

AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Processos de obtenção e caracterização físico-química de quitinas e quitosanas extraídas dos rejeitos da indústria pesqueira da região de Cananéia - SP

Ana Carolina Moreira Fonseca

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientador:

Prof. Dr. Nelson Batista de Lima

São Paulo 2016

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES Autarquia associada à Universidade de São Paulo

Processos de obtenção e caracterização físico-química de quitinas e quitosanas extraídas dos rejeitos da indústria pesqueira da região de Cananéia - SP

Ana Carolina Moreira Fonseca

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientador:

Prof. Dr. Nelson Batista de Lima

Versão Corrigida Versão Original disponível no IPEN

> São Paulo 2016

Dedico esse trabalho

À Força divina que nos rege.

Aos meus pais Lena e Luiz, por tudo que representam para mim e pelos ensinamentos, sem os quais eu não poderia existir.

Aos meus queridos irmãos Celso e Jonathan.

Às minhas avós Ana e Maria

Ao meu amado sobrinho e filho por Deus, Guilherme.

AGRADECIMENTOS

Ao querido Eng° Antônio Bettega pela amizade, apoio e pela proposta de estudar quitina e quitosana.

Ao meu orientador Prof. Dr. Nelson Batista de Lima pela oportunidade de executar esse trabalho.

Ao IPEN pela oportunidade e infraestrutura concedidas para o desenvolvimento desse trabalho.

À Fundação Pátria pelo apoio financeiro.

À Tríade Soluções em Resíduos Ltda. pelas cascas de camarão e ao Nilton pela atenção.

Ao CCTM e colegas por todo apoio.

Aos professores e mestres do IPEN pelos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Ademar Benévolo Lugão e aos colegas do CQMA pelo apoio e disponibilidade dos seus laboratórios e infraestrutura.

Ao Dr. Francisco Braga pelo apoio e espaço cedido para a execução da parte prática do trabalho.

À Prof. Dra. Olga Zazuco Higa pelos ensinamentos e pelo exemplo de pesquisadora.

Ao Dr. Valter Ussui pelo apoio e pelas ideias valiosas.

Ao Prof. Dr. Antônio Augusto Couto pelos ensinamentos e apoio.

À Prof. Dra. Dolores Ribeiro Ricci Lazar pelos ensinamentos, pelo apoio e por toda gentileza.

Ao Dr. Marcos Antônio Scapin pela disponibilidade e pelas análises de FRX.

Ao Olandir pela disponibilidade.

À Ana Cláudia Martinelli Feher pela disponibilidade e paciência em resolver meus problemas com burocracia.

Aos colegas do laboratório de DRX René, Carolline e Glaicy pelo apoio e amizade.

Aos colegas do laboratório de Biomateriais do CQMA pelo apoio e amizade.

À Prof. Dr. Zélia Ludwig pelos ensinamentos e pelo incentivo em fazer o mestrado no IPEN.

Aos meus queridos alunos que contribuíram muito para meu aprendizado enquanto eu tentava os ensinar.

À Eng.^a Luiza Morikawa, ao Sr. Francisco Canto e aos colegas de trabalho pela convivência e apoio durante este período.

Aos meus familiares e amigos pelo apoio.

Ao meu querido e amado Jorge Gabriel dos Santos Batista pelas suas contribuições, paciência, cumplicidade, apoio e carinho.

A todos que passaram pelo meu caminho e de alguma maneira contribuíram para a execução desse trabalho o meu muito obrigada!

Não existe nenhum caminho lógico para o descobrimento das leis elementares. O único caminho é o da intuição.

Albert Einstein

Amai ao próximo como a si mesmo.

Jesus Cristo

Perceber que copiar a Natureza é muito mais difícil do que parece me faz ser reverente a ela e não a um deus.

Janine Benyus

O que fica atrás de nós e o que jaz à nossa frente têm muito pouca importância comparado ao que há dentro de nós.

Ralph Emerson

Foi tentando fugir de mim mesma que acabei me encontrando.

Ana C.

PROCESSOS DE OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE QUITINA E QUITOSANAS EXTRAÍDAS DOS REJEITOS DA INDÚSTRIA PESQUEIRA DA REGIÃO DE CANANÉIA-SP

Ana Carolina Moreira Fonseca

RESUMO

A quitina é o principal produto obtido do processamento das cascas de crustáceos. Esse biopolímero e o seu derivado, quitosana, têm despertado grande interesse comercial em virtude das possibilidades de aplicações que possuem. O gerenciamento desses resíduos e dos subprodutos gerados nas etapas no processo de obtenção pode ser considerado um modelo de biorrefinaria. A implementação de plantas para extração de quitina e quitosana é um desafio, uma vez que a demanda produtiva deve ser atendida sem causar danos ao meio ambiente. Uma grande variedade de quitosanas com diferentes propriedades físicoquímicas podem ser obtidas variando-se as condições de reação. Essas propriedades dependem da origem da matéria-prima, do seu grau médio de desacetilação, distribuição média dos grupos acetil ao longo da cadeia principal e da sua massa molecular média. Os fornecedores de quitosana comercial geralmente não mencionam a procedência da matéria-prima e pouca ou nenhuma informação é fornecida acerca do seu processamento. Sendo assim, as características e a reatividade do produto final podem variar gerando resultados não reprodutíveis. No presente estudo, foi utilizada a biomassa oriunda de rejeitos da indústria pesqueira de camarão da região de Cananéia – SP. As amostras de αquitina foram obtidas por dois procedimentos diferentes: no primeiro, P1, as cascas de camarão após passar pelo pré-tratamento (lavagem, secagem e moagem) foram desproteinizadas para retirada das proteínas em hidróxido de sódio (NaOH) diluído nas concentrações 2%, 5% e 10% e desmineralizadas em ácido clorídrico (HCI) a 20% (v/v) para retirada dos carbonatos; no segundo procedimento, P2, essas etapas foram invertidas. A biomassa resultante foi desacetilada com hidróxido de sódio concentrado a 30%, 40% e 50% em tempos que variaram de 2 a 6 horas. As principais propriedades físico-químicas das amostras de quitosanas obtidas foram

determinadas utilizando a espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) para a determinação do grau médio de acetilação, \overline{GA} , e a técnica de titulação ácido-base mensurada por condutimetria foi utilizada para comparar os resultados; a viscosimetria capilar para a determinação da massa molar média viscosimétrica, $\overline{M_V}$, e a difração de raios X (DRX) para avaliar o grau médio de cristalinidade, \overline{X} . Além disso, foram empregadas as técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para análises morfológicas dos materiais obtidos e a espectrometria de fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda (WDXRF) para análise química das quitosanas. O \overline{GA} e o \overline{X} das amostras diminuíram à medida em que o tratamento se tornou mais vigoroso, enquanto a $\overline{M_V}$ aumentou. O procedimento 2 foi o mais viável por eliminar a etapa de despigmentação, pois originou amostras com tonalidade mais clara e fáceis de pulverizar.

Palavras-chave: Quitina, quitosana, processos de obtenção, caracterização físico-química.

OBTAINING PROCESSES AND PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF CHITIN AND CHITOSAN EXTRACTED OF THE FISHING INDUSTRY WASTE OF CANANEIA-SP REGION

Ana Carolina Moreira Fonseca

ABSTRACT

Chitin is the main product obtained from the processing of crustacean shells. This biopolymer and its derivative, chitosan, have aroused great commercial interest because of the possibilities of applications they have. The management of these wastes and by-products generated in the steps of obtaining processes can be considered a biorefinery model. The implementation of plants for chitin and chitosan extraction is a challenge, since the production demand must be met without causing harm to the environment. A wide variety of chitosan with different physico-chemical properties can be obtained by varying the reaction conditions. These properties depend on the origin of the raw material, its average degree of deacetylation average distribution of the acetyl groups along the backbone and its average molecular weight. Chitosan commercial providers generally do not mention the origin of the raw material and few or no information is provided about the processing. Therefore, the characteristics and reactivity of the final product may vary generating non-reproducible results. The biomass coming from the fishing industry tailings shrimp Cananéia - SP region was used in the present study. Samples of α-chitin were obtained by two different procedures: the first, P1, the shrimp shells after passing through the pretreatment (rinsing, drying and grinding) were deproteinized for removal of proteins in diluted sodium hydroxide (NaOH) in concentrations 2%, 5% and 10% and demineralized in hydrochloric acid (HCl) to 20% (v/v) to remove carbonates; in the second procedure, P2, these steps were reversed. The resulting biomass was deacetylated with sodium hydroxide concentrated at 30%, 40% and 50% in times ranging from 2 to 6 hours. The main physicochemical properties of chitosan samples obtained were determined using Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) to determine the average degree of acetylation, \overline{DA} , and the acid-base titration technique measured by conductimetry was used to compare the results of chitosan; capillary viscometry to determine the viscosimetric average molecular weight, $\overline{M_V}$, and X-ray diffraction (XRD) to evaluate the average degree of crystallinity, \overline{X} . In addition, scanning electron microscopy (SEM) were employed for morphological analyzes of the obtained materials and wavelength dispersion X-ray fluorescence (WDXRF) for chemical analysis of chitosan. The \overline{DA} and \overline{X} of the samples decreased as the treatment became stronger, while $\overline{M_V}$ increased. Procedure 2 was the most feasible to eliminate the depigmentation step because gave clearer and easier samples spraying.

Key-words: Chitin, chitosan, obtaining processes, physicochemical characterization.

Sumário

RES	SUMO	5
ABS	STRACT	7
LIST	ΓA DE TABELAS	11
LIST	ΓA DE FIGURAS	13
LIST	ΓA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	16
LIST	TA DE UNIDADES	18
1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVO	24
3	REVISÃO DA LITERATURA E ESTADO DA ARTE	25
	3.1 Quitina	
	3.2 Quitosana	
	3.3 Aplicações	
	3.4 Principais propriedades da quitina e quitosanas	
	3.4.1 Grau Médio de Cristalinidade (X)	
	3.4.1.1 Estrutura cristalina da quitina36	
	3.4.1.2 Estrutura cristalina da quitosana39	
	3.4.1.3 Difração de raios X42	
	3.4.2 Grau Médio de Desacetilação (GD) 44	
	3.4.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)48	
	3.4.2.2 Método de titulação ácido-base54	
	3.4.3 Massa Molecular Média (<i>M</i>)	
4	MATERIAIS E MÉTODOS	61
	4.1 Fluxograma de Trabalho61	
	4.2 Materiais	
	4.3 Obtenção das amostras de quitina	
	4.4 Obtenção das amostras de quitosanas	
	 4.5 Caracterização das amostras de α-quitina e quitosanas 67 4.5.1 Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de 	
	4.5.1 Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura	
	4.5.2 Percentual de material insolúvel nas amostras de	
	quitosanas	
	4.5.3 Determinação do grau médio de cristalinidade por difração de raios X	
	4.5.4 Determinação do grau médio de acetilação por	
	espectroscopia na região do infravermelho68	

	4.5.5 Determinação do grau médio de desacetilação das amostras de quitosanas por titulação condutimétrica 68	
	4.5.6 Determinação da massa molecular média das amostras de quitosanas por viscosimetria capilar	
	4.5.7 Análise química das amostras de quitosanas por Espectroscopia de Fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda	
	4.5.8 Análise estatística72	
71	RESULTADOS E DISCUSSÕES	5
.107	CONCLUSÕES	6
109	REFERÊNCIAS	7

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Dados referente a pesca de camarão no município de Cananéia-SP no
período de 01/2010 a 01/2015. (Instituto de Pesca: Banco de Dados. Acesso em
30 out. 2015)23
TABELA 2 - Possíveis mercados consumidores de quitosana e sua respectiva
aplicabilidade em cada segmento33
TABELA 3 - Principais técnicas utilizadas na determinação do grau médio de
desacetilação (\overline{GA}) e suas respectivas referências (apud Hussain et al., 2013)47
TABELA 4 - Identificação das amostras utilizadas por Brugnerotto et al. (2001) e
seus respectivos GA determinados por de técnicas absolutas53
TABELA 5 - Definições das viscosidades utilizadas (Michel, 2015). 60
TABELA 6 - Ensaio de granulometria das cascas de camarão moídas utilizadas no
processo de obtenção da quitina e quitosanas analisadas no presente
estudo65
TABELA 7 - Obtenção das amostras de quitina em função da concentração de
NaOH na etapa de desproteinização e do tempo de reação das cascas em HCl na
etapa de desmineralização66
TABELA 8 - Obtenção das amostras de quitosanas em função da concentração de
NaOH e do tempo de reação na etapa de desacetilação67
TABELA 9 - Valores percentuais do rendimento do processo de obtenção das
amostras de quitosanas e de material insolúvel de cada amostra após a
secagem75
TABELA 10 - Resultados obtidos para os parâmetros das amostras de quitina
analisadas: grau médio de cristalinidade (\overline{X}) e grau médio de acetilação (\overline{GA}) 90
TABELA 11 - Resultados obtidos para os parâmetros das amostras de quitosanas
analisadas: grau médio de cristalinidade (\overline{X}) e grau médio de acetilação (\overline{GA})90
TABELA 12 - Tabela de ANOVA dos valores obtidos para o grau médio de
cristalinidade das amostras de quitina e quitosanas determinados por difração de
raios X91
TABELA 13 - Tabela de ANOVA dos valores obtidos para o grau médio de
acetilação das amostras de quitina e quitosanas analisadas determinados por
espectroscopia no IV por Transformada de Fourier 91

TABELA 14 - Resultados obtidos pelo Teste Tukey para os tratamentos que
apresentaram diferenças significativas entre si quanto ao grau médio de
cristalinidade (X) das amostras de quitina e quitosanas93
TABELA 15 - Resultados obtidos pelo Teste Tukey para os tratamentos que
apresentaram diferenças significativas entre si quanto ao grau médio de acetilação
(GA) das amostras de quitina e quitosanas96
TABELA 16 - Resultados obtidos para o percentual de grupos amino $(\overline{\text{GD}})$, sendo
o grau médio de acetilação (GA) seu inverso98
TABELA 17 - Tabela de ANOVA dos valores obtidos para o grau médio de
acetilação das amostras de quitosanas determinados por titulação
condutimétrica98
TABELA 18 - Resultados obtidos pelo Teste Tukey para os tratamentos que
apresentaram diferenças significativas entre si quanto ao grau médio de acetilação
(GA) das amostras de quitosanas99
TABELA 19 - Resultados obtidos para a viscosidade intrínseca, [η], e para a massa
molecular média viscosimétrica $(\overline{\mathrm{M}_{\mathrm{v}}})$ das amostras de quitosanas103
TABELA 20 - Tabela de ANOVA dos valores obtidos para a massa molecular média
das amostras de quitosanas determinados por viscosimetria capilar103
TABELA 21 - Resultados obtidos pelo Teste Tukey para os tratamentos que
apresentaram diferenças significativas entre si quanto à massa molecular média
viscosimétrica $(\overline{M_v})$ das amostras de quitosanas105
TABELA 22 - Teor (mg kg ⁻¹) dos elementos sódio, magnésio, alumínio, silício,
fósforo, enxofre, cloro, potássio, cálcio, ferro, níquel, cobre e zinco nas amostras
obtidas pelo tratamentos 5, 6, 7, 8 e 9 por meio dos procedimentos 1 e 2106

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Principais categorias de pescado e a produção pesqueira em Cananéia
no período de 2009-2013 (Instituto de Pesca: A Pesca em São Paulo, Acesso em:
30 out. 2015)
FIGURA 2 - Anatomia externa do camarão (Slide Share. Acesso em 17 jun.
2014)24
FIGURA 3 - Segmento de estrutura molecular da quitina
FIGURA 4 - Segmento de estrutura molecular da celulose27
FIGURA 5 - Segmento de estrutura molecular da quitosana
FIGURA 6 - Número de publicações classificadas por relevância nas últimas três
décadas (1983-2014), pesquisadas utilizando o termo "chitosan" como palavra-
chave em https://scholar.google.com.br (Adaptado de Se-Kwon, 2013)32
FIGURA 7 - Estrutura proposta para a α-quitina: (a) projeção <i>bc;</i> (b) projeção <i>ab</i>
(Urigami e Tokura, 2006)
FIGURA 8 - Estruturas propostas para a β-quitina (projeção nos eixos <i>ab</i>) (Urigami
e Tokura, 2006)38
FIGURA 9 - Orientações das cadeias poliméricas nas diferentes formas de quitina
(Roberts, 1992)
FIGURA 10 - Empacotamento da estrutura do tendão polimorfo (hidratado). (a)
projeção <i>bc;</i> (b) projeção <i>ab</i> (Urigami e Tokura, 2006)40
FIGURA 11 - Estrutura cristalina do polimorfo anidro da quitosana nas projeções
ab e bc (Urigami e Tokura, 2006)41
FIGURA 12 - Modelo esquemático de um difratômetro de raios X (Laboratório de
Física Moderna, acesso em 24 jul. 2015)42
FIGURA 13 - Ilustração do método para determinação do grau de cristalinidade de
quitina (loelovich, 2014)44
FIGURA 14 - Ilustração do método para determinação do grau de cristalinidade de
quitosana (loelovich, 2014)44
FIGURA 15 - Reação de desacetilação de quitina em quitosana (Shukla et al.,
2013)46
FIGURA 16 - Modelo esquemático de um espectro com transformada de Fourier
(Solomons e Fryhle, 2005)48

FIGURA 17 - Espectro de IV da N-acetil-D-glucosamina e representação das linhas
de base adotadas (Brugnerotto et al., 2001)50
FIGURA 18 - Espectro de IV da D-glucosamina (a) na forma cloridrato; (b) na
forma amina (Brugnerotto et al., 2001)51
FIGURA 19 - Representação das diferentes linhas de base testadas e mencionadas
por Brugnerotto et al. (2001)52
FIGURA 20 - Curva de titulação condutimétrica obtida experimentalmente para uma
amostra de quitosana comercial55
FIGURA 21 - Variação de uma determinada propriedade do polímero em função
de sua massa molecular (Canevarolo Júnior, 2006)56
FIGURA 22 - Curva típica de distribuição de massa molecular de uma amostra
polimérica para os quatro valores médios principais, em que $\mathrm{Mn}=$ massa molecular
média numérica; Mv = massa molecular médio viscosimétrica; Mw = massa
molecular média ponderal e Mz = massa molecular Z-média (Lucas et al.,
2001)58
FIGURA 23 - Fluxograma de trabalho62
FIGURA 24 - Fluxograma do processo de obtenção das quitina64
FIGURA 25 - Amostras de quitosanas obtidas por: (a) procedimento 1; (b)
procedimento 2
FIGURA 26 - Micrografias das amostras de quitina e quitosanas obtidas pelo
tratamento 9 por ambos os procedimentos74
FIGURA 27 - Avaliação da solubilidade das amostras das quitosanas obtidas pelo
procedimento 1. (a) material obtido após a secagem em estufa a 50 °C por 24 horas;
(b) Fração solúvel em ácido acético 1% (da esquerda para direita de 1 a 9)76
FIGURA 28 - Avaliação da solubilidade das amostras das quitosanas obtidas pelo
procedimento 2. (a) material obtido após a secagem em estufa a 50 °C por 24 horas;
(b) Fração solúvel em ácido acético 1% (da esquerda para direita de 1 a 9)77
FIGURA 29 - Difratograma de raios X da amostra de quitosana utilizada como
padrão analítico
FIGURA 30 - Difratogramas de raios X das amostras de quitina preparadas pelo
procedimento 1
FIGURA 31 - Difratogramas de raios X das amostras de quitina preparadas pelo
procedimento 2

FIGURA 32 - Difratogramas de raios X das amostras de quitosanas preparadas
pelo procedimento 181
FIGURA 33 - Difratogramas de raios X das amostras de quitosanas preparadas
pelo procedimento 282
FIGURA 34 - Espectro de absorção na região do infravermelho da amostra de
quitosana utilizada como padrão analítico84
FIGURA 35 - Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de
quitina preparadas pelo procedimento 185
FIGURA 36 - Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de
quitina preparadas pelo procedimento 286
FIGURA 37 - Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de
quitosanas preparadas pelo procedimento 1
FIGURA 38 - Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de
quitosanas preparadas pelo procedimento 288
FIGURA 39 - Curvas de condutividade e pH versus volume de NaOH da amostra
de quitosana utilizada como padrão analítico
FIGURA 40 - Curvas de condutividade e pH versus volume de NaOH das amostras
de quitosanas obtidas pelo procedimento 196
FIGURA 41 - Curvas de condutividade e pH versus volume de NaOH das amostras
de quitosanas obtidas pelo procedimento 297
FIGURA 42 - Curvas de viscosidade reduzida versus concentração da amostra de
quitosana como padrão analítico100
FIGURA 43 - Curvas de viscosidade reduzida versus concentração das amostras
de quitosanas preparadas pelo procedimento 1101
FIGURA 44 - Curvas de viscosidade reduzida versus concentração das amostras
de quitosanas preparadas pelo procedimento 2102

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CG – Cromatografia Gasosa

GD – Grau Médio de Desacetilação

DA – Desacetilação

DM – Desmineralização

DP – Desproteinização

DRX – Difração de Raios X

FRX – Fluorescência de Raios X

FT-IR – Espectroscopia na região do Infravermelho por Transformada de Fourier

Fam – Área do espalhamento amorfo

Fcr – Área do espalhamento cristalino

GIcN – D-glucosamina

GIcNAc – N-acetil-D-glucosamina

lam – Intensidade do espalhamento amorfo

Icr – Intensidade do espalhamento cristalino

I₀ – Intensidade total do difratograma

IV – Espectroscopia na região do Infravermelho

M – Massa Molecular Média

MM - Massa Molecular

 $\overline{M_n}$ – Massa Molecular Média Numérica

 $\overline{M_w}$ – Massa Molecular Média Ponderal

Mv - Massa Molecular Média Viscosimétrica

 $\overline{M_z}$ – Massa Molecular Z-Média

MEV – Microscópia Eletrônica de Varredura

Q_n – Quitina obtidas pelo procedimento 1

Q'n - Quitina obtidas pelo procedimento 2

Qtn - Quitosanas obtidas pelo procedimento 1

Qt'n - Quitosanas obtidas pelo procedimento 2

TPL – Titulação Potenciométrica Linear

UV – Ultravioleta

 \overline{X} – Grau Médio de Cristalinidade

WDXRF – Espectroscopia de fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda

LISTA DE UNIDADES

cm – centímetro		
°C – grau Celsius		
Da – Dalton		
kg – quilograma		
L – litro		
mg – miligrama		
mL – mililitro		
nm – nanômetro		
% – porcentagem		

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, as atenções têm se voltado em substituir os materiais oriundos da indústria petroquímica por produtos obtidos de fontes renováveis. Os polímeros naturais e seus derivados, tais como celulose, amido, colágeno, gelatina, alginato e quitina, têm sido usados para aplicações em diversas áreas de atuação, sendo de grande importância nos avanços científicos graças às vantagens que apresentam, como serem obtidos de fontes renováveis, biocompatíveis e biodegradáveis em sua maioria (Kumar, 2000; Croisier e Jérôme, 2013).

A decomposição natural de produtos obtidos a partir de biopolímeros pode levar à produção de metano, cuja absorção pelo meio ambiente é mais lenta, podendo causar problemas ambientais se produzido em excesso. Entretanto, o gerenciamento adequado desse subproduto, como por exemplo sua canalização em aterros sanitários transformando-o em fonte de energia (biogás), garante que os biopolímeros integrem uma nova classe de materiais que são considerados melhores para meio ambiente, os chamados *ecofriendly* (Matsui, 2007; Mottin et al., 2011; Bof et al., 2015).

Neste contexto, as biorrefinarias tornam-se uma alternativa para a indústria química, pois compreendem instalações e processos pelos quais matérias-primas renováveis e seus resíduos são transformados em biocombustíveis, produtos químicos de alto valor agregado, além de energia, insumos e alimentos. O objetivo de uma biorrefinaria é otimizar o uso de recursos e minimizar os efluentes, maximizando os lucros (Vaz Júnior, 2013).

A quitina é o principal produto obtido pelo processamento das cascas de crustáceos. Esse biopolímero e seu derivado, quitosana, têm despertado grande interesse comercial em virtude das possibilidades de aplicações que possuem. A versatilidade dessas substâncias tem sido avaliada por mais de um século por pesquisadores das mais diversas áreas, gerando um amplo banco de dados na literatura atual (Rinaudo, 2006; Pillai et al., 2009).

A proposta de se estudar quitina e quitosana está relacionada não só com o potencial de aplicações para seu uso em escala industrial, mas também pela abundância das carapaças de crustáceos (suas principais fontes de obtenção)

rejeitados pela indústria pesqueira em consequência da alta produtividade nacional. A elevada produção de camarão na faixa litorânea do Brasil tem gerado grandes quantidades de resíduos sólidos, tendo em vista que a cabeça e a casca do animal correspondem a aproximadamente 40% do seu peso total, contribuindo com a poluição ambiental (Silva et al., 2006).

O Brasil está dentre os maiores produtores mundiais de camarão, não só pelo extenso litoral que possui, mas também por desenvolver nas últimas décadas a carcinicultura, cultivo de camarões em cativeiro, sendo esta uma prática muito criticada em razão dos grandes impactos ambientais que causam em vários aspectos. Esta atividade utiliza uma infinidade de recursos como terra, água, energia, ração, mão de obra, equipamentos, fertilizantes, antibióticos, que devem ser usados de forma consciente para que a atividade seja lucrativa e de maneira que o impacto no meio ambiente seja reduzido ao mínimo, uma vez que é impossível produzir sem provocar alterações ambientais. Em contrapartida, a criação de camarão em cativeiro tem permitido a redução do extrativismo e da pesca predatória (Damasceno et al., 2009; Notori, 2011).

No presente trabalho foi utilizada a biomassa oriunda da indústria pesqueira da região de Cananéia, localizada no Sul do Estado de São Paulo com uma costa de aproximadamente 39 km. A atividade pesqueira é a sua principal fonte econômica, com uma variedade de peixes, crustáceos e moluscos gerando uma diversificação quanto às artes pesqueiras, abrangendo cerca de cinco mil pescadores, residentes nos municípios de Iguape, Cananéia e Ilha Comprida (Mendonça, 2007).

A atividade pesqueira na região é dividida em pesca artesanal e pesca industrial. A primeira utiliza técnicas rudimentares, pouco alteradas ao longo da história e empregadas na captura de uma variedade de espécies; já a segunda, prioriza espécies com alto valor de mercado, empregando tecnologia voltada para a maximização da captura, sem se preocupar com a conservação do estoque e gerando um elevado volume de rejeito pesqueiro (Mendonça, 2007).

Considerando a produção de pescados descarregada no período de 2009 a 2013, Cananéia respondeu por cerca de 12% do total de pescados, o que fez dela o segundo município que mais contribuiu com a produção desse setor em São Paulo. No gráfico da FIG. 1 estão representadas as principais categorias de pescados descarregados no município durante o período mencionado.

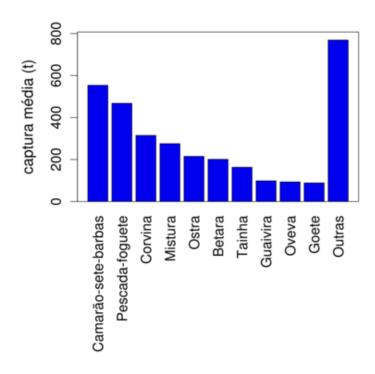


FIGURA 1 - Principais categorias de pescado e a produção pesqueira em Cananéia no período de 2009-2013 (Instituto de Pesca: A Pesca em São Paulo, Acesso em: 30 out. 2015).

O camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) representa a maior parcela na quantidade de camarões pescados na região. Na TAB. 1 são apresentados os dados referentes às quantidades e a receita obtida somente com a pesca de camarão em Cananéia no período de janeiro de 2010 a janeiro de 2015. É possível observar que a pesca extrativista e sem fiscalização adequada tem refletido diretamente na diminuição do total de pescados ao longo desses últimos cinco anos, o que tem tornado o produto mais caro.

TABELA 1 - Dados referente a pesca de camarão no município de Cananéia-SP no período de 01/2010 a 01/2015. (Instituto de Pesca: Banco de Dados. Acesso em: 30 out. 2015).

PERÍODO	ESPÉCIE	QUANTIDADE (kg)	Nº DE DESCRGAS	RECEITA
	Camarão legítimo	16.886,38	1.694	R\$ 251.894,81
2010-2011	Camarão rosa	11.028,35	255	R\$ 253.920,23
2010-2011	Camarão sete-barbas	955.253,00	2.197	R\$ 992.306,41
	TOTAL	983.167,73	4.146	R\$ 1.498.121,45
	Camarão legítimo	17.141,05	1.644	R\$ 352.065,26
	Camarão rosa	6.631,68	229	R\$ 244.278,70
2011-2012	Camarão sete-barbas	653.594,40	2.756	R\$ 2.269.457,20
	TOTAL	677.367,13	4.629	R\$ 2.865.801,16
	Camarão legítimo	16.744,01	1.499	R\$ 260.192,89
2012-2013	Camarão rosa	17.385,69	270	R\$ 518.123,92
2012-2013	Camarão sete-barbas	638.688,50	2.244	R\$ 2.175.921,59
	TOTAL	672.818,20	4.013	R\$ 2.954.238,40
	Camarão legítimo	16.751,13	1.450	R\$ 393.316,83
2013-2014	Camarão rosa	19.952,50	300	R\$ 467.183,35
2013-2014	Camarão sete-barbas	426.032,80	1.857	R\$ 1.864.467,45
	TOTAL	462.736,43	3.607	R\$ 2.724.967,63
	Camarão legítimo	16.823,78	1.174	R\$ 365.725,20
2014 2015	Camarão rosa	19.691,80	303	R\$ 496.110,95
2014-2015	Camarão sete-barbas	356.260,47	1.791	R\$ 1.625.941,46
	TOTAL	392.776,05	3.268	R\$ 2.487.777,61

O resíduo da produção de camarões (casca e cabeça – FIG. 2) contém de 15 a 20% de quitina, 25 a 40% de proteínas e 40 a 55% de carbonato de cálcio, dependendo da espécie. Em crustáceos, a quitina encontra-se associada às proteínas, carbonatos, pigmentos e lipídeos. Por esse motivo, são necessárias três etapas para se isolar esse polímero: desproteinização, desmineralização e despigmentação (Domard e Rinaudo, 1982; Assis et al., 2008). O método de extração comumente utilizado para obtenção de quitina e quitosanas comerciais possui como desvantagem o uso de grandes quantidades de reagentes químicos, que se não tratados de maneira correta, causam problemas mais sérios ao meio ambiente do que os resíduos produzidos pela indústria pesqueira.

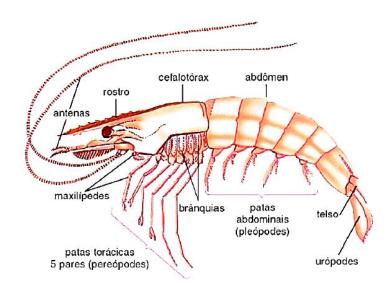


FIGURA 2 - Anatomia externa do camarão (Slide Share. Acesso em 17 jun. 2014).

Por se tratarem de biopolímeros, qualquer variação na origem da matéria-prima ou nas condições de obtenção altera as propriedades do produto final, o que muitas vezes tornam os resultados não reprodutíveis. Suas propriedades dependem da distribuição das unidades de 2-acetoamido-2-desoxi-D-glicopiranose e 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranose ao longo da cadeia, do grau médio de acetilação, \overline{GA} , e da massa molar média, \overline{M} . Várias técnicas e modelos matemáticos foram propostos na literatura para a determinação desses parâmetros, o que leva a confusões nas interpretações dos dados gerando a necessidade de se criar normas, protocolos de ensaios e de análise desses dados.

O gerenciamento desses resíduos e dos subprodutos gerados nas etapas dos processos de obtenção representam um desafio para a implementação de plantas para extração de quitina e quitosana. Estas devem atender a demanda produtiva sem causar danos ao meio ambiente. Para tanto, faz-se necessário toda uma adaptação do processo produtivo no sentido da sustentabilidade, de maneira que todo o conjunto de produtos obtidos possam compensar os custos e a demanda de mercado.

2 OBJETIVO

Determinar por meio de técnicas simples, que possam ser usadas em escala industrial, os principais parâmetros físico-químicos de quitosanas obtidas de quitina extraída dos rejeitos de cascas de camarão produzidos pela indústria pesqueira da região de Cananéia – SP, em variadas condições de reação.

3 REVISÃO DA LITERATURA E ESTADO DA ARTE

3.1 Quitina

Quitina é um polissacarídeo de cadeia linear constituído por resíduos de 2-acetoamido-2-desoxi-D-glicopiranose (N-acetil-D-glucosamina – GlcNAc), unidos por ligações β (1 \rightarrow 4) e possui massas moleculares variáveis, cuja a estrutura está representada na FIG. 3.

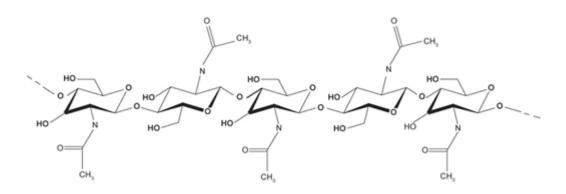


FIGURA 3 - Segmento de estrutura molecular da quitina.

Quitina é o componente estrutural encontrado nos exoesqueletos de muitos artrópodes, incluindo insetos e crustáceos; é também encontrado na parede celular de fungos, sendo o segundo biopolímero mais abundante na natureza, com a vantagem de apresentar uma taxa de reposição duas vezes maior que a da celulose, primeiro em abundância. Sua estrutura química é muito similar à da celulose (FIG. 4), na qual a única diferença é a substituição do grupo hidroxila no carbono C-2 do anel piranosídico por um grupo acetamido. Esta similaridade nas estruturas é refletida no papel de ambos os polímeros na natureza, agindo como materiais estruturais e de defesa, quase sempre associados às proteínas. (Roberts, 1992; Kumar, 2000; Urigami e Tokura, 2006).

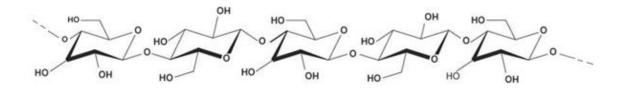


FIGURA 4 - Segmento de estrutura molecular da celulose.

A quitina usada comercialmente é extraída de cascas de caranguejos e camarões. Estas têm como principais componentes a quitina, sais de cálcio (carbonatos e fosfatos em menor quantidade) e proteínas, além de pigmentos e lipídeos em pequenas quantidades (Lima et al., 2006; Battisti e Campana Filho, 2008).

3.1.1 Breve Histórico

A quitina foi originalmente chamada de *fungina* quando descoberta em cogumelos pelo professor francês H. Braconnot, em 1811. Com base em algumas análises, o material obtido mostrou ser impuro, provavelmente contendo outros polissacarídeos. Braconnot também relatou a formação de ácido acético a partir da fungina, chegando a conclusão de que se tratava de uma nova e distinta substância, diferente da encontrada na madeira.

Em 1823, A. Odier isolou uma substância insolúvel contida na carapaça de insetos utilizando soluções de KOH a quente e lhe deu o nome de quitina, termo derivado da palavra grega *chiton*, que significa carapaça. Ele falhou ao detectar a presença de nitrogênio, associando a substância animal à mesma encontrada nos vegetais. No ano seguinte, J. G. Children publicou uma tradução em inglês do artigo de Odier com alguns dados adicionais acerca de seus estudos com quitina que mencionavam a presença de nitrogênio em sua estrutura.

Mediante a descrição dos processos de obtenção, é provável que ambos, Odier e Children, tenham obtido quitosana ao invés de quitina. Dados de análise elementar deram como resultado uma fórmula empírica de aproximadamente C₁₁H₁₇O₇N₂, na qual é consideravelmente mais próxima da

fórmula para a unidade repetitiva do dissacarídeo de quitosana ($C_{12}H_{22}O_8N_2$) do que para a da quitina ($C_{16}H_{26}O_{10}N_2$).

No entanto, a quitosana foi reconhecida e descrita em 1859 pelo professor C. Rouget ao submeter uma amostra de quitina ao tratamento com álcali, no qual resultou em uma substância que se dissolvia em ácidos, diferentemente da própria quitina. O termo quitosana foi dado ao composto desacetilado de quitina por Hoppe-Seyler, em 1894.

As conclusões de Odier a respeito da similaridade do biopolímero estrutural das plantas e do exoesqueletos de insetos levaram a confusões entre celulose, quitina e quitosana. Em 1891, E. Schulze propôs que o nome celulose seria atribuído ao constituinte da parede celular que não se dissolvesse em soluções de ácidos minerais. Em 1894, E. Winterstein publicou dois artigos definindo como 'celulose fúngica' o material contendo nitrogênio obtido por ele a partir de vários tipos de fungos com KOH a 180°C. Embora a hidrólise tenha dado o mesmo monossacarídeo, assim como a quitina, Winterstein não concluiu que a 'celulose fúngica' e a quitina se tratassem da mesma substância, pelo fato da primeira ser solúvel em solução diluída de HCI.

E. Gilson observou a presença de quitina em fungos e sua conversão em quitosana. Ele notou sua insolubilidade em meio alcalino e sua composição elementar estava de acordo com as análises previamente relatadas para quitina animal. Ele sugeriu que a quitina dos cogumelos tivesse o mesmo papel estrutural que a celulose nos vegetais.

Em 1897, C. Tarret isolou a 'fungina' do *Aspergillus niger* e confirmou que se tratava de quitina por hidrólise com HCI e pela reação com KOH. Embora resultados semelhantes tenham sido obtidos com outros fungos, somente no caso do *A. niger* a quitina obtida foi tão pura quanto à do caranguejo. Em 1929, P. Carrer e colaboradores avaliaram os extratos de uma quitina de origem animal (caracol) e fúngica, e encontraram comportamentos similares para ambos. Eles confirmaram que os extratos tinham a mesma estrutura geral com base nos padrões de difração de raios X de crustáceos, fungos e insetos e pelos espectros de infravermelho idênticos para a quitina de insetos e fungos. Logo, a quitina obtida de ambas as fontes, animal ou fúngica, é predominantemente a poli[β-(1→4)2-acetoamido-2-desoxi-D-glicopiranose], em que a fração molar e a distribuição de alguns resíduos de D-glucosamina presentes vai depender da fonte.

Investigações paralelas por outros autores durante esse período determinaram quatro fatores a fim de se obter a estrutura química da quitina e da quitosana: o resíduo de monossacarídeo; se o anel é piranose ou furanose; a posição da ligação glicosídica entre as unidades de monossacarídeos e a estereoquímica da ligação glicosídica (Roberts, 1992; Urigami e Tokura, 2006).

3.2 Quitosana

Quitosana é um copolímero, derivado da quitina, constituído de unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranose (D-glucosamina – GlcN) e 2-acetoamido-2-desoxi-D-glicopiranose (N-acetil-D-glucosamina – GlcNAc) também interligadas por ligações β (1 \rightarrow 4) com diferentes graus médios de acetilação, \overline{GA} , ou desacetilação, \overline{GD} , e massas moleculares variadas. Portanto, o termo quitosana usualmente se refere a família de derivados de quitina obtidas pelo processo de desacetilação pela hidrólise dos grupos acetamido das unidades GlcNAc. O caráter básico da quitosana é atribuído à presença do grupo amina em sua estrutura apresentada na FIG. 5, variando o \overline{GD} de 60 - 99%, (Moore e Roberts, 1979; Bof et al., 2015).

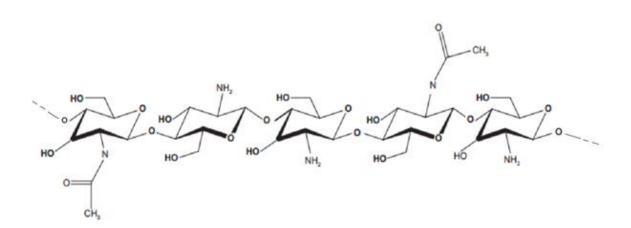


FIGURA 5 - Segmento de estrutura molecular da quitosana.

A quitosana possui quatro tipos de grupos funcionais reativos: os grupos amino e/ou acetamido na posição C_2 do anel piranosídico e hidroxilas primária e secundária nas posições C_6 e C_3 , respectivamente. Quando o \overline{GD} é maior que 60%, o biopolímero é solúvel em meio ácido em consequência da protonação do grupo NH_2 , o que faz da quitosana um polissacarídeo natural de caráter catiônico. Entretanto, a extensão da solubilidade da quitosana é dependente do \overline{GD} , da concentração, do tipo de ácido, da massa molar e do pH do meio (Xia et al., 2011; Hussain et al., 2013; Bof et al., 2015).

Uma grande variedade de quitosanas podem ser obtidas variando-se as seguintes condições de reação: fonte de obtenção da quitina; temperatura e tempo de reação; concentração da solução de álcali e adição de diluente (álcoois ou cetonas de cadeias curtas); razão quitina/álcali; tamanho das partículas de quitina; atmosfera da reação; N-desacetilação heterogênea/homogênea e presença de reagentes que evitem a despolimerização. Essas condições influenciam principalmente nas propriedades físico-químicas, sendo essas dependentes do grau de desacetilação e da distribuição média dos grupos acetamido remanescentes ao longo da cadeia polimérica e da sua massa molecular. Preparações de quitosanas obtidas por N-desacetilação sob condições heterogêneas exibem um padrão de distribuição em blocos e são insolúveis em água (Muzzarelli, 1977; Dumitriu,2001; Hwang et al., 2002; Kumar et al., 2004; Azevedo et al., 2007) (Kumirska et al., 2008).

As preparações disponíveis comercialmente possuem \overline{GD} que variam de 70 a 95% e massa molecular entre 10^4 a 10^6 g mol⁻¹. No entanto, os fornecedores de quitina e quitosana comercial geralmente não mencionam a procedência da matéria-prima e quais as partes do exoesqueleto dos crustáceos foram empregadas. Pouca ou nenhuma informação detalhada é fornecida aos processamentos das matérias-primas, sequência de etapas e condições empregadas em cada uma delas. Sendo assim, as características e a reatividade da quitina comercial podem variar gerando resultados não reprodutíveis e, portanto, existe a necessidade de padronizar e otimizar os processos de obtenção (Domard, 1987; Battisti e Campana Filho, 2008; Se-Kwon, 2010; Bof et al., 2015).

3.3 Aplicações

A grande preocupação mundial em desenvolver produtos naturais mais eficientes, biodegradáveis e ambientalmente seguros retomou e intensificou as pesquisas com quitina e quitosana, expresso pelo crescimento exponencial de artigos publicados nas últimas décadas, como apresentado no gráfico da FIG. 6. Este aumento considerável pode ser atribuído às pesquisas no uso de quitina, quitosana e seus derivados. A modificação química desses biopolímeros fornece a eles novas propriedades funcionais para aplicações nas mais diversas áreas, dentre elas a biomédica, indústria alimentar, cosmética e química (Roberts, 1992; Williams, 2001; Kumar et al., 2004; Silva et al., 2006; Azevedo et al., 2007, Pillai, 2009).

Atualmente, a quitosana é aprovada na Itália, Finlândia, Polônia, Estados Unidos, Japão, China, Coréia e em muitos outros países asiáticos em aplicações como cura de ferimentos, produtos para perda de peso e cosméticos. Produtos à base de quitosana estão disponíveis em várias formas: líquidos, pós, esferas, filmes, tabletes, cápsulas, microesferas, micropartículas, esponjas, fibras e nano fibras, compósitos inorgânicos e hidrogéis. Em cada tipo de formulação as cadeias de quitosana interagem de maneiras diferentes em consequência das associações físicas ou químicas dos componentes. Na TAB. 2 é apresentado um resumo de alguns possíveis mercados e a respectiva função da quitosana (Kumar, 2000; Kumar, 2004; Rinaudo, 2006; Denkbas e Ottenbrite, 2006; Kumirska et al., 2008; Yao et al., 2012; Se-Kwon, 2013; loelovich, 2014).

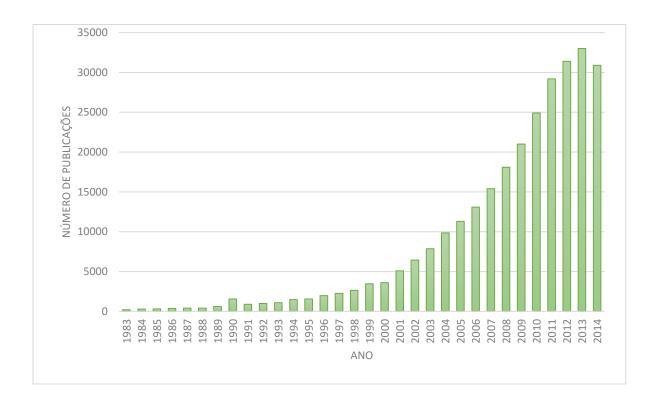


FIGURA 6 - Número de publicações classificadas por relevância nas últimas três décadas (1983-2014), pesquisadas utilizando o termo "*chitosan*" como palavra-chave em https://scholar.google.com.br (Adaptado de Se-Kwon, 2013).

TABELA 2 - Possíveis mercados consumidores de quitosana e sua respectiva aplicabilidade em cada segmento.

POSSÍVEIS MERCADOS	FUNÇÃO		
	Proteção de frutas e legumes;		
Agricultura	tratamento de sementes; ração animal;		
	indutor de auto resistência.		
	Clarificação; fibras dietéticas;		
Alimentos	recuperação de proteínas; remoção de		
	taninos.		
Panal a tacidas	Auxiliar de fixação; revestimentos;		
Papel e tecidos	tingibilidade.		
	Controle do colesterol; bandagem;		
	protetor ocular; pele artificial;		
Medicina	desintoxicação; dentifrícios; suturas;		
	sistemas de liberação controlada de		
	fármacos e moléculas.		
	Emulsificante; umidificante; antiestático;		
Cosméticos	emoliente; hidratante; espessante;		
	formadores de filme; encapsulante.		
	Imobilização de enzimas e de células;		
Biotecnologia	encapsulação; auxiliar de filtração;		
	revestimento de proteínas.		
Tratamento do áque	Agente quelante ou complexante na		
Tratamento de água	remoção de corantes, lipídeos e metais.		

A quitina possui uma baixa solubilidade na maioria dos solventes, o que dificulta a sua aplicabilidade. Já a quitosana possui o grupo amino suscetível de protonação em sua estrutura, o que proporciona um grande número de modificações químicas por meio de rotas sintéticas, tornando-a um material versátil. (Kumar et al., 2004; Lima et al., 2006; Barros et al., 2006).

Na agricultura pode ser usada para estimular o crescimento de microrganismos produtores de quitinases (família de enzimas que degradam a quitina) que destroem nematódeos patógenos e seus ovos, além de estimular o crescimento de plantas (Silva et al., 2006).

A aplicação de revestimentos de quitosana na conservação pós-colheita de vegetais e frutos frescos tem sido alvo de estudos de alguns autores. Os pesquisadores avaliaram o efeito da quitosana no aumento do tempo de prateleira e na inibição de fungos que promovem a deterioração desses alimentos, sendo estes responsáveis por grande parte das perdas de frutas e hortaliças. Esse controle biológico torna a quitosana um promissor substituto dos fungicidas utilizados como método de controle desses patógenos. A interação entre a quitosana positivamente carregada e resíduos ou superfícies microbianas negativamente carregadas é fundamental para uma ação inibitória do crescimento de microrganismos, portanto, quanto maior for o percentual de desacetilação da quitosana maior a sua atividade antimicrobiana (Assis e Leoni, 2003; Assis et al., 2008).

A quitosana proporciona a redução dos níveis de lipídios e triglicerídeos graças ao seu caráter catiônico, o que permite a interação entre esses compostos de caráter aniônico, reduzindo a absorção intestinal desses lipídeos. Além disso, oligômeros de quitina e quitosana apresentam importante papel em atividades antitumorais, antimicrobianas, anti-inflamatórias, antioxidante, hipocolesterolêmica e podem acelerar a absorção de cálcio e ferro (Pillai et al., 2009; Xia et.al., 2011).

A quitosana se comporta como uma base fraca, apresentando um pKa de grupos amino variando entre 6,2 e 7,3, o qual é influenciado pelo \overline{GD} e pela densidade de carga. Os grupos animo quando protonados em pH abaixo de 5,5 proporcionam um caráter catiônico, o que possibilita a interação com superfícies ou componentes aniônicos, tais como a superfície da pele e do cabelo, sendo este um fator crucial para a utilização da quitosana como um bioadesivo em formulações cosméticas com aplicações destinadas a estes locais. A quitosana promove a

estabilização de emulsões em consequência da sua estrutura possuir caráter anfifílico, na qual as interações hidrofóbicas ocorrem nos grupos acetamido, enquanto os grupos amino e a hidroxila são os responsáveis pelas interações hidrofílicas. Além disso, quitosanas de alta massa molecular promovem aumento de viscosidade em meio ácido, podendo fazer parte da composição de pastas de dente, shampoos, cremes para mãos e corpo (Roberts, 1992; Silva et al., 2006).

Como biomaterial, quitosanas são os mais promissores polissacarídeos, com grande potencial para o desenvolvimento de materiais reabsorvíveis, biologicamente ativos e implantes. Tais aplicações incluem: carreador de fármacos, cura de feridas, pele artificial, excipientes farmacêuticos, suplementos dietéticos, dentre outros (Dumitriu, 2001; Williams, 2001; Xia et al., 2011).

3.4 Principais propriedades da quitina e quitosanas

Quitina e quitosanas podem ser obtidas com diferentes propriedades, tornando-se um material versátil na confecção de produtos que atendam às necessidades específicas de diversas áreas, tais como medicina, cosmética, tratamento de água e agricultura. Essas propriedades dependem basicamente do grau de desacetilação e da massa molecular. Entretanto, é necessário que haja uma caracterização estrutural e química de modo a indicar o material adequado para o desenvolvimento em questão. A proposta de se obter um modelo conciso para analisar os principais parâmetros físico-químicos dos materiais obtidos tornouse uma tarefa desafiadora mediante as exigências de mercado (Shukla et al., 2013; loelovich, 2014).

Não existem padrões definitivos para análises de quitina e quitosanas por se tratarem de materiais de origem natural. Inúmeras publicações propõem métodos de caracterização de quitina, quitosanas e seus derivados, mas os modelos utilizados não fornecem dados conclusivos sobre a estrutura e propriedades químicas dos biopolímeros. Nesse sentido, o presente trabalho visou a aplicação de técnicas convencionais e simples de serem aplicadas com base nos modelos e métodos mais citados na literatura para caracterizar os materiais quanto

às suas principais propriedades: grau médio de cristalinidade, \bar{X} ; grau médio de desacetilação, \overline{GD} e massa molar média viscosimétrica, $\overline{M_V}$.

3.4.1 Grau médio de cristalinidade (\overline{X})

A conformação molecular da quitina e da quitosana foi analisada por difração de raios X. Numerosos estudos de cristalografia de quitina e quitosana foram importantes na determinação de suas estruturas. As conformações moleculares da quitina foram analisadas por Blackwell et al. na década de 1970. Embora o primeiro padrão de raios X para a quitosana tenha sido publicado em 1930, sua análise completa foi concluída somente em 1990 (Urigami e Tokura, 2006).

3.4.1.1 Estrutura cristalina da quitina

Quanto a orientação das cadeias de quitina, foram encontrados três polimorfos: a α -quitina, que possui cadeias antiparalelas é encontrada em estruturas rígidas como as carapaças de caranguejos e camarões; a β -quitina, que possui cadeias paralelas, sendo mais maleáveis e mais resistentes, fazendo parte do esqueleto de alguns animais marinhos que necessitam de certa flexibilidade e a γ -quitina que possui cadeias paralelas e antiparalelas, ainda não é muito conhecida e pode ser encontrada nos insetos (Battisti e Campana Filho, 2008; Ioelovich, 2014).

A α -quitina é a forma mais abundante; os polimorfos β e γ -quitina são convertidos em α -quitina por tratamentos apropriados e irreversíveis, o que indica que a forma α é termodinamicamente mais estável. O primeiro estudo de difração de raios X foi publicado por H. A. Gonell em 1926. Minke e Blackwell (1978) analisaram a estrutura cristalina da α -quitina obtida do tendão de lagosta. Na FIG. 7 é representada sua célula unitária com os parâmetros a = 0,474 nm; b = 1,886 nm e c (eixo da fibra) = 1,032, nm, γ = 90° (Rinaudo, 2006).

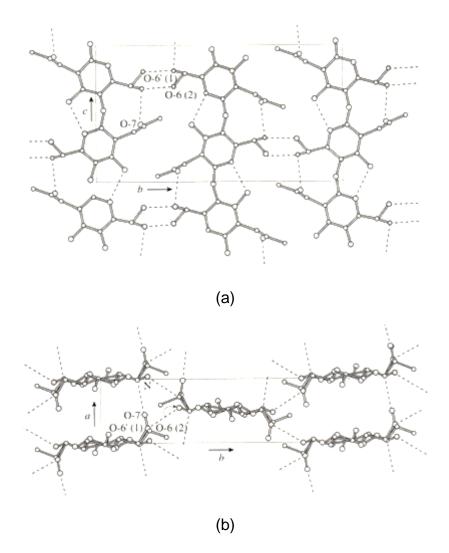


FIGURA 7 - Estrutura proposta para a α-quitina: (a) projeção *bc;* (b) projeção *ab* (Urigami e Tokura, 2006).

A célula contém duas seções de dissacarídeos passando pelo centro e pelo vértice da projeção *ab*, na qual as cadeias de quitina leva a uma conformação helicoidal duplo estendida, isto é, a uma estrutura de ziguezague. As moléculas de quitina estão arranjadas em um modelo antiparalelo, ou seja, a direção das cadeias do centro e do vértice da célula unitária são opostas ao longo do eixo *c*. Cadeias paralelas ao longo do eixo *a* formam estruturas lamelares por ligações de hidrogênio intermolecular. As camadas formadas entre as cadeias do vértice e do centro da célula unitária são também ligadas por ligações de hidrogênio, originando a estrutura rígida, característica da α-quitina (Urigami e Tokura, 2006, Rinaudo, 2006).

A forma β é encontrada nas penas de lulas, nos espinhos de diatomáceas, dentre outros. O estudo conformacional desse polimorfo foi iniciado

em 1950 por W. Lotmer e L. Picken, seguidos por N. Dweltz. A estrutura cristalina mais detalhada foi analisada por K. Gardner e J. Blackwell em 1975. A célula unitária da β -quitina é monoclínica com os parâmetros a = 0,485 nm; b = 0,926 nm e c (eixo da fibra) = 1,038 nm e γ = 97,5 $^{\circ}$, representada na FIG. 8 (Urigami e Tokura, 2006, Rinaudo, 2006).

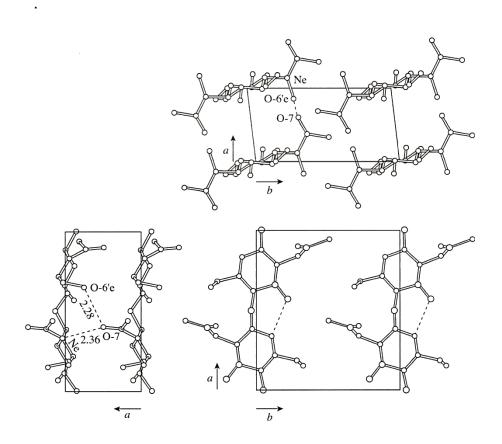


FIGURA 8 - Estruturas propostas para a β-quitina (projeção nos eixos *ab*) (Urigami e Tokura, 2006).

A conformação da cadeia da β -quitina é uma dupla hélice estendida, similar à da α -quitina, porém as moléculas se organizam em um modelo paralelo, contendo somente uma sessão de dissacarídeo na célula unitária. As cadeias formam estruturas lamelares por ligações de hidrogênio ao longo do eixo a, mas estas não estão presentes entre as cadeias ao longo do eixo b. A capacidade de intumescimento da β -quitina pode ser explicada pela inclusão de moléculas pequenas entre suas camadas.

O terceiro polimorfo, a γ-quitina, foi encontrada no revestimento espesso do estômago de *Loligo sp.* O arranjo das cadeias de quitina nessa estrutura foi

previsto como sendo nas direções "baixo, baixo, cima", sendo considerada uma mistura dos polimorfos α e β - quitina. Na FIG. 9 é apresentado esquematicamente o arranjo dos três polimorfos de quitina (Urigami e Tokura, 2006).

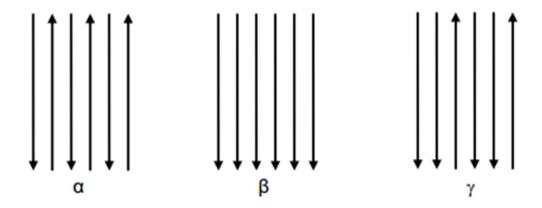


FIGURA 9 - Orientações das cadeias poliméricas nas diferentes formas de quitina (Roberts, 1992).

3.4.1.2 Estrutura cristalina da quitosana

Quatro polimorfos de quitosana foram encontrados por meio de medidas de difração de raios X: três formas hidratadas e uma forma anidra. O primeiro padrão de raios X de quitosana com base no tendão de lagosta por N-desacetilação foi determinado em 1936, por G. Clarck e A. Smith e chamado de "polimorfo tendão". Foi analisado 60 anos mais tarde, por Okuyama et al., em 1997. As cadeias de quitosana e oito moléculas de água estão empacotadas em uma célula unitária ortorrômbica com os parâmetros *a* = 0,895 nm; *b* = 1,697 nm *e c* (eixo da fibra) = 1,034 nm. Cada cadeia de quitosana possui uma conformação de dupla hélice estendida, formando uma estrutura de ziguezague, como encontrado para a α-quitina. As cadeias de quitosana estão empacotadas em modelo antiparalelo ao longo do eixo *c*, ligadas por ligações de hidrogênio ao longo do eixo *b*, formando estruturas lamelares ao longo do eixo *a*. As moléculas de água presentes entre essas camadas estabilizam a estrutura cristalina, sendo este o polimorfo mais abundante da quitosana, representado pela FIG. 10 (Urigami e Tokura, 2006, Rinaudo, 2006).

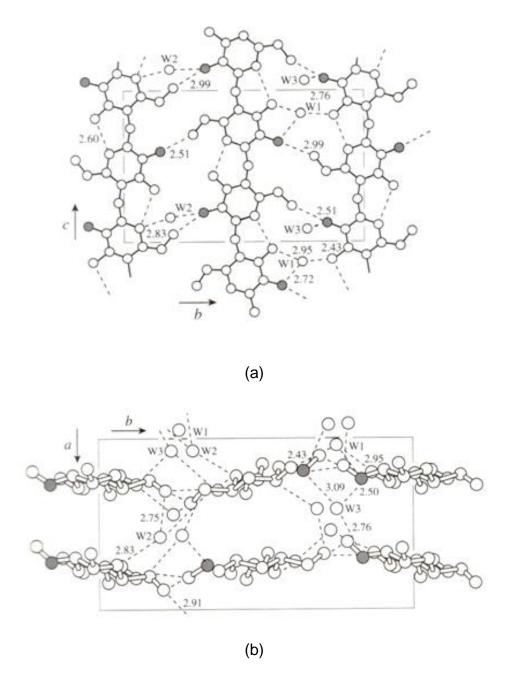


FIGURA 10 - Empacotamento da estrutura do tendão polimorfo (hidratado). (a) projeção *bc;* (b) projeção *ab* (Urigami e Tokura, 2006).

Os outros dois polimorfos hidratados foram chamados de Form II e L-2, sendo a conformação desse último similar à do polimorfo tendão. O cristal do Form II não foi analisado, mas acredita-se que ele seja semelhante aos outros dois polimorfos.

A célula unitária do polimorfo anidro é ortorrômbica, cujos parâmetros são a = 0.828 nm; b = 0.863 nm e c (eixo da fibra) = 1.043 nm. A direção da cadeia ao longo do eixo c é antiparalela, com conformação similar à do polimorfo tendão.

Entretanto, ao contrário das formas hidratadas, as cadeias ao longo do eixo *c* são paralelas e ligadas por ligações de hidrogênio às cadeias vizinhas ao longo do eixo *b*, formando estruturas lamelares ao longo do eixo *a*. Na FIG. 11 é apresentada a projeção da estrutura cristalina desse polimorfo (Urigami e Tokura, 2006).

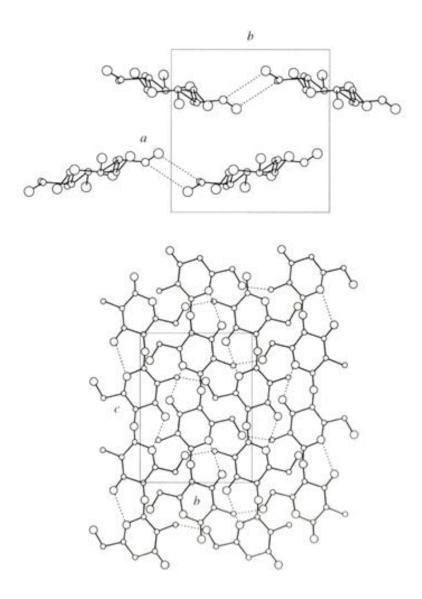


FIGURA 11 - Estrutura cristalina do polimorfo anidro da quitosana nas projeções *ab* e *bc* (Urigami e Tokura, 2006).

3.4.1.3 Difração de raios X

A principal aplicação da difração de raios X refere-se à identificação de domínios cristalinos e dois tipos de informações estruturais podem ser obtidos: estrutura eletrônica e estrutura geométrica. Os planos de difração e suas respectivas distâncias interplanares, bem como as densidades de átomos ao longo de cada plano cristalino, são características específicas e únicas de cada substância, assim como o padrão difratométrico por ela gerado. No caso dos polímeros, a presença de ramificações ou grupos substituintes nas cadeias afeta seu empacotamento gerando domínios não-cristalinos. A análise dos difratogramas permite identificar as amostras com base na diminuição das intensidades e alargamento dos sinais. Na FIG. 12 é mostrado um modelo esquemático de um difratômetro de raios X.

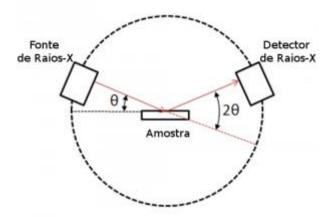


FIGURA 12 - Modelo esquemático de um difratômetro de raios X (Laboratório de Física Moderna (UNICAMP), acesso em 24 jul. 2015).

loelovich (2014) sugere que a avaliação das características estruturais de quitina e quitosana, em termos de conteúdo da fase cristalina ou grau médio de cristalinidade (\bar{X}), é inconclusiva ou limitada. Muitos estudos avaliaram o índice de cristalinidade (I_{Cr}), que se baseia no cálculo da razão da altura dos picos, dado por: $I_{Cr} = (I_O - I_{am})/I_O$, no qual I_O é a altura do pico cristalino e I_{am} é a altura do espalhamento amorfo. Este parâmetro pode indicar o quão alta ou baixa é a cristalinidade do material, mas não está de acordo com o conceito de grau de cristalinidade, que se refere ao peso da fração cristalina no polímero. Estudos mostraram diversas maneiras para a execução dos cálculos usando a altura dos

picos de difração dos planos cristalinos (110) e (020) e as alturas do espalhamento amorfo em $2\theta = 12^{\circ}$, $12,5^{\circ}$ ou 16° com ou sem a subtração do *background*. Outras formas de se calcular o I_{Cr} baseou-se na divisão da área total do difratograma pela soma das áreas cristalina e *background*. Para uma mesma amostra de quitosana, por exemplo, os valores encontrados para o I_{Cr} variaram de 0,4 a 0,8 utilizando diferentes métodos, mostrando resultados inconclusivos sobre a cristalinidade de quitina e quitosana (loelovich, 2014).

Algumas condições para se analisar quantitativamente o \bar{X} de difratogramas de raios X são enumeradas a seguir e demonstradas nas FIG. 13 e 14 (loelovich, 2014):

- A amostra deve estar na forma de pó não texturizado;
- O background deve ser subtraído;
- O difratograma experimental deve ser corrigido;
- As áreas de espalhamento relacionadas aos domínios cristalinos e amorfo devem ser separados do difratograma corrigido;
- A intensidade integrada (área) do espalhamento cristalino e amorfo deve ser usada para calcular o grau de cristalinidade, pela Equação 1.

$$X = \int I_{cr} d\theta / \int I_{o} d\theta = F_{cr}/(F_{cr} + F_{am})$$
 (1)

onde l_o é a intensidade total do difratograma corrigido depois da subtração do *background*; Icr é a intensidade do espalhamento cristalino; F_{cr} é a área do espalhamento cristalino; F_{am} é a área do espalhamento amorfo (loelovich, 2014).

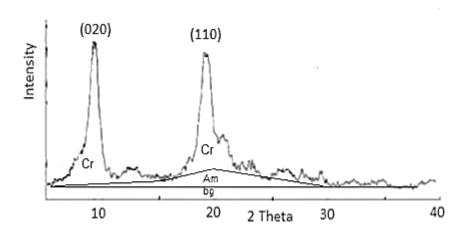


FIGURA 13 - Ilustração do método para determinação do grau de cristalinidade de quitina (loelovich, 2014).

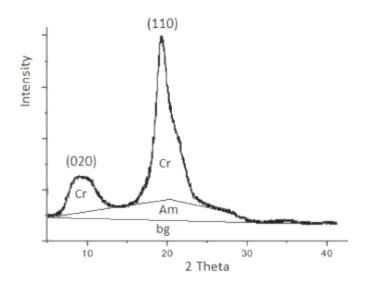


FIGURA 14 - Ilustração do método para determinação do grau de cristalinidade de quitosana (loelovich, 2014).

3.4.2 Grau médio de desacetilação (\overline{GD})

A quantidade de grupos amino das quitosanas é a principal razão para as diferenças entre suas estruturas, propriedades físico-químicas, biológicas e funções quelante e floculante. O grau médio de desacetilação, \overline{GD} , indica o número médio de unidades GlcN livres distribuídos ao longo das cadeias poliméricas; é calculado pela razão da quantidade de GlcN pela soma da quantidade de GlcN e GlcNAc. É considerado o mais importante parâmetro na caracterização de quitina e quitosanas, bem como na diferenciação dos dois biopolímeros (Xia et al., 2011; Croisier e Jérôme, 2013; Hussain et al., 2013).

A versatilidade da quitosana está relacionada não somente ao conteúdo de grupos amino, mas no padrão de substituição do componente em menor quantidade (GlcN em quitina e GlcNAc em quitosana). Existem muitos métodos de aumentar ou diminuir o \overline{GD} das quitosanas. Na prática, quitosanas são obtidas pelo processo de desacetilação com hidróxido de sódio à quente (FIG. 15). Neste caso, o controle das condições de reação (temperatura e concentração dos reagentes) poderia ser um método indicado para se obter o material com o \overline{GD} desejado. Quitosanas comerciais são fornecidas com \overline{GD} que variam de 70-90%. Quitosanas com \overline{GD} > 95% podem ser preparadas submetendo o material a mais uma etapa de desacetilação, no qual frequentemente acarreta na sua despolimerização, além de aumentar os custos do processo (Roberts; 1992; Hussain et al., 2013).

FIGURA 15 - Reação de desacetilação de quitina em quitosana (Shukla et al., 2013).

Muitos métodos têm sido usados para a determinação do \overline{GD} (TAB. 3). Alguns desses métodos são demorados, caros e destrutivos da amostra, além de não apresentarem correlações entre si. Os métodos são geralmente escolhidos conforme a disponibilidade de infraestrutura e de insumos.

TABELA 3 - Principais técnicas utilizadas na determinação do grau médio de desacetilação, \overline{GD} , e suas respectivas referências (*apud* Hussain et al., 2013).

MÉTODO	REFERÊNCIA
Espectrocpia no Infravermelho (IV)	Domszy e Roberts, 1985; Sabnis e Block, 1997; Brugnerotto et al. 2001
Espectroscopia de Dicroísmo Circular	Domard, 1987
Espectroscopia no Ultravioleta (UV)	Muzzarelli, 1985; Tan et al., 1998
Espectroscopia de Ressonância	Shigemasa et al., 1996; Lavertu et al., 2003;
Magnética Nuclear (RMN)	Zhang et al., 2005
Titulação Potenciométrica Linear	Ke e Chen, 1990; Jiang et al., 2003; Balázs e
(TPL)	Sipos, 2007
Teste com Ninidrina	Curotto e Aros, 1993
Determinação Enzimática	Nanjo et al., 1991
Análise Elementar	Shigehiro et al., 1981; Kasaai et al., 2000; Gong
Analise Liemental	et al., 2003; Gupta e Jabrail, 2006
Cromatografia Gasosa (CG)	Aiba, 1986
Titulação ácido-base	Domszy e Roberts, 1985; Baxter et al., 1992

3.4.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

A espectroscopia na região do infravermelho (IV), como todas as outas técnicas espectroscópicas, depende da interação das moléculas ou átomos com a radiação eletromagnética. A radiação no infravermelho faz com que os átomos dos compostos vibrem com amplitude aumentada ao redor das ligações covalentes que os unem. Uma vez que os grupos funcionais das moléculas orgânicas incluem um arranjo específico de átomos ligados, a absorção da energia no IV ocorre de maneira característica para cada molécula. Por isso, é considerada uma técnica importante na análise de compostos orgânicos (Solomons e Fryhle, 2005).

O espectrômetro (FIG. 16) registra o resultado na forma de uma banda de absorção, reproduzidos em um gráfico de tempo contra a intensidade do sinal denominado de interferograma. Existe uma relação entre o interferograma e os valores de seno e cosseno das ondas eletromagnéticas que o origina. A conversão para espectro envolve o tratamento matemático do interferograma por uma série de equações complexas, denominadas Transformadas de Fourier, desenvolvidas pelo matemático Jean-Baptiste Fourier (1768–1830). O computador separa o interferograma em seus componentes, analisa cada um, recompõe e o transforma em espectro.

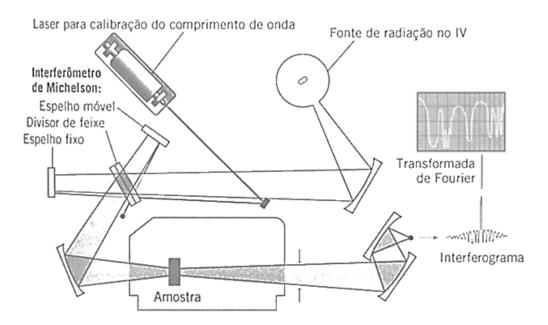


FIGURA 16 - Modelo esquemático de um espectro com transformada de Fourier (Solomons e Fryhle, 2005).

O uso da espectroscopia no IV possui como principais vantagens: análise relativamente rápida; o aparato instrumental é encontrado na maioria dos laboratórios acadêmicos e de pesquisa e desenvolvimento e, desde que seja estabelecido um padrão de referência interna para que seja corrigida a variação de material no feixe, a pureza da amostra não precisa ser determinada separadamente. O padrão de referência também é necessário para compensar a espessura no caso de se utilizar filmes ou a concentração no caso de amostras na forma de pó nas pastilhas de KBr, sendo este último o mais utilizado por permitir que o método seja aplicado em amostras insolúveis (Moore e Roberts, 1980; Roberts, 1992).

Para determinar o \overline{GD} de quitina e quitosanas, duas bandas de absorção devem ser selecionadas: uma banda característica, representando a amida do grupo N-acetil-D-glucosamina e a banda de referência que representa um grupo presente em ambos os monômeros N-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina. A área dessas bandas é delimitada por segmentos obtidos no espectro de IV, denominados linhas de base. Uma relação linear pode ser determinada mediante a relação entre a razão dessas áreas em função do \overline{GD} (Dimzon e Knneper, 2015).

Roberts (1992) cita que foram propostas quatro razões de banda de absorção para análises de quitina e quitosanas, A₁₆₅₅/A₃₄₅₀; A₁₅₅₀/A₂₈₇₈; A₁₆₅₅/A₂₈₆₇ e A₁₅₅₄/A₈₉₇, diferindo entre si tanto na banda selecionada para determinar a concentração do grupo N-acetil (numerador) quanto na de referência (denominador). Entretanto, a primeira razão possui uma série de vantagens perante as outras: a concentração de grupos N-acetil pode ser determinada pela absorbância da banda de amida I em 1655 cm⁻¹ referente ao estiramento de C=O de grupos amida; a banda em 3450 cm⁻¹ é proeminente e relativamente isolada, sendo estes dois atributos importantes na escolha da banda de referência. O uso da banda em 2878 cm⁻¹ ou 2867 cm⁻¹ como banda de referência é complicado em razão da interferência da banda de absorção de estiramento de O-H, que ocorre em frequências em torno de 3450 cm⁻¹. Além disso, a banda de referência interna não depende do conteúdo de grupos N-acetil, o que descarta o uso das bandas em 2878 cm⁻¹ ou 2867 cm⁻¹, uma vez que as vibrações de estiramento C-H ocorrem na faixa de frequência de 2853-2962 cm⁻¹, podendo a intensidade dessas bandas variar por causa do \overline{GD} . A última razão proposta também pode ser descartada, pois

ambas as bandas em 1554 cm⁻¹ e 897 cm⁻¹ são referentes à deformação angular de N-H de grupos amina (Roberts, 1992; Solomons e Fryhle, 2005).

Apesar de ser a técnica mais discutida na literatura, a espectroscopia no IV necessita de calibração, o que geralmente é feito utilizando-se técnica absoluta, como por exemplo, titulação, RMN e CG. No trabalho realizado por Brugnerotto et al. (2001), foi discutido o uso da espectroscopia no IV para determinação do \overline{GD} de quitina e quitosanas. Primeiramente, os autores construíram um modelo de análise comparando os espectros das unidades monoméricas dos biopolímeros, GlcNAc e GlcN apresentados nas FIG. 17 e 18. Os autores compararam a glucosamina e a sua forma cloridrato e não foi observada nenhuma modificação significativa no espectro, portanto, o grau de protonação da amostra não influencia.

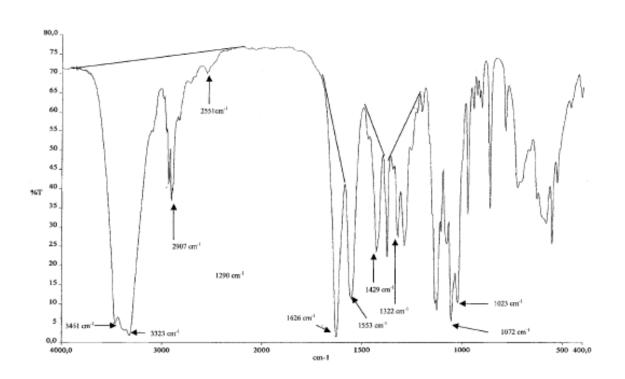


FIGURA 17 - Espectro de IV da N-acetil-D-glucosamina e representação das linhas de base adotadas (Brugnerotto et al., 2001).

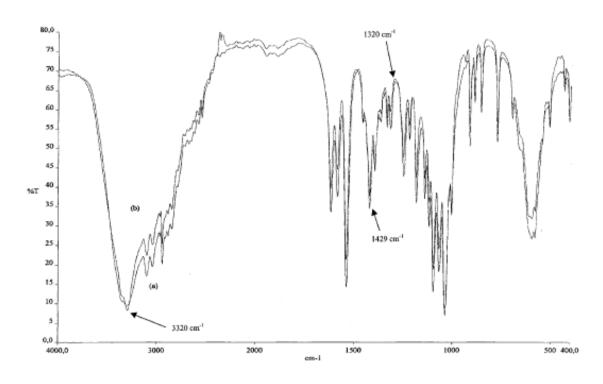


FIGURA 18 - Espectro de IV da D-glucosamina (a) na forma cloridrato; (b) na forma amina (Brugnerotto et al., 2001).

Uma banda específica em 1320 cm⁻¹ apareceu para GlcNAc e a banda em 1650 cm⁻¹, frequentemente citada na literatura como banda específica, apareceu para ambos os monômeros; a banda em torno de 2900 cm⁻¹ não pode ser distinguida no espectro da GlcN, o que corrobora a não utilização de bandas nessa região como referência. Para tal, foram avaliadas duas possibilidades: uma banda larga centrada em 3350 cm⁻¹ (próxima da região de 3450 cm⁻¹) e outra em 1420 cm⁻¹, ambas susceptíveis aos dois monômeros. Uma curva de calibração foi construída em função da composição dos dois monômeros e apresentou concordância entre os dados experimentais e os calculados por modelagem computacional (Brugnerotto et al., 2001).

Os autores analisaram amostras de quitina e quitosanas de várias origens e caracterizadas quanto ao seu grau médio de acetilação, \overline{GA} , utilizando técnicas absolutas, como mostrado na TAB. 4. Os espectros no IV das amostras foram analisados utilizando os mesmos procedimentos e linhas de base, apresentadas na FIG. 19. Duas relações foram propostas, como mostram as Equações 2 e 3:

$$\frac{A_{1320}}{A_{3450}} = 0,00226 \text{ GA} + 0,03146 \qquad r = 0,97$$
 (2)

$$\frac{A_{1320}}{A_{1420}} = 0.03133 \text{ GA} + 0.3822 \qquad r = 0.99$$
 (3)

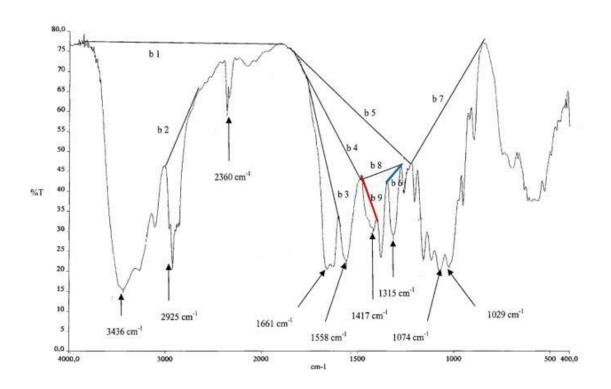


FIGURA 19 - Representação das diferentes linhas de base testadas e mencionadas por Brugnerotto et al. (2001).

TABELA 4 - Identificação das amostras utilizadas por Brugnerotto et al. (2001) e seus respectivos \overline{GA} determinados por técnicas absolutas.

AMOSTRA	FONTE	(GA)	TÉCNICA
1	Casca de caranguejo	0,5	RMN ¹ H líquido
2	Casca de caranguejo	0,5	RMN ¹ H líquido
3	Casca de caranguejo	2	RMN ¹ H líquido
4	Casca de camarão	3	RMN ¹ H líquido
5	Casca de camarão	6	RMN ¹ H líquido
6	Casca de caranguejo	7,8	RMN ¹ H líquido
7	Casca de camarão	8,3	RMN ¹ H líquido
8	Casca de caranguejo	8,5	RMN ¹ H líquido
9	Casca de camarão	9,6	RMN ¹³ C CP/MAS estado sólido
10	Casca de camarão	10,1	RMN ¹³ C CP/MAS estado sólido
11	Casca de caranguejo	11,2	RMN ¹³ C CP/MAS estado sólido
12	Casca de caranguejo	12	RMN ¹ H líquido
13	Casca de camarão	13,2	RMN ¹ H líquido
14	Pena de Iula	13,8	RMN ¹³ C CP/MAS estado sólido
15	Casca de lagosta	20,1	RMN ¹ H líquido
40	Casas da sausanusia	04	RMN ¹ H líquido e RMN ¹³ C
16	Casca de caranguejo	21	CP/MAS estado sólido
17	Casca de caranguejo	40	RMN ¹ H líquido
18	Casca de caranguejo	44	RMN ¹ H líquido
19	Casca de camarão	56,3	RMN ¹³ C CP/MAS estado sólido
20	Pena de Iula	57,5	RMN ¹³ C CP/MAS estado sólido
21	Casca de camarão	86,9	RMN ¹³ C CP/MAS estado sólido
22	Casca de camarão	94,6	RMN ¹³ C CP/MAS estado sólido
23	Pena de Iula	95,9	RMN ¹³ C CP/MAS estado sólido
24	Casca de caranguejo	97	RMN ¹³ C CP/MAS estado sólido
25	Pena de lula	97,9	RMN ¹³ C CP/MAS estado sólido

3.4.2.2 Método de titulação ácido-base

A solubilidade de quitina e quitosanas tem sido amplamente investigada uma vez que essa propriedade influencia no comportamento dos biopolímeros e nas técnicas utilizadas em suas caracterizações. A solubilidade é um parâmetro difícil de controlar, uma vez que depende do \overline{GA} , da concentração iônica, do pH, da natureza do ácido utilizado na protonação e na distribuição da unidades GlcNAc e GlcN (Rinaudo, 2006).

A quitina é altamente hidrofóbica e, portanto, insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos em consequência da sua rígida estrutura cristalina. No entanto, há relatos da sua solubilidade em cloroálcoois em conjugação com soluções aquosas de ácidos minerais, tais como ácido clorídrico concentrado, ácido sulfúrico concentrado, ácido fosfórico (78-97%) e ácido metano sulfônico, embora a massa molecular da quitina comece a diminuir logo após a dissolução; N,Ndimetilacetamida (DMAc) contendo 5% de cloreto de lítio, tetróxido de dinitrogênio, hexafluoroisopropanol N,N-dimetilformamida (DMF), е hexafluoroacetona sesquiidratado foram considerados solventes moderados para a quitina. O cloreto de cálcio diidratado saturado com metanol ou etanol, um dos solventes do Nylon 6-6, incluindo o ácido fórmico, foi também considerado um bom solvente para a quitina (Kumar, 2000; Urigami e Tokura, 2006).

A quitosana é insolúvel em água, mas é solúvel em soluções aquosas de ácidos diluídos, formando sais com os contra íons. Esse fato permite determinar o conteúdo de grupos animo utilizando o método de titulação ácido-base, no qual uma amostra de quitosana é dissolvida em excesso de ácido e titulada com NaOH de concentração conhecida (Roberts, 1992).

A técnica de titulação condutimétrica para determinação da concentração de grupos amino em quitosanas foi proposta por Raymond et al. (1993). A técnica é muito sensível e baseia-se na adição de um eletrólito à solução de outro eletrólito em condições que não provoquem apreciável alteração do volume, na qual a condutância será afetada pela ocorrência ou não de reações iônicas. A condutância de uma solução eletrolítica em qualquer temperatura depende somente dos íons presentes e de suas respectivas concentrações. Possui como desvantagem o fato de qualquer espécie com carga elétrica presente na

solução analisada contribuir para condutância total, levando a falsos resultados (Raymond et al., 1993; Haris, 2005).

A curva de titulação possui dois pontos de inflexão, na qual a diferença entre eles ao longo da abscissa corresponde a quantidade de ácido necessária para protonar os grupos anino, como mostrado na FIG. 20, e sua concentração pode ser determinada pela Equação 4 (Roberts, 1992; Santos et al., 2003).

$$\overline{GD} = \frac{16.1 \cdot [base] \cdot (V_2 - V_1)}{m}$$
 (4)

onde V_1 é o volume de base utilizado para a neutralização de HCl em excesso; V_2 – V_1 é o volume de base usado para a neutralização dos grupos amino protonados da quitosana, [base] é a concentração de base usada e m é a massa da amostra de quitosana .

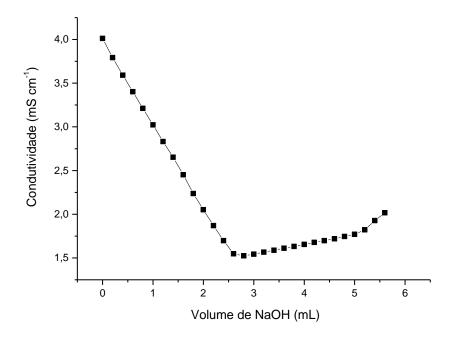


FIGURA 20 - Curva de titulação condutimétrica obtida experimentalmente para uma amostra de quitosana comercial.

3.4.3 Massa molecular média (\overline{M})

Os materiais poliméricos se diferenciam dos demais por possuírem longas cadeias, isto é, possuem alta massa molecular (MM), o que influencia nas suas propriedades físico-químicas de modo que o seu conhecimento e controle são de fundamental importância. Essa influência ocorre de maneira assintótica, na qual as variações de MM provocam maiores alterações nas propriedades quando ocorrem em moléculas de baixa MM, comparadas com as de alta MM, como mostrado na FIG. 21. Cadeias são consideradas poliméricas quando a MM é superior a 10.000 Daltons ou g mL-1. Valores abaixo deste e não menores que 1.000 Daltons são considerados oligômeros, e cadeias poliméricas com MM acima de 250.000 Daltons são consideradas de alta MM (Canevarolo Júnior, 2006).

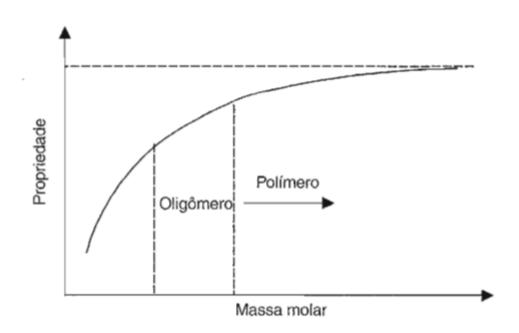


FIGURA 21 - Variação de uma determinada propriedade do polímero em função de sua massa molecular (Canevarolo Júnior, 2006).

A MM de um polímero não pode ser calculada como normalmente é feito com compostos puros de baixa massa molecular, tornando-o um parâmetro difícil de ser determinado. É necessário encontrar um meio para definir a MM e a sua distribuição. O valor encontrado vai depender do método escolhido e, dependendo das considerações feitas no transcorrer da dedução matemática, pode-se obter

vários tipos de massas moleculares médias tais como (Lucas et al., 2001; Canevarolo Júnior, 2006):

a) Massa molecular média numérica $(\overline{M_n})$: é obtida dividindo-se as cadeias em séries de faixas de tamanhos (i) e determinando a fração numérica de cadeias de cada faixa de tamanho, definida como sendo o número de moléculas (N_i) do polímero de massa molar (M_i), dividido pelo número total de cadeias (Equação 5). As principais técnicas utilizadas para determinação da $\overline{M_n}$ são análise de fins de cadeia (por titulação, espectroscopia no infravermelho ou ultravioleta), propriedades coligativas (osmometria, ebuliometria, crioscopia) e cromatografia por esclusão de tamanho.

$$\overline{M_n} = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i} = \frac{massa\ total\ do\ sistema\ polimérico}{n\'umero\ total\ de\ mol\'eculas\ do\ sistema} \tag{5}$$

b) Massa molecular média ponderal $(\overline{M_w})$: é baseada na fração de massa (w_i) de moléculas dentro das várias faixas de tamanho, contribuindo de maneira ponderada para o cálculo da média (Equação 6). Pode ser determinada por espalhamento de luz, ultracentrifugação e por cromatografia por exclusão de tamanho.

$$\overline{M_W} = \frac{\sum w_i M_i}{W} \tag{6}$$

c) Massa molecular média viscosimétrica ($\overline{M_v}$): a viscosidade de soluções diluídas é em função do volume hidrodinâmico do soluto na solução, ou seja, quanto maior sua massa molecular mais viscosa é a solução. Medidas da viscosidade de soluções poliméricas diluídas permitem o cálculo de uma massa molar viscosimétrica média e os valores estão mais próximos de $\overline{M_w}$ do que para $\overline{M_n}$ para um polímero polidisperso (Equação 7).

$$\overline{M_V} = \left(\frac{\sum N_i (M_i)^{1+a}}{\sum N_i M_i}\right)^{1/a} \tag{7}$$

onde a é uma constante que depende do polímero, do solvente e da temperatura.

d) Massa molecular Z-média (\overline{M}_z) : leva em consideração a massa molecular de cada fração do polímero, sendo mais sensível às frações de mais alta massa molecular do que às médias inferiores. Essa média pode ser determinada com base na aplicação dos dados obtidos por ultracentrifugação na Equação 8.

$$\overline{M_Z} = \frac{\sum N_i (M_i)^3}{\sum N_i (M_i)^2} \tag{8}$$

A curva apresentada na FIG. 22 é uma distribuição ponderal das várias massas moleculares existentes, conhecida por Curva de Distribuição de Massa Molecular.

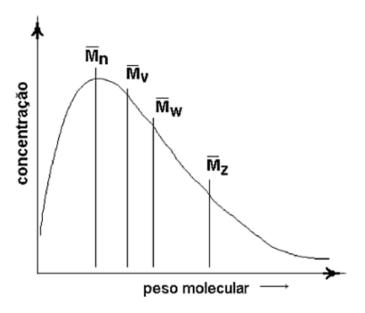


FIGURA 22 - Curva típica de distribuição de massa molecular de uma amostra polimérica para os quatro valores médios principais, em que $\overline{M_n}$ = massa molecular média numérica médio; $\overline{M_v}$ = massa molecular média viscosimétrica médio; $\overline{M_w}$ = massa molecular média ponderal e $\overline{M_z}$ = massa molecular Z-média (Lucas et al., 2001).

3.4.3.1 Viscosimetria

Como visto, diferentes técnicas para se determinar a massa molecular de um polímero podem ser empregadas. Entretanto, a determinação da massa molecular por medidas de viscosidade intrínseca é um método simples e barato para a caracterização de quitosanas, apesar de não ser um método absoluto e

exigir a determinação de constantes mediante a correlação de números de viscosidade limite (viscosidade intrínseca) e massas moleculares determinados por um método absoluto (Roberts e Domszy, 1982; Canevarolo Júnior, 2006).

A viscosidade é um termo comumente conhecido que descreve as propriedades de escoamento de um fluido, ou seja, o atrito das camadas internas dentro do fluido que impõe resistência a fluir. A fluidez de uma solução polimérica pode ser afetada por qualquer condição que controle as dimensões das cadeias poliméricas, tais como, extensão das cadeias (massa molecular); rigidez das cadeias; interação polímero-solvente; tipo de solvente; densidade do meio; concentração; temperatura; vazão da solução, dentre outras.

Medidas de viscosidade de soluções são normalmente feitas pela comparação entre o tempo de escoamento, t, requerido para que um dado volume de solução polimérica passe através de um tubo capilar, e o tempo requerido para o escoamento do solvente puro, t_0 . A viscosidade da solução polimérica, t_0 , é maior que a do solvente puro, t_0 . A concentração das soluções não deve ser muito alta, pois dificulta a extrapolação para dissolução infinita. Tem-se observado que se deve escolher a concentração de modo que t_0 , recaia numa faixa de 1,1 a 1,5, sendo esta considerada uma região de linearidade do fenômeno (Canevarolo Júnior, 2006).

Na TAB. 5 são apresentadas as definições das viscosidades utilizadas, obtidas por várias medidas do tempo de escoamento, t, das soluções poliméricas em diferentes concentrações e do solvente puro (t_0), usadas para o cálculo de $\overline{M_v}$.

TABELA 5 - Definições das viscosidades utilizadas (Michel, 2015).

NOME COMUM	SÍMBOLO	UNIDADE	DEFINIÇÃO
Viscosidade			Mede o quanto a viscosidade
	$\eta_{rel} = t/to$ Relativa		da solução é maior do que a
Relativa			viscosidade do solvente puro.
	1 - (n n Vn	adimensional	Mede o quanto a diferença
Viscosidade			de viscosidade entre a
	$\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1 = (\eta - \eta_o)/\eta_o =$		solução e o solvente é maior
Específica	$(t-t_o)/t_o$		do que a viscosidade do
			solvente puro.
			Indica o ganho de
Viscosidade	n - n /o	[o-1] dl /a	viscosidade promovido por
Reduzida	$\eta_{\rm red} = \eta_{\rm sp}/c$	$[c^{-1}] = dL/g$	unidade de concentração do
			polímero.
	η _{inh} = [In(η _{rel})]/c	[c ⁻¹] = dL/g	Permite que tanto variações
			pequenas quanto variações
Viscosidade			muito grandes da viscosidade
Inerente			da solução, em relação à do
merente			solvente, possam ser
			expressas em um mesmo
			eixo.
	$[\eta] = \left \left(\eta_{sp}/c \right) \right _{c \to 0} = \left \left[\ln \left(\eta_{rel} \right)/c \right] \right _{c \to 0}$		Indica o ganho de
			viscosidade promovido por
			unidade de concentração do
Viscosidade		$[c^{-1}] = dL/g$	polímero, na situação em que
Intrínseca			as moléculas apresentam
			comportamento
			independente umas das
			outras.

A equação de Mark-Houwink relaciona a viscosidade intrínseca de uma solução polimérica e a massa molecular do polímero (Equação 9):

$$[\eta] = k \, (\overline{M})^a \tag{9}$$

onde [η] é a viscosidade intrínseca, *a* é a mesma constante da Equação 6 e está relacionada com a conformação e k é uma constante que depende do polímero, do solvente e da temperatura.

Essas constantes são avaliadas experimentalmente por meio das viscosidades intrínsecas de soluções de polímeros para os quais a massa molecular tenha sido determinada por um método absoluto. Desde 1974, vários autores têm relatado valores para k e a para quitosanas em vários sistemas de solventes e temperaturas, o que causa confusões em aplicações práticas. O \overline{GD} das amostras de quitosanas utilizadas é uma das principais razões para as diferenças encontradas. A densidade linear de carga na cadeia aumenta com o aumento do grau de desacetilação e isso pode originar um aumento gradual na viscosidade intrínseca em razão da expansão da cadeia enovelada. A quitosana comporta-se como um polietrólito em soluções aquosas de ácido diluído. Por isso, a escolha de um bom sistema de solvente para a caracterização de quitosana deve incluir um ácido para a protonação e um sal no intuito de evitar a interação eletrostática e, cosequentemente, a formação de agregados, comum em soluções de polissacarídeos (Roberts e Domszy, 1982; Wang et al., 1991; Knaul et al., 1998; Rinaudo, 2006).

Roberts e Domszy (1982) determinaram valores de massa molecular por espectroscopia de absorção pela técnica de análise de grupo terminal medindo a concentração desses grupos pela formação do derivado de fenilozazona de quitosana por reação de redução com fenilidrazina. Para determinação da [n] dos derivados foi utilizado o sistema de solventes ácido acético 0,1 M / cloreto de sódio 0,2 M à temperatura de 25°C. As constantes viscosimétricas a e k foram determinadas com base no gráfico de $\log \overline{M_n}$ versus $\log[n]$. O termo $\overline{M_n}$ foi substituído pelo $\overline{M_V}$ pelo fato de a ser adimensional e a amostra polidispersível. Após o tratamento dos dados, a análise de regressão linear forneceu como valores para as constantes a = 0,93 e k = 1,81·10⁻³ cm³ g⁻¹. Esses valores são bastante citados na literatura pelo fato deles terem utilizado amostras preparadas com valores de média a alta massa molecular, cada qual contendo uma estreita distribuição (Roberts e Domszy, 1982; Kumar, 2000).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Fluxograma de trabalho

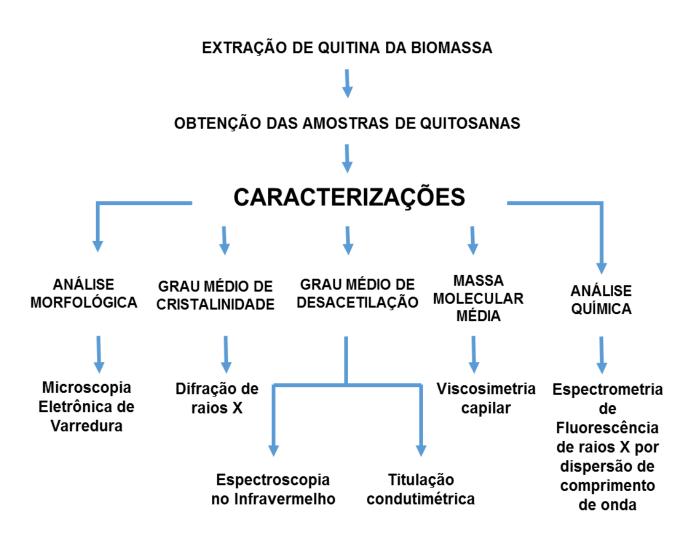


FIGURA 23 - Fluxograma de trabalho.

4.2 Materiais

Lista de Reagentes:

- Ácido Acético P.A. 99% Vetec®
- Ácido Clorídrico P.A. 37% Vetec[®]
- Álcool Etílico Absoluto P.A. 99,7% Alphatec[®]
- Brometo de Potássio P.A. 99% Synth[®]
- Cloreto de Sódio P.A. 99% Casa Americana Ltda.
- Hidróxido de Amônio P.A. 28% Synth[®]
- Hidróxido de Sódio P.A. 99%- Alphatec[®]
- Quitosana de massa molecular média e GD 75-85% Sigma-Aldrich®
- Resíduos de cascas de camarão de espécies não identificadas fornecidas pela Tríade[®] Soluções em Resíduo Ltda. - Cananéia, SP – Brasil.

4.3 Obtenção das amostras de quitina

As amostras de α-quitina do presente estudo foram obtidas por dois procedimentos diferentes, de acordo com o fluxograma apresentado na FIG. 24, denominados procedimento 1 (P1) e procedimento 2 (P2), nas quais as etapas de desproteinização (DP) e desmineralização (DM) foram invertidas (Battisti e Campana Filho, 2008).

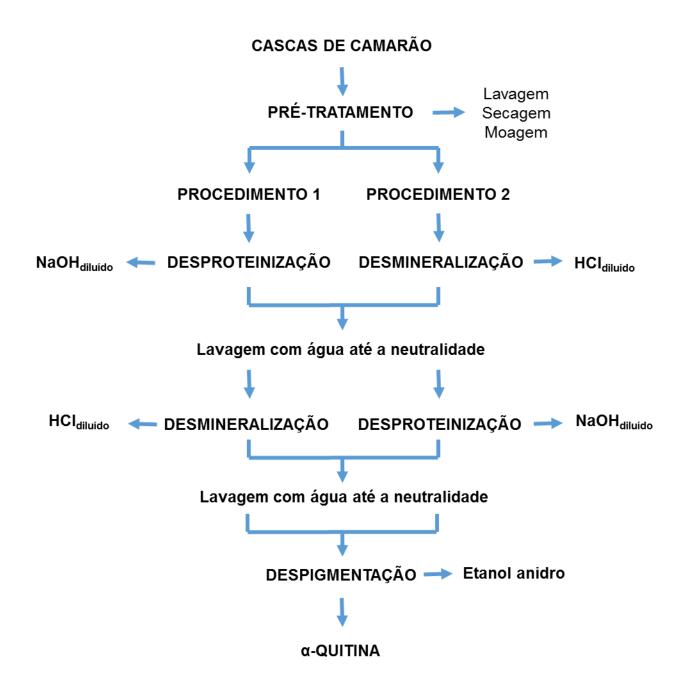


FIGURA 24 - Fluxograma do processo de obtenção das amostras de α-quitina.

As cascas de camarão utilizadas para obtenção das amostras de α-quitina e quitosanas foram coletadas no segundo trimestre de 2013 e fornecidas pela empresa Tríade[®] Soluções em Resíduo Ltda., localizada em Cananéia-SP, Brasil. No pré-tratamento, as cascas foram lavadas com água potável para retirada de areia e sujeiras, centrifugadas para eliminar o excesso de água e submetidas à secagem em estufa com ventilação forçada e temperatura de 60 °C por 1 hora. Após a secagem, foram moídas em moinho de facas, segundo informações do fornecedor. Na TAB. 6 é apresentada a composição granulométrica em termos da distribuição percentual do tamanho de partícula da biomassa utilizada nos procedimentos descritos a seguir.

Tabela 6 - Ensaio de granulometria das cascas de camarão moídas utilizadas no processo de obtenção da quitina e quitosanas analisadas no presente estudo.

Peneira (mm)	0,420	0,250	0,149	0,074	0,061	Fundo
Porcentagens retidas (%)	11	28	18	22	5	16

> Procedimento 1

Na etapa de desproteinização (DP), 160 g de cascas secas e moídas foram suspensos em 1,0 L de solução de NaOH nas concentrações apresentadas na TAB. 7. O sistema foi mantido em banho-maria, no qual a temperatura de reação foi de 80 ± 3 °C por 30 minutos, sob agitação mecânica. Após esse tempo, a amostra foi lavada com água potável até obtenção da neutralidade e, em seguida, uma vez com água destilada. A amostra foi submetida mais duas vezes ao tratamento alcalino nas mesmas condições.

Na etapa de desmineralização (DM), a biomassa desproteinizada foi adicionada a 1,0 L de solução de HCl a 20% (v/v), à temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C), pelo período de tempo definido na TAB. 7. O material sólido resultante deste tratamento foi lavado com água potável até a obtenção da neutralidade e, em seguida, uma vez com água destilada. Esse procedimento foi realizado uma vez. O material obtido foi seco à temperatura ambiente.

> Procedimento 2

Similar ao P1, na etapa de DM, 160 g de cascas secas e moídas foram suspensos em 1,0 L de solução de HCl a 20% (v/v), à temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C), pelo período de tempo definido na TAB. 7. O material sólido resultante deste tratamento foi lavado com água potável até a obtenção da neutralidade e, em seguida, uma vez com água destilada. Esse procedimento foi realizado uma vez.

Na etapa de DP, a biomassa desmineralizada foi adicionada a 1,0 L de solução de NaOH nas concentrações de acordo com a TAB. 7. O sistema foi mantido em banho-maria, no qual a temperatura de reação foi de 80 ± 3 °C por 30 minutos, sob agitação mecânica. Após esse tempo, a amostra foi lavada em água potável até obtenção da neutralidade e, em seguida, uma vez com água destilada. A amostra foi submetida mais duas vezes ao banho alcalino nas mesmas condições. O material obtido foi seco à temperatura ambiente.

As amostras de α -quitina do P1 foram denominadas de Q_n e as do P2 de Q_n , cujo n é o número da amostra.

TABELA 7 - Obtenção das amostras de α-quitina em função da concentração de NaOH na etapa de desproteinização e do tempo de reação das cascas em HCl na etapa de desmineralização.

NaOH (%)	4	8	12
2	Q1	Q2	Q3
5	Q4	Q5	Q6
10	Q7	Q8	Q9

4.4 Obtenção das amostras de quitosanas

Para a obtenção das amostras de quitosanas, aproximadamente 30 g de cada amostra de α-quitina obtida foram lavados com 500 mL de álcool etílico 99,7% por aproximadamente 2 horas em sistema Soxhlet para retirada dos pigmentos. Após a secagem à temperatura ambiente, a amostra foi adicionada a 1,0 L de solução de NaOH, em banho-maria, no qual a temperatura de reação foi

de 110 ± 3 °C, sob agitação mecânica. As concentrações de reagente e o tempo de reação estão descritos na TAB. 8. A lavagem do produto final foi feita até a obtenção da neutralidade e, em seguida, uma vez com água destilada. Esta etapa exigiu muita cautela por causa das altas concentrações de NaOH utilizadas para desacetilação (DA). Como feito para as amostras de α -quitina, as amostras de quitosana do P1 foram denominadas de Qt_n e as do P2 de Qt'_n.

TABELA 8 - Obtenção das amostras de quitosanas em função da concentração de NaOH e do tempo de reação na etapa de desacetilação.

NaOH (%)	2	4	6
30	Qt1	Qt2	Qt3
40	Qt4	Qt5	Qt6
50	Qt7	Qt8	Qt9

4.5 Caracterização das amostras de α-quitina e quitosanas

Os principais parâmetros físico-químicos avaliados das amostras obtidas foram \bar{X} , \bar{GD} , $\bar{M_v}$ e a morfologia e podem variar dependendo do método de purificação adotado, (Hattori e Ishihara, 2015). Sendo assim, para todos os ensaios realizados, as amostras foram pulverizadas e analisadas sem passar por nenhum processo de purificação a fim de avaliar as reais modificações nos produtos finais em consequência do tratamento adotado. O software Origin Lab. 9.0 foi utilizado para o tratamento dos dados e a análise estatística dos resultados. A quitosana da Sigma-Aldrich® foi utilizada como padrão analítico para comparar os resultados das amostras obtidas quanto aos parâmetros \bar{X} , \bar{GD} , $\bar{M_v}$.

4.5.1 Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi a técnica utilizada para avaliar as características morfológicas dos pós das amostras de α-quitina e quitosanas. As análises foram realizadas, sem recobrimento no microscópio eletrônico de varredura Tabletop Microscope modelo TM3000 localizado no Laboratório de Microscopia do Centro de Ciências e Tecnologia de Materiais (CCTM) do IPEN/CNEN-SP.

4.5.2 Percentual de material insolúvel nas amostras de quitosanas

O conteúdo de material insolúvel nas amostras de quitosanas foi determinado mediante a dissolução de 5 g de cada amostra em 500 mL de solução de ácido acético a 1% (v/v). O sistema foi mantido sob agitação constante em agitador tipo *shaker* à temperatura ambiente (25 \pm 5 °C) por 24 horas. Após, as soluções foram filtradas em filtro de papel de porosidade 0,3 μ m. O material retido no filtro foi lavado e seco em estufa a 40 \pm 2 °C e, posteriormente, pesado.

4.5.3 Determinação do grau médio de cristalinidade por difração de raios X

As amostras de α -quitina e quitosanas obtidas foram comparadas por difração de raios X (DRX) quanto ao seu grau de cristalinidade, \bar{X} (loelovich, 2014). As medidas de difração de raios X foram realizadas em difratômetro da marca Rigaku, modelo Multiflex, com radiação de CuK α (λ =1,54 Å) com voltagem de 40 kV, corrente de 20 mA, 2 θ = 2° a 50°, ao passo de 1°/min, localizado no CCTM - IPEN/CNEN-SP.

O \bar{X} foi calculado utilizando a Equação 1 com base na determinação da área definida pelas linhas de base nos difratogramas das amostras, como mostrado nas FIG. 13 e 14.

4.5.4 Determinação do grau médio de acetilação por espectroscopia na região do infravermelho

As amostras de α-quitina e quitosanas foram trituradas e homogeneizadas em 100 mg de KBr na proporção de 1:10. As pastilhas foram confeccionadas com auxílio de uma prensa hidráulica e armazenadas em dessecador até o momento das análises, realizadas em espectrofotômetro da marca Thermo Scientific, modelo Nicolet 6700, no intervalo de varredura de 400-4000 cm⁻¹, na resolução de 4 cm⁻¹, localizado no Centro de Química e Meio Ambiente (CQMA) do IPEN/CNEN-SP.

As alturas dos picos de absorbância nas regiões de 1320 cm⁻¹ e 1420 cm⁻¹ foram obtidas pelas linhas de base 6 e 9 (FIG. 19) para o cálculo do \overline{GD} por meio da Equação 3.

4.5.5 Determinação do grau médio de desacetilação das amostras de quitosanas por titulação condutimétrica

Foi adicionado 0,200 mg de amostra de quitosana a 100 mL de HCl 0,05 mol L-1. A solução foi mantida sob agitação magnética por 2 horas à temperatura

de 25 ± 1 °C. A titulação foi feita adicionando-se 0,1 mL de NaOH 0,4 mol L-1 à solução de quitosana não filtrada. O sistema foi mantido sob agitação constante durante todo o procedimento. Após a adição de cada alíquota de base, os valores de condutância e pH foram mensurados utilizando o condutivímetro portátil da marca MS TECNOPON Equipamentos Especiais LTDA. e o pHmetro da marca Metter Toledo – Seven Compact pH/ion S222. O \overline{GD} de cada amostra foi calculado utilizando a Equação 4.

4.5.6 Determinação da massa molecular média das amostras de quitosanas por viscosimetria capilar

Para determinação da viscosidade intrínseca, [η], foi utilizado um viscosímetro capilar do tipo Cannon-Fenske (tamanho 100). Foram adicionados 0,3 mg de amostra a 30 mL do sistema de solvente CH₃COOH 0,1 mol L⁻¹/NaCl 0,2 mol L⁻¹. As soluções foram filtradas e as diluições preparadas de forma seriada, tal que a viscosidade relativa, η_{rel}, fosse superior a 1,1 e inferior a 1,5. O tempo de escoamento foi medido com auxílio de um cronômetro à temperatura de 25 ± 1 °C. Foram feitas cinco leituras para o cálculo da média do tempo de escoamento do sistema de solventes e das soluções diluídas. Os termos sobre viscosimetria capilar e suas respectivas equações estão relacionados de acordo com a TAB. 5 e, com base neles, a viscosidade intrínseca de cada amostra foi determinada.

A massa molar viscosimétrica foi obtida utilizando a Equação 9, sendo as constantes *a* e *k* utilizadas as mesmas obtidas por Roberts e Domszy (1982), uma vez que foi utilizado o mesmo sistema de solventes e condição de temperatura descritos pelos autores.

4.5.7 Análise química das amostras de quitosanas por espectroscopia de fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda

A análise por espectroscopia de fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda (WDXRF) permitiu a determinação semiquantitativa dos

elementos sódio, magnésio, alumínio, silício, fósforo, enxofre, cloro, potássio, cálcio, ferro, níquel, cobre e zinco. Os espectros, com as linhas analíticas sobrepostas dos elementos químicos analisados, foram obtidos no espectrômetro WDXRF, da marca RIGAKU modelo RIX-3000, no Laboratório de Fluorescência de Raios X do Centro de Lasers e Aplicações (CLA) do IPEN/CNEN-SP. As amostras foram analisadas sem nenhum tratamento prévio.

4.5.8 Análise estatística

Por meio da técnica estatística ANOVA (*ANalysis Of VAriance*) foi possível avaliar a influência dos nove tratamentos para a obtenção das amostras de α-quitina e suas respectivas quitosanas. Cada rota (P1 e P2) foi analisada individualmente pelos valores médios obtidos para os principais parâmetros físico-químicos estudados, gerando um total de quatro grupos analisados. Mediante a análise, foi verificada a existência de diferenças significativas entre as médias e as condições empregadas em cada tratamento.

As hipóteses testadas foram:

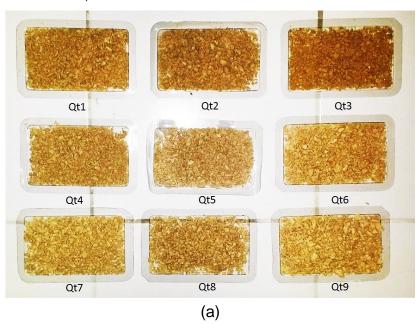
- ➤ Hipótese nula: os valores médios obtidos para os parâmetros físicoquímicos das amostras analisadas não possuem diferenças significativas.
- ➤ Hipótese alternativa: os valores médios obtidos para os parâmetros físico-químicos são diferentes.

Se o valor F for maior ou igual ao valor p, rejeita-se a hipótese de nulidade, ou seja, existem evidências significativas em que pelo menos dois tratamentos diferem entre si a um nível de significância de 0,05. Caso contrário, não se rejeita a hipótese nula.

A ANOVA diz se existe ou não diferença entre os tratamentos, mas não diz quais tratamentos diferem. O Teste Tukey foi aplicado com base no desvio padrão dos valores calculados para cada parâmetro analisado, a fim de testar o contraste dos tratamentos par a par para cada procedimento individualmente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

As amostras de α -quitina e quitosanas obtidas mediante as condições descritas nas TAB. 7 e 8 apresentaram características visuais bem diferentes em virtude do procedimento. No procedimento 1, ambas, α -quitina e quitosana, apresentaram-se em aspecto de pó de coloração castanho médio, enquanto no procedimento 2, as amostras se apresentaram em aspecto de flocos com tonalidades mais claras, como ilustrado na FIG. 25.



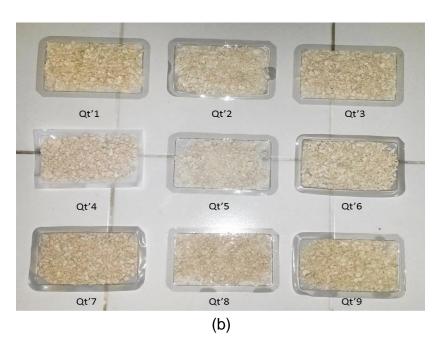


FIGURA 25 - Amostras de quitosanas obtidas: (a) procedimento 1; (b) procedimento 2.

O processo de despigmentação removeu grande quantidade de pigmentos das amostras de quitina obtidas pelo P1 (fato este observado pela coloração acastanhada do etanol utilizado no processo de lavagem); no entanto, suas respectivas quitosanas apresentaram praticamente a mesma coloração dos materiais de partida. O etanol recolhido após a lavagem das amostras de quitina do P2 não apresentou mudanças consideráveis de coloração, o que indica que esta rota tenha promovido a remoção dos pigmentos contidos na casca do camarão. A desproteinização realizada na segunda etapa do P2 permite "encadear" a desacetilação (próxima etapa de ambos os procedimentos) por ocorrer em meio alcalino. Esse fato poderia ser uma justificativa da eficiência desse procedimento em remover os pigmentos. Portanto, a etapa de despigmentação poderia ser eliminada minimizando o tempo e, consequentemente, os custos do processo.

Na FIG. 26 é apresentada as micrografias das amostras de quitina e quitosanas obtidas pelo tratamento 9 (mais vigoroso) por ambos procedimentos. Battisti e Campana Filho (2008) relataram que as mudanças na morfologia das amostras de quitosanas obtidas por eles foram em consequência dos tratamentos ácido e alcalino. O ataque ácido sendo realizado na primeira etapa (P2) seria mais agressivo, degradando mais a superfície. Este fato pode ser observado mediante a formação de poros nas amostras de quitina obtidas por meio do P2 e, em menor intensidade, para suas respectivas quitosanas. O mesmo não foi observado nas amostras obtidas pelo P1.

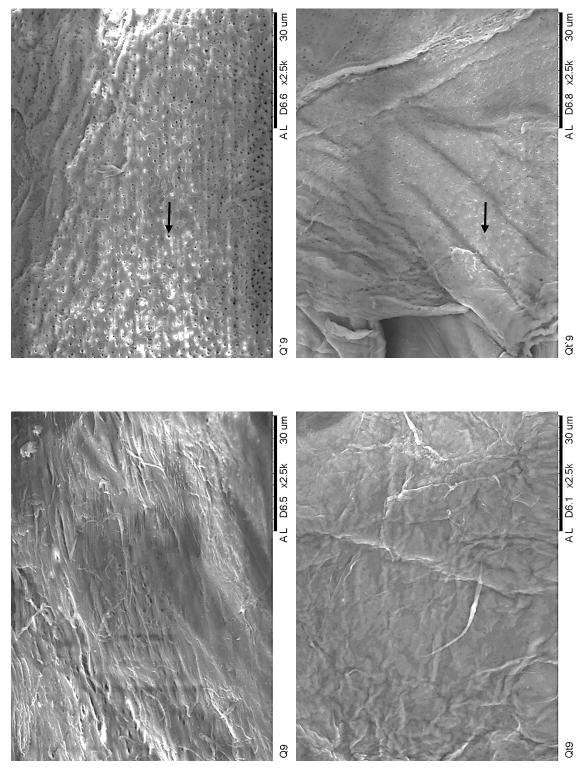
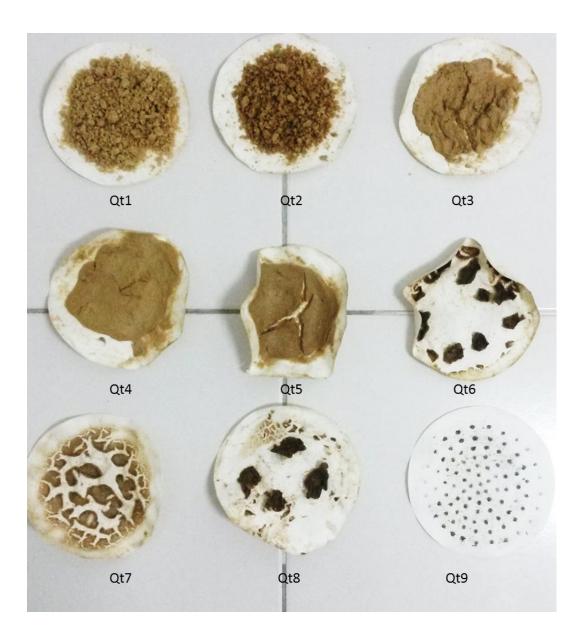


FIGURA 26 - Micrografías das amostras de quitina e quitosanas obtidas pelo tratamento 9 por ambos os procedimentos.

O fato da quitosana ser solúvel em meio ácido tornou-se um método viável para distinguir os dois biopolímeros (quitina e quitosana) e se as condições de processo foram efetivas na obtenção da quitosana. A solubilidade da quitosana está relacionada à quantidade de grupos amino susceptíveis à protonação em meio ácido, ou seja, ao seu \overline{GD} . Quanto maior a quantidade desses grupos, maior a repulsão eletrostática entre as cadeias e, portanto, melhor a solvatação (SANTOS et al., 2003). Chang et al. (1997) verificaram que o \overline{GD} da quitosana aumenta com o aumento da concentração de NaOH, da temperatura e do tempo de reação de N-desacetilação, o que justifica o fato do teor de sólidos ter diminuído à medida em que as condições da etapa de desacetilação se tornaram mais vigorosas, observado nas FIG. 27 e 28. Na TAB. 9 são apresentados os valores percentuais do rendimento do processo de obtenção das amostras de quitosanas e de material insolúvel de cada amostra após a secagem.

TABELA 9 - Valores percentuais do rendimento do processo de obtenção das amostras de quitosanas e de material insolúvel de cada amostra após a secagem.

AMOSTRA P1	Rendimento (%)	Teor de sólidos (%)	AMOSTRA P2	Rendimento (%)	Teor de sólidos (%)
Q1	76	95 ± 4	Q'1	76	98 ± 2
Q2	76	92 ± 2	Q'2	76	95 ± 2
Q3	74	81 ± 4	Q'3	73	84 ± 8
Q4	73	84 ± 5	Q'4	70	86 ± 4
Q5	70	64 ± 4	Q'5	70	66 ± 7
Q6	67	52 ± 6	Q'6	73	61 ± 4
Q7	67	24 ± 1	Q'7	71	39 ± 7
Q8	72	39 ± 7	Q'8	69	48 ± 7
Q9	69	3 ± 1	Q'9	67	2 ± 1

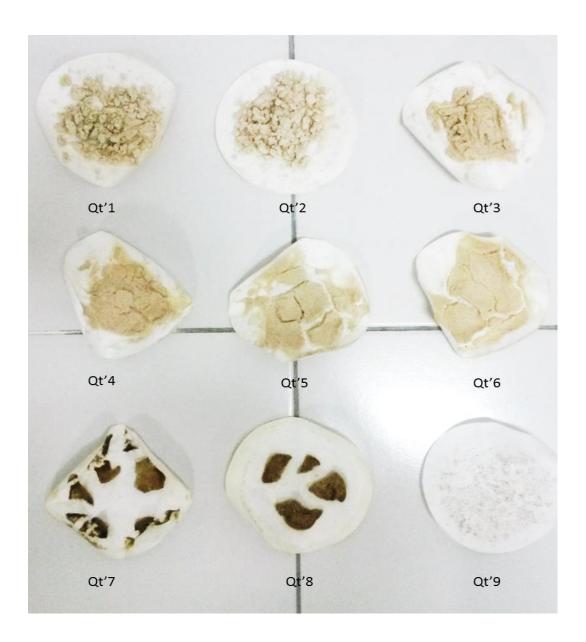


(a)



(b)

FIGURA 27 - Avaliação da solubilidade das amostras das quitosanas obtidas pelo procedimento 1. (a) material obtido após a secagem em estufa a 50 °C por 24 horas; (b) Fração solúvel em ácido acético 1% (da esquerda para direita de 1 a 9).



(a)



(b)

FIGURA 28 - Avaliação da solubilidade das amostras das quitosanas obtidas pelo procedimento 2. (a) material obtido após a secagem em estufa a 50 °C por 24 horas; (b) Fração solúvel em ácido acético 1% (da esquerda para direita de 1 a 9).

O difratograma obtido para a amostra padrão é apresentado na FIG. 29 e os difratogramas das amostras de quitina e quitosanas são apresentados nas FIG. 30 a 33.

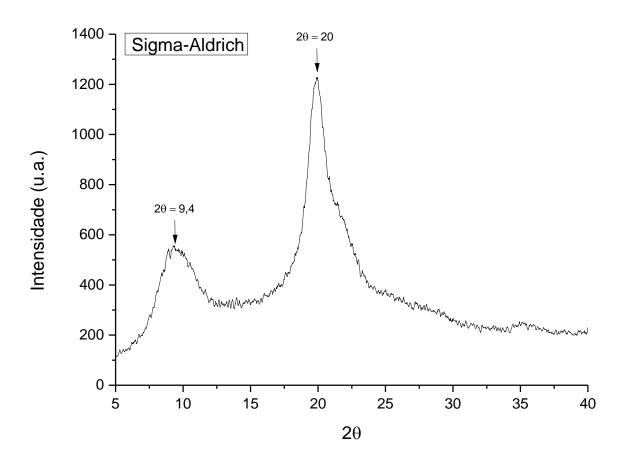


FIGURA 29 - Difratograma de raios X da amostra de quitosana utilizada como padrão analítico.

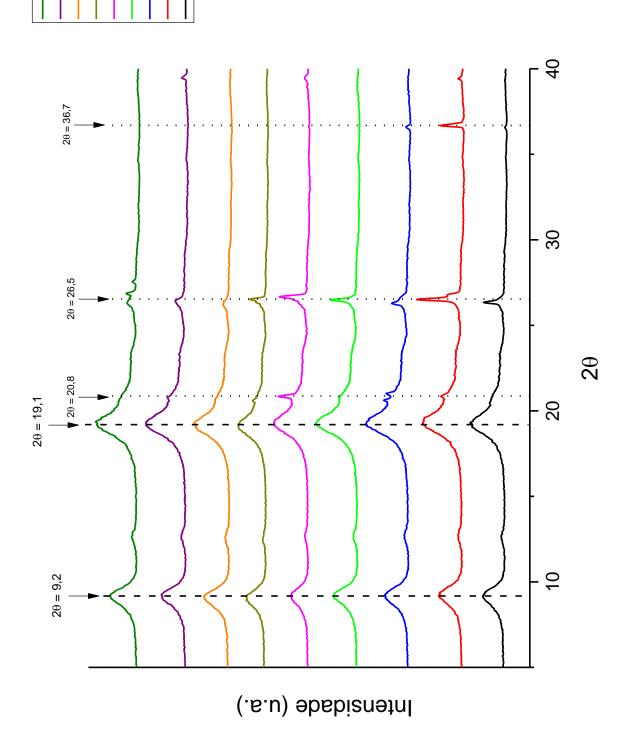


FIGURA 30 - Difratogramas de raios X das amostras de quitina preparadas pelo procedimento 1.

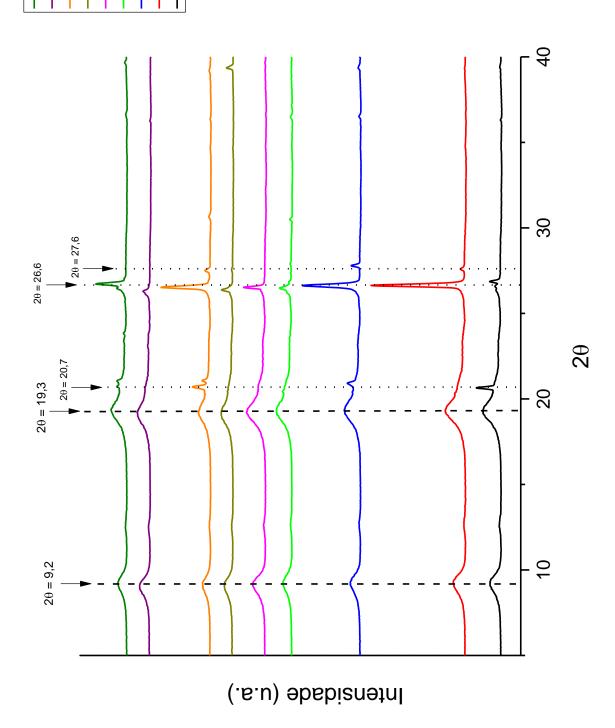


FIGURA 31 - Difratogramas de raios X das amostras de quitina preparadas pelo procedimento 2.

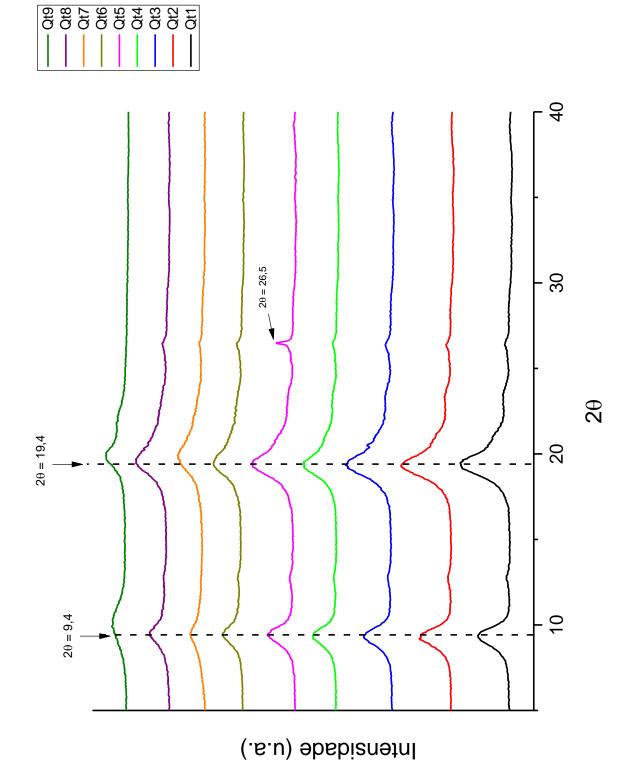


FIGURA 32 - Difratogramas de raios X das amostras de quitosanas preparadas pelo procedimento 1.

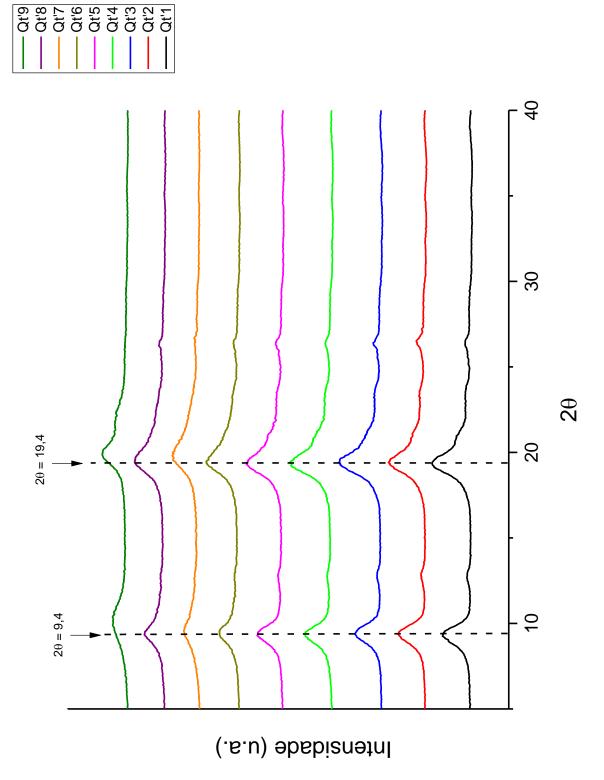


FIGURA 33 - Difratogramas de raios X das amostras de quitosanas preparadas pelo procedimento 2.

Os difratogramas das amostras de quitina estão de acordo com os descritos por loelovich (2014), pois mostraram para todas as amostras de ambos os procedimentos dois picos de difração em 2θ de 9-9,5° e 19-19,5°. De acordo com o autor, estes picos, típicos do polimorfo α , aparecem em consequência da difração dos planos (020) e (110).

Os picos em 20,8°; 26,6° e 36,5° nos difratogramas das amostras de quitina correspondem a fase quartzo (SiO₂) conforme ficha PDF nº 461045. A presença dessa fase pode ser atribuída a contaminações ocorridas durante o processo de desproteinização (uso de base diluída) pelo fato de ter sido utilizado becker de vidro nessa etapa. Uma vez que na etapa de desacetilação (uso de base concentrada) foi utilizado becker de polipropileno, esses picos não foram identificados nas amostras de quitosanas.

A análise a seguir para as amostras de quitosanas é válida para ambos os procedimentos. As amostras de 1 a 6 apresentaram os picos de difração em 20 na mesma região das amostras de quitina. Para as amostras de 7, 8 e 9 foi observado um pico de difração fraco em 20 de 10-10,5° e um mais intenso em 20 de 20-20,5°, também causados pela difração dos planos (020) e (110). Houve um decréscimo na intensidade dos picos de difração das amostras 7 e 9, o que indica diminuição na cristalinidade do biopolímero. Os difratogramas dessas amostras são semelhantes ao difratograma obtido para a amostra padrão, apresentado na FIG. 29. Os valores obtidos para o grau de cristalinidade das amostras de quitina e quitosanas são apresentados nas TAB. 10 e 11.

O espectro de absorção na região do infravermelho obtido para a amostra padrão é apresentado na FIG. 34 e os espectros para as amostras de quitina e quitosanas são apresentados nas FIG. 35 a 38, respectivamente.

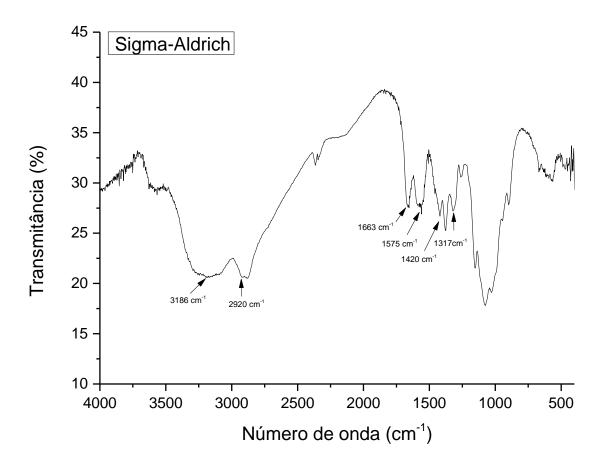


FIGURA 34 - Espectro de absorção na região do infravermelho da amostra de quitosana utilizada como padrão analítico.

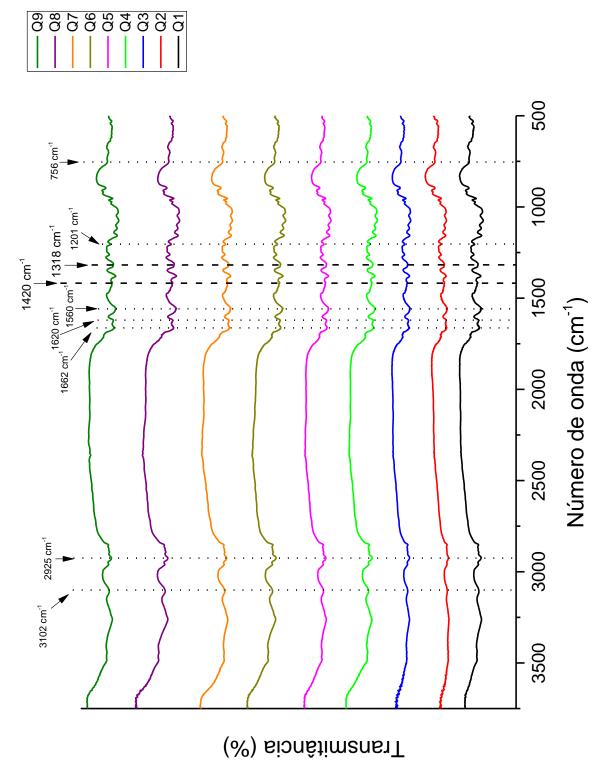


FIGURA 35 - Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de quitina preparadas pelo procedimento 1.

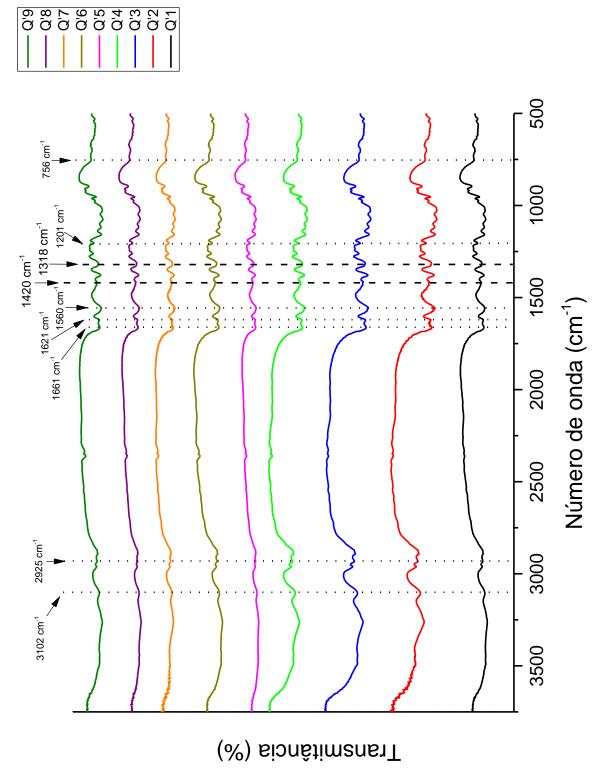


FIGURA 36 - Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de quitina preparadas pelo procedimento 2.

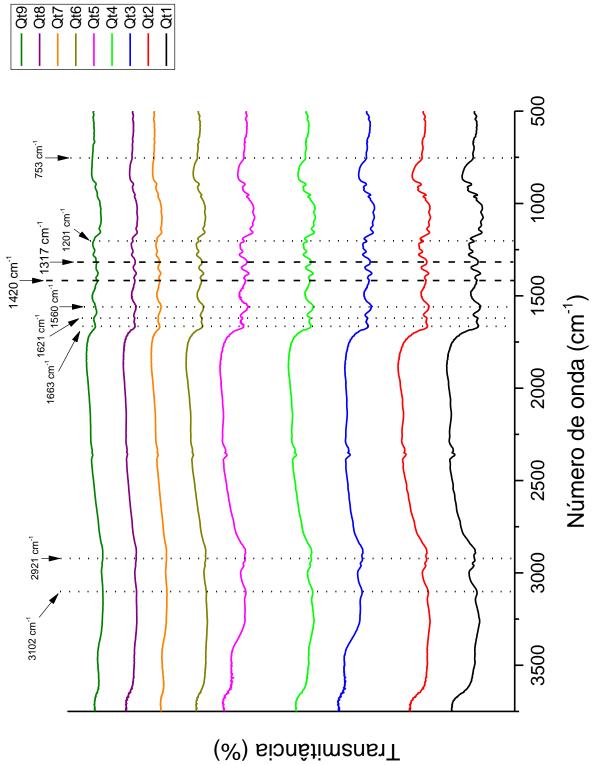


FIGURA 37 - Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de quitosanas preparadas pelo procedimento 1.

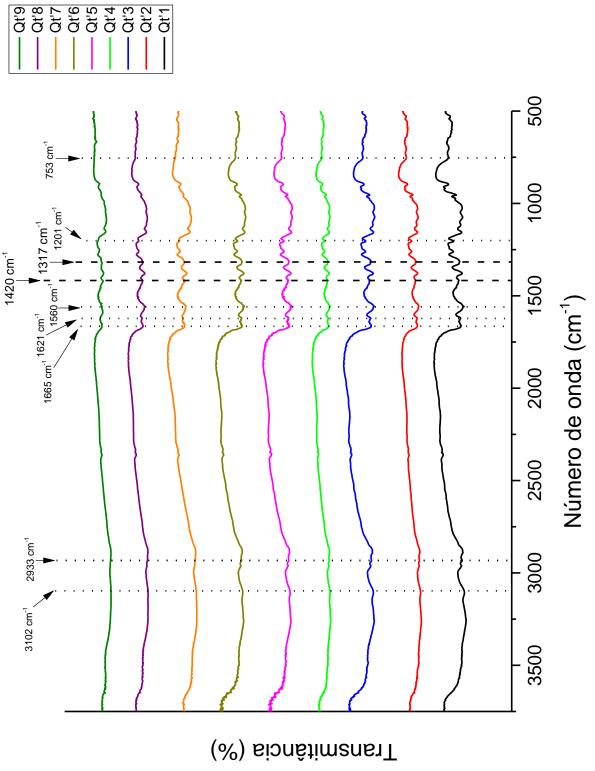


FIGURA 38 - Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de quitosanas preparadas pelo procedimento 2.

As observações feitas a seguir são válidas para as amostras de quitina e quitosanas obtidas por ambos os procedimentos. As amostras de quitina apresentaram as bandas características nas mesmas regiões descritas para o monômero N-acetil-D-glucosamina (FIG. 17). A banda larga que aparece na região de 3500 a 3070 cm⁻¹ corresponde aos estiramentos dos grupos O-H e N-H característicos de álcoois, aminas e amidas presentes na estrutura do sólido. A banda, centrada na região de 3100 cm⁻¹, é referente ao grupo N-H de amidas. Esta banda aparece com intensidade forte para todas as amostras de quitina e para as amostras de quitosanas esta banda perdeu intensidade da amostra 1 para 9.

A banda observada na região de 2920 cm⁻¹ é referente ao estiramento C-H de alcano e pode ser atribuída aos grupos CH₂ dos anéis piranosídicos e ao CH₃ dos grupos acetamido da quitina. Esta banda aparece com intensidade forte para todas as amostras de quitina e para as amostras de quitosanas de 1 a 4, enquanto nos espectros das amostras quitosanas de 5 a 9 foi possível observar o alargamento dessa banda até o seu desaparecimento à medida em que as condições de processamento se tornaram mais vigorosas, como consequência da desacetilação.

As bandas nas regiões de 1660 e 1620 cm⁻¹ (dublet) são atribuídas a deformação axial de C=O de grupo amida e aparecem para todas as amostras de quitina. Como esperado, para as amostras de quitosana a intensidade dessas bandas diminuiu à medida em que os tratamentos se tornaram mais vigorosos. A partir da amostra 5, foi possível observar o alargamento da banda em 1660 cm⁻¹ e o desaparecimento da banda em 1620 cm⁻¹, sendo esse fato também atribuído à eficácia do processo de desacetilação, principalmente para os tratamentos 7, 8 e 9.

A banda observada na região de 1580 cm⁻¹ é atribuída à deformação angular de N-H de grupos amida ou amina secundário e possui a mesma intensidade em todos os espectros para todas as amostras de quitina e para as amostras de quitosanas de 1 a 4. Uma vez que a quitosana contém grupos amino primário em sua estrutura, essa banda perde a intensidade à medida em que o processo de desacetilação se torna mais efetivo, fato esse observado pelo alargamento dessa banda a partir da amostra 5.

A banda na região de 1420 cm⁻¹ foi considerada por Brugnerotto et al. (2001) como banda de referência para os biopolímeros quitina e quitosana. De fato, essa banda apresenta praticamente a mesma intensidade para todos os espectros

de quitina e quitosanas. Já a banda na região de 1320 cm⁻¹ foi considera pelos autores como específica para N-acetil-D-glucosamina. Essa banda apresentou o mesmo perfil observado nas bandas em 2920 cm⁻¹, o dublet em 1660 e 1620 cm⁻¹ e em 1580 cm⁻¹, e, portanto, a mesma análise feita para essas bandas pode ser empregada. As bandas na região de 1200 a 800 cm⁻¹ podem ser associadas às vibrações das estruturas dos polissacarídeos.

Os espectros das amostras de quitosanas 7, 8 e 9 são semelhantes ao espectro obtido para a amostra padrão (FIG. 34). Os resultados obtidos para o grau de acetilação das amostras de quitina e quitosanas estão apresentados nas TAB. 10 e 11, respectivamente.

TABELA 10 - Resultados obtidos para os parâmetros das amostras de quitina analisadas: grau médio de cristalinidade (\bar{X}) e grau médio de acetilação (\bar{GA}) por FT-IR.

AMOSTRA	X (%)	$\overline{GA_{FT-IR}}$ (%)	AMOSTRA	X (%)	$\overline{GA_{FT-IR}}$ (%)
Q1	74 ± 2	71 ± 9	Q'1	78 ± 1	82 ± 10
Q2	72 ± 2	75 ± 8	Q'2	78 ± 1	76 ± 18
Q3	76 ± 3	74 ± 8	Q'3	80 ± 2	77 ± 18
Q4	74 ± 2	81 ± 12	Q'4	77 ± 3	76 ± 16
Q5	77 ± 3	80 ± 11	Q'5	78 ± 2	83 ± 7
Q6	78 ± 3	72 ± 14	Q'6	78 ± 2	85 ± 11
Q7	80 ± 2	87 ± 14	Q'7	83 ±1	77 ± 8
Q8	71 ± 3	83 ± 16	Q'8	74 ± 3	74 ± 7
Q9	72 ± 3	83 ± 13	Q'9	75 ±1	80 ± 9

TABELA 11 - Resultados obtidos para os parâmetros das amostras de quitosanas analisadas: grau médio de cristalinidade (\bar{X}) e grau médio de acetilação $(\bar{G}\bar{A})$ por FT-IR.

AMOSTRA	X (%)	$\overline{GA_{FT-IR}}$ (%)	AMOSTRA	X (%)	$\overline{GA_{FT-IR}}$ (%)
Qt1	77 ± 1	73 ± 15	Qt'1	75 ± 2	78 ± 7
Qt2	74 ± 2	76 ± 13	Qt'2	72 ± 2	82 ± 5
Qt3	64 ± 2	67 ± 14	Qt'3	65 ± 1	70 ± 7
Qt4	72 ± 3	69 ± 10	Qt'4	61 ± 2	68 ± 4
Qt5	64 ± 2	54 ± 13	Qt'5	62 ± 2	55 ± 7
Qt6	65 ± 2	52 ± 8	Qt'6	58 ± 3	52 ± 7
Qt7	57 ± 5	34 ± 6	Qt'7	58 ± 2	29 ± 6
Qt8	60 ± 4	41 ± 5	Qt'8	62 ± 3	39 ± 4
Qt9	52 ± 4	12 ± 6	Q't9	51 ± 4	10 ± 4

Nas TAB. 12 e 13 é apresentado um resumo das informações obtidas pela análise estatística.

TABELA 12 - Tabela de ANOVA dos valores obtidos para o grau médio de cristalinidade das amostras de quitina e quitosanas determinados por difração de raios X.

GRUPOS	FONTE DA VARIABILIDADE	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADOS MÉDIOS	VALOR F	VALOR P
	Entre grupos	9	224,66667	24,96296	3,47845	0,01296
Quitina P1	Dentre grupos	17	122	7,17647		
	Total	26	346,66667			
	Entre grupos	8	164,66667	20,58333	5,97581	8,10E-04
Quitina P2	Dentre grupos	18	62	3,44444		
	Total	26	226,66667			
0 "	Entre grupos	8	1074,66667	134,33333	14,5663	2,06E-06
Quitosanas P1	Dentre grupos	18	166	9,22222		
	Total	26	1240,66667			
0 "	Entre grupos	8	850,66667	106,33333	17,4	5,37E-07
Quitosanas P2	Dentre grupos	18	110	6,11111		
	Total	26	960,66667			

TABELA 13 - Tabela de ANOVA dos valores obtidos para o grau médio de acetilação das amostras de quitina e quitosanas determinados por espectroscopia no IV por Transformada de Fourier.

GRUPOS	FONTE DA VARIABILIDADE	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADOS MÉDIOS	VALOR F	VALOR P
-	Entre grupos	8	242,66667	30,33333	0,21146	0,98465
Quitina P1	Dentre grupos	18	2582	143,44444		
	Total	26	2824,66667			
	Entre grupos	8	732	91,5	0,62528	0,74627
Quitina P2	Dentre grupos	18	2634	146,33333		
	Total	26	3366			
Quitosanas	Entre grupos	8	9826,66667	1228,33333	10,83824	1,74415E- 5
P1	Dentre grupos	18	2040	113,33333		
	Total	26	11866,66667			
Quitosanas	Entre grupos	8	13806	1725,75	50,92377	8,51573E- 11
P2	Dentre grupos	18	610	33,88889		
	Total	26	14416			

O grau de cristalinidade representa a fração cristalina presente no biopolímero. As amostras de quitina obtida pelos tratamentos do P1 apresentaram valores de \bar{X} menores do que os das amostras obtidas pelo P2. As proteínas contidas na casca do camarão geralmente estão associadas à quitina. Sendo assim, uma vez que no P1 a desproteinização é a primeira etapa, é provável que a estrutura cristalina de origem tenha se desestruturado. O comportamento contrário foi observado para as amostras de quitosanas, exceto para as amostras 7 e 8, para as quais os valores de \bar{X} seguiram a mesma tendência das amostras de quitosanas 1 e 2 de ambos os procedimentos. Os valores obtidos para as amostras de quitosanas 1 e 2 de ambos os procedimentos foram bem próximos aos encontrados para a respectiva quitina, o que se justifica pelo fato de terem sido obtidas por condições de processo mais brandas. Para as demais amostras, os valores de \bar{X} diminuíram à medida em que essas condições se tornaram mais vigorosas. Como observado na análise dos difratogramas, a amostra 8 apresentou o valor de \bar{X} maior que o da amostra 7 para ambos os procedimentos.

O valor para o \bar{X} calculado para amostra padrão de acordo com a metodologia empregada foi 42 ± 2%. Este valor é inferior aos valores encontrados para as amostras de quitosanas obtidas. Por se tratar de um padrão analítico, é provável que a quitosana tenha passado por processos de purificação, ao contrário das amostras do presente estudo. Os métodos de purificação geralmente são feitos a partir da dissolução seguida de neutralização por solubilização, o que promove uma diminuição significativa no percentual de cristalinidade devido a uma nova organização estrutural das cadeias, diferente daquela adotada pelo polímero não purificado.

A análise estatística mostrou que os valores encontrados para o \bar{X} das amostras de quitina obtidas pelos procedimentos 1 e 2 e de suas respectivas quitosanas apresentaram diferenças significativas entre pelo menos dois tratamentos. Na TAB. 14 estão apresentados os resultados obtidos pelo Teste Tukey a respeito dos tratamentos que apresentaram diferenças entre si com base no desvio padrão, em um nível de significância de 0,05.

TABELA 14 - Resultados obtidos pelo Teste Tukey para os tratamentos que apresentaram diferenças significativas entre si quanto ao grau médio de cristalinidade (\bar{X}) das amostras de quitina e quitosanas.

GRUPOS	TESTE TUKEY
Quitina P1	Todas as médias diferem entre si em um nível de significância de 0,05.
Quitina P2	Existem diferenças significativas entre os tratamentos 7 e 4; 8 e 3; 8 e 7; 9 e 7.
Quitosanas P1	Existem diferenças significativas entre os tratamentos 3 e 1; 5 e 1; 5 e 2; 6 e 1; 6 e 2; 7 e 1; 7 e 2; 7 e 3; 7 e 4; 8 e 1; 8 e 2; 8 e 4; 9 e 1; 9 e 2; 9 e 4.
Quitosanas P2	Existem diferenças significativas entre os tratamentos 3 e 1; 4 e 1; 4 e 2; 5 e 1; 5 e 2; 6 e 1; 6 e 2; 7 e 1; 7 e 2; 8 e 1; 8 e 2; 9 e 1; 9 e 2.

Como a etapa de desproteinização ocorreu em meio básico (a mesma condição da etapa de desacetilação), é possível que alguns grupos acetamido tenham sido convertidos em grupos amino. As amostras de quitina obtidas pelo P1 apresentaram valores de \overline{GA} menores que os do P2, exceto para a amostra 7, o que indica que a primeira rota contribuiu para a obtenção de quitina mais desacetilada. Este fato não influenciou nos valores de \overline{GA} das amostras de quitosanas, pois as médias se mantiveram próximas entre os pares, exceto para a amostra 7.

As condições utilizadas na etapa de desacetilação para obtenção das quitosanas dos tratamentos 1, 2, 3 e 4 de ambos os procedimentos não foram suficientes para promover a transformação dos grupos acetamido em grupos amino pelo fato dos valores de \overline{GA} obtidos terem sido bem próximos ao da sua respectiva quitina. Da amostra 5 a amostra 9, os valores de \overline{GA} foram diminuindo à medida em que as condições de processo se tornaram mais vigorosas. As amostras de quitosanas 7, 8 e 9 do P1 apresentaram valores de \overline{GA} um pouco maiores que os do P2, o que indica que esta rota seja a mais indicada quando a intenção for a de obter amostras mais desacetiladas.

Para a amostra de quitosana utilizada como padrão, o valor de \overline{GA} obtido pela metodologia empregada foi 25 \pm 5%. Esse resultado está de acordo com a

faixa estabelecida no laudo do fornecedor. As amostras Qt7 e Qt'7 foram as que apresentaram valores mais próximo ao da quitosana Aldrich dentro do desvio padrão calculado, enquanto as amostras Qt9 e Qt'9 apresentaram valores menores. Este fato é um indicativo de que os tratamentos empregados no processamento dessas amostras foram satisfatórios na obtenção de quitosana.

De acordo com a análise estatística, os valores médios de \overline{GA} das amostras de quitina não diferiram significativamente entre si, tanto para o P1 quanto para P2. Isso sugere que os tratamentos de 1 a 9 não influenciaram esse parâmetro, independente da rota seguida. Já as amostras de quitosanas apresentaram diferenças significativas entre pelo menos dois tratamentos. Na TAB. 15 são apresentados os resultados obtidos pelo Teste Tukey a respeito dos tratamentos que apresentaram diferenças entre si com base no desvio padrão, em um nível de significância de 0,05.

TABELA 15 - Resultados obtidos pelo Teste Tukey para os tratamentos que apresentaram diferenças significativas entre si quanto ao grau médio de acetilação (\overline{GA}) das amostras de quitina e quitosanas.

GRUPOS	TESTE TUKEY
Quitina P1	-
Quitina P2	-
Quitosanas P1	Existem diferenças significativas entre os tratamentos 7 e 2; 8 e 1; 8 e 2; 9 e 1-7.
Quitosanas P2	Existem diferenças significativas entre os tratamentos 5 e 1; 5 e 2; 6 e 1; 6 e 2; 6 e 3; 7 e 1-6; 8 e 1-4; 9 e 1-8.

As curvas de condutividade e pH em função do volume de base adicionado nas soluções de quitosanas em ácido clorídrico diluído da amostra padrão e das amostras de quitosanas obtidas pelos procedimentos 1 e 2 estão representadas nas FIG. 39, 40 e 41, respectivamente. De acordo com o volume de base necessário para neutralizar a quitosana, os valores para o grau de desacetilação foram calculados pela Equação 4 e estão representados na TAB. 16. Os resultados obtidos pela análise estatística são apresentados na TAB. 17. O valor de \overline{GD} calculado para a amostra padrão foi 74 ± 1 (ou \overline{GA} 26 ± 1), o que está de acordo com o valor encontrado por FT-IR.

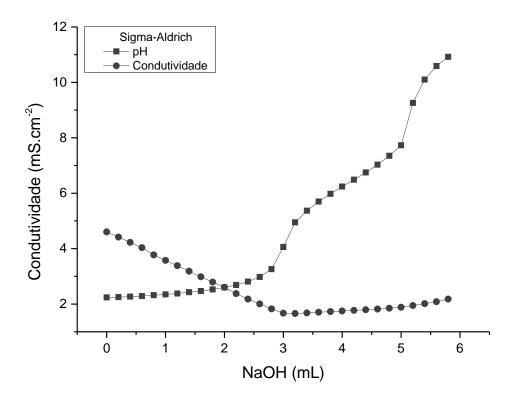


FIGURA 39 - Curvas de condutividade e pH *versus* volume de NaOH da amostra de quitosana utilizada como padrão analítico.

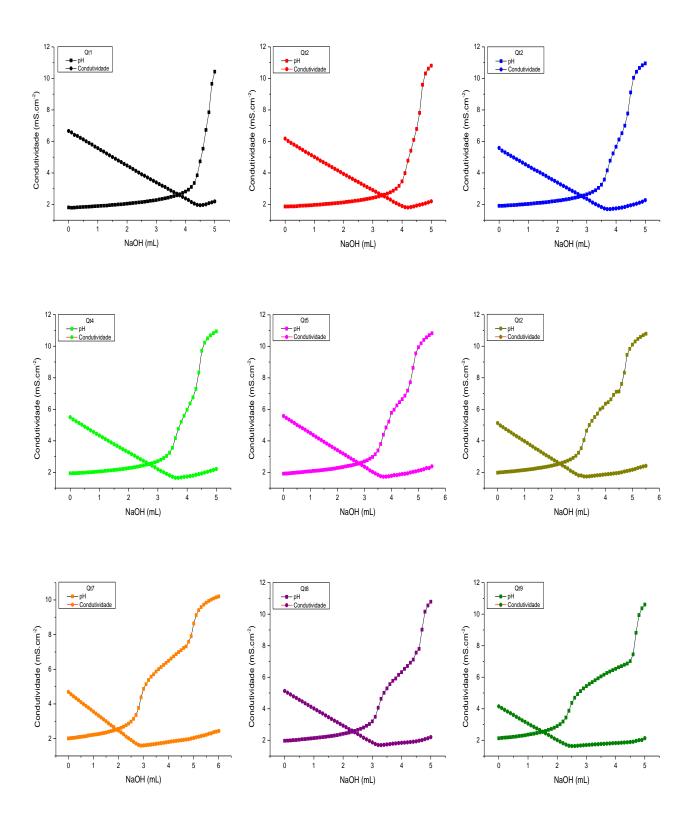


FIGURA 40 - Curvas de condutividade e pH *versus* volume de NaOH das amostras de quitosanas obtidas pelo procedimento 1.

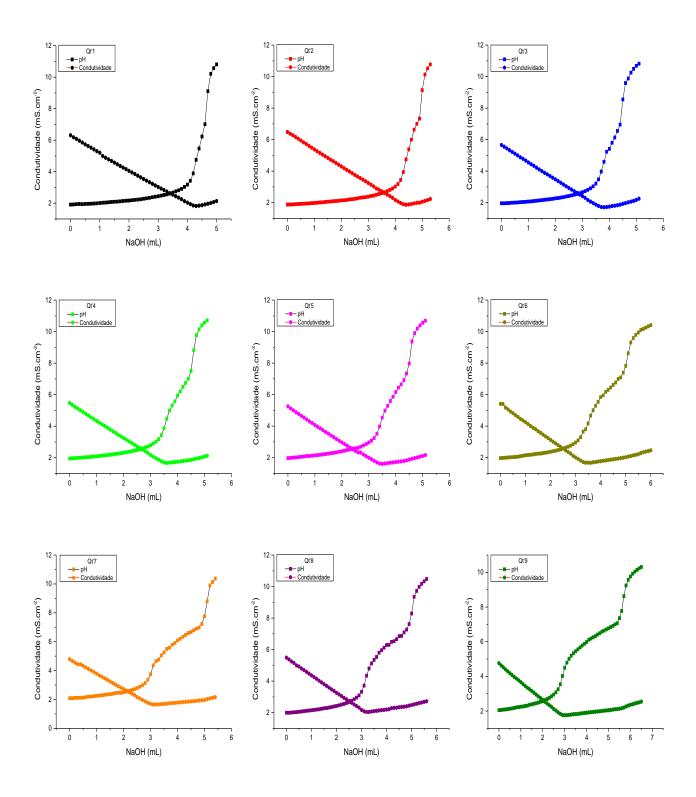


FIGURA 41 - Curvas de condutividade e pH *versus* volume de NaOH das amostras de quitosanas obtidas pelo procedimento 2.

TABELA 16 - Resultados obtidos para o grau de desacetilação (\overline{GD}) , sendo o grau médio de acetilação (\overline{GA}) seu inverso.

	GD	G A		GD	GA
AMOSTRA	(%)	(%)	AMOSTRA	(%)	(%)
Qt1	-	-	Qt'1	-	-
Qt2	-	-	Qt'2	-	-
Qt3	25 ± 1	75 ± 1	Qt'3	26 ± 1	74 ± 1
Qt4	28 ± 1	72 ± 1	Qt'4	34 ± 2	66 ± 2
Qt5	38 ± 1	62 ± 1	Qt'5	37 ± 3	63 ± 3
Qt6	50 ± 2	50 ± 2	Qt'6	51 ± 4	49 ± 4
Qt7	69 ± 3	31 ± 3	Qt'7	64 ± 1	36 ± 1
Qt8	54 ± 6	46 ± 6	Qt'8	60 ± 1	40 ± 1
Qt9	74 ± 2	26 ± 2	Qt'9	88 ± 2	12 ± 2

TABELA 17 - Tabela de ANOVA dos valores obtidos para o grau médio de acetilação das amostras de quitosanas analisadas determinados por titulação condutimétrica.

GRUPOS	FONTE DA VARIABILIDADE	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADOS MÉDIOS	VALOR F	VALOR P
0 ''	Entre grupos	6	6556,28571	1092,71429	136,589	1,32E-11
Quitosanas P1	Dentre grupos	14	112	8		
FI	Total	20	6668,28571			
	Entre grupos	6	8048,28571	1341,38095	281,69	8,96E-14
Quitosanas P2	Dentre grupos	14	66,66667	4,7619		
1 2	Total	20	8114,95238			

A amostras 1 e 2, de ambos os procedimentos, possuem somente um ponto de interseção (curva de condutividade) e inflexão (curva de pH), ou seja, houve somente a neutralização do ácido pela base, o que confirma os valores obtidos para o teor de material insolúvel em meio ácido (TAB. 9). Da amostra 3 a amostra 9, observou-se três regiões, em que a primeira se refere a titulação do ácido em excesso (V₀ a V₁), a segunda a titulação da quitosana protonada (V₁ a V₂) e a terceira ao excesso de base adicionada. De acordo com o esquema apresentado nas FIG. 40 e 41, o volume de base para titular a quitosana protonada aumentou entre as colunas e as linhas à medida em que as condições do processo se tornaram mais vigorosas, exceto para a amostra 8 de ambos os procedimentos.

A análise estatística mostrou que existem diferenças significativas entre pelo menos dois tratamentos. De acordo com os resultados obtidos pelo Teste Tukey, apresentados na TAB. 18, existem mais contrates entre as médias de \overline{GA}

obtidas por titulação condutimétrica do que por FT-IR, o que indica que a primeira técnica é mais sensível que a segunda na determinação do \overline{GA} em razão da menor dispersão dos dados.

TABELA 18 - Resultados obtidos pelo Teste Tukey para os tratamentos que apresentaram diferenças significativas entre si quanto ao grau médio de acetilação (\overline{GA}) das amostras de quitosanas.

GRUPOS	TESTE TUKEY
Quitosanas P1	Todas as médias diferem entre si em um nível de significância de 0,05, exceto os pares 4 e 3; 8 e 6; 9 e 7.
Quitosanas P2	Todas as médias diferem entre si em um nível de significância de 0,05, exceto os pares 5 e 4; 8 e 7.

A massa molecular de polímeros é comumente determinada pela viscosimetria. Neste trabalho, foi empregada a técnica de viscosimetria capilar. Os dados foram obtidos com base no tempo de escoamento do sistema de solventes e das soluções diluídas das quitosanas analisadas, sendo este um método relativo. As curvas de viscosidade reduzida ([n_{red}]) em função da concentração das soluções da amostra padrão e das amostras de quitosanas são apresentadas nas FIG. 42, 43 e 44, respectivamente. Por meio da extrapolação da região de linearidade à diluição infinita a viscosidade intrínseca, [n], foi determinada, satisfazendo a relação de Mark-Houwink (Equação 3). Os resultados obtidos estão apresentados na TAB. 19, e como nos demais parâmetros, na TAB. 20 são apresentados os resultados obtidos pela análise estatística.

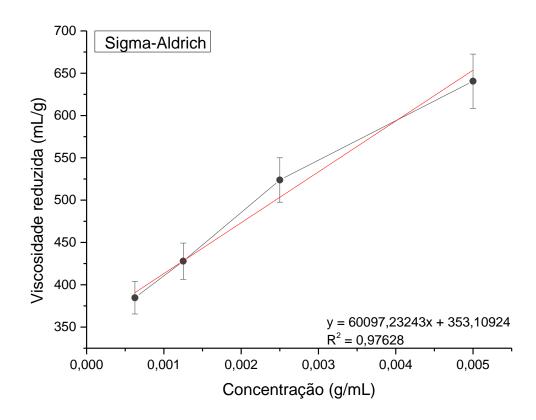


FIGURA 42 - Curvas de viscosidade reduzida *versus* concentração da amostra de quitosana utilizada como padrão analítico.

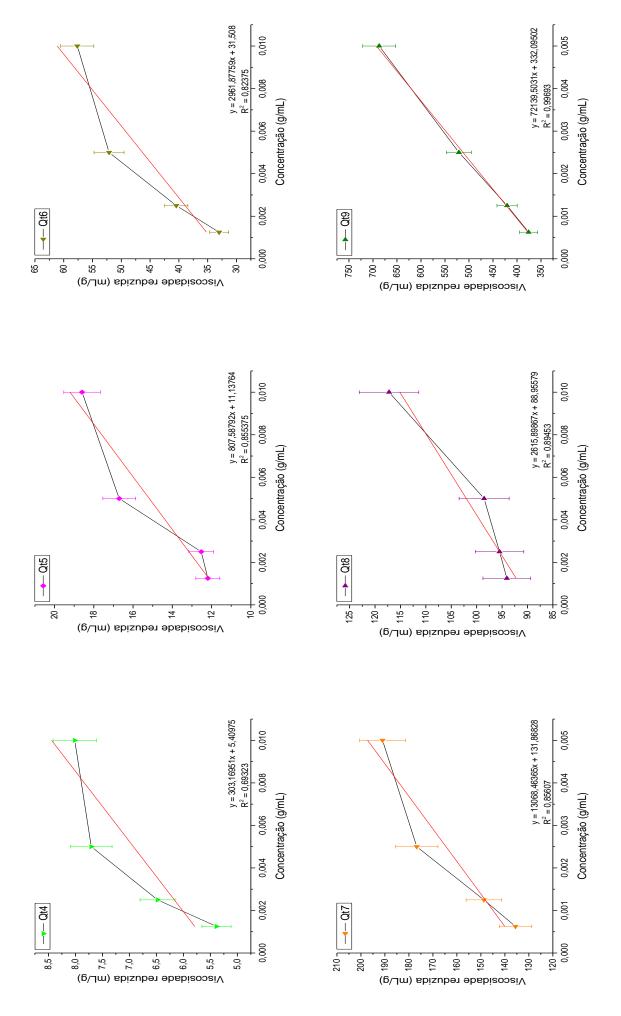


FIGURA 43 - Curvas de viscosidade reduzida versus concentração das amostras de quitosanas preparadas pelo procedimento 1.

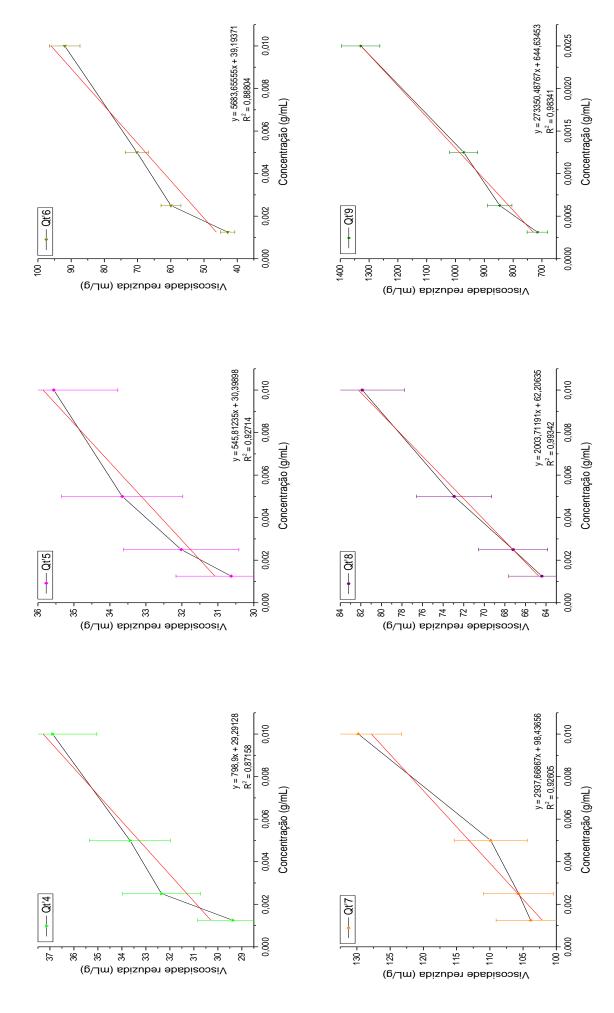


FIGURA 44 - Curvas de viscosidade reduzida versus concentração das amostras de quitosanas preparadas pelo procedimento 2.

TABELA 19 - Resultados obtidos para a viscosidade intrínseca, $[\eta]$, e para a massa molecular média viscosimétrica $(\overline{M_v})$ das amostras de quitosanas.

AMOSTRA	[ŋ]	$\overline{M_V}$ · 10 ³ (g·mL)	AMOSTRA	[ŋ]	$\overline{M_V}$ · 10 ³ (g·mL)
Qt1	-	-	Qt'1	-	-
Qt2	-	-	Qt'2	-	-
Qt3	-	-	Qt'3	-	-
Qt4	5,4 ± 0,2	5,5	Qt'4	29,3 ± 0,1	33,6
Qt5	11,1 ± 0,2	11,8	Qt'5	30,3 ± 0,1	34,8
Qt6	31,5 ± 0,2	36,3	Qt'6	39,1 ± 0,3	45,8
Qt7	131,9 ± 0,2	169,3	Qt'7	98,4 ± 0,1	123,5
Qt8	89,0 ± 0,1	110,9	Qt'8	62,2 ± 0,1	75,4
Qt9	332,1 ± 0,3	456,9	Qt'9	644,6 ± 0,2	932,1

TABELA 20 - Tabela de ANOVA dos valores obtidos para a massa molecular média das amostras de quitosanas analisadas determinados por viscosimetria capilar.

GRUPOS	FONTE DA VARIABILIDADE	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADOS MÉDIOS	VALOR F	VALOR P
:	Entre grupos	5	4,41E+11	8,82E+10	2,04E+6	0
Quitosanas P1	Dentre grupos	12	520000	43333,33333		
FI	Total	17	4,41E+11			
0 ::	Entre grupos	5	1,91E+12	3,81E+11	1,35E+7	0
Quitosanas P2	Dentre grupos	12	340000	28333,33333		
1 2	Total	17	1,91E+12			

A viscosidade intrínseca das amostras 1, 2 e 3 de ambos os procedimentos não pôde ser determinada, pois o tempo de eluição da solução mais concentrada foi igual ao do sistema de solventes, o que confirma que as condições empregadas nesses tratamentos não foram suficientes para formar quitosana.

El-Hefian et al. (2008) mostraram que o tempo de armazenamento à temperatura ambiente influencia diretamente na viscosidade das soluções ácidas de quitosana. Sendo assim, as curvas de viscosimetria do presente estudo foram obtidas imediatamente após as amostras serem solubilizadas.

Ao contrário do que se esperava, à medida em que as condições de processo foram se tornando mais vigorosas, as amostras de quitosanas apresentaram valores de massa molecular maiores do que as obtidas por

condições mais brandas, para ambos os procedimentos. Este fato está relacionado aos valores de \overline{GA} das amostras, como discutido no início deste capítulo.

A linearidade das curvas de viscosidade reduzida em função da concentração da amostra analisada foi proporcional ao aumento no rigor das condições de tratamento. As amostras 4, 5, 6 e 9 do P1 apresentaram valores de $[\eta]$ e, consequentemente de $\overline{M_V}$, menores que os das amostras correspondentes obtidas pelo P2, enquanto as amostras 7 e 8 apresentaram comportamento contrário.

A amostra 4 do P1 pode ser considerada oligômero. Em relação às amostras 5, 6, 7 e 8 do P1 e 4, 5, 6, 7 e 8 do P2 houve a formação de cadeias poliméricas com massa molecular variando de aproximadamente 11000 a 170000 para o P1 e 33000 a 124000 para o P2. Já as amostras 9 de ambos os procedimentos se caracterizam como biopolímeros de massa molecular elevada, sendo a MM da amostra do P2 quase o dobro da amostra do P1.

A amostra padrão apresentou o valor de $\overline{M_V}$ de aproximadamente 482000 g mL⁻¹. A massa molecular viscosimétrica informada pelo fornecedor está na faixa de 190000-310000. Este resultado mostrou que os valores encontrados para as $\overline{M_V}$ das quitosanas obtidas no presente trabalho podem estar superestimadas. De fato, Rinaudo (2006) relatou em seu artigo de revisão que o sistema de solventes adotado por Roberts e Domszy (1982) promove a agregação do biopolímero, o que pode superestimar os valores de massa molecular calculados. O autor propôs o uso do sistema de solventes CH₃COOH 0,3 M/ CH₃COONa 0,2 M por não haver evidências de formação de agregados nessa mistura (Rinaudo et al., 1993).

A análise estatística mostrou que existem diferenças significativas entre pelo menos dois tratamentos e de acordo com os resultados obtidos pelo Teste Tukey, apresentados na TAB. 21, todas as médias diferiram entre si em um nível de significância de 0,05 para ambos os procedimentos. Diante disso, pode-se dizer que as condições empregadas nos tratamentos exercem grande influência na massa molecular do biopolímero resultante.

TABELA 21 - Resultados obtidos pelo Teste Tukey para os tratamentos que apresentaram diferenças significativas entre si quanto à massa molecular média viscosimétrica $(\overline{M_v})$ das amostras de quitosanas.

GRUPOS	TESTE TUKEY
Quitosanas P1	Todas as médias diferem entre si em um nível de significância de 0,05.
Quitosanas P2	Todas as médias diferem entre si em um nível de significância de 0,05.

Mediante a variabilidade nos valores dos parâmetros e de acordo com observações feitas no decorrer desse estudo, as amostras 5 a 9 de ambas os procedimentos apresentaram potencial para possíveis desenvolvimentos nos segmentos citados na TAB. 2. Tais aplicações exigem que seja feita uma análise química, em especial quanto ao teor de metais. A TAB. 22 fornece os resultados obtidos por WDX RF.

TABELA 22 - Teor (mg kg⁻¹) dos elementos sódio, magnésio, alumínio, silício, fósforo, enxofre, cloro, potássio, cálcio, ferro, níquel, cobre e zinco nas amostras obtidas pelo tratamentos 5, 6, 7, 8 e 9 por meio dos procedimentos 1 e 2.

ELEMENTOS					AMOSTRA	×				
Teor em mg kg ⁻¹	QtS	Otte	Ot7	Ott8	Oto	Qť5	Qr'6	Qt'7	Qt'8	Qť9
Na	124 ± 12	70±7	81±8	25±3	9∓99	406 ± 41	2 ± 99	109 ± 11	151 ± 15	92 ± 9
Mg	157 ± 16	107 ± 11	54 ± 5	182 ± 18	65±7	129 ± 13	32 ± 3	2±1	2e ± 7	36 ± 4
A	54 ± 5	2 + 99	20 ± 2	63 ± 6	53 ± 5	49 ± 5	9∓ <u>7</u> 9	131 ± 13	154 ± 15	136 ± 14
·IS	1517 ± 152	1014 ± 101	365 ± 37	897 ± 90	343 ± 34	529 ± 53	621 ± 62	1233 ± 123	631 ± 63	1465 ± 147
۵	292 ± 29	343 ± 34	354 ± 35	315 ± 32	134 ± 13	92 ± 9	76±8	9∓9 <u>9</u>	9 + 99	51±5
S	110 ± 11	112 ± 11	117 ± 12	92 ± 9	118 ± 12	126 ± 13	117 ± 12	170 ± 17	194 ± 19	101 ± 10
ō	494 ± 49	279 ± 28	157 ± 16	226 ± 23	219 ± 22	135 ± 14	162 ± 16	9∓9 <u>9</u>	138 ± 14	192 ± 19
¥	84±8	41±4	2	23 ± 2	13±2	43±4	14±2	71±7	48±5	59 ± 5
Ca	2511 ± 251	2703 ± 270 228	2285 ± 229	2481 ± 248	1793 ± 179	625 ± 63	650 ± 65	674 ± 67	741 ± 74	608 ± 61
Fe	170 ± 17	256 ± 26	115 ± 12	71±7	108 ± 11	104 ± 10	119±12	127 ± 13	186 ± 19	108 ± 11
Z	17±2	16±2	13±2	19±2	23 ± 2	19±2	24 ± 2	22 ± 2	25±3	24±2
no.	8±1	13±2	9±1	8+1	4±1	9±1	6±1	5±1	7±1	6±1
Zn	15±2	14±2	17±2	10 ± 2	13±2	9 ± 1	6±1	4±1	7±1	7±1
C ₆ H ₁₁ O ₄ N	99,4 ± 0,2	$99,5 \pm 0,2$	$99,6 \pm 0,2$	$99,6 \pm 0,2$	$99,7 \pm 0,2$	99,8 ± 0,2	$99,8 \pm 0,2$	$99,7\pm0,2$	99,8 ± 0,2	99,7 ± 0,2

A análise por fluorescência de raios X (FRX) se baseia na medição das intensidades dos raios X característicos emitidos pelos elementos que constituem a amostra quando excitada por partículas como elétrons, prótons ou íons produzidos em aceleradores de partículas, ondas eletromagnéticas ou por tubos de raios X. Essa técnica é bastante versátil podendo ser utilizada em aplicações industriais que necessitam de rotinas analíticas rápidas para controle de qualidade sem destruir a amostra. Além disso, possui como vantagens o baixo custo operacional e mínimo ou nenhum preparo da amostra. No entanto, a determinação de elementos com número atômico baixo por FRX é mais difícil, pois estes apresentam baixa sensibilidade e baixo valor de energia de emissão, sendo essa sua principal desvantagem (Salvador, 2005).

A análise química mostrou baixíssimos teores dos metais níquel, cobre e zinco. As amostras apresentaram elevado teor de silício cuja a sua remoção pelo P1 foi mais efetiva nos tratamentos 7 e 9 e o P2 nos tratamentos 5, 6 e 8. O P1 foi melhor na remoção dos elementos sódio e enxofre, ao passo que o P2 foi mais eficaz na remoção do magnésio, fósforo e cloro. Para os elementos alumínio, potássio e ferro o P2 foi mais efetivo nos tratamentos 5 e 6 e P1 nos tratamentos 7, 8 e 9.

O cálcio foi o elemento analisado que apresentou o teor mais pronunciado. O P2 foi muito mais eficiente na remoção desse elemento em consequência do ataque ácido realizado na primeira etapa. Isso pode estar relacionado ao fato das amostras obtidas por esse procedimento terem apresentado tonalidades mais claras. Segundo Battisti e Campana Filho (2008), as diferenças nos teores de cálcio nas amostras obtidas pelos dois procedimentos podem ser atribuídas às modificações morfológicas provocadas pelo ataque alcalino na primeira etapa do P1.

6 CONCLUSÕES

A sequência das etapas de obtenção de quitina e quitosanas a partir das cascas de camarão influenciou diretamente nas características visuais das amostras. A desmineralização seguida de desproteinização (P2) promoveu amostras mais despigmentadas e fáceis de pulverizar, o que as tornam mais interessantes do ponto de vista comercial, não só pelo aspecto físico, mas por otimizar o processo ao se eliminar a etapa de despigmentação.

Os tratamentos 1, 2, 3 e 4 não foram eficientes na obtenção da quitosana, enquanto os tratamentos 5, 6, 7, 8 e 9 geraram materiais com os parâmetros \overline{X} , \overline{GA} e $\overline{M_V}$ variados para ambos os procedimentos. O conhecimento desses parâmetros é de suma importância nas aplicações de quitina e, sobretudo, quitosana, uma vez que estes influenciam diretamente nas propriedades do produto final.

As técnicas utilizadas no presente estudo se mostraram satisfatórias em avaliar as condições de processamento, proporcionando uma alternativa para determinar esses parâmetros físico-químicos e a eficiência dos processos de obtenção dos bioplímeros, podendo ser utilizadas na indústria e em laboratórios de pesquisa, a fim de garantir o controle de qualidade em linhas de produção, bem como tornar reprodutíveis as pesquisas com esses materiais. Para isso, as metodologias utilizadas nos processos de extração e caracterização desses biopolímeros deveriam ser padronizadas a fim de se obter maior confiabilidade e credibilidade no desenvolvimento de novos produtos.

Apesar de todo o apelo sustentável intrínseco em todo o processo de produção de quitosana, trabalhar com a extração desse material por meio de cascas de camarão oriundas dos rejeitos pesqueiro dentro dos conceitos de biorrefinaria ainda é um desafio graças às inúmeras adaptações que devem ser feitas, elevando os custos do processo. No entanto, foi possível observar o potencial dos materiais obtidos em diversas aplicações mediante a variabilidade dos parâmetros analisados. Isso deixa como perspectivas futuras a possibilidade de utilizar esses materiais no desenvolvimento de embalagens biodegradáveis, cobertura protetora de alimentos, sistemas de liberação de fármacos, curativos e cosméticos.

7 REFERÊNCIAS

- ASSIS, A. S.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M. Bioconversão de resíduos de camarão *Litopenaeus Vannamei* (Booner, 1931) para produção de biofilme de quitosana. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 9, n. 5, p. 480-499, 2008.
- ASSIS, O. B. G.; LEONI, A. M. Filmes comestíveis de quitosana. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 30, p. 33-38, 2003.
- AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, n. 3, p. 27-37, 2007. Disponível em: http://www.dema.ufcg.edu.br/revista Acesso em 22/01/2013.
- BARROS, F.; CAVALCANTE, R.; CARVALHO, T.; DIAS, F.; QUEIROZ, D.; VASCONCELLOS, L.; NASCIMENTO, R. Produção e caracterização de esfera de quitosana modificada quimicamente. **Revista Iberoamericana de Polímero**, v. 7, n. 4, p. 232-246, 2006.
- BATTISTI, M. V.; CAMPANA FILHO, S. P. Obtenção e caracterização de α-quitina e quitosanas de cascas de *Macrobrachium rosembergii* (camarão da Malásia). **Química Nova**, v. 31, n. 8, p, 2014-2019, k 2008.
- BOF, M. J.; BORDAGARAY, V. C.; LOCASO, D. E.; GARCIA, M. A. Chitosan molecular weight effect on starch-composite film properties. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 281-294, 2015.
- BRUGNEROTTO, J.; LIZARDI, L.; GOYCOOLEA F. M.; ARGUELLES-MONAL, W.; DESBRIERES, J.; RINAUDO, M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. **Polymer**, v. 42, n. 8, p. 3569-3580, 2001.
- CROISIER, F.; JÉRÔME, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. **European Polymer Journal**, v. 49, p. 780-792, 2013.
- DENKBAS, E. B.; OTTENBRITE, R. M. Perspectives on chitosan drug delivery systems based on their geometries. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 21, p. 351-368, 2006.
- DIMZON, I. K. D.; KNEPPER, T. P. Degree of deacetylation of chitosan by infrared spectroscopy and partial least squares. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 939-945, 2015.
- DOMARD, A. Determination of N-acetyl content in chitosan samples by c.d. measurements. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 9, p. 333-336, 1987.
- DOMARD, A.; RINAUDO, M. Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 5, p. 49-52, 1982.
- DUMITRIU, S. Polymeric Biomaterials. CRC Press, 2ª edição, 2001, p.187-237.
- EL-HEFIAN, E.; KHAN, R. A.; YAHAYA, A. H. Study of the parameters affecting the viscosity of chitosan solutions. **Journal of Chemical Society of Pakistan**, v. 30, n. 4, p. 529-531, 2008.

- HARIS, D. C., Análise Química Quantitativa, LTC, 2005. p. 218-259.
- HATTORI, H.; ISHIHARA, M. Changes in blood aggregation with differences in molecular weight and degree of deacetylation of chitosan. **Biomedical Materials**, v. 10, p. 1-7, 2015.
- HUSSAIN, M. R.; IMAN, M.; MAJI, T. K. Determination of degree of deacetylation of chitosan and their effect on the release behavior of essential oil from chitosan and chitosan-gelatin complex microcapsules. **International Journal of Advanced Applications**, v. 2, n. 4, p. 4-12, 2013.
- HWANG, K. T.; JUNG, S. T.; CHINNAN, M. S.; PARK, Y S.; PARK, H. Controlling molecular weight and degree of deacetylation of chitosan by response surface methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1876-1882, 2002.
- INSTITUTO DE PESCA: A Pesca em São Paulo preparado por Programa de Monitoramento da Atividade Pesqueira Marinha e Estuarina do Instituto de Pesca. Disponível em:
- http://www.propesq.pesca.sp.gov.br/propesq/web/app.php/publico/31/conteudo Acesso em 30 outubro 2015.
- INSTITUTO DE PESCA: Banco de Dados. Acesso aos relatórios públicos. Disponível em:
- http://www.propesq.pesca.sp.gov.br/propesq/web/app.php/publico/usuarioextern o/> Acesso em 30 outubro 2015.
- IOELOVICH, M. Crystallinity and Hydrophility of Chitin and Chitosan. **Journal of Chemistry**, v. 3, n. 3, p. 7-14, 2014.
- KNAUL, J. Z.; KASSAAI, M. R.; BUI, V. T.; CREBER, K. A. M. Characterization of deacetylated chitosan and chitosan molecular weight review. **Canada Journal Chemistry**, v. 76, 1699-1706, 1998.
- KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan application. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, p. 1-27, 2000.
- KUMAR, M. N. V. R.; MUZZARELLI, R. A.; MUZZARELLI, C.; SASHIWA, H.; DOMB, A. J. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. **Chemical Reviews**, v. 104, p. 6017–6084, 2004.
- KUMIRSKA, J.; WEINHOLD, M. X.; SAUVAGEAU, J. C. M.; THOMING, J.; KACZYNKI, Z.; STEPNOWSKI, P. Determination of the pattern of acetylation of low-molecular-weight chitosan used in biomedical applications. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 50, p. 587-590, 2009.
- LABORATÓRIO DE FÍSICA MODERNA: Unicamp, publicado em Conteúdos Difração de raio X. Disponível em:
- http://sites.ifi.unicamp.br/lfmoderna/conteudos/difracao-de-raio-x/ Acesso em 24 julho 2014.
- LIMA, I. S.; RIBEIRO, E. S.; AIROLDI, C. O Emprego de quitosana quimicamente modificada com anidrido succínico na adsorção de azul de metileno. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 501-506, 2006.
- LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. E. C. Caracterização de **Polímeros: Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica**. E-papers. p. 57-145, 2001.

MENDONÇA, Jocemar T. *Gestão dos recursos pesqueiros do complexo estaurino-laguar de Cananéia-Iguape-Ilha Comprida, litoral Sul de São Paulo, Brasil.* 2007. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos. São Carlos – USP-SC/SP. 384 p. Disponível em:

http://www.bdtd.ufscar.br/htdocs/tedeSimplificado//tde_busca/arquivo.php?codArquivo=1623 Acesso em: 13 janeiro 2014.

MATSUI, Mitsuka. Correlação entre estrutura química e superestrutura macromolecular e morfologia das blendas e redes poliméricas à base de quitina e poliuretano. 2007. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, 136 p. Disponível em:

http://www.pipe.ufpr.br/portal/defesas/tese Acesso em 05 maio 2014.

MOTTIN, A. C.; CÂMARA, J. J. D.; MIRANDA, C. A. S.; PAGNAN, C. S. O uso de bioplásticos no desenvolvimento de produtos sustentáveis. Em: 1º Congresso Nacional de Design, 2011. *Resumos...* Disponível em: http://www.desenhando o futuro.com.br/anais> Acesso em 04 outubro 2013.

MUZZARELLI, R. A. Chitin. Pergamon Press, 1977.

NATORI, M. M.; SUSSEL, F. R.; SANTOS, E. C. B.; PREVIERO, T. C., VIEGAS, E. M. M.; GAMEIRO, A. H. Desenvolvimento da carcinicultura marinha no Brasil e no mundo: avanços tecnológicos e desafios. **Informações Econômicas**, v. 41, n. 2, p. 61-73, 2011.

PILLAI, C. K. S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and Chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progression Polymer Science**, v. 32. p. 641-678, 2009.

RAYMOND, L.; MORIN, F. G.; MARCHESSAULT. R. H. Degree of deacetylation on chitosan using conductimetric tritation and solid-state NMR. **Carbohydrate Research**, v. 246, n. 1, p. 331-336, 1993.

RINAUDO, M. Chitin and Chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 603-632, 2006.

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. 5, p. 281-285, 1993.

ROBERTS, G. A. F.; DOMSZY, J. G. Determination of the viscosimetric constants for chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 4, p. 374-377, 1982.

ROBERTS, G. A. F. Chitin Chemistry. The Macmillan Press Ltd. 1992.

SALVADOR, Vera L. R. **Separação de efeitos de sobreposição de espectros obtidos por WDXRF usando o Método de Rietveld.** 2005. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo. 132 p. Disponível em:

http://pelicano.ipen.br/PosG30/TextoCompleto/Vera%20Lucia%20Ribeiro%20Salvador_D.pdf Acesso em: 16 junho 2015.

SE-KWON, K. Chitin, chitosan oligosaccharides and their derivatives: biological activities and applications, CRC Press, 2010.

SE-KWON, K. Chitin and chitosan derivatives: advances in drug discovery and developments, CRC Press, 2013.

SHUKLA, S. K.; MISHRA, A. K.; AROTIBA, O. A.; MAMBA, B. B. Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, p. 46-58, 2013.

SILVA, H. S. R.; SANTOS, K. S.; FERREIRA, C. R. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p.776-785, 2006.

SLIDE SHARE. Filo Artrópodes – Crustáceos: características e anatomia publicado em Educação. Disponível em: http://pt.slideshare.net/prestao/filo-artrpodes-04-crustceos-caractersticas-e-anatomia> Acesso em 17 junho de 2014.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. Química Orgânica, LTC, 2005, p. 75.

URIGAMI, T.; TOKURA, S. **Material science of chitin and chitosan.** Kodansha Ltd, 2006.

WILLIAMS, P. A. Renewable resources for functional polymers and biomaterials. The Royal Society of Chemistry, p. 292 – 307, 2001.

XIA, W.; LIU, P.; ZHANG, J.; CHEN, J. Biological activities of chitosan and chitoologosaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 170-179, 2011.

YAO, K.; LI, J.; YAO, F.; YIN, Y. Chitosan-based hydrogels: functions and applications. CRC Press, 2011, p. 1 - 50.