de beta-quitina, foi verificado que a beta-quitina (Figura 23) apresenta as mesmas bandas características da alfa-quitina (Tabela 12), com alguns deslocamentos como descrito na literatura¹³⁸.

Figura 23 - Espectro de infravermelho das frações de beta-quitina, entre 4000 e 450 cm⁻¹.

Tabela 12 - Modos de vibração e respectivos números de onda para as diferentes frações de beta-quitina tendo como referência os dados encontrados na literatura para a alfa-quitina¹⁵⁹⁻¹⁶¹

Modos de vibração	Número de onda (cm ⁻¹)				
	Alfa-quitina	Beta 01	Beta 02	Beta 03	Beta 04
Def. angular OH fora do plano	685	689	689	691	691
Def. angular NH fora do plano	730	NV	NV	NV	NV
Def. angular do anel	890	895	897	900	897
Def. angular CH ₃ ao longo da cadeia	975	NV	NV	NV	NV
Def. axial CO	1020	NV	NV	NV	NV
Def. axial CO	1025	1031	1024	1031	1026
Def. axial CO	1065	NV	NV	NV	NV
Def. axial CO	1070	1075	1070	1066	1070
Modo de def. axial em fase do anel	1110	1113	1115	1113	1113
Def. axial OH ligado em ponte	1155	1151	1152	1155	1155
Def. axial CN (amida III)/ def. angular CH ₂	1310	1315	1315	1315	1315
Def. simétrica CH ₃ / def. angular CH / def. angular OH	1378	1398	1399	1398	1395
Def. angular CH ₂ e def. CH ₃	1420	NV	NV	NV	NV
Def. angular CH ₂ e def. CH ₃	1430	NV	NV	NV	NV
Def. angular NH (amida II)	1555	NV	NV	1561	1557
Def. axial CO (amida I)	1619	1631	1638	1638	#
Def. axial CO (amida I)	1652	1660	1660	1660	1660
Def. axial simétrica CH ₂	2840	NV	NV	NV	NV
Def. axial CH	2878	2870	2882	2880	2872
Def. axial CH	2890	NV	NV	NV	NV
Def. axial CH ₃ simétrica / def. axial CH ₂ assimétrica	2929	NV	NV	NV	NV
Def. axial CH ₃	2962	NV	NV	2957	2955
Def. axial NH	3106	3124	3124	3117	#
Def. axial NH	3264	NV	NV	NV	NV
Def. axial OH	3447	3412	3400	3406	#
Def. axial OH	3480	#	#	#	#

NV = Não verificado; * Pequeno ombro; # Bandas sobrepostas

As bandas de deformação axial OH próximas de 3480cm^{-1} e 3440cm^{-1} e as de deformação axial de NH próximas de 3264cm^{-1} e 3106cm^{-1} , não são facilmente verificadas nos espectros das amostras de beta-quitina (Figura 23, Tabela 12) devido à sobreposição e o deslocamento das bandas. Considerando tais limitações, as bandas na região acima de 2000cm^{-1} dos espectros de quitina não são utilizadas em análises quantitativas e qualitativas dos espectros.

As principais bandas consideradas nos espectros no infravermelho de beta-quitina são: deformação axial de amida I ($-\text{C}=\text{O}-\text{NH}_2$) entre 1630cm^{-1} a 1650cm^{-1} , deformação angular de $\text{N}-\text{H}_2$ entre 1590cm^{-1} a 1620cm^{-1} , deformação angular simétrica de $\text{C}-\text{H}_3$ entre 1379cm^{-1} a 1383cm^{-1} , deformação axial amida II ($-\text{C}=\text{O}-\text{NH}_2$) entre 1540cm^{-1} a 1560cm^{-1} , deformação axial de amida III ($-\text{C}=\text{O}-\text{NH}_2$) em aproximadamente 1315cm^{-1} , sendo que todas as deformações citadas estão relacionadas diretamente à presença de grupos acetamido na quitina. A região onde estão inseridas as principais bandas de beta-quitina compreende, portanto, o intervalo entre 1800cm^{-1} e 800cm^{-1} (Figura 24). Os espectros das frações Beta01 (0,425-0,250mm) e Beta02 (0,250-0,125mm) apresentaram melhor definição das bandas de amida I, mas a banda referente a deformação axial de amida II não está presente (Figura 24). Situação oposta é observada nos espectros das frações Beta03 (0,125-0,070mm) e Beta04 ($<0,070\text{mm}$), pois as bandas de amida I aparecem com baixa definição e neste caso a banda de amida II é nitidamente visível em aproximadamente 1560cm^{-1} . Tais constatações sugerem que diferentes tamanhos de partículas de beta-quitina, influenciam a caracterização dos modos vibracionais deste polímero. É a primeira vez que este tipo de influência, tamanho de partícula versus modo de vibração, é constatado na literatura, sugerindo que estudos aprofundados devem ser realizados, visando estabelecer uma relação mais clara entre a influência do diâmetro das partículas de beta-quitina e seus espectros na região do infravermelho.

Figura 24 - Espectro de infravermelho das frações de beta-quitina, entre 1800cm⁻¹ e 800cm⁻¹.

7.1.5 Difração de Raios X

A beta-quitina dos gládios de lulas apresenta dois picos cristalinos em aproximadamente $2\theta \approx 8^\circ$ e $2\theta \approx 20^\circ$, referente aos planos (010) e ((020) (110)) respectivamente. As intensidades dos sinais nos difratogramas de beta-quitina (Figura 25) foram normalizados em relação ao sinal mais intenso, observado no difratograma da fração Beta04.

Figura 25 - Difratomogramas das frações de beta-quitina com diferentes tamanhos de partícula.

Observando a Figura 25 foi constatado que a variação no tamanho das partículas de beta-quitina exerceu influência em suas características estruturais, pois com a diminuição do tamanho de partícula o pico cristalino ($2\theta \approx 20^\circ$) sofreu alargamento, revelando desta maneira a diminuição na cristalinidade das amostras. Também foi observado que com a diminuição do tamanho das partículas ocorreu aumento do ruído nos difratogramas e picos intermediários ($2\theta \approx 13^\circ$ e $2\theta \approx 27^\circ$) ligeiramente mais intensos, indicando que os dados obtidos pela análise de difração de raios X de beta-quitina são influenciados pelo tamanho de partícula utilizado durante a análise.

As variações de índice de cristalinidade e diâmetro aparente dos cristalitos em função do tamanho médio das partículas (TP) mostraram tendência semelhante (Figura 26) de decréscimo com a diminuição de TP, evidenciando que modificações na estrutura cristalina de beta-quitina ocorrem quando a mesma é sujeita à trituração.

Figura 26 - Variação do Índice de cristalinidade (■) e do diâmetro aparente dos cristalitos (●) na direção perpendicular ao plano (110) em função do tamanho de partícula para a beta-quitina.

A mesma tendência foi observada em relação a variação da $\overline{M}_v$ (Figura 22, Tabela 11), sugerindo a correlação entre as características afetadas na trituração de beta-quitina.

Os dados obtidos (Figura 26) de diâmetro aparente dos cristalitos (D_{ap}) das frações de beta-quitina estão condizentes com os valores encontrados na literatura¹³⁸. A variação do D_{ap} apresenta tendência semelhante à variação do I_{cr} , quando correlacionando com o TP.

7.1.6 Microscopia Eletrônica de Varredura

Através das micrografias (Figura 27) pode ser observado que as frações de beta-quitina apresentam tamanho de partículas variado. De fato, independentemente da fração, a morfologia das partículas obtidas apresentam características “fibrosas”, sendo mais longas e com diâmetros menores nas frações menos abundantes (Tabela 11). A morfologia apresentada pelas frações de beta-quitina está condizente com a descrita na literatura^{138, 139} e em parte é explicada pelo arranjo cristalino apresentado por esta polimorfa de quitina.

Figura 27 - Micrografias das frações de beta-quitina (a) 0,425-0,250mm, (b) 0,250-0,125mm, (c) 0,125-0,075mm e (d) <0,075mm.

Através da utilização do programa imageJ foram obtidos os valores de área média por partícula ($\overline{AM}$) por partícula para as frações de beta-quitina. Os resultados obtidos (Tabela 13) foram coerentes com os intervalos expressos na Tabela 11, definidos através do fracionamento por tamanho de partícula da beta-quitina triturada no moinho de facas. Assim a diminuição do diâmetro das peneiras

(Beta01→Beta04) foi acompanhada pela diminuição da área média por partícula. A coerência entre os dados de $\overline{AM}$ calculados pelo programa imageJ e as frações obtidas, demonstra que a utilização deste programa disponibiliza uma ferramenta útil na análise de micrografias.

7.1.7 Degradação Térmica

Os baixos teores obtidos de cinzas para as frações de beta-quitina (Tabela 13) assemelham-se aos apresentados na literatura^{19, 22, 25, 29, 138}.

Os termogramas apresentados pelas frações de beta-quitina (Figura 28a) são semelhantes, mas podem ser divididos em dois grupos. No primeiro grupo (amostras Beta01 e Beta02) os termogramas são praticamente iguais, pois como mostrado na Tabela 13 os valores de perda de massa, de temperatura de máxima degradação e os intervalos de degradação são os mesmos. A degradação térmica das amostras é influenciada, em grande parte, pela cristalinidade, morfologia, massa molar média e tipos de interações e para as amostras Beta01 e Beta02 estas características são muito semelhantes, como já discutido. No segundo grupo (amostras Beta03 e Beta04) os intervalos de temperatura de degradação térmica apresentados foram os mesmos, mas a perda de massa e a temperatura de máxima degradação apresentam pequenas diferenças (Tabela 13), que podem ser atribuídas aos diferentes valores de cristalinidade, massa molar média e tipo de morfologia existente entre essas duas amostras.

a

b

Figura 28 - Curvas termogravimétricas sendo: (a) variação da perda de massa (%) e (b) primeira derivada em relação ao aumento da temperatura (°C), apresentada pelas frações de beta-quitina.

Tabela 13 - Teores de cinzas, valores de área média por partícula, umidade, intervalo da 1ª degradação, perda de massa durante a 1ª degradação e temperatura de máxima degradação para as frações de beta-quitina.

Amostras	Teores de Cinzas (%)	$\overline{AM}$ (mm ²)	Umidade (%)	Perda de Massa (%)	Intervalo de Temperatura (°C)		
					Início	Fim	T _{máx} ^a
Beta-01	0,21±0,02	0,220	9,2	55	263	380	335
Beta-02	0,27±0,06	0,198	7,7	56	263	380	335
Beta-03	0,14±0,01	0,115	10,3	58	262	377	328
Beta-04	0,24±0,03	0,045	9,5	61	262	377	323

^a Temperatura de máxima degradação.

Através da primeira derivada das curvas termogravimétricas, foram obtidas as curvas DTG das amostras (Figura 28b), as quais auxiliaram na elaboração da Tabela 13.

Os dados de umidade apresentados na Tabela 13 revelam que as frações de beta-quitina apresentam valores médios de umidade próximos de 9,2%. A massa de amostra utilizada na análise termogravimétrica é aproximadamente de 7 mg, devido a essa massa tão pequena o erro associado aos valores de umidade são grandes, portanto a análise destes valores deve apresentar caráter mais qualitativo do que quantitativo.

7.1.8 Solubilidade

Os resultados de solubilidade das frações de beta-quitina em HCl 0,55mol/L, ácido fórmico concentrado e água estão inseridos na Tabela 14. Com exceção da amostra Beta04 todas as outras foram insolúveis em HCl 0,55mol/L, o que é atribuído a suas características, principalmente baixa $\overline{M}_v$, $\overline{GD}$ elevado e menor cristalinidade. Todas as amostras de beta-quitina foram solúveis em ácido fórmico (como o esperado), pois a beta-quitina apresenta arranjo cristalino menos compacto, facilitando a sua solubilização em ácidos concentrados. Todas as frações de beta-quitina foram insolúveis em água.

Tabela 14 - Solubilidade das frações de beta-quitina em HCl 0,55mol/L, ácido fórmico concentrado e água.

Amostras	HCl 0,55 mol/L	Ácido Fórmico	H ₂ O
Beta-01	Insolúvel	Solúvel	Insolúvel
Beta-02	Insolúvel	Solúvel	Insolúvel
Beta-03	Insolúvel	Solúvel	Insolúvel
Beta-04	Parcialmente	Solúvel	Insolúvel

7.2 QUITOSANAS

7.2.1 Características Morfológicas Representativas das Amostras dos Grupos I, II e III

7.2.1.1 Espectroscopia no Infravermelho e Difração de Raios X

Os espectros no infravermelho serão explorados na região entre 1700cm^{-1} e 1200cm^{-1} , onde estão localizadas as bandas de interesse tanto para a beta-quitina quanto para as quitosanas. Comparando os espectros na região do infravermelho das quitosanas (CH.01, TT06 e Q-05) com o de beta-quitina (Figura 29), podemos observar a diminuição nas intensidades das bandas em aproximadamente 1650cm^{-1} e 1310cm^{-1} , bandas de amida I e amida III, respectivamente. A diminuição na intensidade destas bandas ocorre devido a menor presença de grupos acetamidos (desacetilação da beta-quitina).

Figura 29 - Espectro no infravermelho na região de 1700cm^{-1} a 1200cm^{-1} das amostras de beta-quitina (0,425-0,250mm), CH.01, TT06 e Q-05.

7.2.1.2 Difração de Raios X

Os difratogramas de beta-quitina (0,425-0,250mm) e das quitosanas (CH.01, TT06 e Q-05) com o das quitosanas do Grupo II também foram divididos em dois, a fim de facilitar a visualização (Figura 58).

As quitosanas obtidas durante os experimentos do processo DAIUS (CH.01, TT06 e Q-13) apresentaram o pico cristalino em $2\theta \approx 20^\circ$, característico de beta-quitina (planos (020) e (110)), porém menos intensos e mais alargados quando comparados com a beta quitina 0,425-0,250mm (Figura 30), revelando que as quitosanas apresentam índice de cristalinidade inferior ao de beta-quitina. O pico em $2\theta \approx 8^\circ$, também característico de beta-quitina (plano (010)), em todas as quitosanas não é visualizado, porém ocorre um novo pico cristalino, de menor intensidade, em $2\theta \approx 9,4^\circ$, o que é atribuído às mudanças na cristalinidade das amostras de quitosanas geradas pelo uso do processo DAIUS na desacetilação de beta-quitina.

Figura 30 - Difratogramas das amostras de beta-quitina (0,425-0,250mm), CH.01, TT06 e Q-13.

7.2.1.3 Termogravimetria

Quando comparamos os termogramas das quitosanas obtidas pelo processo DAIUS (CH.01, TT04 e Q-06) com o da beta-quitina (0,425-0,250mm) observamos que a conversão de quitina em quitosana gera um polímero termicamente menos estável. A menor estabilidade térmica, observada para as quitosanas, advém das mudanças em suas características como: menor cristalinidade, maior presença de grupos GlcN e diminuição da massa molar.

Figura 31 - Variação da perda de massa (%) em relação ao aumento da temperatura (°C), apresentada pelas amostras de beta-quitina (0,425-0,250mm), CH.01, TT04 e Q-06.

7.2.1.4 Solubilidade

A solubilidade das quitosanas foi testada em HCl 0,05 mol/L e em H₂O. Todas as quitosanas obtidas ($\overline{GD} > 50\%$) foram solúveis em meio ácido e insolúveis em água.

7.2.1.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

Observando as micrografias (Figura 32) é possível verificar a diminuição no tamanho das partículas após a sonicação da beta-quitina (a) em comparação com a amostra de quitosana (b). Outro fato importante que ocorre durante a sonicação da beta-quitina é a obtenção de partículas com formas mais homogêneas (Figura 32a).

a

b

Figura 32 - Microscopia da amostra (a) beta-quitina (0,250-0,125mm) e (b) CH4 com ampliação de 100x.

As micrografias apresentadas na Figura 33 revelam mudanças na superfície da beta-quitina (Figura 33a) em comparação com a amostra de quitosana (Figura 33b). Essas mudanças nas superfícies das quitosanas mostram que o ultrassom de alta intensidade está atuando através do fenômeno conhecido como cavitação, gerando superfícies mais rugosas e com maior área superficial, quando comparadas com a beta-quitina.

Figura 33 - Microscopia da amostra (a) beta-quitina (0,250-0,125mm) e (b) CH4 com ampliação de 5000x.

7.3 PROCESSO DAIUS

7.3.1 Grupo I – Efeitos dos Parâmetros do Processo

7.3.1.1 Variação do Grau Médio de Desacetilação, Massa Molar Média Viscosimétrica e Parâmetro de Acetilação

O grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$) e a massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$) são as duas principais características a serem avaliadas nas quitosanas obtidas. Os valores de $\overline{GD}$, $\overline{M}_v$, grau médio de polimerização ($\overline{GP}_v$) e de parâmetro de acetilação (PA) das amostras são apresentados na Tabela 15, mostrando que as quitosanas obtidas apresentaram $60\% \leq \overline{GD} \leq 92\%$ e $1150 \leq \overline{GP}_v \leq 3315$ e que a distribuição de unidades GlcN e GlcNAc é predominantemente randômica (Figura 34), sugerindo que a desacetilação de beta-quitina pelo processo DAIUS ocorre de maneira homogênea. Através da utilização das planilhas disponibilizadas “online” por TEOFILLO & FERREIRA (2006)¹⁴⁰ foi possível determinar a influência das cinco variáveis (Tabela 6) estudadas sobre $\overline{GD}$, $\overline{M}_v$.

Tabela 15 - Valores do grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$), massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$), grau médio de polimerização ($\overline{GP}_v$) e parâmetro de acetilação (PA) para as quitosanas do Grupo I

Amostra	$\overline{GD} \%$	$\overline{M}_v \text{ (g/mol).}10^5$	$\overline{GP}_v$	PA
CH1	62	4,70	2650	0,80
CH2	79	2,70	1590	0,85
CH3	54	4,40	2434	1,18
CH4	92	5,42	3296	1,03
CH5	79	4,50	2647	0,92
CH6	60	2,05	1150	0,95
CH7	73	3,90	2259	1,32
CH8	80	4,80	2281	1,24
CH.01	63	6,00	3315	0,67
CH.02	63	5,80	3278	0,80
CH.03	62	5,60	3157	0,75

Figura 34 - Relação entre o parâmetro de acetilação (PA) e as amostras do Grupo I.

Na Tabela 16 (colunas centrais “Efeitos”) cada contraste principal representa uma das variáveis utilizadas durante o processo DAIUS, C1 = concentração de beta-quitina, C2 = temperatura, C3 = potência do ultrassom, C4 = tempo de sonicação e C5 = diâmetro da beta-quitina.

De acordo com a Tabela 16, os contrastes principais C1, C2, C4 e C5 e os contrastes de interação C23 e C124 são significativos a 95% de confiança “SG” (nível de significância $\alpha = 0,050$). Para a variação do $\overline{GD}$ a única variável que não é significativa é a potência do ultrassom (C3), mas todas as outras influenciam, de forma significativa, a desacetilação de beta-quitina assistida por ultrassom de alta intensidade. A interação entre a temperatura de reação e o diâmetro das partículas de beta-quitina, C25, não favorece o processo DAIUS na obtenção de quitosanas com altos valores de $\overline{GD}$.

Tabela 16 - Planilha para cálculos do planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} para as amostras do Grupo I em relação ao grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$), apresentando a estimativa do erro através de replicatas no ponto central

Planejamento Fatorial Fracionário 2⁵⁻² Resolução III

Experimentos no Ponto Central

Identificação:

Variáveis que influenciam o processo "DAIUS"

Data: 12/06/2012

Ensaios	[]	T	P	TS	D	GD (%)	Efeitos	Erros	t (2)	p	Confundidos
1	-1	-1	-1	1	1	62	SG Média	62,67 ± 0,333	188	3E-05	1 24 35
2	1	-1	-1	-1	-1	79	SG C1	10,75 ± 0,408	26,332	0,001	2 14 345
3	-1	1	-1	-1	1	54	SG C2	4,75 ± 0,408	11,6351	0,007	3 15 245
4	1	1	-1	1	-1	92	C3	1,25 ± 0,408	3,06186	0,092	4 12 235
5	-1	-1	1	1	-1	79	SG C4	11,75 ± 0,408	28,7815	0,001	5 13 234
6	1	-1	1	-1	1	60	SG C5	-16,8 ± 0,408	41,029	6E-04	23 45 125 134
7	-1	1	1	-1	-1	73	SG C23	2,25 ± 0,408	5,51135	0,031	25 34 123 145
8	1	1	1	1	1	80	C25	1,25 ± 0,408	3,06186	0,092	124 135
pc1	0	0	0	0	0	63	SG C124	19,42 ± 0,782	24,8379	0,002	
pc2	0	0	0	0	0	63	Nível de significância α: 0,050 $\frac{\alpha}{n}$				
pc3	0	0	0	0	0	62					
pc4	0	0	0	0	0						
pc5	0	0	0	0	0						
Média - pc						62,67					
Variância - pc						0,333					
Desvio padrão - pc						0,577

De acordo com a Tabela 17, os contrastes principais C2 e C4 e os contrastes de interação C124 são significativos a 95% de confiança "**SG**" (nível de significância $\alpha = 0,050$). Para a variação da $\overline{M}_V$ apenas duas variáveis mostraram ser significativas na obtenção de quitosanas com elevada $\overline{M}_V$, a temperatura de reação e o tempo de sonicação, a interação entre elas, C124, também se mostrou favorável à obtenção de quitosanas menos degradadas. A maior influência observada para estas variáveis é compatível com os dados obtidos em trabalhos anteriores⁸⁶, pois com o aumento da temperatura e/ou tempo de sonicação ocorre uma degradação maior das quitosanas, gerando assim quitosanas com $\overline{M}_V$ menores.

Tabela 17 - Planilha para cálculos do planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} para as amostras do Grupo I em relação a massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$), apresentando a estimativa do erro através de replicatas no ponto central

Planejamento Fatorial Fracionário 2⁵⁻² Resolução III

Experimentos no Ponto Central

Identificação:

Variáveis que influenciam o processo “DAIUS”

Data: 12/06/2012

Ensaio	[]	T	P	TS	D	Mv (g/mol)	Efeitos	Erros	t (2)	p	Confundidos		
1	-1	-1	-1	1	1	469399	SG Média	579338 ± 12713	45,5693	5E-04	1	24	35
2	1	-1	-1	-1	-1	268302	C1	-65350 ± 15571	4,19698	0,052	2	14	345
3	-1	1	-1	-1	1	443685	SG C2	116836 ± 15571	7,50362	0,017	3	15	245
4	1	1	-1	1	-1	541947	C3	-48296 ± 15571	3,10174	0,09	4	12	235
5	-1	-1	1	1	-1	449498	SG C4	157013 ± 15571	10,0839	0,01	5	13	234
6	1	-1	1	-1	1	205870	C5	-13932 ± 15571	0,89476	0,465	23	45	125 134
7	-1	1	1	-1	-1	394858	C23	-7130 ± 15571	0,45788	0,692	25	34	123 145
8	1	1	1	1	1	479923	C25	7333,5 ± 15571	0,47098	0,684	124	135	
pc1	0	0	0	0	0	601822	SG C124	-3E+05 ± 29815	11,5814	0,007			
pc2	0	0	0	0	0	578379	Nível de significância α: 0,050
pc3	0	0	0	0	0	557813							
pc4	0	0	0	0	0								
pc5	0	0	0	0	0								
Média - pc						579338							
Variância - pc						4,85E+08							
Desvio padrão - pc						22020,17

Através dos resultados obtidos (Tabela 16 e Tabela 17) as duas variáveis escolhidas para o estudo da otimização do processo DAIUS (Grupo II) foram a temperatura e o tempo de reação, pois estas variáveis foram significativas a 95% de confiança em ambos os casos: $\overline{GD}$ e $\overline{M}_v$. Além disso tais dados mostram que a obtenção de quitosanas com o auxílio do processo DAIUS é reprodutível para estas características, conforme os dados das amostras obtidas em triplicata no ponto central.

7.3.2 Grupo II - Otimização do Processo

7.3.2.1 Variação do Grau Médio de Desacetilação, Massa Molar Média Viscosimétrica e Parâmetro de Acetilação

As variáveis escolhidas para serem estudadas nos experimentos de otimização foram a temperatura e o tempo de reação. Como já discutido anteriormente, estas variáveis foram as que mais influenciaram as características das quitosanas ($\overline{GD}$ e $\overline{M}_v$) obtidas pelo processo DAIUS. A variações do $\overline{GD}$, $\overline{M}_v$, $\overline{GP}_v$ e PA estão mostrados na Tabela 18, mostrando que as quitosanas obtidas apresentaram $42\% \leq \overline{GD} \leq 68\%$ e $640 \leq \overline{GP}_v \leq 5287$ e que a distribuição de unidades GlcN e GlcNAc é predominantemente randômica (Figura 35). A variação do $\overline{GD}$ para as quitosanas do Grupo II não foi tão elevada quando comparada com a do Grupo I ($60\% \leq \overline{GD} \leq 92\%$), fato que está relacionado ao maior número de variáveis que influenciam o $\overline{GD}$ (Tabela 16). No caso do $\overline{GP}_v$ foi observado maior variação para as quitosanas do Grupo II em relação às do Grupo I ($1150 \leq \overline{GP}_v \leq 3315$), pois no Grupo II foram utilizadas as únicas variáveis que influenciam a variação da $\overline{M}_v$ (Tabela 17), porém é importante destacar que quitosanas com diferentes valores de $\overline{GD}$ e $\overline{GP}_v$ foram obtidas pelo processo DAIUS, utilizando uma faixa estreita de valores de temperatura ($45,9^\circ\text{C} \leq T \leq 74,2^\circ\text{C}$) e de tempo de reação ($25,9\text{min.} \leq t \leq 54,2\text{min.}$).

Tabela 18 - Valores do grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$), massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$), grau médio de polimerização ($\overline{GP}_v$) e parâmetro de acetilação (PA) para as quitosanas do Grupo II

Amostra	$\overline{GD}$ %	$\overline{M}_v$ (g/mol).10 ⁵	$\overline{GP}_v$	PA
TT01	45	6,10	3304	0,89
TT02	68	7,63	4366	0,95
TT03	47	5,60	3047	0,87
TT04	68	3,00	1717	0,96
TT05	42	9,83	5287	0,90
TT06	68	1,12	640	1,15
TT07	55	4,00	2218	1,34
TT08	59	8,03	4495	0,94
TT09	59	4,30	2407	1,23
TT10	58	4,34	2424	0,99

Com o auxílio das tabelas disponibilizadas “online” por TEOFILO & FERREIRA (2006)¹⁴⁰ foi possível realizar o planejamento composto central (modelo quadráticos de duas variáveis) para a variação do $\overline{GD}$ (Tabela 19), $\overline{M_v}$ (Tabela 20) e PA (Tabela 21). Nas tabelas utilizadas para a realização do planejamento fatorial a temperatura de reação está representada pelo código “X₁” e o tempo de sonicação pelo código “X₂”.

Figura 35 - Relação entre o parâmetro de acetilação (PA) e as amostras do Grupo II.

Tabela 19 - Planejamento composto central (modelo quadráticos de duas variáveis) para a variação do $\overline{GD}$ das quitosanas do Grupo II

Planejamento Composto Central - Modelo Quadrático

Duas Variáveis

Identificação: Otimização do processo "DAIUS" (Grau Médio de Desacetilação) Data: 12/06/2012

Planejamento			Respostas	Estimadas
Ensaio	X ₁	X ₂	y	ŷ
1	-1	-1	45,00	44,92513
2	1	-1	68,00	66,1503
3	-1	1	47,00	47,840829
4	1	1	68,00	67,065999
5	-1,41	0	42,00	41,24871
6	1,41	0	68,00	69,7662
7	0	-1,41	55,00	56,166887
8	0	1,41	59,00	58,858023
9	0	0	59,00	58,493961
10	0	0	58,00	58,493961
11				
12				
13				

	Coeficientes	Erro	t (1)	p
SG	b ₀ 58,49 ± 0,5	0,5	116,99	0,00544
SG	b ₁ 10,11 ± 0,2504	0,2504	40,39	0,01576
	b ₂ 0,958 ± 0,2504	0,2504	3,8257	0,16276
	b ₁₁ -1,502 ± 0,332	0,332	4,5249	0,13847
	b ₂₂ -0,496 ± 0,332	0,332	1,4947	0,37538
	b ₁₂ -0,5 ± 0,3536	0,3536	1,4142	0,39183
Nível de significância: α		0,05	$\frac{\alpha}{n}$	

Parâmetros para a ANOVA		
n° de parâmetros (p)	6	
n° total de observações (n)	10	
n° de níveis (m)	9	
nível de significância (α)	0,05	$\frac{\alpha}{n}$

Análise de Variância - Modelo Quadrático

FV	SQ	nGL	MQ	Fcalc.	p
Regressão	834,351	5	166,87	63,27515 SG	0,0006735
Resíduos	10,5489	4	2,6372		
F. Ajuste	10,0489	3	3,3496	6,699242	0,2749938
Erro Puro	0,5	1	0,5		
Total	844,9	9			

% variação explicada 98,75147

% máx. de variação explicável 99,94082

Como resultado principal, utilizando o planejamento composto central, obtivemos a equação $f(\overline{GD})$ para a variação do $\overline{GD}$, e através desta equação foi possível obter o gráfico de superfície de resposta (Figura 36) para a variação do $\overline{GD}$ em relação à variação da temperatura e do tempo de sonicação.

$$f(\overline{GD}) = (58,50) + (10,11) \cdot (x) + (0,96) \cdot (y) + (-1,50) \cdot (x^2) + (-0,50) \cdot (y^2) + (-0,50) \cdot ((x) \cdot (y))$$

Todos os gráficos de superfície de resposta (Figura 36, Figura 37 e Figura 38) foram elaborados a partir da extrapolação dos valores dos níveis de temperatura e tempo de sonicação entre -2 e +2, esta extrapolação foi realizada afim de melhor visualizar a variação do $\overline{GD}$, $\overline{Mv}$ e PA.

Figura 36 - Gráfico de superfície de resposta para a variação do $\overline{GD}$, das quitosanas do Grupo II, em relação à variação da temperatura e do tempo de sonicação.

Analisando a Figura 36 podemos concluir que quando mantemos fixo o nível de temperatura e variamos o tempo de sonicação o $\overline{GD}$ aumenta com o aumento do tempo de sonicação. Quando fixamos o tempo de sonicação e variamos a temperatura observamos que o $\overline{GD}$ se mantém praticamente constante. A região no gráfico compreendida entre os níveis 1 e 2 para o tempo de sonicação e 0 e 2 para temperatura de reação (vermelho escuro) correspondente às condições experimentais cuja aplicação resulta em quitosanas mais desacetiladas.

A análise da variação da $\overline{M_v}$ (Tabela 20) com o auxílio do planejamento composto central (modelo quadráticos de duas variáveis) forneceu a equação $f(\overline{M_v})$.

$$f(\overline{M_v}) = (432101) + (-167386) \cdot (x) + (6924) \cdot (y) + (53743) \cdot (x^2) + (80905) \cdot (y^2) + (-103250) \cdot ((x) \cdot (y))$$

Tabela 20 - Planejamento composto central (modelo quadráticos de duas variáveis) para a variação do $\overline{M}_v$ das quitosanas do Grupo II

Planejamento Composto Central - Modelo Quadrático

Duas Variáveis

Identificação: Otimização do processo "DAIUS" (Massa Molar Média Viscosimétrica)

Data: 12/06/2012

Planejamento			Respostas	Estimadas
Ensaio	X ₁	X ₂	y	ŷ
1	-1	-1	610000,00	623962,52
2	1	-1	763000,00	495689,06
3	-1	1	560000,00	844311,22
4	1	1	300000,00	303037,76
5	-1,41	0	983000,00	774964,26
6	1,41	0	112000,00	302933,7
7	0	-1,41	400000,00	583185,65
8	0	1,41	803000,00	602712,32
9	0	0	430000,00	432101,76
10	0	0	434000,00	432101,76
11				
12				
13				

	Coeficientes			Erro	t (1)	p
SG	b ₀	432101,757	± 2000	216,05	0,00295	
SG	b ₁	-167386,73	± 1001,5	167,14	0,00381	
	b ₂	6924,34994	± 1001,5	6,914	0,09144	
SG	b ₁₁	53743,3855	± 1327,9	40,471	0,01573	
SG	b ₂₂	80904,9971	± 1327,9	60,925	0,01045	
SG	b ₁₂	-103250	± 1414,2	73,009	0,00872	
Nível de significância: α					0,05	

Parâmetros para a ANOVA		
n° de parâmetros (p)		6
n° total de observações (n)		10
n° de níveis (m)		9
nível de significância (α)		0,05

Análise de Variância - Modelo Quadrático

FV	SQ	nGL	MQ	Fcalc.	p
Regressão	3E+11	5	6E+10	0,779995811	0,6120128
Resíduos	3,1E+11	4	8E+10		
F. Ajuste	3,1E+11	3	1E+11	12745,78695	SG 0,0065112
Erro Puro	8000000	1	8E+06		
Total	6E+11	9			

% variação explicada 49,36695438

% máx. de variação explicável 99,99867586

A partir da função $f(\overline{M}_v)$ foi possível a elaboração do gráfico de superfície de resposta para a variação da $\overline{M}_v$ em relação à variação da temperatura e do tempo de sonicação (Figura 37).

Figura 37 - Gráfico de superfície de resposta para a variação da $\overline{M}_v$, das quitosanas do Grupo II, em relação à variação da temperatura e do tempo de sonicação.

A variação da $\overline{M}_v$ (Figura 37) ocorre de forma oposta àquela apresentada pela variação do $\overline{GD}$ (Figura 36), pois quando mantemos fixa a temperatura e variamos o tempo de sonicação, observamos que para níveis mais altos de tempo de sonicação quitosanas com menores $\overline{M}_v$ são obtidas. O gráfico de superfície de resposta da variação da $\overline{M}_v$ (Figura 37) revela também a presença de uma região de mínimo para a $\overline{M}_v$, das quitosanas, entre os níveis -1 e +1 para a temperatura e +1 e +2 para o tempo de sonicação. As quitosanas com as maiores $\overline{M}_v$ são obtidas quando os menores níveis de tempo de sonicação são utilizados (-2 a 0) e os níveis extremos de temperatura são empregados (-2 a -1 e +1 a +2). Quando variamos a temperatura e o tempo de sonicação na desacetilação de beta-quitina assistida por ultrassom de alta intensidade diferentes tendências são observadas para a variação do $\overline{GD}$ e da $\overline{M}_v$, pois quanto maior o tempo de sonicação maior a degradação e, portanto, menor a $\overline{M}_v$ da quitosana, mas quanto maior o tempo de sonicação quitosanas mais desacetiladas são obtidas.

Outra característica importante avaliada para as quitosanas obtidas foi o parâmetro de acetilação (PA), o qual nos informa como estão distribuídos, ao longo da cadeia polimérica, as unidades GlcNAc (A) ou GlcN (D), fornecendo desta

maneira indicações de como a desacetilação de beta-quitina através do processo DAIUS ocorre. A análise dos dados do PA também foi feita com o auxílio das tabelas de planejamento composto central (Tabela 21).

Tabela 21 - Planejamento composto central (modelo quadráticos de duas variáveis) para a variação do PA das quitosanas do Grupo II

Planejamento Composto Central - Modelo Quadrático

Duas Variáveis

Identificação: Otimização do processo "DAIUS" (Parâmetro de Acetilação) Data: 12/06/2012

Planejamento			Respostas	Estimadas
Ensaio	X ₁	X ₂	y	ŷ
1	-1	-1	0,89	1,0161791
2	1	-1	0,95	1,1255934
3	-1	1	0,87	0,856446
4	1	1	0,96	0,9996788
5	-1,41	0	0,90	0,85119
6	1,41	0	1,15	1,0293062
7	0	-1,41	1,34	1,1606861
8	0	1,41	0,94	0,9593043
9	0	0	1,23	1,1082686
10	0	0	0,99	1,1082686
11				
12				
13				

Coeficientes	Erro	t (1)	p
b ₀ 1,108 ± 0,1184	9,3571	0,06778	
b ₁ 0,063 ± 0,0593	1,0649	0,47998	
b ₂ -0,071 ± 0,0593	1,204	0,44123	
b ₁₁ -0,085 ± 0,0786	1,0746	0,4771	
b ₂₂ -0,024 ± 0,0786	0,3088	0,80935	
b ₁₂ 0,008 ± 0,0838	0,1009	0,93595	

Nível de significância: α 0,05

Parâmetros para a ANOVA

n° de parâmetros (p)	6
n° total de observações (n)	10
n° de níveis (m)	9
nível de significância (α)	0,05

Análise de Variância - Modelo Quadrático					
FV	SQ	nGL	MQ	Fcalc.	p
Regressão	0,10595	5	0,0212	0,673033	0,6672977
Resíduos	0,12593	4	0,0315		
F. Ajuste	0,09788	3	0,0326	1,162819	0,5778539
Erro Puro	0,02806	1	0,0281		
Total	0,23188	9			
% variação explicada				45,69027	
% máx. de variação explicável				87,90013	

Através da equação f(PA) foi possível a elaboração do gráfico de superfície de reposta para a variação do PA das quitosanas obtidas nesta etapa (Figura 38).

$$f(\text{PA}) = (1,108) + (0,063) \cdot (x) + (-0,071) \cdot (y) + (-0,085) \cdot (x^2) + (-0,024) \cdot (y^2) + (0,008) \cdot ((x) \cdot (y))$$

Figura 38 - Gráfico de superfície de resposta para a variação do PA, das quitosanas do Grupo II, em relação à variação da temperatura e do tempo de sonicação.

O gráfico de superfície de resposta da variação do PA apresenta um máximo entre os níveis -2 a 0 para o tempo de sonicação e -1 a +1 para a temperatura, indicando que as quitosanas obtidas nesta região apresentam uma tendência de distribuição das unidades GlcNAc (A) ou GlcN (D), na forma de padrão randômico ideal. À medida que aumentamos o tempo de sonicação (níveis de 0 a +2) e a temperatura para os níveis das extremidades (0 a 2 e 0 a -2), observamos uma diminuição no PA, indicando quitosanas que apresentam uma tendência de distribuição das unidades GlcNAc (A) ou GlcN (D) predominantemente em bloco. O círculo compreendido entre as cores amarelo escuro e vermelho claro na Figura 38 representa os parâmetros ideais para a obtenção de quitosanas, através do processo DAIUS, com valores de PA bem próximos de 1,0, onde a distribuição das unidades GlcNAc (A) ou GlcN (D) se aproxima do padrão randômico ideal. A Figura 35 ilustra melhor a variação dos valores de PA apresentados pelas quitosanas do Grupo II. A maioria das amostras apresentou uma tendência de valor de PA próximo de 1,0 (padrão randômico ideal).

7.3.3 Grupo III - Cinética do Processo

7.3.3.1 Grupo III - Testes Exploratórios (TE)

7.3.3.1.1 Variação do Grau Médio de Desacetilação

Os resultados de $\overline{GD}$ para as quitinas parcialmente desacetiladas obtidas a partir da reação de desacetilação de beta-quitina assistida por ultrassom de alta intensidade estão inseridos na Tabela 22.

Tabela 22 - Valores do grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$) para as amostras do Grupo III - Testes Exploratórios

Amostra	Tempo de Sonicação (min.)	$\overline{GD}$ (%) RMN de ^1H
Beta-Quitina	0,0	11
Q-1e	5,0	15
Q-2e	10,0	18
Q-3e	15,0	21
Q-4e	20,0	37
Q-5e	25,0	39
Q-6e	30,0	41
Q-7e	40,0	43
Q-8e	50,0	47
Q-9e	60,0	55

Através dos dados de $\overline{GD}$ (Tabela 22) foi possível elaborar a curva de cinética da reação de desacetilação via processo DAIUS (Figura 39). Analisando a figura podemos observar que a desacetilação apresenta duas etapas, sendo que a primeira, que ocorre nos primeiros 20 minutos é a etapa mais rápida do processo e a segunda etapa é observada no intervalo entre 20 e 60 minutos da reação. Com o objetivo de tentar elucidar as duas etapas mencionadas, novos experimentos foram realizados, de maneira a permitir avaliar o avanço da reação de desacetilação na fase inicial ($t \leq 20 \text{ min.}$), na fase de transição ($20 \text{ min.} \leq t \leq 30 \text{ min.}$) e para tempos longos de reação ($t \geq 60 \text{ min.}$). Analisando a Figura 39 podemos concluir que durante a reação de desacetilação do processo DAIUS ocorre a atuação de duas etapas de reação, o primeiro que ocorre nas etapa iniciais da reação sendo o mais rápido e o segundo que ocorre, neste caso, após os 20 minutos de reação. Quando analisamos

a cinética da reação entre os tempos de 15 e 20 minutos (Figura 39) os dados de $\overline{GD}$ sugerem a presença de uma fase crítica, a qual separa as duas etapas.

Figura 39 - Curva cinética da desacetilação de beta-quitina assistida por ultrassom de alta intensidade para as amostras do Grupo III - Testes Exploratórios.

7.3.3.2 Grupo III - Estudos Cinéticos (EC)

A partir da análise dos testes exploratórios de cinética da reação de desacetilação via processo DAIUS, foi elaborada uma nova abordagem na tentativa

de elucidar a cinética desta reação. Com a finalidade de otimizar o processo de obtenção de amostras, foram reduzidos o volume de solução de NaOH 40% (de 100mL para 50mL) e a massa de beta-quitina (de 3,3g para 2,2g). Os intervalos de tempos de sonicação também foram diminuídos durante a fase inicial da reação ($t \leq 30$ min.).

7.3.3.2.1 Variação do Grau Médio de Desacetilação e da Massa Molar Média Viscosimétrica.

Os valores do $\overline{GD}$, da $\overline{M}_v$ e do PA para as amostras do Grupo III (EC) e seus respectivos tempos de reação estão inseridos na Tabela 23.

Tabela 23 - Valores do grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$), da massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$), do grau médio de polimerização ($\overline{GP}_v$) e do parâmetro de acetilação (PA) das amostras obtidas a partir da reação de desacetilação de beta-quitina via processo DAIUS para os estudos cinéticos

Amostra	Tempo de Sonicação (min.)	$\overline{GD}$ (%)		$\overline{M}_v$ ($\times 10^5$ g/mol)	$\overline{GP}_v$	PA (u.a.)
		Condutivimetria	RMN de ^1H			
Beta	0,0	9,0 $\pm$ 0,5	4,0 $\pm$ 0,3	17,4 $\pm$ 0,05	8602	ND

Q-01	1,5	13,2±0,3	10,0±0,2	ND	ND	ND
Q-02	3,0	14,0±2,0	13,8±0,2	ND	ND	ND
Q-03	5,0	16,3±1,8	20,0±0,1	ND	ND	ND
Q-04	7,5	19,5±2,1	27,0±0,3	ND	ND	ND
Q-05	10,0	27,9±1,8	32,0±0,2	ND	ND	ND
Q-06	12,5	35,1±0,6	35,1±0,2	ND	ND	ND
Q-07	15,0	36,8±0,2	39,2±0,3	ND	ND	ND
Q-08	17,5	39,3±1,5	43,2±0,2	ND	ND	ND
Q-09	20,0	47,3±0,1	45,0±0,1	ND	ND	ND
Q-10	25,0	50,5±1,4	50,1±0,3	ND	ND	ND
Q-11	30,0	51,0±1,1	55,3±0,2	ND	ND	1,17
Q-12	40,0	54,9±0,5	58,6±0,5	ND	ND	1,19
Q-13	50,0	61,4±0,2	62,2±0,6	ND	ND	1,31
Q-14	60,0	62,3±0,4	64,5±0,3	6,1±0,03 ^a	3460	1,30
Q-15	90,0	68,5±0,7	73,1±0,5	7,2±0,03	4172	1,31
Q-16	120,0	77,5±2,6	80,4±0,4	7,0±0,02	4131	1,28
Q-17	180,0	80,5±0,5	85,0±0,6	6,1±0,04	3642	1,23

^a Beta-quitina parcialmente desacetilada ainda estava presente na amostra Q-14, pois durante a filtragem para a análise viscosimétrica uma pequena quantidade de amostra ficou retida no filtro na forma de gel. ND = não determinado.

Para a análise da cinética de desacetilação de beta-quitina via processo DAIUS, os $\overline{GD}$ utilizados foram os por espectroscopia de RMN de ^1H , porém os resultados de $\overline{GD}$ obtidos através da titulação condutimétrica foram, para todas as amostras, bem próximos dos valores obtidos pela RMN de ^1H .

Analizando os dados do $\overline{GD}$ das amostras do Grupo III (EC) em função do tempo de sonicação (Figura 40) é possível observar, que durante a desacetilação da beta-quitina via processo DAIUS, ocorrem duas etapas durante a reação. A hidrólise dos grupos acetamido durante a primeira etapa, a qual ocorre até aproximadamente 20 minutos de reação, é a etapa mais rápida da reação, apresentando uma constante de velocidade (k) de $29,4 (\text{min}^{-1}) 10^3$, o valor de k foi calculado fazendo o uso da Equação 1. A segunda etapa, a qual ocorre a partir dos 20 minutos de reação, apresenta uma constante de velocidade menor ($k = 7,6 (\text{min}^{-1}) 10^3$) quando comparado com a primeira etapa, porém mesmo para longos tempos de reação (180 minutos) a reação não atinge um patamar para os valores de $\overline{GD}$. Entretanto trabalhos descritos na literatura^{36, 90} mostram que valores de $\overline{GD}$ constantes são atingidos após 1 hora de reação, e quando existe a necessidade de obter uma quitosana mais desacetilada (maior $\overline{GD}$) é preciso interromper a reação e iniciar

uma nova etapa de desacetilação³⁷. Desta maneira, o processo gera mais custos e se torna mais demorado, além de favorecer a diminuição da massa molar da quitosana.

Figura 40 - Curva cinética da desacetilação de beta-quitina assistida por ultrassom de alta intensidade, grau médio de desacetilação (RMN de ^1H) *versus* tempo de sonicação, para as amostras do Grupo III - Estudos Cinéticos.

Quando comparamos o valor da constante de reação do processo DAIUS com outros processos descritos na literatura (Tabela 24), que não utilizam o ultrassom de alta intensidade na desacetilação da beta-quitina, podemos perceber que para processos executados à mesma temperatura, os valores da constante de velocidade são inferiores ao apresentado pelo processo DAIUS. Assim comparando a constante k descrita por METHACANON, P. et al. (2003)¹⁶² o aumento é de 4,5 vezes e no caso de LAMARQUE, G. et al. (2007)⁹⁰ é de 2,9 vezes. No caso de reações que utilizam temperaturas elevadas a constante de velocidade é maior em comparação com o processo DAIUS (Tabela 24), porém o primeiro processo é executado a 90°C enquanto o processo DAIUS é executado a 60°C.

Tabela 24 - Comparação entre os valores de constante de velocidade do processo DAIUS e outros processos propostos na literatura

Processo	Temperatura (°C)	Concentração de NaOH (%)	Quitina:NaOH	Constante de
----------	------------------	--------------------------	--------------	--------------

				velocidade (min ⁻¹) 10 ³
PROCESSO DAIUS	60	40	1:22	29,4
METHACANON, P. et al. (2003) ¹⁶²	60	40	1:10	6,6
LAMARQUE, G. et al. (2007) ⁹⁰	60	50	1:22	10,0
LAMARQUE, G. et al. (2004) ³⁶	90	50	1:22	37,6

A análise da variação da $\overline{M}_v$ ficou limitada às três últimas amostras do estudo cinética (Q-15, Q-16 e Q-17), devido à solubilização incompleta das outras amostras, tanto em N,N-dimetilacetamida/LiCl 5% no caso das amostras com $\overline{GD} \leq 50\%$ (Q-01 até Q-09), quanto em tampão ácido acético 0,3M/acetato de sódio 0,2M, para as amostras com $\overline{GD} \geq 50\%$ (Q-10 até Q-14). As únicas amostras completamente solúveis em tampão ácido acético 0,3M/acetato de sódio 0,2M foram as amostras Q-15, Q-16 e Q-17. Assim, as soluções das amostras Q-10, Q-11, Q-12, Q-13 e Q-14, quando submetidas a filtração um gel ficava retido no filtro, revelando a existência de beta-quitina parcialmente desacetilada, provavelmente com $\overline{GD} \leq 50\%$ e elevada massa molar.

A análise dos dados da Figura 41 sugere a existência de beta-quitina parcialmente desacetilada na amostra Q-14, pois com o aumento do tempo de sonicação a massa molar aumenta (Q-15). Este fato ocorre devido à existência de beta-quitina parcialmente desacetilada (provavelmente, $\overline{GD} < 50\%$) e de elevada massa molar, pois com o aumento do tempo de sonicação ocorre a desacetilação desta quitina parcialmente desacetilada presente na amostra Q-14, tornando a amostra Q-15 completamente solúvel em meio ácido. Considerando que para chamarmos o produto da reação de desacetilação da quitina de quitosana, um dos critérios utilizados é a sua solubilidade em meio aquoso ligeiramente ácido, podemos concluir que entre os tempos de 60 e 180 minutos (nas condições utilizadas) temos a conversão completa da beta-quitina em quitosana. Diferentemente dos processos convencionais, no quais o aumento do tempo de reação diminui drasticamente a massa molar média das quitosanas, a ação do

ultrassom de alta intensidade na reação de desacetilação de beta-quitina é caracterizada pela diminuição menos acentuada de massa molar média em função do tempo (Figura 41) como descrito por DELEZUK et al. (2011)⁸⁶.

Figura 41 - Variação da massa molar média viscosimétrica em função do tempo de sonicação, para as amostras Q-14, Q-15, Q-16 e Q-17.

A análise do parâmetro de acetilação só foi realizada para as amostras de quitosanas solubilizadas em D₂O/HCl 1% ($\overline{GD} > 50\%$). As amostras de beta-quitina parcialmente desacetiladas ($\overline{GD} < 50\%$) que foram solubilizadas em DCl/D₂O 20% a 70°C sofreram degradação da cadeia polimérica, assim quando o PA era calculado para tais amostras os valores sempre estavam próximos de 1 (padrão randômico ideal), fato atribuído a hidrólise das cadeias poliméricas que ocorre de maneira aleatória.

Quando analisamos a variação do PA para as amostras com $\overline{GD} > 50\%$ (Figura 42), observamos que os valores de PA, que estão próximo do padrão randômico ideal, permanecem praticamente constantes com o aumento do tempo de sonicação.

Figura 42 - Relação entre o parâmetro de acetilação (PA) e as amostras do Grupo III - Estudos Cinéticos.

7.3.3.2.2 Espectroscopia no Infravermelho e Difração de Raios X

Os espectros de infravermelho das amostras do Grupo III (TC) foram divididos em três, a fim de serem melhor visualizados (Figura 43), tais espectros revelaram a diminuição gradativa nas bandas de absorção de amida I (1650cm^{-1}) e amida III (1310cm^{-1}), como observado nos testes exploratórios, tal resultado é coerente com o aumento gradativo do GD.

Figura 43 - Espectro no infravermelho ampliado na região de 1800 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} das amostras do Grupo III - Estudos Cinéticos.

Os difratogramas das amostras do Grupo III (EC) estão representados na Figura 44. A fim de melhor visualizar os difratogramas, os resultados foram divididos em três figuras, porém em cada figura foi mantido constante o difratograma da beta-quitina (linha preta). No caso das amostras Q-12, Q-14 e Q-16 foi realizada a supressão dos picos de NaCl (resíduo formado durante a neutralização da reação com HCl concentrado com o NaOH 40%) em $2\theta \approx 32^\circ$ (face (200)) e $2\theta \approx 45,5^\circ$ (face (220)), para que não houvesse interpretações errôneas nos difratogramas de tais amostras. Analisando a Figura 44 observamos o surgimento de novos picos cristalinos em $2\theta \approx 9,4^\circ$, $2\theta \approx 12,8^\circ$, $2\theta \approx 26^\circ$, $2\theta \approx 32^\circ$, $2\theta \approx 35^\circ$ e $2\theta \approx 39^\circ$, o surgimento de novos picos cristalográficos, em comparação com a beta-quitina (que possui picos característicos em 2θ igual $7,8^\circ$ e $19,2^\circ$), revela que durante a reação de desacetilação assistida por ultrassom de alta intensidade ocorrem alterações nos arranjos cristalinos dos produtos obtidos, mas à medida que a reação evolui ($t \geq 30$ min., aproximadamente) os novos picos começam a desaparecer. Dentre os novos picos, os que aparecem com mais destaque são aqueles em $2\theta \approx 9,4^\circ$, $2\theta \approx 12,8^\circ$ e $2\theta \approx 26^\circ$, pois desde os primeiros minutos de reação ($t = 3$ min.) já estão presentes, porém estes não são observados nos espectros das amostras Q-10 e Q-11, que correspondem a tempos de reação na fase de transição das duas etapas de reação (Figura 40). Desta maneira fica evidente que as características cristalinas das amostras são influenciadas pelo tipo de mecanismo que governa o processo DAIUS.

O destaque principal para os novos picos cristalinos, que apareceram no difratogramas das amostras, é para os picos que surgiram na região de menor ângulo sendo eles em $2\theta \approx 9,4^\circ$ e $2\theta \approx 12,8^\circ$ visualizados sobre as linhas pontilhadas B e C na Figura 45, respectivamente. Estes picos estão relacionados com a hidratação do retículo cristalino da beta-quitina. A beta-quitina, na maioria dos casos, é encontrada na forma di-hidratada e apresenta o pico bem definido em $2\theta \approx 7,8^\circ$ representado pela linha pontilhada A na Figura 45, enquanto as formas mono-hidratada e anidra apresentam o pico cristalino em $2\theta \approx 8^\circ$ e $2\theta \approx 9,8^\circ$, respectivamente³⁹. Analisando os difratogramas da Figura 46 observamos que ocorre a transição da beta-quitina di-hidratada para a forma mono-hidratada e/ou anidra já nos primeiros minutos de reação (amostra Q-01), pois ocorre o deslocamento do pico em A ($2\theta \approx 7,8^\circ$) para o pico em B ($2\theta \approx 9,4^\circ$), evidenciando a

perda de água de hidratação. O surgimento do pico em C ($2\theta \approx 12,8^\circ$) evidência da mesma maneira a perda de água de hidratação que ocorre durante a reação de desacetilação via processo DAIUS. De fato, o deslocamento do pico de A para B e o surgimento do pico em C, são diretamente relacionado com o valor de d da lei de Bragg (Equação 16).

$$2d \sin \theta = n\lambda \text{ (Equação 16)}$$

Onde n é um número inteiro, λ é o comprimento de onda da radiação incidente, d é a distância entre planos atômicos e θ é o ângulo de incidência em relação ao plano considerado. Assim quando moléculas de água do retículo cristalino são retiradas a distância d diminui, sendo que d no caso da beta-quitina é a distância entre as folhas no retículo cristalino. A desidratação da beta-quitina leva ao surgimento de diferentes planos cristalinos, pois para a forma mono-hidratada temos os planos (002) e (010) em $2\theta \approx 8,5^\circ$ (que está sobreposto) e o plano (011) em $2\theta \approx 9,8^\circ$, na situação da amostra anidra temos o plano (001) em $2\theta \approx 9,8^\circ$ e o plano (011) em $2\theta \approx 12,8^\circ$. A desidratação das amostras do Grupo III – Estudos Cinéticos, leva a conclusão que durante a reação de desacetilação assistida por ultrassom de alta intensidade o fenômeno da cavitação está atuando dentro do retículo cristalino expulsando as moléculas de água e desta maneira favorecendo a entrada de íons OH^- hidratados dentro dos retículos, assim facilitando a desacetilação da quitina.

A velocidade da reação de desacetilação via processo DAIUS começa a diminuir a partir do momento que a intensidade do pico da forma mono-hidratada também diminui ou quase não se está mais presente nos difratogramas (amostra Q-10). Este fato coloca em evidência a importância da hidratação da beta-quitina durante a reação de desacetilação assistida por ultrassom de alta intensidade. De fato, quando comparamos a constante de velocidade de reação da segunda etapa ($7,6 \text{ (min}^{-1}) \cdot 10^3$) com as constantes de velocidades dos processos convencionais, executados na mesma temperatura, observamos que ambas estão bem próximas. Portanto o favorecimento da reação de desacetilação de beta-quitina via processo DAIUS ocorre devido a atuação das ondas ultrassônicas no interior dos retículos cristalinos.

Figura 44 - Difratoqramas da beta-quitina e das amostras do Grupo III - Estudos Cinéticos.

Figura 45 - Difrátogramas da beta-quitina e das amostras do Grupo III - Estudos Cinéticos, ampliado na região entre $2\theta=3^\circ$ e $2\theta=20^\circ$.

A Equação 14 e a Equação 15 foram utilizadas na determinação do índice de cristalinidade (I_{cr}) e no diâmetro aparente dos cristalitos (D_{ap}), respectivamente. Os resultados de I_{cr} e D_{ap} para as amostras do Grupo III (Estudos Cinéticos) estão inseridos na Tabela 25.

Tabela 25 - Dados de I_{cr} e D_{ap} para as amostras do Grupo III - Estudos Cinéticos

Amostra	Tempo de Sonicação (min.)	Índice de Cristalinidade (I_{cr})%	Diâmetro Aparente dos Cristalitos (D_{ap})Å
Beta	0,0	82	23,8
Q-01	1,5	79	24,2
Q-02	3,0	78	27,9
Q-03	5,0	78	36,2
Q-04	7,5	75	37,7
Q-05	10,0	76	38,0
Q-06	12,5	74	38,9
Q-07	15,0	71	36,3
Q-08	17,5	70	30,5
Q-09	20,0	64	21,1
Q-10	25,0	72	23,4
Q-11	30,0	75	27,4
Q-12	40,0	72	19,6
Q-13	50,0	72	19,5
Q-14	60,0	71	19,5
Q-15	90,0	64	19,0
Q-16	120,0	63	19,3

Analisando a Figura 46 é possível constatar que tanto o I_{cr} quanto o D_{ap} das amostras é influenciado pelo tempo de sonicação. Quando analisamos o I_{cr} em função do tempo de sonicação, inicialmente temos uma diminuição do I_{cr} com o aumento do tempo de sonicação, até o tempo crítico de 20 minutos, com o avanço da reação (tempos superiores a 20 minutos) observamos o aumento I_{cr} seguido por sua constância para tempos elevados de reação. O D_{ap} apresenta aproximadamente a mesma tendência do I_{cr} , porém nos tempos iniciais da reação o D_{ap} sofre um aumento com o aumento do tempo de sonicação. Tanto para a variação do I_{cr} quanto para o D_{ap} temos um tempo crítico em 20 minutos, onde as características dos produtos obtidos apresentam tendência diferente. Este fato sugere, que o mecanismo de reação envolvido na reação de desacetilação via processo DAIUS, além de governar a velocidade de desacetilação também influencia as características dos produtos obtidos.

Figura 46 - Variação do índice de cristalinidade (■) e do diâmetro aparente dos cristalitos (●) em relação ao tempo de sonicação para as amostras do Grupo III - Estudos Cinéticos.

7.3.3.2.3 Termogravimetria

Os dados de umidade e cinzas apresentados pelas amostras geradas pela cinética do processo DAIUS nos estudos cinéticos (Tabela 26) revelaram, como discutido para as amostras do teste exploratório, que as amostras iniciais (até 20 min. de reação) apresentaram valores de umidade e cinzas próximos aos da beta-quitina de partida este fato está relacionado com a semelhança ($\overline{GD}$) entre as amostras obtidas e a beta-quitina. Com o avanço da reação de desacetilação, amostras com menores teores de umidade e maiores teores de cinzas foram obtidas, sugerindo a formação de quitosana, a qual possui maior quantidade de grupos NH_3 que favorecem a interação da quitosana com água e outras substâncias.

Tabela 26 - Dados obtidos com o auxílio da termogravimetria para as amostras do Grupo III - Estudos Cinéticos

Amostra	T _{onset} (°C)	T ₀ (°C)	T _f (°C)	Perda de Massa (%)	T _{max} (°C)	Umidade (%)	Cinzas (%)
Beta-Quitina	308	262	382	57,2	334	7,8	0,5
Q-01	247	223	403	49,2	311	7,4	0,6
Q-02	305	252	397	47,9	352	7,2	0,6
Q-03	296	252	405	47,2	335	7,8	0,5
Q-04	257	224	395	45,3	294	7,2	0,7
Q-05	259	225	419	45,1	275	7,8	0,6
Q-06	277	225	398	44,2	309	8,1	0,7
Q-07	234	201	373	43,8	244	7,5	0,5
Q-08	297	250	389	43,8	312	7,8	0,8
Q-09	261	216	408	45,3	276	7,8	0,9
Q-10	281	235	417	45,9	304	8,3	1,4
Q-11	286	249	416	42,2	303	9,5	2,5
Q-12	280	244	416	39,0	303	8,5	3,0
Q-13	277	231	418	38,2	297	8,4	1,4
Q-14	279	247	414	38,2	301	8,7	2,9
Q-15	276	225	391	38,4	293	8,6	3,0
Q-16	251	214	383	38,4	270	8,4	2,8

A variação da T_{onset} e da T_{max} em função do tempo de sonicação (Figura 47) ocorre de maneiras semelhantes para as duas variáveis. Novamente fica evidenciado a divisão nas características das amostras em aproximadamente 20 minutos de reação. Os valores de T_{onset} e da T_{max} variam da seguinte forma no intervalo de 0 a 20 minutos: diminuição>aumento>diminuição. No intervalo acima dos 20 minutos de reação observamos valores quase que constantes de T_{onset} e de T_{max} até o fim da reação, onde ocorre a diminuição nos valores de tais características.

Figura 47 - Variação da temperatura “onset” (■) e da temperatura de máxima degradação (●) em função do tempo de sonicação (min.), para as amostras do Grupo III - Estudos Cinéticos.

7.3.3.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura e Solubilidade

Observando as micrografias obtidas pela MEV (Figura 48) é possível verificar a diminuição no tamanho das partículas (Figura 48a) após a sonicação da beta-quitina em comparação com as amostras Q-01 (3 minutos de reação) e Q-10 (25 minutos de reação). Outra fato importante que ocorre durante a sonicação da beta-quitina é obtenção de partículas com formas mais homogêneas (Figura 48a). As micrografias apresentadas na Figura 48b e Figura 48c revelam a mudança na superfície da beta-quitina em comparação com as amostras. Essa mudança na superfície das amostras mostra de forma prática a atuação do ultrassom de alta intensidade, o qual através do fenômeno conhecido como cavitação gera superfícies mais rugosas e com maior área superficial quando comparamos com a beta-quitina.

Figura 48 - Microscopia da beta-quitina e das amostras Q-01 e Q-10, (a) ampliação de 100x; (b) ampliação de 500x e (c) ampliação de 1000x;

O aumento na rugosidade das superfícies das amostras fica mais evidente quando analisamos a Figura 49a onde temos a ampliação de 5000x e a Figura 49b onde é possível visualizar a topografia em 3D da superfície das amostras.

Figura 49 - Microscopia da beta-quitina e das amostras Q-01 e Q-10, (a) ampliação de 5000x e (b) topografia em 3D utilizada para o calculo da rugosidade superficial.

A rugosidade superficial (RS) das amostras aumenta até um máximo em 10 minutos de reação (Tabela 27), porem após este tempo ocorre uma diminuição nos valores da RS seguida de, aproximadamente, valores constantes de RS até o fim da reação.

Tabela 27 - Dados de área média por partícula (mm²), rugosidade superficial (%) e circularidade (u.a.) para as amostras do Grupo III - Estudos Cinéticos, obtidos com o auxílio do programa imageJ

Amostra	Área média por Partícula (mm ²)	Rugosidade Superficial (%) ^a	Circularidade (u.a.)
Beta-Quitina	0,2398	0,0	0,725
Q-01	0,0130	21,6	0,775
Q-02	0,0118	22,5	0,819
Q-03	0,0141	48,7	0,769
Q-04	0,0213	52,4	0,681
Q-05	0,0250	91,6	0,672
Q-06	0,0265	45,9	0,680
Q-07	0,0280	34,6	0,693
Q-08	0,0288	29,5	0,696
Q-09	0,0304	38,4	0,698
Q-10	0,0249	43,3	0,793
Q-11	0,0188	46,8	0,912
Q-12	0,0187	57,6	0,901
Q-13	0,0180	47,7	0,906
Q-14	0,0187	31,5	0,910
Q-15	0,0250	30,6	0,922
Q-16	0,0251	27,8	0,905

Quando analisamos os valores de área média por partícula e de circularidade (Tabela 27) em função do tempo de sonicação é possível distinguir três intervalos (Figura 50), sendo: i) tempos iniciais de sonicação a $\overline{AM}$ diminui e a circularidade aumenta; ii) tempo de sonicação até 25 minutos a $\overline{AM}$ aumenta e a circularidade diminui e iii) tempos de sonicação superiores a 30 minutos a $\overline{AM}$ e a circularidade permanecem praticamente constantes. Desconsiderando a variação da $\overline{AM}$ e da circularidade das amostras para os tempos iniciais de sonicação até (5 minutos), podemos considerar que dos dois tipos de mecanismos (Figura 40) apresentados pela cinética do processo DAIUS, aquele que mais influencia a $\overline{AM}$ e a circularidade é o primeiro mecanismo, o qual apresenta velocidade de reação superior ao segundo mecanismo.

Figura 50 - Variação da área média por partícula (■) e da circularidade (●) em função do tempo de sonicação (min.), para as amostras do Grupo III - Estudos Cinéticos.

A solubilidade das amostras do Grupo III – estudos cinéticos foi testada em HCl 0,05 mol/L e em H₂O (Tabela 28). Todas as amostras a partir da Q-10 (GD=50,5) foram solúveis, visualmente em meio ácido (HCl 0,05 mol/L), as outras amostras, com exceção da beta-quitina, foram parcialmente solúveis neste meio. Todas as amostras foram insolúveis em água.

Tabela 28 - Solubilidade das amostras Grupo III - Estudos Cinéticos em HCl 0,05 mol/L e em H₂O

Amostra	HCl (0,05 mol/L)	H ₂ O
Beta-Quitina	Insolúvel	Insolúvel
Q-01	Parcialmente Solúvel	Insolúvel
Q-02	Parcialmente Solúvel	Insolúvel
Q-03	Parcialmente Solúvel	Insolúvel
Q-04	Parcialmente Solúvel	Insolúvel
Q-05	Parcialmente Solúvel	Insolúvel
Q-06	Parcialmente Solúvel	Insolúvel
Q-07	Parcialmente Solúvel	Insolúvel
Q-08	Parcialmente Solúvel	Insolúvel
Q-09	Parcialmente Solúvel	Insolúvel
Q-10	Solúvel	Insolúvel
Q-11	Solúvel	Insolúvel
Q-12	Solúvel	Insolúvel
Q-13	Solúvel	Insolúvel
Q-14	Solúvel	Insolúvel
Q-15	Solúvel	Insolúvel
Q-16	Solúvel	Insolúvel
Q-17	Solúvel	Insolúvel

As soluções obtidas a partir da dissolução das amostras do Grupo III - Estudos Cinéticos em HCl 0,05 mol/L foram submetidas a análise no ultravioleta visível (Figura 51).

Figura 51 - Curvas de comprimento de onda (cm⁻¹) versus a absorbância as amostras do Grupo III - Estudos Cinéticos em HCl 0,05 mol/L.

A partir de tais medidas foi possível correlacionar as absorvâncias em $\lambda = 600\text{nm}$ ($A_{600\text{nm}}$) das soluções das amostras do Grupo III - Estudos Cinéticos em HCl 0,05 mol/L (Figura 52). A absorvância em $\lambda = 600\text{nm}$ diminui até aproximadamente os 20 minutos de sonicação, após este tempo de reação a absorvância permanece constante. Desta maneira a Figura 52 revela que para tempos superiores a 20 minutos amostras cada vez mais solúveis, em meio ácido, são obtidas.

Figura 52 - Curva de absorvância em $\lambda = 600\text{ nm}$ ($A_{600\text{nm}}$) para as amostras do Grupo III - Estudos Cinéticos em HCl 0,05 mol/L *versus* o tempo de sonicação (min.).

7.3.4 Reprodutibilidade das Características

Para testar a reprodutibilidade do processo DAIUS na reação de desacetilação do ultrassom de alta intensidade as amostras Q-15, Q16 e Q17 foram produzidas em duplicatas. As características analisadas para confirmar a reprodutibilidade na produção das amostras de quitosanas foram o $\overline{GD}$ e $\overline{Mv}$ (Tabela 29).

Tabela 29 - Amostras do Grupo III - Estudos Cinéticos produzidas em duplicadas e seus respectivos valores de $\overline{GD}$ e $\overline{Mv}$

Amostra	Reação	Grau Médio de Desacetilação (%), Condutimetria	Massa Molar Média Viscosimétrica ($\times 10^5$ g/mol)
Q-15	1	68,5 $\pm$ 0,7	7,20 $\pm$ 0,03
	2	69,7 $\pm$ 0,5	7,14 $\pm$ 0,04
Q-16	1	77,5 $\pm$ 2,6	7,00 $\pm$ 0,02
	2	79,6 $\pm$ 1,2	7,04 $\pm$ 0,03
Q-17	1	80,5 $\pm$ 0,5	6,10 $\pm$ 0,04
	2	81,5 $\pm$ 0,5	6,18 $\pm$ 0,03

Em cada reação (1 ou 2) na Tabela 29 todos os parâmetros da reação do processo DAIUS foram mantidos iguais para a mesma amostra. A variação do $\overline{GD}$ e da $\overline{Mv}$ para ambas as amostras ficou dentro do erro aceitável, demonstrando que a utilização do ultrassom de alta intensidade na desacetilação de beta-quitina gera amostras de quitosanas com características reprodutíveis, quando as mesmas condições reacionais são utilizadas, este fato já havia sido comprovado através das amostras feitas em triplicatas do Grupo I (Tabela 15). A reprodutibilidade nas características das quitosanas é outro diferencial que o processo DAIUS possui quando comparado com os métodos usuais de obtenção de quitosana, os quais raramente fornecem quitosanas com características reprodutíveis.

8 CONCLUSÕES

O estudo de obtenção de beta-quitina mostrou que dependendo do processo utilizado podem ser obtidas amostras com características diferentes. A separação por tamanho de partícula de beta-quitina revelou que quantidades diferentes de frações de amostras são obtidas após a trituração das mesmas em moinho de facas. As principais modificações que ocorreram durante o processo de trituração são as relacionadas com o grau médio de desacetilação e a massa molar média viscosimétrica das frações, pois através da análise dos conjuntos de frações de beta-quitina foi possível concluir que o cisalhamento e o aquecimento gerado pelo moinho de facas causaram a degradação e a desacetilação da beta-quitina. Para as frações obtidas de beta-quitina a diminuição do tamanho de partícula gerou quitinas com maior $\overline{GD}$ e baixa $\overline{M}_v$, este fato pode ser explicado pelo tempo de permanência das partículas no interior do moinho, pois para tempos maiores de trituração o cisalhamento e o aumento da temperatura são maiores, gerando desta maneira modificações estruturais nas amostras de beta-quitina.

Além do $\overline{GD}$ e da $\overline{M}_v$ outras modificações nas características das frações de quitina foram observadas, como os modos vibracionais na região da espectrometria no infravermelho, cristalinidade, degradação térmica e solubilidade. A variação do tamanho médio das partículas, na beta-quitina, gerou mudanças mais acentuadas nas características das frações obtidas, como observado na diminuição da cristalinidade e da temperatura de máxima degradação em função do tamanho médio das partículas.

A trituração da quitina é uma das etapas importante no processo de obtenção, pois a partir dela partículas de tamanhos mais uniformes são obtidas, garantindo desta maneira que o material de partida para produção de quitosana seja o mais homogêneo possível. Quanto mais características da matéria-prima são conhecidas, mais fácil será a adequação da reação no sentido do favorecimento da obtenção dos produtos com características controladas e propriedades específicas.

Os estudos visando à obtenção de quitosanas através da desacetilação de beta-quitina assistida por ultrassom de alta intensidade (processo DAIUS) mostraram que, dependendo das condições utilizadas no processo, amostras com características diferentes podem ser obtidas. A utilização das planilhas eletrônicas desenvolvidas por TEOFILO¹⁴⁰ foram de grande ajuda na elaboração do planejamento de experimentos, pois através delas foi possível a realização de um menor número de experimentos, sem que os efeitos das variáveis utilizadas fossem perdidos. A análise das quitosanas obtidas pelos experimentos do Grupo I revelou que a variação do $\overline{GD}$ não é influenciada apenas pela potência do ultrassom e que para a variação da M_v duas variáveis são as que mais influenciam a despolimerização da quitosana (temperatura de reação e tempo de sonicação). A elaboração dos gráficos de superfície de resposta do Grupo II necessitava da escolha de duas variáveis, foram escolhidas a temperatura da reação e o tempo de sonicação, pois estas duas variáveis eram as que mais influenciavam a variação de $\overline{M_v}$ e também estavam dentre aquelas que mais influenciavam a variação do $\overline{GD}$, de acordo com os resultados dos experimentos do Grupo I.

Através dos gráficos de superfície de resposta foi possível avaliar os efeitos do processo DAIUS na variação do $\overline{GD}$, $\overline{M_v}$ e PA. O aumento da temperatura e do tempo de sonicação, durante o processo DAIUS, gera quitosanas com maiores valores de $\overline{GD}$, porém com menores valores de $\overline{M_v}$. O aumento do tempo de sonicação gera diminuição nos valores de PA, e para a variação da temperatura ocorre um máximo dos valores de PA aproximadamente no nível 0 (60,0°C), a partir deste nível o aumento ou diminuição da temperatura gera quitosanas com valores menores de PA. A escolha da temperatura de reação e do tempo de sonicação como variáveis do processo DAIUS forneceu uma melhor compreensão da variação do $\overline{GD}$ e da $\overline{M_v}$, além de demonstrar que as quitosanas obtidas a partir destes parâmetros apresentam valores de PA próximos 1,0 (padrão randômico ideal de distribuição de unidades GlcN e GlcNAc). Assim os dados de PA sugerem que a desacetilação de beta-quitina assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade ocorre de forma homogênea, indicando que a reação de hidrólise dos grupos acetamidos ocorre também nas regiões cristalinas da beta-quitina e não

apenas nas regiões de baixa cristalinidade, diferenciando desta maneira o processo DAIUS dos métodos convencionais de obtenção de quitosanas.

O estudo exploratório da cinética da desacetilação de beta-quitina pelo processo DAIUS demonstrou que a desacetilação ocorre de forma rápida nos primeiros 20 minutos de reação e após este tempo ela ocorre mais lentamente, a partir destes dados iniciais os novos experimentos envolvendo a cinética do processo DAIUS foram realizados de forma a minimizar a perda de resultados da reação e favorecer a obtenção de quitosanas.

Todas as etapas acima descritas, seus resultados e conclusões nos conduziram a parte final do trabalho “O estudo cinético da desacetilação de beta-quitina assistida por ultrassom de alta intensidade”. Para a realização dos estudos cinéticos, a massa e o volume da reação foram reduzidos, esta abordagem foi utilizada com a finalidade de favorecer a desacetilação de beta-quitina em tempos menores e facilitar a obtenção de amostras.

A análise dos dados do grau médio de desacetilação para a cinética de desacetilação revelou a existência de duas etapas distintas de reação, como observado durante os testes exploratórios. A primeira etapa é caracterizada pela hidrólise rápida dos grupos acetamido ($k = 29,4 \text{ min}^{-1} \cdot 10^3$), na segunda etapa a hidrólise dos grupos acetamido ocorre de forma mais lenta ($7,6 \text{ min}^{-1} \cdot 10^3$), porém até o tempo de 180 minutos de reação não foi atingido um patamar para os valores de $\overline{GD}$, este fato é um dos diferenciais do processo DAIUS, pois nos processos comumente utilizados³⁶ na desacetilação de beta-quitina após 60 minutos de reação a hidrólise dos grupos acetamido é interrompida e mesmo com o aumento do tempo de reação os valores de $\overline{GD}$ são mantidos constantes ocorrendo apenas à degradação das cadeias poliméricas.

Quando comparamos os dados de constante de velocidade encontrados na literatura para desacetilação de beta-quitina sem a utilização do ultrassom de alta intensidade e o processo DAIUS que utiliza o ultrassom de alta intensidade, constatamos que o processo DAIUS é mais eficiente que os processos convencionais para a mesma temperatura (60°C) e está muito próximo dos processos que utilizam

temperaturas mais elevadas (90°C). Diferente dos processos convencionais onde o aumento do tempo de reação diminui rapidamente a massa molar média das quitosanas obtidas, devido as temperaturas elevadas utilizadas, a variação da massa molar média viscosimétrica das amostras obtidas via processo DAIUS é caracterizada pela despolimerização não acentuada em função do tempo de reação. Os valores de PA para as amostras com $\overline{GD} > 50\%$ ficou entre o intervalo do padrão randômico e do alternado, fortalecendo a hipótese de que a desacetilação de beta-quitina via processo DAIUS ocorre de forma homogênea. Os espectros obtidos na região do infravermelho foram condizentes com a diminuição do $\overline{GD}$ das amostras durante a reação de cinética de desacetilação. Um dos resultados mais revelador e surpreendente para a cinética de desacetilação via processo DAIUS foram os obtidos pela difração de raios X, pois esta análise revelou que durante o processo DAIUS ocorre a perda de água do retículo cristalino da beta-quitina, esta perda de água está relacionada com o processo de cavitação gerado pelo ultrassom de alta intensidade, indicando que a cavitação atua dentro do retículo cristalino da beta-quitina liberando as moléculas de água na forma de jatos (aproximadamente 100m/s), desta maneira facilitando o ataque nucleofílico dos íons hidróxidos no grupamento acetamido da beta-quitina. As etapas da cinética de reação do processo DAIUS também estão ligadas a perda de água do retículo cristalino, pois a velocidade da reação de desacetilação começa a diminuir a partir do momento que a intensidade do pico da forma mono-hidratada também diminui ou quase não se está mais presente nos difratogramas. Portanto o favorecimento da reação de desacetilação de beta-quitina via processo DAIUS ocorre devido a atuação das ondas ultrassônicas no interior dos retículos cristalinos.

A presença das duas etapas durante a reação de desacetilação via processo DAIUS influenciou não apenas a variação do $\overline{GD}$, mais também as características das amostras obtidas. As principais características analisadas apresentaram tendências semelhantes quando comparadas no intervalo da primeira (entre 0 e 20 minutos) e da segunda etapa (entre 20 e 120 minutos), dentre elas podemos citar a variação do I_{cr} , D_{ap} , T_{onset} , T_{max} , $\overline{AM}$ e C_{irc} . As análises de solubilidade revelaram que a partir da amostra Q-10 todas as mostras eram solúveis em solução de HCl 0,05 mol/L, porém quando submetidas a solubilização em tampão ácido acético

0,3M/acetato de sódio 0,2M seguida de filtragem em membrana com diâmetro dos poros de $0,45\mu\text{m}$ (Millipore – White SCWP) para a análise viscosimétrica, foi verificado que para as amostras Q-10, Q11, Q12, Q13 e Q-14 um gel viscoso ficava retido na membrana, possivelmente estas amostras ainda possuíam beta-quitina parcialmente desacetilada e de alta massa molar. O estudo de reprodutibilidade das características das quitosanas obtidas pelo processo DAIUS revelou que para as mesmas condições de reação tanto o $\overline{GD}$ e a $\overline{Mv}$ das amostras feitas em duplicatas foram próximos.

O presente trabalho contribuiu de forma importante tanto na elucidação do processo DAIUS quanto para futuros estudos de produção de quitosanas com características controladas. Através dos diversos dados obtidos referentes a obtenção de beta-quitina, os principais parâmetros que influenciam, os gráficos de superfície de resposta e de como ocorre a cinética do processo DAIUS, estudos que visam à produção de quitosanas com características controladas podem utilizar destes dados com o intuito de controlar as variáveis da reação de desacetilação a fim de minimizar os custos, diminuir as etapas no processo e obter quitosanas com características específicas.

9 MODELO DE AÇÃO DO PROCESSO DAIUS

Diante de todos os resultados obtidos no presente estudo será proposto o modelo de ação do processo DAIUS, para explicar como o ultrassom de alta intensidade atua na desacetilação da beta-quitina.

Inicialmente pensávamos que devido a cavitação gerada pelo ultrassom de alta intensidade as partículas de beta-quitina eram pulverizadas e desta maneira ocorria o aumento da superfície da área de contato e assim a hidrólise dos grupos acetamidos era favorecida. Esta hipótese é fortemente apoiada pelas micrografias de MEV, que revelam tais mudanças nas superfícies das amostras. Porém outra hipótese que sempre foi colocada em questão era que a cavitação atuava dentro do retículo cristalino da beta-quitina e através dos dados de difração de raios X foi possível sustentar esta suposição.

A beta-quitina possui em média, por retículo cristalino, duas unidades de água, portanto a beta-quitina é di-hidratada. Durante a cinética de desacetilação do processo DAIUS foi constatado, através da difração de raios X, a eliminação das moléculas de água do retículo cristalino da beta-quitina. Com a cavitação ocorrendo no interior do retículo cristalino, a formação das bolhas cavitacionais seguida de seu colapso violento, liberam as moléculas de água dos retículos cristalinos e desta maneira favorecem o acesso na região cristalina dos íons hidróxidos, aumentando a velocidade de reação mesmo a temperaturas mais baixas (60°C) que as empregadas nos processo convencionais (>80°C).

Portanto os dois fatores que favorecem o aumento dos sítios ativos durante a reação de desacetilação da beta-quitina pelo ultrassom de alta intensidade são:

- Aumento da área superficial das partículas.
- Atuação do fenômeno de cavitação nas moléculas de água dos retículos cristalinos.

Considerando todas as afirmações discutidas acima, podemos propor os mecanismos de atuação das duas etapas da reação de cinética do processo DAIUS.

- 1ª Etapa - durante esta etapa o mecanismo de reação é favorecido pelo aumento da área superficial das partículas e a atuação do fenômeno de cavitação no interior dos retículos cristalinos, liberando as moléculas de água e favorecendo a hidrólise das unidades GlcNAc pelo íon OH^- , a atuação deste mecanismo esta limitada a presença de moléculas de água no reticulo cristalino da beta-quitina.
- 2ª Etapa - durante esta etapa o mecanismo de reação é favorecido apenas pelo aumento da área superficial das partículas, que ocorre devido ao fenômeno de cavitação gerado pelo ultrassom.

10 RESULTADOS E DISCUSSÃO

10.1 Grupo I

10.1.1 Espectroscopia no Infravermelho e Difração de Raios X

Afim de melhor interpretar os dados de infravermelho os espectros serão mostrados na região entre 1700cm^{-1} e 1200cm^{-1} , onde estão localizadas as bandas de interesse tanto para a beta-quitina quanto para as quitosanas. Comparando os espectros na região do infravermelho das quitosanas do Grupo I com a beta-quitina de partida (Figura 53), podemos observar a variação nas intensidades das bandas em aproximadamente 1650cm^{-1} e 1310cm^{-1} , bandas de amida I e amida III, respectivamente.

Figura 53 - Espectro no infravermelho ampliado na região de 1700cm⁻¹ a 1200cm⁻¹, (a) beta-quitina > 0,425 mm e as amostras CH1, CH3, CH5 e CH7; (b) beta-quitina 0,250-0,125mm e as amostras CH2, CH4, CH6 e CH8 e (c) beta-quitina 0,425-0,250mm e as amostras CH.01, CH.02 e CH.03.

A beta-quitina dos gládios de lulas apresenta dois picos cristalinos em aproximadamente $2\theta \approx 8^\circ$ e $2\theta \approx 20^\circ$, referente aos planos (010) e ((020), (110)) respectivamente. As quitosanas do Grupo I também apresentam o pico cristalino em $2\theta \approx 20^\circ$, menos intenso e mais alargado do que na beta-quitina de partida, mas nem todas apresentam o pico em $2\theta \approx 8^\circ$ (Figura 54), o que decorre da diminuição da cristalinidade durante a irradiação de beta-quitina por ultrassom de alta intensidade.

Figura 54 - Difrátogramas da beta-quitina de partida e quitosanas do Grupo I, (a) beta-quitina > 0,425mm² e as amostras CH1, CH3, CH5 e CH7; (b) beta-quitina 0,250-0,125mm² e as amostras CH2, CH4, CH6 e CH8 e (c) beta-quitina 0,425-0,250mm² e as amostras CH.01, CH.02 e CH.03.

A diminuição no índice de cristalinidade (I_{cr}) e no diâmetro aparente dos cristalitos (D_{ap}) das quitosanas em relação a beta-quitina de partida pode ser observada na Tabela 30. O I_{cr} teve uma diminuição média de aproximadamente 25% e o D_{ap} apresentou uma diminuição média de aproximadamente 75%. Através destes dados podemos constatar que a diminuição no tamanho dos cristalitos ocorre de forma acentuada quando a beta-quitina é submetida à irradiação pelo ultrassom de alta intensidade, porém os cristalitos remanescentes, na quitosana, apresentam elevados índices de cristalinidade quando comparados com os da beta-quitina de partida.

Tabela 30 - Valores dos índices de cristalinidade (I_{cr}) e no diâmetro aparente dos cristalitos (D_{ap}) para as beta-quitinas de partida e a quitosanas do Grupo I

Amostra	Índice de Cristalinidade (I_{cr})%	Diâmetro Aparente dos Cristalitos (D_{ap})Å
Beta (>0,425)	89	29,9
CH1	72	15,0
CH3	67	11,2
CH5	65	7,3
CH7	68	11,3
Beta (0,250-0,125)	84	26,1
CH2	79	20,0
CH4	69	12,5
CH6	74	14,9
CH8	60	6,2
Beta (0,425-0,250)	84	29,9
CH.01	65	7,5
CH.02	73	8,6
CH.03	67	8,5

10.1.2 Termogravimetria

Os dados de umidade e cinzas apresentados na Tabela 31 revelam que as amostras de quitosanas apresentam valores menores de umidade quando comparadas com a beta-quitina de partida, porém a beta-quitina de partida apresenta valores menores de cinzas. A massa de amostra utilizada na análise termogravimétrica é aproximadamente de 7 mg, devido a essa massa tão pequena o erro associado aos valores de umidade e cinzas são grandes, portanto a análise destes valores deve apresentar caráter mais qualitativo do que quantitativo.

Analisando na Tabela 31 os valores da temperatura a partir da qual se inicia a degradação térmica com perda de produtos voláteis (T_{onset}) e a temperatura de máxima degradação (T_{max}) para as quitosanas do Grupo I e a beta-quitina de partida, observamos que a conversão de quitina em quitosana gera um polímero termicamente menos estável, fato que também está relacionado com diminuição do I_{cr} das quitosanas, pois quitosanas com menor I_{cr} apresentam menores T_{onset} (Figura 55(a)) e T_{max} (Figura 55(b)). Apesar da relação entre o I_{cr} e temperaturas de T_{onset} ($R^2=0,54$) e T_{max} ($R^2=0,55$) apresentar uma variação elevada, existe uma tendência linear entre estas características (Figura 55). Quando comparamos a perda de massa no primeiro evento de degradação das quitosanas com as respectivas frações de beta-quitina, observamos que para as amostras de quitosanas a perda de massa é menor devido aos menores valores de I_{cr} .

Tabela 31 - Dados obtidos com o auxílio da termogravimetria para as quitosanas do Grupo I

Amostra	T_{onset} (°C)	T_0 (°C)	T_f (°C)	Perda de Massa (%)	T_{max} (°C)	Umidade (%)	Cinzas (%)
Beta ($>0,425$)	311	263	380	55	335	9,2	0,5
CH1	284	231	422	49	315	4,0	1,2
CH3	293	237	434	48	314	4,5	2,0
CH5	247	202	430	48	266	5,5	1,2
CH7	290	239	426	48	313	3,8	1,2
Beta ($0,250-0,125$)	304	262	377	58	328	10,3	0,5
CH2	296	235	422	52	334	5,0	1,6
CH4	293	224	416	48	313	5,0	1,6
CH6	258	201	425	50	290	5,0	0,8
CH8	255	204	416	45	286	4,6	1,2
Beta ($0,425-0,250$)	309	263	380	56	335	7,7	0,5
CH.01	240	198	412	48	256	4,8	1,0
CH.02	287	173	435	52	311	4,5	0,8
CH.03	254	206	435	49	275	4,7	1,2

Os dados referentes ao primeiro evento de degradação, temperatura inicial (T_0), final (T_f) e perda de massa, observados para as quitosanas do Grupo I estão condizentes com as variações de T_{onset} e T_{max} .

Figura 55 - Relação entre a variação do índice cristalinidade (%) para as quitosanas do Grupo I e (a) temperatura “onset” (T_{onset} , °C) e (b) temperatura de máxima degradação (T_{max} , °C).

10.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura e Solubilidade

Através das micrografias (Figura 56), obtidas em microscópio de varredura eletrônica (MEV), e com o auxílio do programa imageJ foi possível calcular a área média por partícula (Figura 56(a)), a rugosidade superficial (Figura 56(e)) e a circularidade (Figura 56(a)) das mesmas.

Quando comparamos a área média por partículas ($\overline{AM}$) de quitosanas com a da beta-quitina de partida (Tabela 32) observamos uma diminuição, em média, maior que 60% em todos os casos. Esta diminuição na $\overline{AM}$ ocorre devido ao efeito da cavitação causado pelo ultrassom de alta intensidade, pois através deste efeito as partículas iniciais de beta-quitina são fragmentadas. Observando a variação da rugosidade superficial (RS) das amostras, fica claro que as quitosanas obtidas pelo processo DAIUS apresentam valores mais elevados de RS quando comparadas com a beta-quitina de partida, este aumento da rugosidade superficial é atribuído também ao efeito da cavitação o qual além de fragmentar as partículas também gera o cisalhamento entre as “folhas” da beta-quitina, como observado nas (Figura 56(a, b e d)). Os dados de circularidade revelam que as quitosanas exibem uma tendência mais circular (circularidade próximas de 1,000) quando comparadas com a beta-quitina de partida. Neste caso a utilização do ultrassom de alta intensidade está favorecendo a formação de partículas mais circulares e por tanto mais homogêneas.

Tabela 32 - Dados de área média por partícula (mm²), rugosidade superficial (%) e circularidade (u.a.) para as quitosanas do Grupo I, obtidos com o auxílio do programa imageJ

Amostra	Área média por Partícula (mm²)	Rugosidade Superficial (%)^a	Circularidade (u.a.)
Beta (>0,425)	0,4500	0,0	0,794
CH1	0,0258	62,7	0,915
CH3	0,0297	35,7	0,905
CH5	0,0247	31,4	0,917
CH7	0,0314	22,4	0,880
Beta (0,250-0,125)	0,1550	0,5	0,651
CH2	0,0216	29,0	0,865
CH4	0,0145	11,3	0,884
CH6	0,0570	24,6	0,901
CH8	0,0260	32,7	0,880
Beta (0,425-0,250)	0,2700	1,0	0,754
CH.01	0,0231	45,3	0,904
CH.02	0,0208	53,4	0,916
CH.03	0,0397	39,1	0,882

^a Rugosidade calculada através do desvio quadrático, atribuindo o menor valor de rugosidade para a Beta (>0,425) como sendo 0,0%.

Figura 56 - Microscopia da amostra CH4, (a) ampliação de 100x; (b) ampliação de 500x; (c) ampliação de 1000x; (d) ampliação de 5000x e (e) topografia em 3D utilizada para o cálculo da rugosidade superficial.

A solubilidade das quitosanas foi testada em HCl 0,05 mol/L e em H₂O (Tabela 33). Todas as amostras de quitosanas foram solúveis em meio ácido e insolúveis em água.

Tabela 33 - Solubilidade das amostras do Grupo I em HCl 0,05 mol/L e em H₂O

Amostra	HCl (0,05 mol/L)	H ₂ O
Beta (>0,425)	Insolúvel	Insolúvel
CH1	Solúvel	Insolúvel
CH3	Solúvel	Insolúvel
CH5	Solúvel	Insolúvel
CH7	Solúvel	Insolúvel
Beta (0,250-0,125)	Insolúvel	Insolúvel
CH2	Solúvel	Insolúvel
CH4	Solúvel	Insolúvel
CH6	Solúvel	Insolúvel
CH8	Solúvel	Insolúvel
Beta (0,425-0,250)	Insolúvel	Insolúvel
CH.01	Solúvel	Insolúvel
CH.02	Solúvel	Insolúvel
CH.03	Solúvel	Insolúvel

10.2 Grupo II

10.2.1 Espectroscopia no Infravermelho e Difração de Raios X

Como realizado para o Grupo I, os espectros de infravermelho serão demonstrados na forma ampliada, na região entre 1700cm^{-1} a 1200cm^{-1} , onde estão localizadas as bandas de interesse tanto para a beta-quitina quanto para as quitosanas, os espectros foram divididos em dois (Figura 57), facilitando a visualização de todos os espectros. Quando comparamos os espectros na região do infravermelho das quitosanas do Grupo II com a respectiva beta-quitina de partida (Figura 57), é nítida a diminuição nas intensidades das bandas em aproximadamente 1650cm^{-1} e 1310cm^{-1} , bandas de amida I e amida III, respectivamente. A diminuição na intensidade destas bandas ocorre devido a derivatização de beta-quitina em quitosana, pois ocorre a diminuição da quantidade de grupos acetamido e consequentemente todas as bandas referentes a este grupo sofrem diminuição de intensidade.

Figura 57 - Espectro no infravermelho ampliado na região de 1800cm⁻¹ a 1200cm⁻¹ das quitosanas obtidas durante os experimentos de otimização (Grupo II) do processo DAIUS.

Os difratogramas das quitosanas do Grupo II também foram divididos em dois, a fim de facilitar a visualização (Figura 58). As quitosanas obtidas durante os experimentos de otimização do processo DAIUS apresentaram o pico cristalino em $2\theta \approx 20^\circ$, característico de beta-quitina (planos (020) e (110)), porém menos intensos e mais alargados quando comparados com a beta quitina de partida (Figura 58). O pico em $2\theta \approx 8^\circ$, também característico de beta-quitina (plano (010)), não está presente nas quitosanas, porém ocorre na região de menor ângulo um novo pico cristalino, de menor intensidade, em $2\theta \approx 9,4^\circ$, tais fatos estão associados as mudanças na cristalinidade das amostras de quitosanas geradas pelo uso do processo DAIUS na desacetilação de beta-quitina (Tabela 34).

Figura 58 - Difratogramas da beta-quitina de partida e quitosanas obtidas durante os experimentos de otimização do processo DAIUS.

Analisando a Tabela 34 podemos observar a diminuição no índice de cristalinidade (I_{cr}) e no diâmetro aparente dos cristalitos (D_{ap}) das quitosanas em relação a beta-quitina de partida. Como observado para o Grupo I as quitosanas do Grupo II apresentaram uma diminuição média no I_{cr} de 20% em reação a beta-quitina de partida. Uma diminuição média de 60% do D_{ap} das quitosanas em relação a beta-quitina de partida foi constatada através dos dados da Tabela 34.

Tabela 34 - Valores dos índices de cristalinidade (I_{cr}) e diâmetro aparente dos cristalitos (D_{ap}) para as beta-quitinas de partida e a quitosanas do Grupo II

Amostra	Índice de Cristalinidade (I_{cr})%	Diâmetro Aparente dos Cristalitos (D_{ap})Å
Beta-Quitina	84	26,1
TT01	72	8,0
TT02	69	10,6
TT03	74	15,9
TT04	59	6,7
TT05	71	13,0
TT06	68	12,0
TT07	72	9,2
TT08	63	4,2
TT09	64	11,5
TT10	74	14,2

10.2.2 Termogravimetria

Como observado para o Grupo I os dados de umidade e cinzas apresentados pelas quitosanas obtidas durante os experimentos de otimização do processo DAIUS (Tabela 35) revelam que as quitosanas apresentam valores menores de umidade quando comparadas com a beta-quitina de partida, porém a beta-quitina apresenta valores menores de cinzas. Na Tabela 35 estão inseridos os valores de T_{onset} e T_{max} para as quitosanas do Grupo II e da beta-quitina de partida, através destes fica evidente que a conversão de quitina em quitosana, gera um polímero termicamente menos estável, fato que está relacionado com diminuição do I_{cr} das quitosanas, pois quitosanas com menor I_{cr} apresentam menores T_{onset} (Figura 59(a)) e T_{max} (Figura 59(b)). A relação aproximadamente linear entre I_{cr} e as temperaturas de T_{onset} ($R^2=0,77$) e T_{max} ($R^2=0,66$) é um forte indicativo de que a estabilidade térmica das quitosanas está diretamente ligada com a cristalinidade da amostra.

Tabela 35 - Dados obtidos com o auxílio da termogravimetria para as quitosanas do Grupo II

Amostra	T_{onset} (°C)	T_0 (°C)	T_f (°C)	Perda de Massa (%)	T_{max} (°C)	Umidade (%)	Cinzas (%)
Beta	304	262	377	58	328	10,3	0,5
TT01	288	229	418	48	313	5,0	1,8
TT02	290	224	420	49	313	4,2	0,7
TT03	290	232	428	52	314	5,5	1,5
TT04	258	202	409	46	298	4,8	1,4
TT05	295	239	432	52	320	4,8	0,6
TT06	285	226	417	47	310	4,0	1,3
TT07	287	228	426	50	312	4,7	0,5
TT08	245	202	401	47	265	4,3	1,2
TT09	287	235	423	49	312	4,6	1,0
TT10	285	234	431	47	307	4,6	1,1

Os dados referentes ao primeiro evento de degradação, T_0 , T_f e perda de massa, observados para as quitosanas do Grupo II estão condizentes com as variações de T_{onset} e T_{max} .

Figura 59 - Relação entre a variação do I_{cr} (%) para as quitosanas do Grupo II e (a) T_{onset} , (°C) e (b) T_{max} , (°C).

10.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura e Solubilidade

A utilização do programa imageJ foi muito útil, pois permitiu extrair dados importantes das micrografias das quitosanas do Grupo II, representadas pela amostras TT07 (Figura 60), fornecendo a determinação da área média por partícula (Figura 60(a)), rugosidade superficial (Figura 60(e)) e circularidade (Figura 60(a)) das mesmas.

Quando a área média por partículas ($\overline{AM}$) de quitosanas é comparada com a da beta-quitina de partida (Tabela 36) observamos uma diminuição, em média, maior que 70% em todos os casos. Observando a variação da rugosidade superficial (RS) das quitosanas, é evidente que quitosanas obtidas através do processo DAIUS apresentam valores mais elevados de RS quando comparadas com a beta-quitina de partida, este aumento da rugosidade superficial pode ser observado nas micrografias b, c e d (Figura 60), onde a superfície da amostra TT07 apresenta “ranhuras” a quais são atribuídas ao fenômeno de cavitação causado pelo ultrassom de alta intensidade. A maioria dos resultados de circularidade ficou acima de 0,900, revelando que as quitosanas exibem uma tendência mais circular (circunferência ideal igual a 1,000) quando comparadas com a beta-quitina de partida, que apresente um formato mais irregulares. Como no caso do Grupo I a utilização do ultrassom de alta intensidade favorece a formação de partículas mais homogêneas quanto ao tamanho e a forma.

Tabela 36 - dados de área média por partícula (mm^2), rugosidade superficial (%) e circularidade (u.a.) para as quitosanas do Grupo II, obtidos com o auxílio do programa imageJ

Amostra	Área média por Partícula (mm^2)	Rugosidade Superficial (%)^a	Circularidade (u.a.)
Beta-Quitina	0,1550	0,0	0,651
TT01	0,0356	29,6	0,911
TT02	0,0377	29,7	0,912
TT03	0,0277	28,4	0,898
TT04	0,0416	27,3	0,909
TT05	0,0222	34,7	0,913
TT06	0,0415	29,3	0,908
TT07	0,0239	29,0	0,887
TT08	0,0344	49,6	0,885
TT09	0,0266	17,5	0,907
TT10	0,0235	27,3	0,899

^a Rugosidade calculada através do desvio quadrático, atribuindo o menor valor de rugosidade para a Beta-quitina como sendo 0,0%.

Figura 60 - Microscopia da amostra TT07, (a) ampliação de 100x; (b) ampliação de 500x; (c) ampliação de 1000x; (d) ampliação de 5000x e (e) topografia em 3D utilizada para o calculo da rugosidade superficial.

A solubilidade das quitosanas foi testada em HCl 0,05 mol/L e em H₂O (Tabela 37). Todas as quitosanas obtidas foram solúveis em meio ácido e insolúveis e água.

Tabela 37 - Solubilidade das amostras do Grupo II em HCl 0,05 mol/L e em H₂O

Amostra	HCl (0,05 mol/L)	H ₂ O
Beta-Quitina	Insolúvel	Insolúvel
TT01	Solúvel	Insolúvel
TT02	Solúvel	Insolúvel
TT03	Solúvel	Insolúvel
TT04	Solúvel	Insolúvel
TT05	Solúvel	Insolúvel
TT06	Solúvel	Insolúvel
TT07	Solúvel	Insolúvel
TT08	Solúvel	Insolúvel
TT09	Solúvel	Insolúvel
TT10	Solúvel	Insolúvel

10.3 Grupo III - Testes Exploratórios

10.3.1 Espectroscopia no Infravermelho e Difração de Raios X

Os espectros de infravermelho (Figura 61) revelaram uma diminuição gradativa nas bandas de absorção de amida I (1650cm^{-1}) e amida III (1310cm^{-1}), tal resultado é coerente com o aumento gradativo do $\overline{GD}$, das amostras obtidas durante a realização dos TE de cinética do processo DAIUS.

Figura 61 - Espectro no infravermelho ampliado na região de 1800cm^{-1} a 1200cm^{-1} das amostras do Grupo III - Testes Exploratórios.

Os difratogramas das amostras do Grupo III foram divididos em dois a fim de melhor visualizar os mesmos. Todas as amostras obtidas apresentaram uma diminuição no I_{cr} e no D_{ap} dos cristalitos como podemos evidenciar na Figura 62.

Figura 62 - Difratogramas da beta-quitina de partida e das amostras do Grupo III - Testes Exploratórios

Tanto o I_{cr} quanto o D_{ap} dos cristalitos sofre uma diminuição com o aumento do tempo de sonicação até o tempo de 20 minutos (“momento crítico”), mas após este tempo o I_{cr} e o D_{ap} voltam a aumentar até atingirem um patamar, permanecendo praticamente constantes até o tempo de 60 minutos de reação (Figura 63).

Figura 63 - Variação do índice de cristalinidade (■) e do diâmetro aparente dos cristalitos (●) em relação ao tempo de sonicação para as amostras do Grupo III - Testes Exploratórios.

10.3.2 Termogravimetria

Os dados de umidade e cinzas apresentados pelas amostras geradas pela cinética do processo DAIUS nos testes exploratórios (Tabela 38) revelaram que as amostras iniciais (até 20 min. de reação) apresentaram valores de umidade e cinzas próximos aos da beta-quitina, fato que está relacionado com a semelhança ($\overline{GD}$) entre as amostras obtidas e a beta-quitina. À medida que a reação de desacetilação avança (tempos de reação superiores a 20 min.), amostras com menores teores de umidade e maiores teores de cinzas foram obtidas, sugerindo a formação de quitosana, a qual, como discutido anteriormente, apresenta tais características devido aos valores superiores de $\overline{GD}$ quando comparada com a beta-quitina.

Tabela 38 - Dados obtidos com o auxílio da termogravimetria para as amostras do Grupo III - Testes Exploratórios

Amostra	T _{onset} (°C)	T ₀ (°C)	T _f (°C)	Perda de Massa (%)	T _{max} (°C)	Umidade (%)	Cinzas (%)
Beta-Quitina	309	263	380	56	335	7,7	0,5
Q-1e	274	180	428	51	287	7,3	0,6
Q-2e	290	216	422	50	320	8,1	0,6
Q-3e	282	216	420	49	314	8,8	0,6
Q-4e	220	192	388	47	237	8,0	0,5
Q-5e	257	201	415	50	287	8,6	0,6
Q-6e	276	217	413	48	310	8,2	0,7
Q-7e	294	227	422	48	314	7,0	0,8
Q-8e	267	202	406	45	301	6,0	1,0
Q-9e	288	221	420	46	310	6,1	1,1

A variação da T_{onset} e da T_{max} em função do tempo de sonicação (Figura 64) revela que inicialmente existe uma diminuição destes valores até um mínimo em 20 minutos (“momento crítico”), após este tempo de sonicação ocorre um aumento seguido por valores quase que constantes de T_{onset} e de T_{max} até o fim da reação.

Figura 64 - Variação da temperatura “onset” (■) e da temperatura de máxima degradação (●) em função do tempo de sonicação (min.), para as amostras do Grupo III - Testes Exploratórios.

10.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura e Solubilidade

A área média por partículas ($\overline{AM}$) diminui rapidamente nos primeiros minutos da reação do processo DAIUS como observado na Tabela 39. Esta diminuição sugere que o efeito de cavitação gerado pelo ultrassom de alta intensidade atua de forma efetiva desde os primeiros minutos da reação.

Tabela 39 - Dados de área média por partícula (mm^2), rugosidade superficial (%) e circularidade (u.a.) para as amostras do Grupo III - Testes Exploratórios, obtidos com o auxílio do programa imageJ

Amostra	Área média por Partícula (mm^2)	Rugosidade Superficial (%) ^a	Circularidade (u.a.)
Beta-Quitina	0,2398	0,0	0,725
Q-1e	0,0113	27,4	0,853
Q-2e	0,0126	19,5	0,841
Q-3e	0,0109	22,9	0,833
Q-4e	0,0085	30,0	0,816
Q-5e	0,0111	29,1	0,848
Q-6e	0,0134	28,0	0,827
Q-7e	0,0175	37,0	0,833
Q-8e	0,0152	36,1	0,841
Q-9e	0,0148	39,1	0,831

^a Rugosidade calculada através do desvio quadrático, atribuindo o menor valor de rugosidade para a Beta-quitina como sendo 0,0%.

Figura 65 - Microscopia da amostra Q-7e, (a) ampliação de 100x; (b) ampliação de 500x; (c) ampliação de 1000x; (d) ampliação de 5000x e (e) topografia em 3D utilizada para o cálculo da rugosidade superficial.

O aumento da rugosidade superficial (RS) com o aumento do tempo de reação (Tabela 39) sugere que o aumento de energia liberada pelo ultrassom favorece a degradação da superfície das amostras (Figura 65 (b, c e d)). A maioria dos resultados de circularidade ficou acima de 0,800, revelando que as amostras apresentam uma tendência mais circular (circunferência ideal igual a 1,000) quando comparadas com a beta-quitina de partida (0,725), que apresente um formato mais irregular. Como no caso do Grupo I e do Grupo II a utilização do ultrassom de alta

intensidade esta favorecendo a formação de partículas mais circulares e por tanto mais homogêneas.

Quando analisamos a variação da área média por partícula e da circularidade (Tabela 39) em função do tempo de sonicação (Figura 66) é possível observar padrão semelhante apresentado pelo I_{cr} , D_{ap} , T_{onset} e T_{max} , pois inicialmente ocorre a diminuição dos valores de $\overline{AM}$ e C_{irc} até 20 minutos (“momento crítico”), seguido do aumento e de valores praticamente constantes até o fim da reação.

Esta tendência observada para as características das amostras (Figura 63, Figura 64 e Figura 66) corrobora com os dados de $\overline{GD}$ (Figura 39), na existência de dois mecanismos que governam a reação de desacetilação de quitina assistida por ultrassom de alta intensidade. Estes dois mecanismos além de apresentarem velocidades de desacetilação diferentes, também fornecem características distintas para as amostras obtidas durante cada etapa da reação.

Figura 66 - Variação da área média por partícula (■) e da circularidade (●) em função do tempo de sonicação (min.), para as amostras do Grupo III - Testes Exploratórios.

A solubilidade das beta-quitinas parcialmente desacetiladas foi testada em HCl 0,05 mol/L e em H₂O (Tabela 40), apenas a amostra Q-9e ($\overline{GD}=55$) foi totalmente solúvel em meio ácido, as outras amostras foram parcialmente solúveis neste meio. Todas as amostras foram insolúveis em água.

Tabela 40 - Solubilidade das amostras Grupo III - Testes Exploratórios em HCl 0,05 mol/L e em H₂O

Amostra	HCl (0,05 mol/L)	H ₂ O
Beta-Quitina	Insolúvel	Insolúvel
Q-1e	Parcialmente Solúvel	Insolúvel
Q-2e	Parcialmente Solúvel	Insolúvel
Q-3e	Parcialmente Solúvel	Insolúvel
Q-4e	Parcialmente Solúvel	Insolúvel
Q-5e	Parcialmente Solúvel	Insolúvel
Q-6e	Parcialmente Solúvel	Insolúvel
Q-7e	Parcialmente Solúvel	Insolúvel
Q-8e	Parcialmente Solúvel	Insolúvel
Q-9e	Solúvel	Insolúvel

11 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos para as quitosanas dos Grupos I, II e III revelaram que as modificações estruturais causadas pelo ultrassom de alta intensidade influenciam em suas propriedades.

Os resultados de infravermelho mostraram, qualitativamente, que mudanças estruturais ocorriam quando a beta-quitina era submetida ao processo DAIUS, tais mudanças foram mais perceptíveis quando considerávamos as bandas, na região do infravermelho, referentes aos grupos acetamido. O índice de cristalinidade e o diâmetro aparente dos cristalitos são afetados pelos parâmetros do processo DAIUS, na maioria dos casos quitosanas com menores I_c e D_{ap} , em comparação com a beta-quitina de partida, são obtidas. Para as amostras do Grupo I e II foi evidenciado que a degradação térmica das quitosanas está relacionada diretamente aos seus índices de cristalinidade, sendo que temperaturas de degradação menores são constatadas para quitosanas que apresentam menores índices de cristalinidade.

Para as quitosanas do Grupo III foi observado que os dois mecanismos que governam a desacetilação de quitina via processo DAIUS, além de apresentarem velocidades de desacetilação diferentes, fornecem quitosanas com características e propriedades distintas durante cada etapa da reação.

A utilização do ultrassom de alta intensidade na desacetilação de beta-quitina, gera quitosanas com características controladas, como discutido na primeira parte, e com propriedades específicas. Fato que corrobora com o interesse para as diversas aplicações que podem surgir para estas quitosanas.

12 INTRODUÇÃO

A utilização do ultrassom de alta intensidade tem sido amplamente utilizada na química de polímeros para a produção de oligômeros e polímeros de baixa massa molecular. Vários mecanismos têm sido propostos para a degradação polimérica através das ondas ultrassônicas, mas estudos fundamentais ainda são necessários para elucidar tais reações. A produção e a caracterização de polissacarídeos feitos com características controladas, como quitosana (Figura 9), ácido hialurônico (Figura 67) e o alginato (Figura 68) são de grande interesse, pois suas aplicações estão inseridas nas mais importantes áreas de atuação, como nanotecnologia, biomedicina, agricultura e outros campos que exigem características físicas específicas dos polímeros naturais. Por conseguinte, neste trabalho, quitosana (CH), ácido hialurônico (AH) e alginato (AG) foram submetidos ao ultrassom de alta intensidade, com a finalidade de investigar e comparar os mecanismos envolvidos na reação de despolimerização destes polímeros.

Figura 67 - Estrutura do ácido hialurônico, formada por ácido glucurônico e a N-acetilglicosamina, unidas por ligações glicosídicas alternadas do tipo β -(1 $\rightarrow$ 4) e β -(1 $\rightarrow$ 3), onde $2n' = n$, sendo n o número de unidades repetitivas.

Figura 68 - Estrutura do alginato, formado por blocos homopoliméricos de ligações glicosídicas (1 $\rightarrow$ 4) constituídos por resíduos de ácido β -D-manuronila e ácido α -L-guluronila, onde m e n são o número de resíduos.

12.1 Ácido Hialurônico

O ácido hialurônico (AH) mostrado na Figura 67 é um biopolímero de elevada massa molecular, encontrado em organismos vivos¹⁶³. É biodegradável, biocompatível, polar e atua como polieletrólito (poliânion) em soluções aquosas^{163, 164}. Desempenha importantes funções estruturais e mecânicas em vários tecidos, participa no controle de hidratação e no transporte de água em tecidos celulares, além de afetar diversos processos biológicos, tais como inflamações e metástase e desenvolvimento tumoral¹⁶³. Também é usado na liberação controlada de fármacos, em formulações cosméticas ou nutricionais, cirurgias oftalmológicas e na engenharia de tecidos¹⁶³⁻¹⁶⁵.

12.2 Alginato

O alginato (Figura 68) é um polissacarídeo natural extraído de algas marrons. Desde que foi descoberto por Stanford em 1881, o alginato tem sido usado em diversas aplicações, tais como alimentos, impressão têxtil, indústria do papel e produtos farmacêuticos¹⁶⁶. Como é um polímero solúvel em água, o alginato é um excelente material para a formação de gel, capaz de reter uma grande quantidade de água. Nos últimos anos o alginato tem sido amplamente utilizado na indústria farmacêutica, para a fabricação de bandagens. Neste tipo de aplicação o alginato pode ser utilizado sob a forma seca para absorver fluido em feridas ou para doar água a uma ferida seca, quando usado na forma de gel hidratado. Em qualquer um dos casos, a interação do alginato com a superfície da ferida cria um ambiente úmido. Tem sido demonstrado que, quando as feridas são mantidas em estado úmido, a migração das células epiteliais a partir da borda da ferida para a área central da mesma é mais rápida do que quando as feridas são mantidas em estado seco¹⁶⁷.

13 OBJETIVOS

Comparar a cinética da reação de despolimerização induzida por ultrassom de alta intensidade, para três diferentes polímeros naturais (quitosana, ácido hialurônico e alginato).

Estudar as variáveis que envolvem a reação de despolimerização do ácido hialurônico por irradiação de ultrassom (concentração, temperatura, tempo de sonicação, frequência do ultrassom e adição de ácido (HCl) na reação).

14 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

14.1 Parâmetros do Ultrassom

Foram utilizados dois equipamentos de ultrassom: (1) Sonics Vibra Cell (Fisher Scientific Bioblock, França) e (2) Lixea formulator type BA (Sinaptec SA, França), as suas características são apresentadas na Tabela 41. A despolimerização foi realizada em um reator de vidro de forma tronco-cônica, com diâmetros de base de 4 e 8 cm e uma altura ($H_{\text{máx}}$) de 5 cm (Figura 69). As soluções foram homogeneizadas por agitação magnética, e a temperatura do reator foi mantida constante durante os experimentos.

Tabela 41 - Características dos equipamentos de ultrassom utilizados

Equipamento	Frequência f (KHz)	Potência Máxima P_{max} (W)	Diâmetro da Sonda ϕ (mm)
1	20	750	25
2	39	100	25

Figura 69 - Reator de forma tronco-cônica utilizado na despolimerização via ultrassom.

14.2 Preparação das Soluções

14.2.1 Quitosana

O quitosana, obtido a partir de quitina de gládios de lula, foi adquirida da empresa Mahtani PVT. Ltd. (Índia). A quitosana foi purificada por dissolução em 0,5% (m/v) em uma quantidade estequiométrica de ácido acético, em seguida a solução resultante foi filtrada, sucessivamente, em membranas (Millipore) de porosidade: 3, 1,2, 0,8, e 0,45 μ m. O polímero foi então precipitado com solução aquosa de amônia. Após repetidas lavagens com água deionizada, o precipitado foi liofilizado. As características iniciais da quitosana são $\overline{GD}$ =99,0 $\pm$ 0,1%), o grau médio de polimerização numérico, $\overline{GPn}$ = 972 $\pm$ 50 e o índice de polidispersividade, I_p =2,68 $\pm$ 0,1. A quitosana foi redissolvida em solução aquosa de ácido acético, em quantidade estequiométrica. Para o estudo da influência da $\overline{GD}$, uma quitosana com $\overline{GD}$ =50% foi utilizada na reação de despolimerização via ultrassom de alta intensidade.

14.2.2 Ácido Hialurônico

Ácido hialurônico nativo (HA) e de grau cosmético foi adquirido na empresa HTL - La Boitardière (França). O ácido hialurônico foi dissolvido durante 24 horas a temperatura ambiente em água deionizada e após a sua completa dissolução a solução foi filtrada, sucessivamente, em membranas (Millipore) de porosidade: 3, 1,2, 0,8, e 0,45 μ m. As características iniciais do ácido hialurônico são o grau de acetilação, AD=100% e o grau médio de polimerização numérico, $\overline{GPn}$ =3460 $\pm$ 90.

14.2.3 Alginato

O alginato de sódio, de grau alimentar, foi adquirido da Danisco Landerneau SAS (França). O alginato foi dissolvido durante 24 horas a temperatura ambiente em água deionizada e após a sua completa dissolução a solução foi filtrada, sucessivamente, em membranas (Millipore) de porosidade: 3, 1,2, 0,8, e 0,45 μ m. As características iniciais do alginato são o grau médio de polimerização numérico,

$\overline{GPN}=726\pm39$ e o índice de polidispersividade, $I_p = 1,90\pm0,1$. Outro fator importante é a razão manuronila/guluronila (M/G), que para a nossa amostra de alginato está razão é igual a 0,5.

14.3 Parâmetros da Reação

Os parâmetros das reações para cada amostra foram resumidos na Tabela 02. Em todas as reações o volume inicial utilizado foi de 100mL.

Tabela 42 - Parâmetros de reação para a despolimerização via ultrassom do ácido hialurônico, alginato e quitosana

Amostra	Código	Ultrassom	Concentração m/m (%)	Temperatura de Reação	Frequência (Watts)
Ácido Hialurônico	AH1	1	0,05	25°C	285
	AH2	1	0,10	25°C	285
	AH3	1	0,25	25°C	285
	AH4	1	0,25	45°C	285
	AH5	1	0,25	5°C	285
	AH6	2	0,25	25°C	100
	AH7 ^a	1	0,25	25°C	285
	AH8 ^b	2	0,25	25°C	100
Alginato	AG	1	0,25	25°C	285
Quitosana	CH1 ^c	1	0,25	25°C	285
	CH2 ^d	1	0,25	25°C	285

^a Reator tipo Erlenmeyer, ^b tempo de sonicação elevado (t=1140 min.), ^c quitosana com $\overline{GD}=50.0\%$ e ^d $\overline{GD}=99.0\%$.

14.4 Despolimerização via Ultrassom

A cinética de despolimerização foi acompanhada através da diminuição do $\overline{GPN}$ das amostras em função do tempo de sonicação. As massas molares médias e o índice de polidispersividade foram determinados com a ajuda do sistema acoplado “on line” de cromatografia de permeação em gel (CPG) com coluna (PL aquagel-OH Mixed 8µm). Os detectores utilizados foram o refratômetro diferencial (Waters R 410) e o espalhamento de luz laser multi-ângulos, operado em 632,8nm (Wyatt Amanhecer DSP). Alíquotas de 0,2 ml foram retiradas durante a reação de despolimerização via ultrassom, com pipeta automática e completadas até 1mL com tampão. A solução tampão utilizada foi a de 0,066M de Na₂HPO₄(65%)/0,0066M de KH₂PO₄(35%), pH=7,1, para as amostras de ácido hialurônico e de alginato. O

tampão acetato de amônia 0,15M/ácido acético 0,2M, pH=4,5, foi usado como eluente para as amostras de quitosana. A configuração “on line” do cromatógrafo permitiu a determinação simultânea da concentração e da massa molar das alíquotas retirada durante reação de despolimerização via ultrassom. As medições de ângulo de contato forneceram resultados absolutos de massa molar média, desta maneira não foi necessária qualquer tipo de calibração ou utilização de padrões de referência. A coleta e o processamento dos dados foram realizados com o programa ASTRA 4.73.04 da Wyatt Technology Corporation.

14.5 Separação de Oligômeros por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A amostra de ácido hialurônico (AH10), de baixa massa molar, foi separada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O equipamento utilizado consistiu de uma coluna de vidro com 3,2cm de diâmetro interno e 100cm de altura, bomba de CLAE (Waters 510), refratômetro Gilson modelo 132 e coletor automático. A fase estacionária utilizada foi poliacrilamida (Bio-Gel P4/Bio-Rad) e a fase móvel foi o tampão (pH=7,1), 0,066M de Na_2HPO_4 (65%)/0,0066M de KH_2PO_4 (35%). As amostras foram coletadas em intervalos de 5mL em 5mL. Depois de coletadas as amostras foram analisadas por cromatografia de permeação em gel, como descrito no item 12.4.

15 RESULTADOS E DISCUSSÕES

15.1 Ácido Hialurônico

A fim de elucidar a despolimerização do ácido hialurônico induzida por ultrassom alta intensidade, os seguintes parâmetros foram estudados: concentração de polímero (Figura 71), temperatura da reação (Figura 72), frequência da irradiação de ultrassom (Figura 74) e geometria do reator (Figura 76).

Quando o ultrassom de alta intensidade é aplicado a uma solução de ácido hialurônico, de elevado $\overline{GPN}$ inicial ($\overline{GPN}_{(0)} \approx 3500$), uma rápida diminuição do grau de polimerização é observado nos primeiros tempos da reação ($t < 50 \text{ min.}$), seguido por uma cinética mais lenta (Figura 70). Para fins cinéticos, o efeito do ultrassom sobre as dimensões moleculares do ácido hialurônico foi expresso como a diferença entre o grau médio de polimerização numérico no tempo t , $1/\overline{GPN}_{(t)}$, e o do início da reação, $1/\overline{GPN}_{(0)}$. Por analogia com os resultados de MONTROLL (1941)¹⁶⁸ e os de POPA-NITA et al. (2011)¹¹⁶ relativas as reações de despolimerização química de sistemas polidispersos, podemos utilizar a Equação 17.

$$\frac{1}{\overline{GPN}_{(t)}} - \frac{1}{\overline{GPN}_{(0)}} = n^0 (1 - e^{-kt}) \text{ Equação 17}$$

Onde:

n_0 = fator pré-exponencial que representa a fração de ligações glicosídicas disponível para degradação.

k = constante de degradação

Todos os dados de constante de degradação (k) e do fator pré-exponencial (n_0) estão inseridos na Tabela 43.

Figura 70 - Evolução do grau médio de polimerização numérico *versus* o tempo de sonicação, para a despolimerização do ácido hialurônico (AH3).

Tabela 43 - Valores de fator pré-exponencial (n_0) e constante de velocidade de degradação (k) para todas as reações de degradação estudadas

Código	n_0	k (h^{-1})
AH1	0,015	0,120
AH2	0,015	0,190
AH3	0,014	0,180
AH4	0,011	0,160
AH5	0,010	0,185
AH6	0,035	0,083
AH7	0,013	0,178
AH8	0,014	0,180
AG	0,032	0,060
CH1	0,024	0,093
CH2	0,025	0,081

Considerando o impacto da concentração de ácido hialurônico na reação de despolimerização via ultrassom (Figura 71), percebemos inicialmente que com o aumento da concentração de ácido hialurônico a constante de velocidade também aumenta (Tabela 43), porém este aumento não é linear, pois para as concentrações de 0,10% e 0,25% os valores de k são praticamente constantes (Tabela 43). Os valores do fator pré-exponencial foram, praticamente os mesmos em cada caso, sugerindo que a fração de ligações glicosídicas disponível para degradação não é influenciada pela concentração de ácido hialurônico.

Figura 71 - Relação entre $1/GPn(t) - 1/GPn(0)$ versus o tempo de sonicação, para a variação da concentração de ácido hialurônico durante a reação de despolimerização via ultrassom, onde (■) 0,05%, (●) 0,10% e (▲) 0,25%.

A influência da temperatura (5, 25 e 45°C) para a hidrólise via ultrassom foi estudada (Figura 72). Os valores de k foram calculados usando a Equação 17 (Tabela 43), tais resultados revelaram que a variação da temperatura não afetou a constante de velocidade de degradação. De fato quando correlacionamos os resultados de k com a temperatura absoluta, gráfico de Arrhenius (Figura 73), percebemos que o efeito da degradação via ultrassom pode ser atribuído apenas as ondas mecânicas geradas e não pela temperatura da reação. Os valores do fator pré-exponencial diminuíram, de forma discreta, com a diminuição da temperatura, sugerindo que a fração de ligações glicosídicas disponível para degradação pode ser influenciada pela temperatura da reação.

Figura 72 - Relação entre $1/GPn(t) - 1/GPn(0)$ versus o tempo de sonicação, para a variação da temperatura durante a reação de despolimerização via ultrassom, onde (■) 25°C, (●) 45°C e (▲) 5°C.

Figura 73 - Gráfico de Arrhenius, mostrando a dependência da constante de velocidade da reação de despolimerização via ultrassom em função da temperatura absoluta ($1000/T$).

Através do estudo da variação da frequência do ultrassom de alta intensidade na cinética de despolimerização (Figura 74) foi possível determinar que a despolimerização é fortemente influenciada pela frequência. Os dados obtidos do fator pré-exponencial e da constante de velocidade de degradação (Tabela 43), revelaram que apesar de apresentar uma k baixa (0,083), quando utilizamos o ultrassom de 39KHz, o n_0 desta reação é elevado (0,035), desta maneira ácido hialurônico de baixa massa molar foi obtido quando utilizamos o ultrassom 39KHz em comparação com o de 20KHz, para os mesmos tempos de reação.

Quando comparamos a variação do $\overline{GPn}$ em função do índice de polidispersividade (I_p) das amostras, para quase todos os casos, observamos o padrão apresentado para amostra reação AH3, inicialmente temos a diminuição do I_p acompanhando a diminuição do $\overline{GPn}$ em seguida temos valores praticamente constantes de I_p , porém para os tempos elevados de despolimerização é evidenciado o aumento do I_p . A única exceção deste tipo de variação, considerando nossos experimentos, foi quando utilizamos o ultrassom de 39KHz (reação AH6), pois para tempos elevados ao invés de aumentar o I_p , tais valores diminuíram. No primeiro caso (reação AH3) este tipo de mecanismo já foi evidenciado na literatura¹¹⁶, pois para a quitosana existem dois mecanismos envolvidos na despolimerização via ultrassom, sendo que o primeiro conduz a uma rápida cisão das cadeias do polímero e uma diminuição da polidispersividade, e o segundo é responsável pela obtenção de cadeias poliméricas curtas e/ou oligômeros, com um aumento de polidispersividade. No caso da despolimerização do ácido hialurônico em todos os casos foi constatada a presença destes dois mecanismos de reação, porém no caso da reação AH6 o segundo mecanismo também é responsável pela obtenção de cadeias poliméricas curtas e/ou oligômeros, mas ao invés do aumento ocorre a diminuição da polidispersividade.

Figura 74 - Relação entre $1/GPn(t) - 1/GPn(0)$ versus o tempo de sonicação, para a variação da frequência do ultrassom durante a reação de despolimerização via ultrassom, onde (■)20KHz e (●)39KHz.

Figura 75 - Relação entre o $\log(GPn)$ versus o índice de polidispersividade (I_p), para a variação da frequência do ultrassom durante a reação de despolimerização via ultrassom, onde (■)20KHz e (●)39KHz.

A utilização de diferentes geometrias de reator (tronco-cônico e Erlenmeyer) tinha como foco otimizar a despolimerização do ácido hialurônico via ultrassom, porém através dos dados de k e n_0 (Tabela 43) observamos que a mudança na geometria do reator gera pouca influência na cinética de despolimerização (Figura 76).

Figura 76 - Relação entre $1/GPn(t)-1/GPn(0)$ versus o tempo de sonicação, para a variação do tipo de geometria do reator durante a reação de despolimerização via ultrassom, onde (■) reator tronco-cônico e (●) reator Erlenmeyer.

15.2 Quitosana

O estudo da cinética de despolimerização da quitosana via ultrassom, já foi descrito na literatura¹¹⁶, porém a variação do $\overline{GD}$ da quitosana ainda não havia sido investigada. Para realizar este estudo duas quitosanas com $\overline{GD}$ s diferentes (50% e 99%) foram utilizadas. Os resultados da cinética de despolimerização mostraram que independentemente do $\overline{GD}$ inicial da quitosana tanto o fator pré-exponencial quanto a constante de velocidade de degradação (Tabela 43) não são afetados.

Figura 77 - Relação entre $1/GPn(t) - 1/GPn(0)$ versus o tempo de sonicação, para a variação do grau médio de desacetilação da quitosana durante a reação de despolimerização via ultrassom, onde (■) $\overline{GD}=50\%$ e (●) $\overline{GD}=99\%$.

15.3 Alginato

As curvas de cinética de despolimerização via ultrassom para os três polímeros naturais (ácido hialurônico, alginato e quitosana) estão representadas na Figura 78. Através dos dados de k e n_0 para reações de cada polímeros (Tabela 43), observamos que o alginato é o polímero natural, dentre os três, que apresenta o maior valor do fator pré-exponencial ($n_0 = 0,032$), porém é aquele que apresenta menor constante de velocidade de degradação. O ácido hialurônico apresenta o maior valor de k (0,180), porém apresenta fator pré-exponencial baixo (0,014) em comparação com outros dois polímeros, os valores k (0,081) e n_0 (0,025) para a quitosana são intermediários aos de alginato e de ácido hialurônico.

Figura 78 - Relação entre $1/GPn(t) - 1/GPn(0)$ versus o tempo de sonicação para a variação do tipo de polímero natural utilizado durante a reação de despolimerização via ultrassom, onde (■) ácido hialurônico, (●) alginato e (▲) quitosana.

A despolimerização do ácido hialurônico e do alginato apresentam os dois tipos de mecanismos constatados para a quitosana¹¹⁶, porém durante o segundo mecanismo da cinética do ácido hialurônico e do alginato são obtidas cadeias poliméricas curtas e/ou oligômeros com índices de polidispersividade maiores do que os das quitosanas (Figura 79).

Figura 79 - Relação entre o log(GPn) versus o índice de polidispersividade (I_p), para a variação do tipo de polímero natural utilizado durante a reação de despolimerização via ultrassom, onde (■) ácido hialurônico, (●) alginato e (▲) quitosana.

15.4 Separação dos Oligômeros por CLAE

A amostra final da reação AH8 foi obtida pela sonicação da solução de ácido hialurônico durante 1140 minutos. A execução prolongada desta reação teve como finalidade a obtenção de uma amostra com baixa massa molar ($\overline{M}_w = 5,47 \text{g/mol } 10^3$), sendo considerada oligômero de ácido hialurônico. A separação dos oligômeros por CLAE e posterior análise das frações pela CPG, revelou que a despolimerização do ácido hialurônico via ultrassom ocorre de forma heterogênea, pois quando analisamos a curva cromatográfica da amostra de oligômero (AH8_T) e as suas 8 frações (Figura 80), observamos que a amostra de oligômero é formada por cadeias de diferentes tamanhos, que vão desde as maiores (AH8_F1) até as menores (AH8_F8).

Figura 80 - Curvas cromatográficas (CPG) do oligômero do ácido hialurônico e suas frações, obtidas pela CLAE.

Analisando os dados obtidos por CPG para a amostra de oligômero do ácido hialurônico e suas frações (Tabela 44), observamos que a fração de maior $\overline{M}_w$ (AH8_F1) é a que apresenta menor contribuição para a amostra (0,66%). As amostras AH8_F2 e AH8_F3 são as que estão em maior proporção no oligômero (49,23%) e apresentam $\overline{M}_w$ próximas a do valor do oligômero, porém os valores de I_p destas frações são maiores quando comparados com o do oligômero. As frações AH8_F4, AH8_F5 e AH8_F6 apresentam $\overline{M}_w$ menores e I_p próximos do oligômero, as últimas duas frações são as de menor $\overline{M}_w$, porém apresentam valores de I_p bem próximos 1,0, caracterizando tais amostras como sendo monodispersas, assim como a amostras AH8_F1.

Tabela 44 - Dados, obtidos pela CPG, de massa molar média ponderal ($\overline{M}_w$), índice de polidispersividade (I_p) e massa coletada, para a amostra de oligômero do ácido hialurônico e suas frações.

Fração	$\overline{M}_w$ (g/mol 10^3)	I_p	Massa (gx 10^{-5}) coletada no CPG	Massa (%)
AH8_T	5,47	1,100	-	-
AH8_F1	14,4	1,020	0,3	0,66
AH8_F2	5,73	1,180	9,0	19,26
AH8_F3	4,55	1,190	14,0	29,97
AH8_F4	3,00	1,100	7,0	14,98
AH8_F5	2,82	1,090	5,3	11,35
AH8_F6	2,87	1,085	4,4	9,42
AH8_F7	1,96	1,013	3,7	7,92
AH8_F8	1,15	1,031	3,0	6,42

16 CONCLUSÕES

Os dados da despolimerização via ultrassom do ácido hialurônico e do alginato, revelaram que, assim como para quitosana¹¹⁶, a cinética de despolimerização consiste em dois mecanismos. O primeiro mecanismo conduz a uma rápida cisão das cadeias do polímero e uma diminuição da polidispersividade, e o segundo é responsável pela obtenção de cadeias poliméricas curtas e/ou oligômeros, com um aumento de polidispersividade. Estes dois mecanismos foram observados para todos os casos, exceto quando utilizamos o ultrassom de 39KHz, pois na reação AH6 durante a atuação do segundo mecanismo ao invés do aumento ocorreu a diminuição do índice polidispersividade das cadeias poliméricas curtas e/ou oligômeros obtidos. A cinética de despolimerização via ultrassom para o ácido hialurônico, quitosana e alginato (Figura 78), apresentou algumas diferenças nas constantes de velocidade de degradação e no fator pré-exponencial para cada polímero. Estas diferenças estão relacionadas ao tipo de ligação que ocorre em cada um destes polímeros. A separação dos oligômeros de ácido hialurônico pela cromatografia líquida de alta eficiência revelou que o oligômero obtido no fim da reação ($t=1140\text{min.}$) apresentava variação heterogênea de sua massa molar e dos índices de polidispersividade (Tabela 44). A utilização do ultrassom de alta intensidade na cinética de despolimerização do ácido hialurônico, alginato e quitosana é uma ferramenta importante quando desejamos modificar as características estruturais ($\overline{GPn}$ e I_p) e por consequência as propriedades destes polímeros naturais.

17 QUITOSANAS COM CARACTERÍSTICAS CONTROLADAS

Durante a utilização do processo DAIUS e da despolimerização via ultrassom de alta intensidade várias amostras de quitosanas foram obtidas, com diferentes características estruturais (grau médio de desacetilação e grau médio de polimerização) como observado na Figura 81. As quitosanas obtidas através da desacetilação de beta-quitina via processo DAIUS (Grupos I, II e III-EC) apresentam elevada massa molar e grau médio de acetilação variado. As quitosanas obtidas a partir da despolimerização via ultrassom de alta intensidade (CH2), apresentam grande variação na massa molar, porém o grau médio de acetilação é constante para todas as amostras. Os círculos desenhados na Figura 81 representam aplicações específicas de quitosanas com tais características. As quitosanas com características compreendidas no círculo azul são de grande interesse para a agricultura¹⁶⁹, pois desempenham excelente papel na proteção das plantas. As quitosanas com características compreendidas no círculo amarelo são de grande interesse na área biomédica¹⁷⁰, pois apresentam função antimicrobiana.

Figura 81 - Quitosanas obtidas pelo uso do processo DAIUS: (■) Grupo I, (●) Grupo II e (▲) Grupo III – EC, e pela despolimerização via ultrassom de alta intensidade: (▼) CH2.

Como discutido por KUMIRSKA et al. (2011)¹⁷¹, a produção de quitosanas com características controladas é uma etapa importante para aplicação em biotecnologia. Os autores destacam que a massa molar média, o grau médio de acetilação e a distribuição das unidades GlcN e GlcNAc na cadeia polimérica, afetam a atuação das quitosanas em aplicações que explorem sua atividade antimicrobiana, antioxidante ou antitumoral, ou em liberação de fármacos, engenharia de tecidos, no efeito hipocolesterolêmico e na terapia do câncer¹⁷¹.

A utilização das duas técnicas, processo DAIUS e despolimerização via ultrassom, pode ser considerada como tendo o efeito de simbiose no sentido da obtenção de quitosanas com características controladas. Através do processo DAIUS é possível obter quitosanas de elevada massa molar e diferentes graus médios de acetilação. A despolimerização via ultrassom pode ser utilizada quando desejamos quitosanas com massas molares menores. Com o ajuste ideal dos parâmetros dos processos podemos obter diferentes tipos de quitosanas.

18 REFERÊNCIAS

- [1] MUZZARELLI, R. A. A.; BOUDRANT, J.; MEYER, D.; MANNO, N.; DEMARCHIS, M.; PAOLETTI, M. G. Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 995-1012, 2012.
- [2] ROBERTS, G. A. F. **Chitin chemistry**. London: The MacMillan, 1992. 350 p.
- [3] 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.
- [4] ROBERTS, G. A. F. Thirty years of progress in chitin and chitosan. **Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives**, v. 13, n. 3, p. 7-15, 2008.
- [5] RUIZ-HEREIRA, J.; RUIZ-MEDRANO, R. Chitin biosynthesis in fungi. In: DILIP, K.A. (Ed.). **Handbook of fungal biotechnology**. London: Taylor & Francis, 2003. v. 1, p. 435-447.
- [6] ZENG, J. B.; HE, Y. S.; LI, S. L.; WANG, Y. Z. Chitin whiskers: an overview. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 1, p. 1-11, 2012.
- [7] KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.
- [8] RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006.
- [9] PETER, M. G. Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. **Journal of Macromolecular Science - Pure and Applied Chemistry**, v. A32, n. 4, p. 629-640, 1995.
- [10] MERZENDORFER, H. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 24, p. 4393-4412, 2003.
- [11] KRAMER, J. K.; MERZENDORFER, H.; ARAKANE, Y.; MUTHUKRISHNAN, S. Chitin metabolism in insects. In: GILBERT, L.I. (Ed.). **Insect biochemistry and molecular biology**. San Diego: Academic Press, 2012. v. 1, p. 193-235.
- [12] KROON-BATENBURG, L. M.; KROON, J. The crystal and molecular structures of cellulose I and II. **Glycocojugate Journal**, v. 14, n. 5, p. 677-690, 1997.

- [13] INSTITUTO DE PESCA. **Informe da Produção Pesqueira Marinha e Estuarina do Estado de São Paulo**. 2011. Disponível em: <[ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/1012InformePMAP.pdf](http://ftp.sp.gov.br/ftppesca/1012InformePMAP.pdf)>. Acesso em: 27 mar. 2013.
- [14] SHAHIDI, F.; SYNOWIECKI, J. Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*). **Processing Discards Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 8, p. 1527-1532, 1991.
- [15] SPILLERE, L. C.; BEAUMORD, A. C. Formulação de uma hipótese global de situação de impacto para o parque industrial pesqueiro instalado SC. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 11, n. 4, p. 380-384, 2006.
- [16] FALCONE, D. M. B.; AGNELLI, J. A. M.; FARIA, L. I. L. Panorama setorial e perspectivas na área de polímeros biodegradáveis. **Polimeros: Ciência e Tecnologia**, v. 17, n. 1, p. 5-9, 2007.
- [17] SIGMA ALDRICH. **Chitin from shrimp shells**. 2013. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c7170?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 21 mar. 2013.
- [18] MATHUR, N. K.; NARANG, C. K. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. **Journal of Chemical Education**, v. 67, n. 11, p. 938-942, 1990.
- [19] CAMPANA FILHO, S. P.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R. L. Extração, estruturas e propriedades de α - e β -quitina. **Química nova**, v. 30, n. 3, p. 644-650, 2007.
- [20] SIGNINI, R. **Estudos de obtenção, purificação e caracterização de quitosana**. 1998. 110 f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1998.
- [21] HIRANO, S. Chitin and chitosan. In: GERHARTS, W. (Ed.). **Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry**. New York: VCH, 1986. v. A6, p. 231-232.
- [22] CHAUSSARD, G.; DOMARD, A. New aspects of the extraction of chitin from squid pens. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 2, p. 559-564, 2004.
- [23] SINI, T. K.; SANTHOSH, S.; MATHEW, P. T. Study on the production of chitin and chitosan from shrimp shell by using *Bacillus subtilis* fermentation. **Carbohydrate Research**, v. 342, n. 16, p. 2423-9, 2007.

- [24] NO, H. K.; MEYERS, S. P.; LEE, K. S. Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, n. 3, p. 575-579, 1989.
- [25] NO, H. K.; MEYERS, S. P. Preparation and characterization of chitin and chitosan a review. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 4, n. 2, p. 27-52, 1995.
- [26] WANG, S. L.; CHIO, S. H. Deproteinization of shrimp and crab shell with the protease of *Pseudomonas aeruginosa* K-187. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, n. 7, p. 629-633, 1998.
- [27] 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.
- [28] ACOSTA, N.; JIMENEZ, C.; BORAU, V.; HERAS, A. Extraction and characterization of chitin from crustaceans. **Biomass and Bioenergy**, v. 5, n. 2, p. 145-153, 1993.
- [29] 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.
- [30] BLACKWEL, J. Structure of beta-chitin or parallel chain systems of poly- beta- (1 $\rightarrow$ 4)-N-acetyl-D-glucosamine. **Biopolymers**, v. 7, n. 3, p. 281-298, 1969.
- [31] GARDNER, K. H.; BLACKWELL, J. Refinement of structure of Beta-chitin. **Biopolymers**, v. 14, n. 8, p. 1581-1595, 1975.
- [32] MUZZARELLI, A. A. Chitin. In: MARK, H.F.;BIKALES, N.M.;OVERBERGER, C.G.;MENGES, G. (Ed.). **Encyclopedia of polymers science engeneering**. New York: John Wiley, 1985. v. 2, p. 430-441
- [33] MINKE, R.; BLACKWELL, J. The Structure of α -chitin. **Journal of Molecular Biology**, v. 120, n. 2, p. 167-181, 1978.
- [34] KURITA, K.; TOMITA, K.; ISHI, S.; NISHIMURA, S. I.; SHIMODA, K. β -chitin as a convenient starting material for acetolysis for efficient preparation of N-acetylchitooligosaccharides. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 31, n. 9, p. 2393-2395, 1993.

- [35] 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.
- [36] LAMARQUE, G.; VITON, C.; DOMARD, A. Comparative study of the first heterogeneous deacetylation of α - and β -chitins in a multistep process. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 3, p. 992-1001, 2004.
- [37] LAMARQUE, G.; VITON, C.; DOMARD, A. Comparative study of the second and third heterogeneous deacetylations of α - and β -chitins in a multistep process. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 5, p. 1899-1907, 2004.
- [38] SAITO, Y.; PUTAUX, J.-L.; OKANO, T.; GAILL, F.; CHANZY, H. Structural aspects of the swelling of β -chitin in HCl and its conversion into α -chitin. **Macromolecules**, v. 30, n. 14, p. 3867-3873, 1997.
- [39] SAITO, Y.; KUMAGAI, H.; WADA, M.; KUGA, S. Thermally reversible hydration of β -chitin. **Biomacromolecules**, v. 3, n. 3, p. 407-410, 2002.
- [40] HACKMAN, R. H.; GOLDBERG, M. Studies on chitin: VI. The nature of alfa- and beta-chitins. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 18, n. 4, p. 935-946, 1965.
- [41] RATHKE, T. D.; HUDSON, S. M. Review of chitin and chitosan as fiber and film formers. **Review in Macromolecular Chemistry and Physics**, v. C34, n. 3, p. 375-437, 1994.
- [42] GAILL, F.; PERSSON, J.; SUGIYAMA, J.; VUONG, R.; TANNER, S.; CHANZY, H. Beta-chitin from deep sea hydrothermal vent worms. In: BRINE, C.J.; SANDFORD, P.A.; ZIKAKIS, J.P. (Ed.). **Advances in chitin and chitosan**. London: Elsevier Applied Science, 1992. v. 1, p. 216-224.
- [43] WEIMARN, P. P. V. Conversion of fibroin, chitin, casein, and similar substances into the ropy-plastic state and colloidal solution. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 109-110, 1926.
- [44] STRIEGEL, A. M. Theory and applications of DMAc/LiCl in the analysis of polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 34, n. 4, p. 267-274, 1997.
- [45] POIRIER, M.; CHARLET, G. Chitin fractionation and characterization in N,N-dimethylacetamide/lithium chloride solvent system. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, n. 4, p. 363-370, 2002.

- [46] MARTHUR, N. K.; NARANG, C. K. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. **Journal of Chemical Education**, v. 67, n. 11, p. 938-942, 1990.
- [47] SANTOS, J. E.; SOARES, J. P.; DOCKAL, E. R.; CAMPANA-FILHO, S. P.; CAVALHEIRO, E. T. G. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polimeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.
- [48] SIGNINI, R.; CAMPANA-FILHO, S. P. Características e propriedades de quitosanas purificadas nas formas neutra, acetato e cloridrato. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, n. 2, p. 58-64, 2001.
- [49] KUMAR, M. N. V. R.; MUZZARELLI, R. A. A.; MUZZARELLI, C.; SASHIWA, H.; DOMB, A. J. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 12, p. 6017-6084, 2004.
- [50] YONG-WOO, C.; JINHO, J.; CHONG, R. P.; SOHK-WON, K. Preparation and solubility in acid and water of partially deacetylated chitins. **Biomacromolecules**, v. 1, n. 4, p. 609-614, 2000.
- [51] SIGNINI, R.; DESBRIÈRES, J.; CAMPANA FILHO, S. P. On the stiffness of chitosan hydrochloride in acid-free aqueous solutions. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, n. 4, p. 351-357, 2000.
- [52] BÉGIN, A.; VAN CALSTEREN, M.-R. Antimicrobial films produced from chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 26, n. 1, p. 63-67, 1999.
- [53] RUEL-GARIÉPY, E.; CHENITE, A.; CHAPUT, C.; GUIRGUIS, S.; LEROUX, J.-C. Characterization of thermosensitive chitosan gels for the sustained delivery of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 203, n. 1, p. 89-98, 2000.
- [54] GILDBERG, A.; STENBERG, E. A new process for advanced utilisation of shrimp waste. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 8, p. 809-812, 2001.
- [55] OUNGBHO, K.; MÜLLER, B. W. Chitosan sponges as sustained release drug carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 156, n. 2, p. 229-237, 1997.
- [56] SELMER-OLSEN, E.; RATNAWEERA, H. C.; PEHRSON, R. A novel treatment process for dairy wastewater with chitosan produced from shrimp-shell waste. **Water Science Technology**, v. 34, n. 11, p. 33-40, 1996.
- [57] ASSIS, O. B. G.; ALVES, H. C. Metodologia mínima para a produção de filmes comestíveis de quitosana e avaliação preliminar de seu uso como revestimento protetor em maçãs cortadas. **Embrapa Instrumentação Agropecuária Comunicado Técnico**, v. 49, n. 1, 2002.

- [58] LI, Q.; DUNN, E. T.; GRANDMAISON, E. W.; GOOSEN, M. F. Applications and Properties of Chitosan. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 7, n. 4, p. 370-397, 1992.
- [59] KANDRA, P.; CHALLA, M. M.; JYOTHI, H. K. Efficient use of shrimp waste: present and future trends. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 1, p. 17-29, 2012.
- [60] FELT, O.; BURI, P.; GURNY, R. Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, n. 11, p. 979-993, 1998.
- [61] SHIBUYA, N.; MINAMI, E. Oligosaccharide signalling for defense responses in plant. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 59, n. 3, p. 223-233, 2001.
- [62] ALPAR, H. O.; EYLES, J. E.; WILLIAMSON, E. D.; SOMAVARAPU, S. Intranasal vaccination against plague, tetanus and diphtheria. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 51, n. 1, p. 173-201, 2001.
- [63] THANOU, M.; VERHOEF, J. C.; JUNGINGER, H. E. Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 52, n. 2, p. 117-126, 2001.
- [64] ALONSO, M. J.; SANCHEZ, A. The potential of chitosan in ocular drug delivery. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 55, n. 11, p. 1451-63, 2003.
- [65] HEJAZI, R.; AMIJI, M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 89, n. 2, p. 151-165, 2003.
- [66] THARANATHAN, R. N.; KITTUR, F. S. Chitin - The undisputed biomolecule of great potential. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 1, p. 61-87, 2003.
- [67] SINHA, V. R.; SINGLA, A. K.; WADHAWAN, S.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; BANSAL, K.; DHAWAN, S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 274, n. 1-2, p. 1-33, 2004.
- [68] AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 100, n. 1, p. 5-28, 2004.
- [69] KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2-3, p. 126-139, 2004.

[70] SENEL, S.; MCCLURE, S. J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 10, p. 1467-1480, 2004.

[71] 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, n. 1, p. 108-118, 2006.

[72] 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.

[73] KIM, I. Y.; SEO, S. J.; MOON, H. S.; YOO, M. K.; PARK, I. Y.; KIM, B. C.; CHO, C. S. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 1, p. 1-21, 2008.

[74] BHATNAGAR, A.; SILLANPAA, M. Applications of chitin- and chitosan-derivatives for the detoxification of water and wastewater--a short review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 152, n. 1-2, p. 26-38, 2009.

[75] EL HADRAMI, A.; ADAM, L. R.; EL HADRAMI, I.; DAAYF, F. Chitosan in plant protection. **Mar Drugs**, v. 8, n. 4, p. 968-87, 2010.

[76] ALISHAHI, A.; AİDER, M. Applications of chitosan in the seafood industry and aquaculture: a review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 3, p. 817-830, 2011.

[77] PILLAI, C. K. S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science**, v. 34, n. 7, p. 641-678, 2009.

[78] KHOR, E. Chitin: a biomaterial in waiting. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 6, n. 4, p. 313-317, 2002.

[79] CAVALHEIRO, É. T. G.; CAVALHEIRO, C. C. S.; CAMPANA FILHO, S. P. Chitosan-Schiff bases: preparation and current applications in research and developments on chitin and chitosan. In: JAYAKUMAR, R.; PRABAHARAN (Ed.). **Current research and developments on chitin and chitosan in biomaterials science**. Kerala: Research Signpost, 2009. v. 2, p. 89-106.

[80] ABREU, F. R.; CURTI, E.; BRITTO, D.; CARDOSO, M. B.; CAVALHEIRO, É. T. G.; CAMPANA FILHO, S. P. Polyelectrolyte derivatives of chitosan: Preparation and characterization of N,N,N-trimethylchitosan and N,O-carboxymethylchitosan. In: JAYAKUMAR, R.; PRABAHARAN, M. (Ed.). **Current research and developments on Chitin and Chitosan in Biomaterials Science**. Kerala: Research Signpost, 2009. v. 2, p. 107-121.

- [81] CHANG, K. L. B.; TSAI, G.; LEE, J.; FU, W. R. Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution. **Carbohydrate Polymers**, v. 303, n. 3, p. 327-332, 1997.
- [82] SANNAN, T.; KURITA, K.; IWAKURA, Y. Studies on chitin, 1. Solubility change by alkaline treatment and film casting. **Die Makromolekulare Chemie**, v. 176, n. 4, p. 1191-1195, 1975.
- [83] 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, n. 5, p. 933, 1998.
- [84] FOCHER, B.; BELTRAME, P. L.; NAGGI, A.; TORRI, G. Alkaline N-deacetylation of chitin enhanced by flash treatments. Reaction kinetics and structure modifications. **Carbohydrate Polymers**, v. 12, n. 4, p. 405-418, 1990.
- [85] CAMPANA FILHO, S. P.; SIGNINI, R.; CARDOSO, M. B. Effects of sonication on the reactivity of chitin towards its deacetylation. **International Journal of Polymeric Materials**, v. 51, n. 8, p. 695-700, 2002.
- [86] 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.
- [87] SAHU, A.; GOSWAMI, P.; BORA, U. Microwave mediated rapid synthesis of chitosan. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 1, p. 171-5, 2009.
- [88] 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, n. 8, p. 701-709, 2002.
- [89] LAMARQUE, G.; CRETENET, M.; VITON, C.; DOMARD, A. New route of deacetylation of α - and β -Chitins by means of freeze-pump out-thaw cycles. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 3, p. 1380-1388, 2005.
- [90] LAMARQUE, G.; CHAUSSARD, G.; DOMARD, A. Thermodynamic aspects of the heterogeneous deacetylation of β -chitin: reaction mechanisms. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 6, p. 1942-1950, 2007.
- [91] SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S. P. Purificação e caracterização de quitosana comercial. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 8, n. 4, p. 63-68, 1998.
- [92] SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S. P. On the preparation and characterization of chitosan hydrochloride. **Polymer Bulletin**, v. 42, n. 2, p. 159-166, 1999.

[93] CAMPANA FILHO, S. P.; SIGNINI, R. Efeito de aditivos na desacetilação de quitina. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, n. 4, p. 169-173, 2001.

[94] GOY, R. C.; ASSIS, O. B.; CAMPANA FILHO, S. P. Produção de esferas de quitosana. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 33, n. 4, p. 30-34, 2004.

[95] BRITTO, D.; CAMPANA FILHO, S. P.; ASSIS, O. B. Mechanical properties of N,N,N-trimethylchitosan chloride films. **Polimeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 2, p. 129-132, 2005.

[96] ABREU, F. R.; CAMPANA FILHO, S. P. Preparation and characterization of carboxymethylchitosan. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 2, p. 79-83, 2005.

[97] 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, n. 2, p. 183-190, 2001.

[98] DELEZUK, J. A. D. M. **Desacetilação de beta-quitina por ultra-som de alta intensidade: Estudo dos efeitos da amplitude e do tempo de irradiação e da temperatura da reação**. 2009. 108 f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos/SP, 2009.

[99] CAMPANA-FILHO, S. P.; DELEZUK, J. A. D. M.; CARDOSO, M. B.; DOMARD, A. **Processo para preparação de quitosana por meio de desacetilação de quitina**. BR PI0901825-5A2, 04 maio 2009.

[100] MASON, T. J. **Sonochemistry**: the uses of ultrasound in chemistry. London: The Royal Society of Chemistry, 1990. 151 p.

[101] SHINGARE, M. S.; SHINGATE, B. B. Ultrasound in synthetic applications and organic chemistry. In: MUDHOO, A. (Ed.). **Handbook on applications of ultrasound**. New York: CRC, 2011. v. 1, p. 213-261.

[102] MOJTAHEDI, M. M.; ABAEE, M. S. Ultrasound applications in synthetic organic chemistry. In: MUDHOO, A. (Ed.). **Handbook on applications of ultrasound**. New York: CRC, 2011. v. 1, p. 281-321.

[103] TEO, B. M.; GRIESER, F.; ASHOKKUMAR, M. Applications of ultrasound to polymer synthesis. In: MUDHOO, A. (Ed.). **Handbook on applications of ultrasound**. New York: CRC, 2011. v. 1, p. 475-500.

- [104] KUJIPERS, M. W. A.; KEMMERE, M. F.; KEURENTJES, J. T. F. **Ultrasound-induced polymerisation and depolymerisation**. 2000. Disponível em: <http://w3.tue.nl/fileadmin/st/SPD/Poster_Martijn.pdf>. Acesso em: 27 mar. 2013.
- [105] RATOARINORO, F. C.; WILHELM, A. M.; BERLAN, J.; DELMAS, H. Activation of a solid-liquid chemical reaction by ultrasound. **Chemical Engineering Science**, v. 50, n. 3, p. 554-558, 1995.
- [106] LUCHE, J.-L. Sonochemical activation in organic synthesis. Part 1. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris**, v. 28, n. 8, p. 203-213, 1996.
- [107] GONZE, E.; FOUREL, L.; GONTHIER, Y.; BOLDO, P.; BERNIS, A. Wastewater pretreatment with ultrasonic irradiation to reduce toxicity. **Chemical Engineering Journal**, v. 73, n. 2, p. 93-100, 1999.
- [108] SUSLICK, K. S.; PRICE, G. J. Applications of ultrasound to materials chemistry. **Annual Review of Materials Science**, v. 29, n. 1, p. 295-326, 1999.
- [109] BROCHETTE-LEMOINE, S.; TROMBOTTO, S.; JOANNARD, D.; DESCOTES, G.; BOUCHU, A.; QUENEAU, Y. Ultrasound in carbohydrate chemistry: sonophysical glucose oligomerisation and sonocatalysed sucrose oxidation. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 7, n. 4, p. 157-161, 2000.
- [110] MARTINES, M. A. U.; DAVOLOS, M. R.; JAFELICCI JÚNIOR, M. O efeito do ultra-som em reações químicas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 251-256, 2000.
- [111] PRICE, G. J. Recent developments in sonochemical polymerisation. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 10, n. 4-5, p. 277-283, 2003.
- [112] STAVARACHE, C.; VINATORU, M.; MAEDA, Y. Aspects of ultrasonically assisted transesterification of various vegetable oils with methanol. **Ultrason Sonochem**, v. 14, n. 3, p. 380-6, 2007.
- [113] FARROQ, R. Applications of sonochemistry in pharmaceutical sciences. In: MUDHOO, A. (Ed.). **Handbook on applications of ultrasound**. New York: CRC, 2011. v. 1, p. 97-104.
- [114] SUSLICK, K. S.; HAMMERTON, D. A.; CLINE JR., R. E. The sonochemical hot spot. **Journal of the American Chemical Society**, v. 108, n. 18, p. 5641-5642, 1986.
- [115] KARDOS, N.; LUCHE, J.-L. Sonochemistry of carbohydrate compounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 332, n. 2, p. 115-131, 2001.

- [116] POPA-NITA, S.; LUCAS, J. M.; LADAVIERE, C.; DAVID, L.; DOMARD, A. Mechanisms involved during the ultrasonically induced depolymerization of chitosan: characterization and control. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 5, p. 1203-11, 2009.
- [117] PRICE, G. J.; SMITH, P. F. Ultrasonic degradation of polymer solutions. 2. The effect of temperature, ultrasound intensity and dissolved gases on polystyrene in toluene. **Polymer**, v. 34, n. 19, p. 4111-4117, 1992.
- [118] TAKAHASHI, Y.; MIKI, F.; NAGASE, K. Effect of sonolysis on acid degradation of chitin to form oligosaccharides. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 68, n. 7, p. 1851-1857, 1995.
- [119] MACHOVÁ, E.; KOGAN, G.; CHORVATOVICOVA, D.; SANDULA, J. Ultrasonics depolymerization of the chitin-glucan complex from *Aspergillus niger* and antimutagenic activity of its product. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 6, n. 1-2, p. 111-114, 1999.
- [120] CZECHOWSKA-BISKUP, R.; ROKITA, B.; LOTFY, S.; ULANSKI, P.; ROSIAK, J. M. Degradation of chitosan and starch by 360-kHz ultrasound. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, n. 2, p. 175-184, 2005.
- [121] KASAAI, M. R.; ARUL, J.; CHARLET, G. Fragmentation of chitosan by ultrasonic irradiation. **Ultrason Sonochem**, v. 15, n. 6, p. 1001-8, 2008.
- [122] DARABOINA, N.; MADRAS, G. Kinetics of the ultrasonic degradation of poly (alkyl methacrylates). **Ultrason Sonochem**, v. 16, n. 2, p. 273-9, 2009.
- [123] PRICE, G. J.; WHITE, A. J.; CLIFTON, A. A. The effect of high-intensity ultrasound on solid polymers. **Polymer**, v. 36, n. 26, p. 4919-4925, 1995.
- [124] COBLEY, A.; MASON, T. J.; PANIWNKY, L.; SAEZ, V. Aspects of ultrasound and materials science. In: MUDHOO, A. (Ed.). **Handbook on applications of ultrasound**. New York: CRC, 2011. v. 1, p. 41-73.
- [125] PETERS, D. Ultrasound in materials chemistry. **Journal of Materials Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 1605-1618, 1996.
- [126] CRAVOTTO, G.; CINTAS, P. Introduction to sonochemistry: a historical and conceptual overview. In: MUDHOO, A. (Ed.). **Handbook on applications of ultrasound**. New York: CRC, 2011. v. 1, p. 23-40.
- [127] BIZZI, C. A.; MÜLLER, E. I.; FLORES, E. M. M.; DUARTE, F. A.; KORN, M.; NUNES, M. A. G.; MELLO, P. A.; DRESSLER, V. L. Ultrasound-assisted industrial synthesis and processes. In: MUDHOO, A. (Ed.). **Handbook on applications of ultrasound**. New York: CRC, 2011. v. 1, p. 535-580.

[128] PARADKAR, A.; DHUMAL, R. Ultrasound-assisted particle engineering. In: MUDHOO, A. (Ed.). **Handbook on applications of ultrasound**. New York: CRC, 2011. v. 1, p. 75-96.

[129] CINTAS, P.; CRAVOTTO, G.; CANALS, A. Combined ultrasound–microwave technologies. In: MUDHOO, A. (Ed.). **Handbook on applications of ultrasound**. New York: CRC, 2011. v. 1, p. 659-673.

[130] YASUDA, K.; KODA, S. Development of sonochemical reactor. In: MUDHOO, A. (Ed.). **Handbook on applications of ultrasound**. New York: CRC, 2011. v. 1, p. 581-597.

[131] ESTAGER, J. Integrating ultrasound with other green technologies: toward sustainable chemistry. In: MUDHOO, A. (Ed.). **Handbook on applications of ultrasound**. New York: CRC, 2011. v. 1, p. 675-696.

[132] MOHOLKAR, V. S.; SIVASANKAR, T.; NALAJALA, S. Mechanistic aspects of ultrasound-enhanced physical and chemical processes. In: MUDHOO, A. (Ed.). **Handbook on applications of ultrasound**. New York: CRC, 2011. v. 1, p. 502-533.

[133] POLLET, B. G.; HIHN, J.-Y. Sonoelectrochemistry: from theory to applications. In: MUDHOO, A. (Ed.). **Handbook on applications of ultrasound**. New York: CRC, 2011. v. 1, p. 623-657.

[134] HIHN, J.-Y.; DOCHE, M.-L.; MANDROYAN, L. H.; POLLET, B. G. Ultrasound for better reactor design: how chemical engineering tools can help sonoreactor characterization and scale-up. In: MUDHOO, A. (Ed.). **Handbook on applications of ultrasound**. New York: CRC, 2011. v. 1, p. 599-622.

[135] CELLA, R. Ultrasound in synthetic applications and organic chemistry. In: MUDHOO, A. (Ed.). **Handbook on applications of ultrasound**. New York: CRC, 2011. v. 1, p. 263-279.

[136] DADRAS, S.; TORKAMANY, M. J.; SABBAGHZADEH, J. Ultrasound-assisted synthesis of nanomaterials. In: MUDHOO, A. (Ed.). **Handbook on applications of ultrasound**. New York: CRC 2011. v. 1, p. 105-127.

[137] 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. v. 1, p. 188-195.

[138] LAVAL, R. L.; ASSIS, O. B. G.; CAMPANA FILHO, S. P. β -Chitin from the pens of *Loligo* sp.: extraction and characterization. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 13, p. 2465-2472, 2007.

- [139] CARDOSO, M. B. **Contribuição ao estudo da reação de desacetilação de quitina: Estudos da desacetilação assistida por ultra-som de alta potência.** 2008. 96 f. Tese (Doutorado em Físico-Química) - Departamento de Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
- [140] TEOFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para calculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.
- [141] HIRAI, A.; ODANI, H.; NAKAJIMA, A. Determination of degree of deacetylation of chitosan by ^1H NMR spectroscopy. **Polymer Bulletin**, v. 26, n. 1, p. 87-94, 1991.
- [142] VARUM, 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, n. 1, p. 17-23, 1990.
- [143] VEIGA, S. C. P. **Estudos físico-químicos de N-acetilação de quitosanas em meio homogêneo.** 2011. 100 f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2011.
- [144] 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.
- [145] VARUM, K. M.; ANTHONSEN, M. W.; GRASDALEN, H.; SMIDSRØD, O. ^{13}C -N.m.r. studies of the acetylation sequences in partially N-deacetylated chitins (chitosans). **Carbohydrate Research**, v. 217, n. 1, p. 19-27, 1991.
- [146] 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. **Journal Marine Drugs**, v. 8, n. 1, p. 1567-1636, 2010.
- [147] AIBA, S. Studies on chitosan: 3. Evidence for the presence of random and block copolymer structures in partially N-acetylated chitosans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 13, n. 1, p. 40-44, 1991.
- [148] HUGGINS, M. The viscosity of dilute solutions of long-chain molecules. IV. Dependence on concentration. **Journal of the American Chemical Society**, v. 64, n. 1, p. 2716-2718, 1942.
- [149] SLADE JUNIOR, P. E. Polymer molecular weights. Part II. In: SLADE JUNIOR, P.E.; JENKINS, L.T. (Ed.). **Techniques and methods of polymer evaluation** . New York: Marcel Dekker, 1975. v. 1, p. 592.

- [150] SEYMOR, R. B. **Polymer chemistry**. New York: Marcel Dekker, 1988. 690 p.
- [151] FLORY, P. J. **Principles of polymer chemistry**. New York: Cornell University 1953. 672 p.
- [152] RINAUDO, M.; MILAS, M.; DUNG, P. L. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 15, n. 3, p. 281-285, 1993.
- [153] TERBOJEVICH, M.; CARRARO, C.; COSANI, A. Solution studies of the chitin lithium chloride-nn-di-methylacetamide system. **Carbohydrate Polymers**, v. 180, n. 1, p. 73-86, 1988.
- [154] KULICKE, W.-M.; CLASEN, C. **Viscosimetry of polymers and polyelectrolytes**. Hamburg: Springer, 2004 . 120 p.
- [155] DIAS, F. C. **Uso do software Image j para análise quantitativa de imagens de microestruturas de materiais**. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia), INPE, São José dos Campos, 2008.
- [156] CARASCHI, J. C.; CAMPANA FILHO, S. P.; CURVELO, A. A. Preparação e caracterização de polpas obtidas da dissolução a partir de bagaço de cana-de-açúcar. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 3, n. 5, p. 24-29, 1996.
- [157] STRUSZCZYK, H. Microcrystalline chitosan. I. Preparation and properties of microcrystalline chitosan. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 33, n. 1, p. 177-189, 1987.
- [158] CARDOSO, M. B. **Estudo dos efeitos da irradiação de quitina com ultrassom sobre sua desacetilação**. 2003. 67 f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) - Departamento de Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.
- [159] PEARSON, F. G.; MARCHESSAULT, R. H.; LIANG, C. Y. Infrared spectra of crystalline polysaccharides. **Journal of Polymer Science**, v. 43, n. 141, p. 101-116, 1960.
- [160] FOCHER, B.; NAGGI, A.; TORRI, G.; COSANI, A.; TERBOJEVICH, M. Structural differences between chitin polymorphs and their precipitates from solutions - evidence from CP-MAS ¹³C-NMR, FT-IR and FT-Raman spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 17, n. 1, p. 97-102, 1992.
- [161] KURITA, K.; KAJI, Y.; MORI, T.; NISHIYAMA, Y. Enzymatic degradation of β-chitin: susceptibility and the influence of deacetylation. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, n. 1, p. 19-21, 2000.

- [162] METHACANON, P.; PRASITSILP, M.; POTHISREE, T.; PATTARAARCHACHAI, J. Heterogeneous N-deacetylation of squid chitin in alkaline solution. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, n. 1, p. 119-123, 2003.
- [163] NECAS, J.; BARTOSIKOVA, L.; BRAUNER, P.; J., K. Hyaluronic acid (hyaluronan) a review. **Veterinarni Medicina**, v. 53, n. 8, p. 397-411, 2008.
- [164] LAPCIK, L. J.; LAPCIK, L. Hyaluronan Preparation, structure, properties, and applications. **Chemical reviews**, v. 98, n. 8, p. 2662-2684, 1998.
- [165] BEASLEY, K. L.; WEISS, M. A.; WEISS, R. A. Hyaluronic acid fillers: a comprehensive review. **Facial Plast Surg**, v. 25, n. 2, p. 86-94, 2009.
- [166] GACESA, P. Alginates. **Carbohydrate Polymers**, v. 8, n. 1, p. 161-182, 1988.
- [167] QIN, Y. Alginate fibres: an overview of the production processes and applications in wound management. **Polymer International**, v. 57, n. 2, p. 171-180, 2008.
- [168] MONTROLL, E. Molecular size distributions and depolymerization reactions in polydisperse systems. **Journal of American Chemical Society**, v. 63, n. 5, p. 1215-1220, 1941.
- [169] EL GUEDDARI, N. E.; KOLKENBROCK, S.; SCHAAF, A.; CHILUKOTI, N.; BRUNEL, F.; GORZELANNY, C.; FEHSE, S.; CHACHRA, S.; BERNARD, F.; NAMPALLY, M.; KALAGARA, T.; IHMOR, P.; MOERSCHBACHER, B. M. Chitin and chitosan modifying enzymes: versatile novel tools for the analysis of structure-function relationships of partially acetylated chitosans In: CAMPANA FILHO, S.P. (Ed.). **Advances in Chitin Science**, Fortaleza : European Chitin Society, 2013. v. 14.
- [170] MOERSCHBACHER, B. M. Bio-activity matrices of chitosans in plant protection. In: GNANAMANICKAM, S.S.; BALASUBRAMANIAN, R.; ANAND, N. (Ed.). **Emerging Trends in Plant-Microbe Interactions**, Chennai: University of Madras, 2005. v. 1, p. 186-190.
- [171] KUMIRSKA, J.; WEINHOLD, M. X.; CZERWICKA, M.; KACZYŃSKI, Z.; BYCHOWSKA, A.; BRZOZOWSKI, K.; THÖMING, J.; STEPNOWSKI, P. Biomedical activity of chitin/chitosan based materials-influence of physicochemical properties apart from molecular weight and degree of N-acetylation. In: LASKOVSKI, A. (Ed.). **Biomedical Engineering, Trends in Materials Science**. London: Interchopen, 2011. v. 1, p. 25-64.