UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

Prospecção quantitativa e qualitativa de uma nova fonte renovável de
quitosana

Adriana Maia Bezerra

São Paulo

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

Prospecção quantitativa e qualitativa de uma nova fonte renovável de
quitosana

Adriana Maia Bezerra

Versão Original

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Bronislaw Polakiewicz

São Paulo

2015

Adriana Maia Bezerra

Prospecção quantitativa e qualitativa de uma nova fonte renovável de
quitosana

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Prof. Dr. Bronislaw Polakiewicz
orientador/presidente

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

4o. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2015

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Bronislaw Polakiewicz, pela confiança, dedicação, auxílio e orientação durante todo o decorrer do trabalho.

Aos professores do departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutico pelo incentivo e colaboração.

À amiga Natália Marchesan Bexiga por todo companheirismo, paciência, dedicação e incentivos constantes.

À amiga Rossana Giudice Ribeiro de Araújo por todo auxílio e amizade.

Aos funcionários do departamento, por toda ajuda.

Aos amigos e companheiros de laboratório, da pós-graduação e iniciação científica pela amizade e companheirismo.

Aos meus pais, Aldeide Maia e Francisco Bezerra Júnior, por me ajudarem na formação da minha vida e pelo apoio incondicional.

A todos meus familiares, em especial ao meu irmão David Maia Bezerra e à minha prima Laura Maia de Castro, e amigos que sempre me apoiaram e acreditaram no meu potencial.

Às agências de fomento Capes e CNPQ pelo apoio financeiro.

E por fim, agradeço a todos que de alguma maneira colaboraram para a realização deste trabalho.

Obrigada!

“Na natureza nada se cria, nada se perde, tudo se transforma.”

(Antoine Lavoisier)

RESUMO

BEZERRA, A. M. **Prospecção quantitativa e qualitativa de uma nova fonte renovável de quitosana**. 2015. 105f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A quitosana é um biopolímero funcional com grande potencial de desenvolvimento, podendo gerar diferentes tipos de materiais com variadas funções. Conforme modificações na sua estrutura, a quitosana tem encontrado aplicações nas mais diversas áreas, possuindo um grande leque de aplicações. Apesar do crescente uso da quitosana e do aumento das pesquisas por novas aplicações, a prospecção de outras opções de fontes (que não crustáceos) de quitosana não têm sido consistentemente apresentadas. O objetivo do presente projeto é realizar a prospecção quantitativa e qualitativa de uma nova fonte renovável de quitosana. Temos como uma fonte alternativa para a produção de quitosana, os blatódeos que são comumente conhecidos como baratas. Eles são organismos terrestres que apresentam uma reprodução consideravelmente rápida, se adaptam aos mais variados ambientes e tem o custo de criação baixíssimo devido à sua fácil adaptação ao ambiente e alimentação. Além disso, os blatódeos não possuem sazonalidade, e ainda realizam ecdises, podendo-se utilizar as exúvias para a produção de quitosana. Foram determinados o processo e o rendimento do processo de obtenção de quitosana a partir de blatódeos (*Phoetalia pallida*). Os blatódeos foram submetidos a tratamento com solução de hidróxido de sódio 50% (p/v) em temperatura de 120 °C por sete tempos diferentes (1, 2, 3, 6, 10 e 20 horas). As quitosanas obtidas foram caracterizadas mediante técnicas de espectroscopia no Infravermelho (FTIR), comportamento térmico (TG/DTG e DSC), difração de raios-x, viscosimetria e teste de solubilidade. A obtenção de quitosana a partir de blatódeos apresentou vantagens em relação à produção a partir de crustáceos: reduzido número de etapas do processo e dispensa o tratamento com HCl, que é um poluente. O processo de obtenção de quitosana teve rendimento de aproximadamente 15%, variando de acordo com o tempo de reação. De uma maneira geral, as quitosanas de barata apresentaram características semelhantes à quitosana de camarão.

Palavras-chave: Biopolímero. Quitosana. Blatódeos. Barata.

ABSTRACT

BEZERRA, A. M. **Quantitative and qualitative exploration of a new renewable source of chitosan.** 2015. 105f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Chitosan is a functional biopolymer with great development potential, which can generate different types of materials with several purposes. Depending on changes in its structure, chitosan has found applications in several areas, having a wide range of applications. Despite the increasing use of chitosan and the increase in research for new applications, the exploration of other options as sources of chitosan (other than shellfish) have not been consistently shown. The goal of this project is to conduct a quantitative and qualitative exploration of a new renewable source of chitosan. Blattaria, commonly known as cockroaches, are an alternative source for the production of chitosan. They are terrestrial organisms that present a considerably fast reproduction, adapt to many different environments and have a very low cost of growing, due to its easy adaptation to the environment and food. Moreover, the cockroaches don't present seasonality and still perform ecdysis, where the exuvia can be used to produce chitosan. The process and the efficiency of the process of obtaining chitosan from the cockroaches, *Phoetalia pallida*, were determined: they were treated with a solution of sodium hydroxide 50% (w / v) at a temperature of 120 °C for seven different time periods (1, 2, 3, 6, 10 and 20 hours). Chitosans obtained therefrom were characterized by Infrared spectroscopy (FTIR), thermal behavior (TG / DTG and DSC), x-ray diffraction, viscosimetry and solubility test. Obtaining chitosan from cockroaches showed advantages over the production from shellfish: reduced number of process steps and not requiring treatment with HCl, which is a pollutant. The process of obtaining chitosan showed an efficiency of approximately 15%, depending upon the reaction time. In general, the cockroach chitosan showed characteristics similar to shrimp chitosan.

Keywords: Biopolymer. Chitosan. Blattaria. Cockroach.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01- Gráfico demonstrativo do número de publicações sobre quitosana entre os anos de 1970 a 2014 (Fonte: SciFinder Scholar, 2015)	16
FIGURA 02- Estrutura da celulose (a), quitina (b) e quitosana (c)	21
FIGURA 03- Desacetilação química da quitina	21
FIGURA 04- Orientação da cadeia molecular em α - , β - , γ -quitina	22
FIGURA 05- Rota da biossíntese de quitina em insetos	24
FIGURA 06- Ciclo da quitina	25
FIGURA 07- Representação gráfica da matriz orgânica de insetos (fora de escala)	48
FIGURA 08- Representação gráfica da matriz orgânica de crustáceos (fora de escala)	48
FIGURA 09- Representação gráfica dos processos de obtenção de quitosana a partir de cascas de crustáceos e de blatódeos	50
FIGURA 10- Difratorômetro Rigaku Miniflex (a) e <i>FTIR</i> Bomem MB100 (b)	55
FIGURA 11- Calorímetro Exploratório Diferencial SHIMADZU, modelo DSC-60 (c) e Termograma SHIMADZU modelo DTG-60H (d)	56
FIGURA 12- Balança analítica METTLER TOLEDO modelo AG285	56
FIGURA 13- Estrutura dos recipientes utilizados na criação das baratas	57
FIGURA 14- Rações para a dieta das baratas	57
FIGURA 15- As caixas 1 e 2 fechadas com a tela	58
FIGURA 16- Blatódeo <i>Phoetalia pallida</i>	66
FIGURA 17- Quitosana de blatódeos precipitada em solução de pH 7	67
FIGURA 18- Solução de quitosana e glutaraldeído (a) e estrutura química da quitosana reticulada com glutaraldeído (b)	68
FIGURA 19- Espectro infravermelho da amostra de quitosana padrão Quito SA	69
FIGURA 20- Espectro infravermelho da amostra Quito 1	69
FIGURA 21- Espectro infravermelho da amostra Quito 2	70
FIGURA 22- Espectro infravermelho da amostra Quito 3	70
FIGURA 23- Espectro infravermelho da amostra Quito 6	71
FIGURA 24- Espectro infravermelho da amostra Quito 10	71
FIGURA 25- Espectro infravermelho da amostra Quito 20	72
FIGURA 26- Difratorograma das amostras Quito 2, Quito 3, Quito 6, Quito 10, Quito 20 e Quito SA	75

FIGURA 27- Curva DSC da amostra de quitosana padrão Quito SA	77
FIGURA 28- Curva DSC da amostra de quitosana Quito 1 e Quito 2	77
FIGURA 29- Curva DSC da amostra de quitosana Quito 3 e Quito 6	77
FIGURA 30- Curva DSC da amostra de quitosana Quito 10 e Quito 20	78
FIGURA 31- Gráfico TG/DTG da amostra Quito SA	79
FIGURA 32- Gráfico TG/DTG das amostras Quito 1 e Quito 2	79
FIGURA 33- Gráfico TG/DTG das amostras Quito 3 e Quito 6	80
FIGURA 34- Gráfico TG/DTG das amostras Quito 10 e Quito 20	80
FIGURA 35- Gráfico de determinação da viscosidade intrínseca da amostra Quito 1	84
FIGURA 36- Gráfico de determinação da viscosidade intrínseca da amostra Quito 2	85
FIGURA 37- Gráfico de determinação da viscosidade intrínseca da amostra Quito 3	86
FIGURA 38- Gráfico de determinação da viscosidade intrínseca da amostra Quito 6	87
FIGURA 39- Gráfico de determinação da viscosidade intrínseca da amostra Quito 10	87
FIGURA 40- Gráfico de determinação da viscosidade intrínseca da amostra Quito 20	88
FIGURA 41- Balanço de massa da produção de quitosana a partir de baratas grávidas (fêmeas ovadas)	92

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Quantidade aproximada de quitina em cada espécie	19
TABELA 2- Etapas do processo de obtenção de quitosana	33
TABELA 3- Toxicologia de glutamato de quitosana em ratos	40
TABELA 4- Especificações da quitosana para produto de grau farmacêutico	41
TABELA 5- Empresas que comercializam quitina, quitosana ou produtos relacionados	46
TABELA 6- Números de publicações científicas relacionadas à quitina e quitosana. Fonte: Scopus. Publicações a partir do ano 2000	51
TABELA 7- Peso das baratas nos meses de dezembro, janeiro, fevereiro, março, abril, maio, junho, julho, agosto, setembro e outubro	64
TABELA 8- Peso das baratas nos meses de dezembro, janeiro, fevereiro, março, abril, maio, junho, julho, agosto, setembro e outubro	65
TABELA 9- Legendas das amostras obtidas em função ao tempo de aquecimento	66
TABELA 10- Grau de desacetilação (%GD) das amostras de quitosana	72
TABELA 11- Índice de cristalinidade das amostras de quitosana de blatódeos e da quitosana padrão	76
TABELA 12- - Valores dos picos endotérmicos e exotérmicos das amostras de quitosana	78
TABELA 13- Resultados de TG/DTG das amostras de quitosana	81
TABELA 14- Solubilidade das amostras de quitosana Quito 1, Quito 2, Quito 3, Quito 6, Quito 10, Quito 20 e Quito SA a 20 °C	82
TABELA 15- Tempo médio de escoamento do solvente puro no capilar	83
TABELA 16- Tempo de escoamento das soluções de quitosana da amostra Quito 1 em 7 concentrações (1 g/L; 1,25 g/L; 1,5 g/L; 1,75 g/L; 2 g/L; 2,25 g/L; 2,5 g/L) e os valores de viscosidades obtidos	84
TABELA 17- Tempo de escoamento das soluções de quitosana da amostra Quito 2 em 7 concentrações (1 g/L; 1,25 g/L; 1,5 g/L; 1,75 g/L; 2 g/L; 2,25 g/L; 2,5 g/L) e os valores de viscosidades obtidos	85
TABELA 18- Tempo de escoamento das soluções de quitosana da amostra Quito 3 em 7 concentrações (1 g/L; 1,25 g/L; 1,5 g/L; 1,75 g/L; 2 g/L; 2,25 g/L; 2,5 g/L) e os valores de viscosidades obtidos	85
TABELA 19- Tempo de escoamento das soluções de quitosana da amostra Quito 6 em 7 concentrações (1 g/L; 1,25 g/L; 1,5 g/L; 1,75 g/L; 2 g/L; 2,25 g/L; 2,5 g/L) e os valores de viscosidades obtidos	86
TABELA 20- Tempo de escoamento das soluções de quitosana da amostra Quito 10 em 7 concentrações (1 g/L; 1,25 g/L; 1,5 g/L; 1,75 g/L; 2 g/L; 2,25 g/L; 2,5 g/L) e os valores de viscosidades obtidos	87

TABELA 21- Tempo de escoamento das soluções de quitosana da amostra Quito 20 em 7 concentrações (1 g/L; 1,25 g/L; 1,5 g/L; 1,75 g/L; 2 g/L; 2,25 g/L; 2,5 g/L) e os valores de viscosidades obtidos 88

TABELA 22- Massa molar viscosimétrica média (Mv) das amostras de quitosana obtidas a partir de baratas Quito 1, Quito 2, Quito 3, Quito 6, Quito 10 e Quito 20 89

TABELA 23- Rendimento do processo de obtenção de quitosana a partir de blatódeos para as amostras Quito 1, Quito 2, Quito 3, Quito 6, Quito10 e Quito 20 90

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1- Características físico-químicas da quitosana	28
QUADRO 2- Aplicações de quitosana	38

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	15
1.1.	Considerações iniciais	15
1.2.	Breve histórico	17
1.3.	Incidência da quitina	18
1.4.	Quitina e Quitosana	20
1.4.1.	Estrutura química da quitina e quitosana	20
1.5.	Biossíntese de quitina em insetos.....	23
1.6.	Biodegradação da quitina	25
1.7.	Propriedades de quitina e quitosana	26
1.7.1.	Propriedades físico-químicas da quitina.....	26
1.7.2.	Propriedades físico-químicas da quitosana	26
1.7.2.1.	Grau de Desacetilação (GD).....	28
1.7.2.2.	Massa Molar Viscosimétrica Média (Mv).....	30
1.7.2.3.	Cristalinidade da quitosana	31
1.7.2.4.	Biodegradabilidade da quitosana.....	31
1.8.	Produção de quitina e quitosana.....	32
1.8.1.	Obtenção de quitosana.....	33
1.9.	Modificações químicas da quitosana.....	33
1.10.	Aplicações da quitina e quitosana	34
1.10.1.	Aplicações farmacêuticas	34
1.10.2.	Aplicações biomédicas	36
1.10.3.	Aplicações em cosméticos.....	37
1.10.4.	Outras aplicações da quitosana.....	37
1.11.	Biodistribuição da quitosana	38
1.12.	Toxicologia da quitina e quitosana.....	39
1.13.	Aspectos regulatórios	40
1.13.1.	A quitosana como agente terapêutico.....	42
1.14.	Quitosana e o mercado mundial	42
1.14.1.	Situação atual e perspectivas futuras.....	44
1.14.2.	Empresas que produzem quitosana	45
1.15.	Blatódeos	47
1.16.	Processo de obtenção de quitosana a partir de crustáceos e a partir de blatódeos	49
2.	JUSTIFICATIVA.....	51

3.	OBJETIVOS.....	54
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.1.	Processo para obtenção de quitosana a partir de blatódeos.....	56
4.1.1.	Criação de blatódeos	56
4.1.2.	Processo de desacetilação.....	58
4.1.3.	Processo de purificação	58
4.1.4.	Diálise.....	59
4.1.5.	Método de secagem por liofilização.....	59
4.1.6.	Determinação do rendimento do processo de obtenção de quitosana a partir de baratas.....	59
4.2.	Caracterização das amostras de quitosana obtidas a partir de blatódeos	60
4.3.	Espectroscopia de Infravermelho (IV)	60
4.4.	Difração de raios-x (DRX)	61
4.5.	Testes de solubilidade	61
4.6.	Análises Térmicas	61
4.6.1.	Medidas Termogravimétricas (TG/DTG)	62
4.6.2.	Medidas de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	62
4.7.	Massa molar viscosimétrica média (Mv)	62
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1.	Criação de blatódeos	64
5.2.	Obtenção de quitosana a partir de blatódeos	65
5.3.	Teste de glutaraldeído com solução de quitosana de blatódeos	67
5.4.	Espectroscopia Infravermelho (IV)	68
5.5.	Difração de raios-x	74
5.6.	Análise Térmica (DSC e DTG)	76
5.6.1.	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	76
5.6.2.	Termogravimetria.....	79
5.7.	Solubilidade das amostras de quitosana obtidas.....	82
5.8.	Determinação da Massa molar viscosimétrica média (Mv)	83
5.9.	Rendimento	90
5.10.	Balanço de massa parcial	92
6.	CONCLUSÃO.....	93
7.	BIBLIOGRAFIA.....	94

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações iniciais

A quitosana é um biopolímero obtido a partir da desacetilação química ou enzimática da quitina, que é o segundo biopolímero mais abundante na natureza, ficando atrás apenas da celulose. A quitina é encontrada em carapaças de crustáceos, em insetos, moluscos e na parede celular de fungos (SINGLA, 2001).

Este biopolímero está sendo considerado um dos materiais mais promissores para um futuro próximo e vem recebendo destaque considerável nas pesquisas e aplicações. Isto se deve à grande versatilidade de aplicações encontrada nesse polímero e seus derivados. O Japão elegeu a quitosana como o material do século XXI, investindo, anualmente, gigantesca quantidade de recursos financeiros nos desenvolvimentos científicos e tecnológicos a ele relacionados (NIFANT'EV, 1998).

Até o momento, o Japão e os EUA são os países que vêm se destacando como os maiores produtores, consumidores e pesquisadores de quitina e quitosana e seus derivados (NIFANT'EV, 1998). Países como a China e a Coreia também se destacam como grandes produtores de quitina e derivados, assim como países bálticos (Suécia, Polônia) que vêm trabalhando com a casca do krill, porém em menor quantidade (KOBELK, 1990).

Para se ter uma ideia, o número de publicações científicas, relacionadas à quitina e à quitosana gira em torno de 128.792, sendo 39.164 publicações relacionadas à quitina e 89.628 à quitosana. Na Figura 1 tem-se um gráfico demonstrativo do número de publicações sobre quitosana entre os anos de 1970 e 2014. Fonte: SciFinder Scholar, 2015.

Figura 1 - Gráfico demonstrativo do número de publicações sobre quitosana entre os anos de 1970 e 2014 (Fonte: SciFinder Scholar, 2015)

No entanto, toda a quitosana produzida é obtida a partir das carapaças de caranguejos e camarões, que são subprodutos da indústria pesqueira e, portanto, de alta sazonalidade. Ou seja, existem épocas do ano em que a pesca de tais animais é proibida por causa da reprodução, e a produção de quitosana é nula. A produção destes crustáceos em cativeiro é proporcionalmente muito pequena em relação à pesca livre, e mesmo essa modalidade está sujeita à sazonalidade.

Apesar do crescente uso da quitosana e do aumento das pesquisas por novas aplicações, a prospecção de outras opções de fontes de quitosana não tem sido consistentemente apresentada. Em nosso laboratório, Laboratório de Síntese Orgânica Aplicada da FCF/USP, a partir do ano de 2011, começamos a trabalhar com pesquisas para obtenção e caracterização de quitosana a partir de insetos, mais especificamente baratas. Entre 2014 e o ano presente (2015), começaram trabalhos nessa linha e foram publicados alguns estudos sobre a prospecção de quitina e quitosana a partir de variadas espécies de insetos. Badawy e Mohamed (2015) extraíram quitina de cinco espécies de insetos (gafanhotos, baratas, besouro, vespas e percevejos) e compararam com a quitina

obtida a partir de camarão. Outro estudo realizado por KAYA et al. (2015) avaliou a obtenção de quitina e quitosana a partir de gafanhotos.

A maior parte da produção de camarão, fonte de obtenção da quitosana comercializada, está localizada em regiões industrializadas e poluídas, como por exemplo, regiões na Coreia, na China e na Índia. Assim, os crustáceos ali obtidos apresentam-se, atualmente, contaminados com metais pesados. A preocupação chega a tal ponto que, no ano de 2004, o Dr. John Zhou, que faz parte do Institute of Clean Technologies (Instituto de Tecnologias Limpas), Alberta Research Council, no Canadá, e em 2008, o Dr. Martin Schmitt da Naturstoff-Hautpflege, que ficaram sabendo dos nossos trabalhos com quitosana, nos solicitaram amostras da mesma por ser esta de baixíssimo índice de contaminação. Já nos EUA, a fonte americana do golfo do México está com grandes restrições devido ao vazamento de petróleo ocorrido em 2010 em uma plataforma petrolífera. E, além destes fatores ambientais, a produção de camarão sofre influências sazonais e é dependente de tratamentos químicos.

Desta maneira, as poucas fontes de quitosana tornam-se ainda mais reduzidas, mesmo porque em todos os lugares, inclusive no Brasil, a produção de crustáceos é essencialmente artesanal.

1.2. Breve histórico

O termo “quitina” deriva da palavra grega “χιτών”, que significa túnica ou cobertura, fazendo referência à sua dureza por funcionar como uma capa protetora de invertebrados.

Em 1811, o professor francês de História Natural e Diretor do Jardim Botânico da Academia de Ciências em Nancy, H. Braconnot, deu início à história da pesquisa da quitina quando publicou o artigo intitulado “*Sur la nature des champignons*”. Neste trabalho ele isolou a quitina e a descreveu como um material insolúvel em meio alcalino, encontrado em fungos superiores, o qual foi nomeado “fungine” (KNORR, 1991; MUZZARELLI, 1977; ROBERTS, 1992).

Alguns anos mais tarde, em 1823, A. Odier isolou do exoesqueleto de insetos uma fração similar e deu o nome “quitina”. Ele ainda relatou a semelhança entre as substâncias presentes no exoesqueleto dos insetos e nos tecidos vegetais e observou a presença de quitina na carapaça de crustáceos.

O conhecimento molecular da quitina iniciou-se anos mais tarde, quando Payen (em 1843) relatou a presença de nitrogênio em sua estrutura (ROBERTS, 1992). A saponificação da quitina com consequente formação de quitosana apenas foi observada em 1859 por C. Rouget e em 1878, G. Ledderhose mostrou que a hidrólise da quitina produz glicosamina e ácido acético.

F. Hoppe-Seyler relatou (em 1894) a ocorrência de quitina em caranguejo, aranhas e escorpiões.

Em 1935 e 1936, as primeiras patentes (juntamente com várias aplicações) foram emitidas por G. W. Rigby e por Du pont de Nemours & Co, respectivamente. O primeiro livro sobre quitina apareceu em 1977, no qual foi descrita a estrutura química da quitina. Livros exclusivamente sobre a temática de quitina estão disponíveis em japonês e em inglês, *Chitin Handbooks* (MUZZARELLI; PETER, 1997).

A primeira conferência internacional sobre quitina e quitosana, a 1st International Conference on Chitin/Chitosan (ICCC), a qual foi realizada em Boston em maio de 1977, proporcionou um grande impulso nas pesquisas e investigações sobre quitina e quitosana. A conferência foi organizada, principalmente, pelo Sr. Vincent LoCicero da Massachusetts Science and Technology Foundation juntamente com o MIT Sea Grant Program and the Massachusetts Science and Technology Foundation.

Antes da primeira International Conference on Chitin/Chitosan (ICCC), havia contato limitado entre os cientistas que trabalhavam na mesma área de pesquisa sobre quitosana e não havia quase nenhum contato entre cientistas que trabalhavam em áreas diferentes, como os das áreas de química e biológica. A primeira ICCC reuniu, pela primeira vez, cerca de 240 cientistas trabalhando em todo e qualquer aspecto da molécula de quitina e seu derivado, a quitosana. Isso mostra o impacto que essa primeira conferência teve para pesquisadores de quitina e quitosana. Atualmente, ocorrem muitas conferências e congressos sobre quitina e quitosana (ROBERTS, 2008).

1.3. Incidência da quitina

A quitina está presente em diversos tipos de organismos. Sua incidência foi observada em diversos reinos: Fungi (cogumelos e mofos), Plantae (algas), Animalia e Protozoa, assim como também no sub-reino Metazoa (em que a quitina presente em artrópodes, crustáceos, aracnídeos e insetos), e ainda em nematódeos, nos filos Molusca, Rotifera e Coelenterata. Quitoooligossacarídeos como o N-acetilglicosamina

(GlcNAc) $_n$, $n > 2$, são sintetizados em inúmeros organismos, dentre eles, bactérias da família Rhizobiaceae, filária, peixes teleósteos e até em humanos (MUZZARELLI et al., 1986; HASLAM et al., 1999).

Frequentemente é afirmado que a quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante da terra, estando apenas após a celulose. Entretanto, a quantidade de quitina sintetizada anualmente é equivalente ou superior à da celulose. Grande quantidade de animais e fungos envolvidos na síntese de quitina são marinhos e pequenos ou microscópicos, e assim é bastante difícil obter dados confiáveis destes organismos (EBERT, 1993; WAGNER, G. P. 1994). A regeneração anual da celulose provocada pela fotossíntese é estimada a $1,3 \times 10^9$ toneladas anuais (CAUCHIE, 1997), enquanto a síntese de quitina é estimada dentre $2,3 \times 10^9$ a 10^{11} toneladas anuais. Desta forma, apesar da celulose ser mais abundante em termos de ocorrência estática, a quitina é mais proeminente em termos dinâmicos de metabolismo, excedendo a regeneração anual de celulose provavelmente em uma ordem de magnitude (EBERT, 1993).

A quantidade de quitina varia dentre os organismos, os quais podem apresentar apenas traços de até 80% da sua fração orgânica. Temos como exemplo de fontes ricas em quitina os fungos, os quais podem conter até 45% de quitina, e artrópodes. A fração orgânica da cutícula de insetos contém entre 20 e 60% de quitina (HACKMAN, 1987).

As proporções de quitina encontradas variam de acordo com a espécie e a região de origem (Tabela 1) (NWE; FURUIKE; TAMURA, 2011; THATTE, 2004).

Tabela 1- Quantidade aproximada de quitina em cada espécie

Espécies	% de Quitina*
Fungos	5-20%
Polvos/Lulas	3-20%
Escorpiões	30%
Aranhas	38%
Baratas	55%

Espécies	% de Quitina*
Bicho da seda	20%
Caranguejo Hermit	69%
Camarão	20%

*É importante mencionar que algumas dessas quantidades de quitina foram calculadas com os animais secos, outras com os animais *in vivo* e em outros casos não foi informado nada. Essas informações não foram esclarecidas pelos autores.

1.4. Quitina e Quitosana

A quitina e quitosana são polímeros de origem animal, sendo a quitina um dos recursos orgânicos renováveis mais abundantes do mundo. Ela é encontrada em parede celular de fungos, exoesqueleto de crustáceos (camarões, caranguejos, lagostas etc.) e insetos.

1.4.1. Estrutura química da quitina e quitosana

A quitina (CAS 1398-61-4) e a celulose possuem semelhança funcional, apresentando baixa solubilidade e baixa reatividade química, e semelhança estrutural, porém a quitina apresenta no carbono de posição dois de cada unidade glicosídica da celulose uma substituição da hidroxila (OH) por grupos acetilados (NHCOCH_3). Logo, a quitina é composta por uma cadeia longa não ramificada formada por unidades N-acetil-2-deoxi-D-glicopirranose que são interligadas por ligações glicosídicas β (1 $\rightarrow$ 4) que se arranjam em alfa hélice estabilizadas por pontes de hidrogênio intramoleculares (Figura 2(a) e (b)) (SINGLA, 2001). É um pó incolor, apresentando estrutura parte cristalina e parte amorfa, insolúvel na maioria dos solventes. Ela se dissolve em ácidos minerais concentrados com degradação simultânea da cadeia polimérica (DALLAN, 2005; RODAS, 2004).

A quitosana é um heteropolissacarídeo derivado do processo de desacetilação química da quitina (Figura 3), constituída, predominantemente, por várias unidades D-

glicosamina e por unidades *N*-acetil-*D*-glicosamina ligadas por ligações β (1 $\rightarrow$ 4) (Figura 2 (c)) (DOMARD, 2011).

Figura 2- Estrutura da celulose (a), quitina (b) e quitosana (c)

Figura 3- Desacetilação química da quitina

Similar à celulose, a quitina apresenta três estruturas polimórficas denominadas α -, β - e γ -quitina. Cadeias do polissacarídeo associadas através de ligações de hidrogênio entre os grupos N-H e o C=O da cadeia adjacente dão origem às três

estruturas cristalinas diferentes (α -, β - e γ -quitina) de acordo com a polaridade da cadeia do polissacarídeo (MARTÍNEZ; FALOMIR; GOZALBO, 2009).

As formas polimorfas da quitina correspondem a diferentes arranjos no estado sólido, consequente de disposições distintas das cadeias dos polímeros nas folhas ou lamelas que constituem o domínio cristalino (Figura 4).

A α -quitina corresponde a um empacotamento denso: as cadeias poliméricas estão arranjadas de forma antiparalelas em diferentes lamelas ou folhas, e esta disposição favorece a existência de numerosas ligações de hidrogênio inter- e intra-cadeias da mesma lamela e de lamelas contíguas (os grupos redutores das cadeias estão em extremidades opostas). Na β -quitina, as cadeias de diferentes lamelas estão dispostas paralelamente, o que dificulta ligações de hidrogênio intermoleculares envolvendo lamelas vizinhas, resultando em um empacotamento menos denso. No caso da γ -quitina, parece ocorrer uma combinação dos dois arranjos descritos anteriormente (α -, β -quitina), em que as cadeias de duas lamelas paralelas (cadeias com mesma polaridade) são intercaladas por uma lamela com a cadeia antiparalela (cadeia com polaridade oposta) (Figura 4) (MUZZARELLI, 1977; ROBERTS, 1992).

Figura 4- Orientação da cadeia molecular em α - , β - , γ -quitina

A quitina adota determinada estrutura polimórfica em função do organismo considerado e também do papel que desempenha (ABRAM; HIGUERA, 2004). A α -quitina é a forma mais abundante na natureza e mais estável, sendo encontrada em estruturas rígidas e resistentes, como no exoesqueleto de artrópodes. Já as formas β -quitina e γ -quitina ocorrem em estruturas mais flexíveis, mas também resistentes. A estrutura da γ -quitina é a menos conhecida e estudada; acredita-se que ela seja uma distorção das duas outras estruturas polimorfas (α - e β -quitina).

A associação de inúmeras cadeias de lamelas adjacentes é responsável pela estrutura microfibrilar da quitina; esta confere algumas propriedades ao polímero, como a resistência física, insolubilidade à maioria de solventes e uma maior resistência a degradação por enzimas hidrolíticas (MUZZARELLI, 1977).

1.5. Biossíntese de quitina em insetos

Todo organismo que contém quitina em sua estrutura a sintetiza. Nos insetos, a quitina é o principal componente da cutícula, a qual é uma matriz extracelular que recobre a epiderme e traqueia (PETER, M. G., 2005).

Para que haja crescimento e desenvolvimento em insetos, eles são compelidos a trocar periodicamente suas cutículas durante a muda (ecdises). O crescimento do inseto e sua morfogênese são estritamente dependentes da sua capacidade de remodelar as estruturas quitinosas. Com esse objetivo, os insetos produzem continuamente enzimas quitina-sintetase e enzimas quitinolíticas em diferentes tecidos. A coordenação da síntese e degradação da quitina requer um rigoroso controle das enzimas participantes no desenvolvimento (MERZENDORFER; ZIMMICH, 2003; MERZENDORFER, 2006).

O processo de ecdise é iniciado quando ocorre a separação das células epidérmicas da cutícula velha através da secreção do fluido da muda (este é formado por proteases e quitinases, enzimas que digerem a maior parte da cutícula velha) e formação da membrana ecdisial. A nova cutícula é formada pela secreção de proteína e filamentos de quitina. Antes do completo processo de esclerotização, o inseto expande sua nova cutícula e libera a antiga, chamada agora de exúvia. Os hormônios responsáveis pela regulação do processo de ecdise são o ecdisonio, que desempenha a função de estimular as células epiteliais a darem início ao processo de ecdise; e o hormônio inibidor de muda (MIH, do inglês, Moulting Inhibitor Hormone) (FUKAMIZO, T.; KRAMER, K. J., 1985a).

A biossíntese de quitina vem sendo amplamente estudada em fungos; menos informações estão disponíveis para artrópodes. Foi assumido que a rota de biossíntese de quitina em insetos é bastante similar ou igual à dos fungos (KRAMER; MUTHUKRISHNAN, 2005).

A rota de biossíntese da quitina em insetos começa com a trealose, fonte de açúcar extracelular em insetos. A rota é descrita na Figura 5.

Figura 5 - Rota da biossíntese de quitina em insetos (MERZENDORFER; ZIMOCH, 2003)

A síntese da quitina pode ser dividida em três etapas distintas:

- (1) Na primeira etapa, ocorre a reação catalítica da enzima no espaço citoplasmático para a formação do polímero;
- (2) Na etapa seguinte, há a translocação da quitina pela membrana citoplasmática, e sua deposição no espaço extracelular;

(3) Por fim, ocorre a união espontânea do polímero, formando-se microfibrilas cristalinas. Em reações subsequentes, as microfibrilas se unem a outros açúcares, proteínas e glicoproteínas para formar o exoesqueleto de artrópodes (MERZENDORFER, 2006).

1.6. Biodegradação da quitina

A quitina é biologicamente sintetizada em um total aproximado de 1 bilhão de toneladas por ano. Este volume não se acumula na natureza, pois é biodegradado através do ciclo da quitina (Figura 6), por enzimas hidrolíticas (lisoenzima, quitinase, quitina desacetilada e quitosanase) que estão amplamente distribuídas nos tecidos e fluidos corporais de animais e plantas e também no solo, no mar e em lagos (BRINE, 1991).

Para uma completa hidrólise da quitina, é encontrado nos organismos quitinolíticos um sistema enzimático composto por duas hidrolases: quitinase e quitobiase. Primeiramente, a quitina é atacada pela quitinase, liberando principalmente quitobiose, oligômeros de N-acetil-glicosamina e uma pequena quantidade de N-acetil-glicosamina. Em seguida, a quitobiase converte quitobiose em N-acetil-glicosamina (Figura 6).

Figura 6- Ciclo da quitina

As quitinases desempenham um importante papel no processo de decomposição da quitina e na utilização da quitina como fonte renovável. Quitinases microbianas de compostos não vivos são ativos em um papel de limpeza e ainda fornecem um substrato oxidável, uma fonte de carbono e nitrogênio. Quantidades massivas de quitina e

quitosana são sintetizadas anualmente, e como não ocorre acúmulo destas no ambiente, conclui-se que quantidades massivas são também degradadas (BHATTACHARYA et al., 2007).

1.7. Propriedades de quitina e quitosana

Uma grande variedade de materiais pode ser preparada a partir de quitosana: ela pode ser encontrada em forma de pó, gel, filmes, membranas semipermeáveis, fibras, nano cápsulas, esferas e esponjas (GOULART, 2006). A quitina, devido à sua insolubilidade, é raramente submetida a reações químicas, apenas no processo de desacetilação para preparação da quitosana.

1.7.1. Propriedades físico-químicas da quitina

A quitina é um pó amarelado de estrutura cristalina ou amorfa, altamente hidrofóbica, insolúvel em água, em alguns ácidos e bases diluídas e em vários solventes orgânicos. Ela é solúvel em hexafluorisopropanol, hexafluoracetona, cloroálcoois adicionados a soluções aquosas de ácidos minerais e dimetilacetamida contendo 5% de cloridrato de lítio (KURITA, 1998).

1.7.2. Propriedades físico-químicas da quitosana

O polímero quitosana é insolúvel em água, em pH alcalino e neutro e solúvel em pH ácido (SHI et al., 2006). O ácido fórmico é tido como o melhor solvente para quitosana, sendo obtidas soluções de quitosana em sistemas aquosos com 0.2-100% de ácido fórmico (YI, H. et al., 2005). O solvente utilizado como referência é solução de ácido acético a 1% com pH 4.0. A quitosana é solúvel em ácidos diluídos ($\text{pH} < 5,5$), como ácido hidrocloreídrico 1% e ácido nítrico diluído, e insolúvel em ácido sulfúrico e ácido fosfórico (RINAUDO; PAVLOV; DESBRIERES, 1999).

O grupamento amino na quitosana apresenta valor de pK_a de $\sim 6,5$. A presença desses grupamentos possibilita que o pH modifique a carga e propriedades da quitosana. Em pH baixo os grupamentos amino são protonados, se tornam carregados positivamente e isto torna a quitosana um polieletrólito catiônico solúvel em água. Com o aumento do pH acima de 6, os grupamentos aminos se desprotonam e o polímero de

quitosana se desprotona, perdendo sua carga e se tornando insolúvel em água. A transição solúvel/insolúvel ocorre na faixa de pKa de 6-6.5.

Vários fatores afetam a solubilidade da quitosana, tais como, temperatura, concentração de álcali, tempo de reação de desacetilação, tamanho de partícula, entre outros (RAO, S. M., 2007).

A faixa de pKa é dependente do grau de N-acetilação, e consequentemente, a solubilidade da quitosana também. Com os grupamentos aminos protonados, a molécula de quitosana se torna solúvel e bioadesiva, pois se liga às cargas negativas das superfícies, como da mucosa (YOGESHKUMAR; ATUL; ADHIKRAO, 2013). Porém, as propriedades da solução de quitosana não são dependentes apenas do grau de acetilação, mas também da distribuição dos grupamentos N-acetil ao longo da cadeia principal e da sua massa molecular (MUZZARELLI, 1983).

O polímero de quitosana apresenta as seguintes propriedades físico-químicas e biológicas (THAKUR, 2014):

- aminopolisacarídeo linear com elevado teor de nitrogênio;
- capacidade de formar pontes de hidrogênio intermolecular;
- alta viscosidade;
- grupos reativos para *cross-linking* e ativação química;
- quelante e complexante;
- agente floculante;
- propriedades de adsorção, filtração e separação;
- capacidade de formar filme, material adesivo para isolamento de biomoléculas;
- biocompatibilidade;
- bioativo;
- biodegradável;
- não tóxico;
- atividade antimicrobiana (antibacteriano, antifúngico e antiviral);
- propriedades de antiácido, antiulceroso e antitumoral;
- anticoagulante;
- atividade hipolipêmica.

A matéria-prima quitosana é comercializada em forma de pó. Não foi estabelecido ainda um padrão dos parâmetros físicos e químicos para este polímero. Modificações no processo de obtenção da quitosana, como variação de temperatura,

tempo de aquecimento e concentração de reagentes, podem causar alterações no produto final e modificar seu grau de desacetilação, massa molecular e viscosidade intrínseca (KNAUL et al., 1998; RIANDE, 2000).

A caracterização da quitosana pode ser feita levando-se em consideração as características físicas, químicas e biológicas (Quadro 1). As características físicas são: tamanho das partículas, densidade, solubilidade, viscosidade e descrição de suas apresentações. Já as características químicas são: distribuição de massa molecular, grau de desacetilação, pH, índice de cristalinidade, valor de retenção de água, níveis de metais pesados e proteínas. E as biológicas são: apirogenicidade, citotoxicidade e biocompatibilidade (KNAPCZYK et al., 1989; SANFORD, 1989).

Características		
Físicas	Tamanho da partícula	<30 μm
	Densidade	1.35 – 1.40 g/cc
	Solubilidade	Insolúvel em água Solúvel em meio ácido
	Alta massa molecular	
Químicas	pH	<5,5
	Alta densidade de cargas	Em pH >5,5
	Adere à superfície carregada –	
	Forma gel com poliânions	
	Favorável a modificações químicas	
	Polieletrólito linear	

Quadro 1- Características físico-químicas da quitosana

1.7.2.1. Grau de Desacetilação (GD)

O grau de desacetilação (GD) representa a percentagem de grupos NH_2 livres apresentado pelo polímero de quitosana e é, provavelmente, a sua característica mais importante, pois a maioria de suas propriedades são dependentes desse fator, como densidade de carga e solubilidade (RINAUDO, 2006).

O grau de desacetilação da quitosana pode ser determinado por diversas técnicas, como: análise elementar, titulação potenciométrica (TORRES et al., 2005), espectroscopia ultravioleta (UV) (WU et al., 2008), espectroscopia na região do infravermelho (IV), titulometria com ninhidrina, ressonância nuclear magnética (RMN), entre outros (MELLO et al., 2006).

A espectroscopia IV é uma técnica instrumental rápida e simples que depende da interação das moléculas ou átomos com a radiação eletromagnética, evidenciando a presença de grupos funcionais. A radiação infravermelha causa aumento da amplitude de vibrações das ligações covalentes entre átomos e grupos funcionais de compostos orgânicos e de insaturações. Nos compostos orgânicos os grupos funcionais possuem átomos ligados por arranjos específicos, então a absorção de energia IV por uma molécula orgânica ocorrerá de modo característico destes grupos funcionais, específicos daquela molécula.

Na espectroscopia IV, um feixe de radiação passa através da amostra, e a radiação que é transmitida pela amostra é comparada com um feixe de referência. Os compostos absorvem a energia IV em regiões particulares do espectro, as quais são quantificadas. As frequências absorvidas pela amostra serão evidenciadas pela diferença entre os eixos. O espectrômetro registra os resultados na forma de gráfico, mostrando a absorbância versus a frequência ou comprimento de onda.

Na técnica de espectroscopia de infravermelho (IV) os dados são ajustados em equações relacionadas às bandas associadas aos grupos carbonila (C=O), do N-acetil e hidroxila (OH) presentes na quitina e quitosana. As equações propostas, normalmente, utilizam os valores de absorbância das bandas em 1655 e 3450 cm^{-1} , associadas a carbonila e hidroxila, respectivamente. A primeira banda varia de acordo com o grau de desacetilação da quitina, diminuindo da quitina para a quitosana, e a segunda está presente tanto no espectro da quitina quanto no da quitosana, então, não sofre alteração (MUZZARELLI, 1985; KIM et al., 1997; CHO; NO; MEYERS, 1998; MUZZARELLI, 1998; MONTEIRO, 2000; MELLO et al., 2006).

Os valores em absorbância obtidos, relativos a esses dois comprimentos de onda, são utilizados para o cálculo do grau de desacetilação da amostra segundo equação proposta por Domszy e Roberts:

$$\text{GD} = 100 - [(A_{1655}/A_{3450}) \times 100/1.33] \quad \text{Equação 1}$$

O fator 1,33 corresponde à constante que representa a razão (A_{1655}/A_{3450}) para quitinas completamente acetiladas. É assumido o valor igual a zero para quitosanas totalmente desacetiladas (CANELA; GARCIA, 2001; KHAN, PEH, CHING, 2002).

1.7.2.2. Massa Molar Viscosimétrica Média (Mv)

A massa molecular da quitosana pode variar dependendo da procedência da amostra e dos tipos de tratamento que foram empregados para obtenção.

Em função da rapidez e simplicidade e devido à capacidade da quitosana formar soluções viscosas, o método bastante utilizado para a determinação da massa molar média da quitosana é a viscosimetria; entretanto, outros métodos como cromatografia de permeação em gel e espectrometria de espalhamento de luz podem ser utilizados (SANTOS, 2004).

A equação mais utilizada que relaciona viscosidade e massa molecular é a equação de Mark-Houwink-Sakurada:

$$[\eta] = K \cdot Mv^a \quad \text{Equação 2}$$

Onde: $[\eta]$ é a viscosidade intrínseca;

Mv é a massa molar viscosimétrica média;

K e “a” são constantes viscosimétricas

As constantes viscosimétricas são independentes da massa molecular, porém são dependentes do solvente, temperatura e da estrutura química do polímero (MAGHAMI; ROBERTS 1988; KUMAR, 2000).

A densidade linear de carga da molécula de quitosana em solução ácida irá variar conforme a quantidade de grupamentos amino livres ao longo da cadeia polimérica, e isto afetará a configuração da cadeia da quitosana em solução, bem como os valores de K e “a”. Os valores de “a” dependem diretamente da configuração do polímero. Para polímeros lineares de cadeia aleatória, os valores de “a” devem ser maiores que 0,5, uma vez que valores abaixo de 0,5 são típicos de proteínas globulares em que a cadeia polimérica é hidratada e em configuração de espiral, não sendo estas duas características observadas nas cadeias de quitosana. Valores de “a” em torno de 1,2 são utilizados para cadeias estendidas e muito longas (MAGHAMI; ROBERTS, 1988; ROBERTS, 1992; ANTHOSEN; VARUM; SMIDSRØD, 1993).

Utilizando-se valores de $K = 1,81 \times 10^{-3}$ e $a = 0,93$, tem-se observado resultados aceitáveis de Mw (MAGHAMI; ROBERTS, 1988).

1.7.2.3. Cristalinidade da quitosana

Em estado sólido, a quitosana é um polímero semicristalino. Sua morfologia tem sido muito investigada e foram mencionados na literatura muitos polimorfismos (CLARK, 1936; MAZEAU, 1994; OKUYAMA, 1999; OGAWA, 2004). A difração de raios-x (DRX) de quitosana com alto grau de desacetilação e com baixa massa molecular indicou célula unitária ortorrômbica contendo duas cadeias de quitosana antiparalela sem molécula de água (OGAWA, 1992). De acordo com estudos de difração de raios-x, a cristalinidade da quitosana depende do seu grau de desacetilação e do processo de obtenção do biopolímero (MONTEIRO, 2000).

1.7.2.4. Biodegradabilidade da quitosana

Biodegradação, química ou enzimática, resulta em fragmentos passíveis de depuração renal. Um exemplo de degradação química, seria a biodegradação catalisada por ácido que ocorre no estômago (HSU; DON; CHIU, 2002).

A quitosana pode ser degradada por enzimas que hidrolisam as seguintes ligações: glicosamina-glicosamina, glicosamina - N-acetil-glicosamina e N-acetil-glicosamina – N-acetil-glicosamina (KEGG, 2009). Em vertebrados a quitosana é predominantemente biodegradada pela lisozima e por enzimas bacterianas presentes no cólon (KEAN; THANOU, 2009).

No corpo humano, a quitina e quitosana são biodegradadas, principalmente, através de hidrólise enzimática pela lisozima, a qual é uma enzima proteolítica não específica que está presente em todos os tecidos do corpo. Outra enzima capaz de quebrar a quitosana é a lipase; esta é encontrada na saliva e nos fluidos pancreáticos e gástricos (PANTALEONE; YALPANI; SCOLLAR, 1992).

Apesar da predominância da biodegradação da quitosana pela lisozima, foram identificados oito quitinases em humanos, três das quais mostraram atividade enzimática (FUNKHOUSER; ARONSON, 2007), porém estas não foram avaliadas em relação à degradação da quitosana e/ou seus derivados (BOOT et al., 2001).

A biodegradação enzimática da quitosana gera produtos não-tóxicos (PANTALEONE; YALPANI; SCOLLAR, 1992).

Características do polímero de quitosana, como, massa molecular, grau de acetilação, distribuição de grupamentos acetil ao longo da cadeia polimérica, pH e até o

método de preparação da quitosana, podem influenciar em sua biodegradabilidade, facilitando ou dificultando a acessibilidade enzimática, modificando o processo de hidrólise do polissacarídeo (KHOR, 2002).

Pesquisas relacionadas à degradação da quitosana após administração intravenosa são raramente reportadas. Portanto, o mecanismo de degradação da quitosana após ser administrada por via intravenosa é ainda pouco conhecido. Possivelmente, os processos de distribuição, degradação e eliminação são fortemente dependentes da massa molecular. O fígado e os rins são, provavelmente, os órgãos onde ocorre a degradação da quitosana. Em estudo em que foram injetados, por via intravenosa, 7.1-8.6 mg/kg de oligossacarídeos de quitosana em coelhos, observou-se um aumento na atividade de lisoenzimas no sangue desses (HIRANO et al., 1988).

A administração bucal de discos de quitosana em porcos foi avaliada. A massa molecular da quitosana utilizada foi de 400 kDa. Os discos de quitosana permaneceram na cavidade bucal dos porcos por mais de 6 horas sem evidência de deseintegração. A formulação com quitosana modificada, 4-tiobutilamida quitosana, foi significativamente mais mucoadesiva do que a formulação de quitosana não modificada (LANGOTH, 2006).

Após a administração oral, a quitosana sofre alguma degradação no trato gastrointestinal, sendo a digestão predominantemente no intestino. Hirano (1988) mostrou que a digestão da quitosana varia de acordo com a espécie. Em galinhas e galos ocorreu entre 67-98% de degradação após a ingestão oral e em porcos a degradação foi de 39-83%.

Ao final do processo de despolimerização da quitosana pela lisozima, há a formação de dois açúcares (N-acetilglicosamina e glicosamina) que estão envolvidos no processo de reepitelização, explicando assim a propriedade de biodegradabilidade da quitosana (KUMAR, 2000).

1.8. Produção de quitina e quitosana

O processamento químico de resíduos da indústria pesqueira é a principal fonte de quitina e quitosana comercializada atualmente. Procedimentos biotecnológicos e químicos estão sendo bastante estudados para produção de quitina e quitosana. Até o momento, a investigação de fontes alternativas de quitosana (insetos e fungos) não forneceu uma técnica viável no processo de produção de quitosana, e não foi

apresentada uma abordagem tecnológica (extração e análise) de quitosana a partir de insetos.

A quitosana obtida comercialmente vem de subprodutos (cascas de crustáceos) da indústria de pesca, mas nunca com o único propósito de apenas produzir quitosana. Os processos químicos de produção de quitina e quitosana envolvem procedimentos como remoção de proteínas, minerais, pigmentos e desacetilação. Tem-se que o rendimento de quitina a partir de crustáceos é de 1-2% do peso úmido das matérias-primas (PETER, 2005).

1.8.1. Obtenção de quitosana

O processo de obtenção de quitosana consiste basicamente em quatro etapas: desproteinização, desmineralização, clareamento e desacetilação (Tabela 2). A concentração dos reagentes, temperatura e tempos de reação são bastante variados dependendo da fonte da matéria-prima e das especificações desejadas do produto final, como grau de desacetilação e massa molecular (NO; MEYERS, 1997).

Tabela 2 - Etapas do processo de obtenção de quitosana

Etapas	Reagente	Temperatura (°C)	Tempo (h)
Desproteinização	0,5-15% NaOH	25-100	0,5-72
Desmineralização	2,5-8% HCl	15-30	0,5-48
Clareamento	Solventes orgânicos; H ₂ O ₂ , NaOCl	20-30	Lavagem 1h
Desacetilação	40-50% NaOH	60-150	0,5-144

1.9. Modificações químicas da quitosana

Por ser insolúvel em água e em meio neutro, condição em que a maioria das enzimas fisiológicas exercem sua atividade, algumas aplicações da quitosana ficam limitadas (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006). Porém, a quitosana possui três grupos funcionais reativos, um grupamento amino e dois grupamentos hidroxil, e esses grupamentos ampliam as possibilidades de modificações químicas seletivas, como acetilação, alquilação e carboximetilação (PETER, 1995; SHI et al., 2006). As

modificações químicas na estrutura da quitosana viabilizam a síntese de derivados com potencias usos comerciais e amplia as possibilidades para novas aplicações (RINAUDO, 1993; SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

A funcionalidade da quitosana tem mostrado ser dependente não apenas da sua estrutura química, mas também do seu tamanho molecular, pois muitas das propriedades físico-químicas e funcionais de uma cadeia polimérica são definidas pela sua massa molecular (HUANG, 2008); por exemplo, a viscosidade, a solubilidade e a atividade antibacteriana (JIA; SHEN; XU, 2001).

1.10. Aplicações da quitina e quitosana

A partir da década de 70 a produção industrial da quitosana apresentou um elevado crescimento. A pesquisa por novas aplicações e o emprego em diversas áreas (agricultura, farmacêutica, cosmética, alimentos) tem aumentado exponencialmente desde então (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006; SHI et al., 2006; KUMAR, 2000). A utilização comercial da quitosana tem sido exitosa na engenharia de água, na manufatura têxtil, em cosméticos e suplementação alimentar (PETER, 2005).

1.10.1. Aplicações farmacêuticas

A quitosana é um material funcional de aplicação em vários campos do conhecimento. Na área farmacêutica ela vem sendo utilizada como excipiente em formulações farmacêuticas, para liberação controlada de medicamentos e encapsulação de materiais. A natureza policatiónica da quitosana mais a sua biodegradabilidade lhe conferem características ideais para a interação com a superfície negativamente carregada dos tecidos (KUMAR, 2000).

Devido à sua biocompatibilidade e baixa toxicidade, a quitosana vem sendo estudada para fins farmacêuticos convencionais, bem como para novas aplicações.

Segue abaixo algumas aplicações da quitosana no campo farmacêutico (YOGESHKUMAR; ATUL; ADHIKRAO, 2013):

- Diluente na compressão direta de comprimidos;
- Aglutinante na granulação úmida;
- Liberação modificada de fármacos a partir de comprimidos e grânulos;

- Carreador de fármacos em sistemas microparticulados;
- Filmes para liberação controlada de fármacos;
- Preparação de hidrogéis, agente para aumento da viscosidade de soluções;
- Agente umectante e melhoramento de dissolução de medicamentos;
- Desintegrante;
- Polímero bioaderente;
- *Delivery* de fármacos;
- Intensificador de absorção (por exemplo, por via nasal ou oral);
- Polímero biodegradável (implantes, micropartículas);
- Carreador em vacinas e terapia gênica.

Latenciação e pró-fármacos de quitosana

A latenciação é um método de desenvolvimento molecular por meio de pró-fármacos que consiste, mediante reação química ou enzimática, na transformação do fármaco em forma de transporte inativo que libera a porção ativa no local de ação, desviando o fármaco de barreiras que possam alterar seus efeitos e diminuindo seus efeitos adversos. O pró-fármaco é caracterizado pela ligação biorreversível entre o fármaco e outra molécula, chamada de transportador.

Por meio da latenciação é possível se ter direcionamento de ação para sistema nervoso central (SNC), prolongamento de ação, seletividade de ação, melhoramento da biodisponibilidade, e ainda, diminuição de instabilidade e baixa solubilidade em preparações farmacêuticas.

Na literatura existem trabalhos que utilizam a quitosana e seus derivados como transportadores poliméricos em pró-fármacos.

Kato e colaboradores (2004) empregaram a succinilquitosana como transportador polimérico para a mitomicina C. A utilização do derivado da quitosana possibilitou a obtenção de pró-fármacos solúveis ou insolúveis em água. Ambos os pró-fármacos exibiram efeitos antineoplásicos acompanhados de diminuição de efeitos adversos quando comparado à administração do fármaco em forma isolada. Foi observado que o tempo de meia-vida pode variar de acordo com o grau de substituição do derivado. O aumento no grau de substituição, aumentou o tempo de meia vida. Isto é explicado pela quantidade de grupo carboxilato (carga negativa) na molécula, o que proporciona maior tempo de retenção do constituinte nos fluidos plasmáticos. Em outro

estudo, a succinilquitosana e a carboximetilquitosana foram empregadas como transportadores e houve diminuição dos efeitos adversos da mitomicina C (SONG et al., 1993).

O pró-fármaco de metanfetamina e carboximetilquitosana mudou de forma satisfatória a cinética de liberação do fármaco. Anteriormente à latenciação, os níveis séricos eram mantidos por, no máximo, 7 h, e, após a obtenção da forma latente, foi possível obter níveis plasmáticos por até 120 h (BABA et al., 1988).

Ouchi et al. (1992) obtiveram pró-fármacos de 5-fluorouracila utilizando carboximetilquitosana e quitosana como transportadores. O pró-fármaco prolongou o tempo de ação do fármaco e ainda exibiu menos efeitos adversos quando comparados à utilização somente do antineoplásico 5-fluorouracila.

Atualmente, a quitosana não é registrada como um medicamento, mas a glicosamina é utilizada para amenizar a dor em doenças reumáticas. Na Europa a glicosamina só é vendida com prescrição médica, mas nos Estados Unidos ela é um medicamento de venda livre. O sulfato de glicosamina é obtido por hidrólise de quitina com ácido clorídrico, seguido por troca iônica (PETER, 2005).

1.10.2. Aplicações biomédicas

Na área biomédica, a quitosana é usada em suturas cirúrgicas, pois por ser biocompatível acarreta uma redução nas reações alérgicas. É utilizada também na fabricação de lentes de contato, já que contam com a maior biocompatibilidade do que as lentes feitas de polímeros sintéticos e ainda, são confortáveis, absorvem água e são permeáveis ao ar, podendo assim ser utilizadas por um período de tempo maior (SANFORD, 1989). É ainda empregada na reconstituição óssea, implantes dentários e na confecção de outros biomateriais, como membranas renais e pele artificial. (DODANE, 1998; KUMAR, 2000).

Adicionada a complexos com soluções de polímeros aniônicos, como polifosfatos, alginatos e pectinas, a quitosana é utilizada para formação de biomembranas, encapsulação e imobilização de enzimas e células.

A quitosana, por possuir uma estrutura química muito semelhante à celulose e não ser digerida pelas enzimas digestivas, é considerada uma fibra de origem animal (MUZZARELLI, 1996). Ela atua na redução dos níveis de colesterol. Devido à alta densidade de cargas positivas do polímero, a quitosana se liga aos ânions dos ácidos

graxos impedindo sua absorção pelo organismo. No estômago, um ambiente ácido, a quitosana adsorve as gorduras durante a digestão e quando chega ao intestino, que apresenta um ambiente básico, o complexo quitosana-gordura é solidificado, sendo então excretado junto com as fezes (DEUCHI, 1994).

A quitosana estimula a liberação de células da resposta inflamatória e acelera a migração destas para a área lesada. As células da resposta inflamatória, tais como macrófagos, removem células mortas e atacam os micro-organismos enquanto induzem outras células do sistema imunológico. Isto acelera o processo de cicatrização e reduz as chances de infecção do local afetado. As cargas positivas da molécula de quitosana permitem a interação eletrostática com glicosaminoglicanos, os quais ativam fatores de crescimento, que possibilita um crescimento melhorado e regular das células, evitando assim a formação de queloides (UENO; MORI; FUJINAGA, 2001).

1.10.3. Aplicações em cosméticos

Na indústria cosmética, a quitosana é usada como esfoliante, hidratante capilar, creme dental e no tratamento de acne. A aplicação de quitosana em cosméticos é baseada na propriedade da quitosana de formar filmes em superfícies negativamente carregadas e por formar hidrogéis (LANG, 1995). Por ser um polissacarídeo catiônico em $\text{pH} < 6,0$, a quitosana carregada positivamente irá interagir com as superfícies carregadas negativamente, como o cabelo e a pele. Além disto, é um agente umectante e hidratante, sendo também utilizada como um doador de viscosidade em xampus não-iônicos (SANFORD, 1989). Sabões contendo quitosana são comercializados atualmente na Coreia (PETER, 2005).

1.10.4. Outras aplicações da quitosana

A quitosana vem sendo aplicada no tratamento de água para remoção de íons, como floculante para clarificação e redução de odores; na agricultura, como adubo e fungicida e no revestimento de frutas e sementes; e como auxiliar de curtimento e acabamento, aumentando a temperatura do encolhimento, penetração e fixação de corantes e ainda melhorando a resistência à água (SINGLA, 2001). Outro uso da quitosana é na fabricação de papéis, em que a quitosana é adicionada à pasta de papel

ou reveste a folha de papel, melhorando a resistência a ruptura e aumentando a força necessária para o rasgo (WIECZOREK, 1997).

No Quadro 2 estão resumidas algumas das aplicações da quitosana (PETER, 2005, BOURIOTIS et al., 2000).

Aplicações	Exemplos
Bioteecnológica	Imobilização de enzimas, substratos enzimáticos, purificação de proteínas
Cosméticos	Produtos capilares e de pele
Material biomédico e farmacêutico	Tratamento de queimaduras, pele artificial, suturas, lentes de contato, sistema de liberação de fármacos, terapia dentária, hemostático
Aditivos alimentares	Clarificação de frutas e bebidas, estabilização da cor, conservante, espessante, estabilizante, fibras alimentares
Engenharia de água	Adsorção de íons metálicos e corantes; floculação de proteínas; separação de solventes orgânicos
Agricultura	Revestimento de frutas e sementes, fungicida, fertilizante
Outros	Fibras sintéticas, revestimento de papel, algodão, filmes e esponjas

Quadro 2 - Aplicações de quitosana

1.11. Biodistribuição da quitosana

A biodistribuição da quitosana é dependente da formulação na qual ela é empregada, como tamanho da nanopartícula, assim como características intrínsecas do polímero, como massa molecular e grau de desacetilação. Em formulações de nanopartículas, a biodistribuição será dependente do tamanho e carga das nanopartículas, e a quitosana será eliminada apenas após a liberação do fármaco dentro das células dos tecidos alvos. Porém, antes de ser eliminada a quitosana passa pelo processo de biodegradação.

A quitosana pode ser modificada para acelerar ou reduzir a liberação de fármacos, e isto afeta a cinética, metabolismo e excreção da quitosana.

Em três estudos (BANERJEE et al., 2005; ZHANG et al., 2008; ALEXIS et al., 2008) foi observado que o principal órgão em que a quitosana foi encontrada após administração intravenosa foi o fígado, o que pode ocorrer pois o fígado é o órgão primário de metabolismo (LINE, 2000).

Foi avaliada a biodistribuição de quitosana traçada com agentes fluorescentes, e a presença de quitosana foi detectada em vários órgãos, principalmente nos rins (ordem de concentração: rins > fígado > baço > intestino > plasma > pulmão > estômago > coração > músculos > cérebro) e sua excreção foi renal (ZHANG et al., 2008).

Traçadores radioativos e fluorescentes vêm sendo utilizados para avaliar a biodistribuição da quitosana após administração intravenosa, porém esses métodos não garantem com precisão a avaliação da liberação e eliminação (KEAN; THANOU, 2010).

Apesar de pouco estudada, a distribuição da quitosana após administração oral parece ser bastante dependente da massa molecular. Provavelmente, oligômeros de quitosana podem apresentar alguma absorção, enquanto quitosanas de faixa de massa molecular alta são excretadas sem serem absorvidas (KEAN; THANOU, 2010).

1.12. Toxicologia da quitina e quitosana

A quitina está presente em frutos do mar e cogumelos que são normalmente consumidos por humanos. Ambos são considerados não tóxicos e seguros para alimentação, com exceção de pessoas alérgicas aos frutos do mar. Porém, a hipersensibilização está mais ligada a componentes proteicos do que aos polissacarídeos (PETER, 2005).

A quantidade de cargas positivas do polímero de quitosana afeta a sua interação com as células e os microambientes, podendo diminuir ou aumentar sua absorção e consequentemente a toxicidade. As propriedades físico-químicas do polímero e sua conformação e formulação altera a distribuição e dessa maneira a absorção. Além disso, as vias de administração, concentração, tempo de contato e células afetadas também interferem na toxicidade.

Testes de toxicidade *in vitro* sugeriu que a toxicidade aumenta quando há aumento da densidade de cargas da molécula de quitosana. Ocorre um limiar em que a quantidade de cargas é baixa, havendo poucos pontos de contato entre a molécula e a célula, reduzindo significativamente o efeito tóxico da quitosana. Isso ocorre com

quitosanas com grau de desacetilação entre 40-60%. Porém quitosanas com massa molecular inferior a 10 KDa não apresentaram toxicidade. Quitosanas modificadas, em que não houve alteração na densidade de cargas, não apresentaram alteração de toxicidade quando comparadas a quitosana nativa (KEAN; THANOU, 2010).

A aplicação de discos bucais de quitosana em ratos não causou inflamação na mucosa (LANGOTH et al., 2006). A mucosa nasal de ratos foi exposta a solução de quitosana a 0,5% (p/v) por mais de uma hora e não houve mudanças significativas na morfologia celular da mucosa quando comparadas ao grupo controle (ILLUM; FARRAJ; DAVIS, 1994).

Hwang e Damodaran (1995) verificaram uma toxicidade muito baixa de quitosana em ratos. E um extensivo estudo toxicológico realizado com PROTASANTM UP (glutamato de quitosana) (Tabela 3) mostrou que o glutamato de quitosana não é tóxico em ratos. Neste estudo foram testadas várias rotas de aplicação, assim como ensaios de citotoxicidade, mutagenicidade e hipersensibilização (DORNISH *et. al.*, 1997).

Tabela 3 - Toxicologia de glutamato de quitosana em ratos (DORNISH *et. al.*, 1997).

Aplicação	Sem efeitos tóxicos observados em	Aplicação por
Oral	Até 600 mg/kg por dia	13 semanas
Intravenosa	Até 25 mg/kg	Única
Intraperitoneal	Até 500 mg/kg	7 dias
Mucosa nasal	Até 3 mg por dia	7 dias

1.13. Aspectos regulatórios

A quitosana não é registrada como medicamento, sendo algumas das razões para isto a falta de padrões, a escassez de dados sobre a eficácia e a ausência de dados toxicológicos e de segurança em longo prazo. Não foram estabelecidos parâmetros e protocolos de definições de pureza, características químicas e físico-químicas. Além disso, apesar da literatura apresentar inúmeros resultados positivos, os resultados não se mostram consistentes e sim com muita variação. A utilização da quitosana como excipiente farmacêutico é dificultado pela falta de testes

pré-clínicos apropriados e pela ausência de avaliação de segurança dos compostos (BALDRICK, 2000).

Na Tabela 4 estão listadas algumas especificações da quitosana para produtos de grau farmacêutico.

Tabela 4 - Especificações da quitosana para produto de grau farmacêutico

Parâmetro	Especificação	Referência
Viscosidade	Deve ser especificada	A, B, C
GD	Deve ser especificada	A, B, C
Teor de ácido	Deve ser especificada	A
Umidade	Deve ser especificada	A, B, C
Solubilidade, turbidez	>99,9%	A, B, C
Metais pesados	<27 ppm	A, B
Endotoxina	<625 EU g ⁻¹	A
Microbiológico	<1 c.f.u. g ⁻¹	A
Cor	Sem cor, creme, acinzentado	B, C
Teor de cinzas	<3%	B, C
Aparência	Pó, flocos	B
Granulometria	Menor que 25% > 2%	B
Análise cromatográfica	Sugerido	C
Análise espectroscópica	Sugerido	C
Análise química	Sugerido	C
Proteína, aminoácidos	Sugerido	C

A= DORNISH et al. (1997); B= WOJTASZ-PAKAJ et al. (1994); C= STEVENS (2001)

A quitosana é aprovada para aplicações alimentares no Japão, Itália e Finlândia (ILLUM, 1998) e foi aprovada pelo FDA para utilização em curativos (WEDMORE et al., 2006).

1.13.1. A quitosana como agente terapêutico

A maioria dos estudos de administração de quitosana a humanos utilizou entre 3 e 6 gramas de quitosana por dia durante uma refeição.

Pesquisas aprofundadas sobre efeitos colaterais e/ou interações da quitosana em humanos ainda não foram realizadas, porém estudos em animais sugerem que o polímero de quitosana pode inibir a absorção de minerais, gorduras e vitaminas. A ingestão da quitosana pode causar alteração na flora intestinal, acreditando-se que essa alteração seja benéfica; porém não foi excluída a possibilidade dessas mudanças serem negativas a longo prazo. Pessoas que sofrem de síndrome de má absorção intestinal não devem utilizar quitosana. Outras contraindicações não foram bem estabelecidas, assim como informações para gestantes e lactantes.

Existe potencial alergênico para indivíduos alérgicos a crustáceos. Ensaios clínicos reportaram poucos efeitos adversos, geralmente limitados a flatulência e constipação (YOGESHKUMAR; ATUL; ADHIKRAO, 2013).

1.14. Quitosana e o mercado mundial

O Japão e os Estados Unidos são considerados os principais países produtores e consumidores de quitina/quitosana e seus derivados; porém, outros países já mostram interesses nesses polímeros e estão desenvolvendo pesquisas e produção de quitina/quitosana e derivados. Além do Japão e Estados Unidos, a produção comercial de quitosana está concentrada na Polônia, Noruega, Índia e Austrália (KUMAR, 2000).

O Japão aplica uma grande soma em investimentos na pesquisa e desenvolvimento científico e tecnológica da quitosana, em virtude da ampla área de aplicações deste polímero (NIFANT'EV, 1998).

Na primeira conferência internacional sobre quitosana, International Conference on Chitin/Chitosan (ICCC), foram apresentados três trabalhos que consideraram o fator econômico da produção de quitosana a partir de resíduos de crustáceos nos Estados Unidos. Tomando uma planta industrial capaz de produzir cerca de 5×10^5 kg de quitosana por ano, uma série de possíveis custos de produção foram calculados, em que os valores encontrados variaram de US\$1,20 / kg (JOHNSON; PENISTON, 1978) a US\$ 2,2 / kg (PERCEVAL, 1978) para produção de quitina e de US\$1,82 (JOHNSON; PENISTON, 1978) a US\$4,42 (PERCEVAL, 1978) para obtenção de quitosana. O

terceiro trabalho (MURRAY; HATTIS, 1978) considerou apenas o custo de produção da quitosana, que ficou entre US\$2,21 - US\$5,53.

Isso dá um custo médio de US \$ 3,50 / kg de quitosana, o que segundo Roberts (2008) calculou, usando como base o Índice de Preços ao Consumidor (1913-2008) do Federal Reserve Bank de Minneapolis, representava US\$ 11,50 / kg em valores presentes à época do estudo. Isto é muito próximo do preço de mercado da quitosana de qualidade razoável na China. Esse preço não inclui o custo de transporte que, para pequenas quantidades (cerca de menos de 100 kg), seria quase o dobro do preço. No entanto, os cálculos feitos em 1977 foram baseados no pressuposto de que a matéria-prima, isto é, os resíduos das fábricas de processamento de mariscos, seria disponível a preços muito baixos ou mesmo a custo zero.

Na conferência de 1977, um trabalho (BALASSA; PRUDDEN, 1978) abordou a aplicação da quitosana em áreas médicas, mas não sugeriu que o preço da quitosana seria muito elevado como é atualmente. A quitosana utilizada na área médica é de alto valor agregado, sendo vendida por várias empresas a US\$25.000,00 / kg (ROBERTS, 2008).

O preço a granel de quitosana varia aproximadamente de US\$ 10,00 a US\$ 1.000,00 por quilograma (JOHNSON, 2002). A variação no valor do quilo da quitosana é dependente principalmente das especificações do produto, grau de pureza, matéria-prima, processo de extração, fabricantes e outras características adequadas para aplicações de alto valor técnico agregado (PETER, 2005).

Segundo Archer (2001), no Reino Unido o grama de quitosana altamente purificada é encontrado por até 50 libras esterlinas.

O preço mundial da quitosana em pequenas quantidades é cerca de US\$ 52,20 / 50 g para quitosana de baixa massa molecular e de US\$ 56,40 / 50 g para quitosana de média massa molecular (catálogo online da Sigma-Aldrich, consulta em setembro de 2015 – correspondente a US\$1.044,00/kg e US\$1.128,00/kg, respectivamente).

Atualmente, não se tem disponível dados confiáveis de valores exatos da produção de quitina e quitosana (PETER, 2005). Mas o maior mercado para os derivados de quitina é o da biomedicina, com um valor estimado em um bilhão de dólares por ano (ARCHER, 2001).

De acordo com Hirano (1989), as empresas japonesas tinham, em 1988, a capacidade de produzir 2.000 toneladas de quitina, mas apenas 700 toneladas eram

produzidas. Deste montante, 500 toneladas eram usadas para produção de quitosana, glicosamina e oligossacarídeos 60 toneladas e 40 toneladas para outros propósitos.

Na atualidade, a demanda por quitina e quitosana aumentou notavelmente, e instalações de produção destes polímeros apareceram em vários lugares do mundo. Baseado em informações do autor Peter (2005), as empresas cogitam aumentar a capacidade de produção de quitosana para algo em torno de 1.000 toneladas por ano. Dito isto, estima-se que a produção global anual de quitina e quitosana seja na ordem de 3.000-10.000 toneladas. Com isso, tem-se que aproximadamente apenas 1% dos resíduos de crustáceos do mundo é realmente utilizado para a produção de quitina e quitosana (PETER, 2005).

1.14.1. Situação atual e perspectivas futuras

Hoje em dia, mais de trinta anos depois da primeira conferência internacional sobre quitina e quitosana realizada em 1977, é aceito que o termo “quitosana” não é usado para identificar uma substância única, mas sim para se referir a um copolímero com variações de subunidades de N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina, com propriedade comum de solubilidade em ácidos orgânicos diluídos, tais como o ácido acético. Atualmente, a maioria dos autores define a quitosana utilizada em sua pesquisa em termos de, pelo menos, grau de desacetilação e massa molecular (ROBERTS, 2008).

Embora a descoberta da quitina por Braconnot tenha sido cerca de 30 anos antes da descoberta da celulose por Payen e a quantidade de quitina produzida anualmente por biossíntese não seja muito menor do que a da celulose, a aplicação industrial da celulose é muito mais avançada em relação à da quitina e da quitosana. Uma explicação para isso é que a celulose apresenta uma maior facilidade industrial de obtenção e a molécula de quitosana é mais complexa. A completa compreensão da molécula de quitosana está apenas começando e com ela será possível atingir o ápice da sua exploração comercial (ROBERTS, 2008).

Uma avaliação crítica de potenciais fontes de quitina e quitosana concluiu que camarão e caranguejo são as principais fontes de quitina e quitosana e devem assim permanecer em um futuro imediato (ALLAN; KONG, 1978). Mais de trinta anos depois, o camarão de água doce e salgada continua predominando como fonte de quitosana. Isso se deve a dois fatores principais: (1) crescimento da aquicultura, o que vem permitindo uma fonte contínua de fornecimento de resíduos e (2) grande aumento

no consumo de camarão, que em 1977 ainda era considerado item alimentar de luxo (ROBERTS, 2008).

Uma quantidade considerável de pesquisas sobre o uso de resíduos da fermentação de micélios como fonte de quitina e quitosana de fungos vem sendo realizada, argumentando-se que os fungos poderiam ser uma fonte de quitosana estável, não sazonal, com características mais consistentes do que a quitosana obtida a partir de crustáceos.

No entanto, até hoje essa fonte de quitosana não vem sendo a escolha de empresas que produzem a quitosana. Atualmente, existe apenas uma empresa produtora de quitosana que utiliza quitosana de fungo, uma empresa belga chamada Kitozyme. Porém, a sua matéria-prima não é de resíduos do processo de fermentação, a que normalmente os trabalhos e pesquisas se referem quando falam de quitosana de fungo, mas sim de cogumelos comestíveis convencionais cultivados na França sob contrato e enviados à Bélgica para processamento. Portanto, quitosana obtida a partir de resíduos de fermentação de micélios ainda continua sendo uma fonte de quitosana com potencial inexplorado (ROBERTS, 2008).

Grandes empresas químicas e farmacêuticas possuem patentes de produção e uso dos polímeros de quitina e quitosana, e desde 1977, quando foi publicado *Chitin Handbooks*, a exploração destes polímeros com pesquisa por novas aplicações aumentou notavelmente. Entretanto, a quitina e quitosana ainda não possuem uma posição estabelecida no mercado de produtos de alto valor técnico agregado. O preço relativamente elevado de quitosana de boa qualidade, a falta de regulamentação e ainda, problemas com a disponibilidade da matéria-prima (que depende não apenas da dinâmica dos organismos marinhos, mas também de fatores políticos e ambientais), dificultam a inserção da quitosana nesse mercado especializado.

Uma vez que a quitosana foi registrada para utilização em aditivo alimentar, como excipiente farmacêutico e em algumas aplicações médicas e agrícolas, é esperado um grande aumento na demanda pelo polímero nos próximos anos (PETER, 2005).

1.14.2. Empresas que produzem quitosana

Empresas que produzem quitina, quitosana e/ou produtos relacionados estão listadas na Tabela 5 (PETER, 2005). Como nem todos os produtores e empresas estão listados na internet, esta lista pode estar incompleta.

Tabela 5 - Empresas que comercializam quitina, quitosana ou produtos relacionados (PETER, 2005).

Empresa	Produto
BioPrawn AS Tronso, Noruega	Quitosana para uso farmacêutico e cosmético
Henkel KGaA Dusseldorf, Alemanha	Quitosana para uso farmacêutico e cosmético
Chito-Bios Ancona, Itália	N-carboxiisobutil quitosana
ChitoGenics Halifax, Canadá	Quitina, quitosa e carboximetil-quitosana
Genis hf Islândia	Quitosana e oligossacarídeos
Heppe GmbH Halle-Queis, Alemanha	Quitosana
Katakura Chikkarin Co., Ltda. Tóquio, Japão	Quitina e quitosana
Kate International	Quitina e quitosana
Kitto Life Co. Seul, Coreia	Quitosana, oligossacarídeos e glicosamina
Korea Co. Ltd. Youngdeok Co. Ltd. Coreia	Fibras de quitina e quitosana para uso médico, têxtil Quitosana e derivados
Micromod Alemanha	Quitosana, nanocápsulas
Primex Ingredients Noruega	Quitosana para alimentos e cosméticos
Pronova Noruega	Quitosana
Seafresh Chitosan Tailândia	Quitosana
SONAT Rússia	Quitosana para a indústria alimentícia

1.15. Blatódeos

A Organização das Nações Unidas para alimentação e agricultura (FAO), agência da Organização das Nações Unidas (ONU) de combate à fome, propõe, a partir de conhecimentos que 2 bilhões da população consomem insetos, o incentivo à inclusão de insetos na dieta como fonte de proteína e outros nutrientes. Os insetos são considerados ecológicos, pois utilizam muito menos água e liberam menos gases do efeito estufa em sua produção quando comparados à criação de gados. Além disso, os insetos apresentam alto índice de conversão, sendo necessários 2 kg de ração para produzir 1 kg de inseto (enquanto o gado requer 11 kg de alimento e uma tonelada de água, em média, para produzir 1 kg de carne) e reprodução (Anexo A – Reportagem da Folha de São Paulo de 13 de maio de 2013).

Os blatódeos são comumente conhecidos como baratas e constituem aproximadamente 4000 espécies viventes (VIANNA; BERNE; RIBEIRO, 2001). *Phoetalia pallida* (Brunner, 1865) é uma espécie de blatódeo de rápida reprodução. A barata adulta fêmea mede cerca de 2,5 cm, e 2,0 cm o macho. Essa espécie prospera em uma temperatura de 20 °C, sendo 30 °C a temperatura ótima para rápido crescimento e reprodução.

A quitina é o principal componente da cutícula, traquéia e membrana peritrófica em insetos (NEMTSEV et al., 2004). A cutícula de insetos é formada por quatro camadas: epicutícula, exocutícula, endocutícula e a na parte mais interna, a epiderme (Figura 7). As principais funções da quitina presente nas cutículas de insetos são (MOUSSIAN et al., 2005):

- ✓ Unir a cutícula às células da epiderme;
- ✓ Integrar e apoiar a montagem da epicutícula;
- ✓ Estabilizar a organização em camadas da cutícula.

Figura 7- Representação gráfica da matriz orgânica de insetos (fora de escala)
(NWE, 2010)

A estrutura da cutícula de crustáceos é similar à cutícula dos insetos, porém a composição é diferente. As camadas da matriz orgânica são compostas por fibras de quitina-proteína que se encontram associadas a grande quantidade de carbonato de cálcio (Figura 8). A ausência de carbonato cálcio no exoesqueleto de insetos facilita a obtenção de quitina e quitosana a partir destes, quando comparado com o processo de obtenção de quitina e quitosana a partir de crustáceos (ver item 1.14).

Figura 8 - Representação gráfica da matriz orgânica de crustáceos (fora de escala)
(NWE, 2010)

1.16. Processo de obtenção de quitosana a partir de crustáceos e a partir de blatódeos

A quitina e quitosana obtidas através da produção industrial destes polímeros a partir de resíduos de crustáceos apresentam características físico-químicas inconsistentes, devido a sazonalidade e variação da matéria-prima e também por dificuldades encontradas no processo (STEVENS, 2008). Como alternativa a esses problemas, a produção de quitosana a partir de fontes alternativas, como insetos, vem sendo considerada.

A síntese da quitina a partir de crustáceos se dá da seguinte maneira: as cascas de crustáceos (por exemplo, camarão), são pulverizadas para aumento da superfície de contato, facilitando as etapas seguintes; em seguida é feita a desproteinização com hidróxido de sódio 5% (tal procedimento também é realizado pra se evitar o odor que instantaneamente ocorre com as cascas de camarão); depois é realizada a desmineralização com HCl 30%; e então, realiza-se a despigmentação pela extração com etanol ou acetona, ou branqueamento com uso de KMnO_4 , NaCl, NaOCl, SO_2 , NaHSO_3 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ou H_2O_2 . A quitina sofre então o processo de desacetilação na presença de hidróxido de sódio concentrado 50% e em temperatura elevada entre 110-150 °C, na maioria das vezes (ANTONINO, 2007).

A cutícula dos insetos é composta por quitina, melanina e proteínas; as proteínas e a melanina são solúveis em meio alcalino (NEMTSEV et al., 2004). No processo de obtenção de quitosana a partir de blatódeos, a solução de hidróxido de sódio 50% a 120 °C dissolve os componentes da cutícula, as proteínas e lipídeos, exceto a quitina e esta é convertida em quitosana. Não é necessária a etapa de desmineralização, nem de despigmentação, e a desproteinização e a conversão de quitina em quitosana acontece em um mesmo processo.

Na figura 9 estão representados de maneira comparativa os processos de obtenção de quitosana a partir de crustáceos e blatódeos.

Figura 9 - Representação gráfica dos processos de obtenção de quitosana a partir de cascas de crustáceos e de blatódeos

Observa-se que a obtenção de quitosana a partir de blatódeos apresenta vantagens em relação à produção a partir de crustáceos: reduzido número de etapas do processo, assim como o número de reagentes; e dispensa o tratamento com HCl que é um poluente, pois as baratas não apresentam carbonato de cálcio em sua estrutura. E ainda, a quantidade de efluentes gerados é bem menor, pois na produção a partir de blatódeos só há uma etapa de lavagem, enquanto na quitosana de crustáceos são quatro.

2. JUSTIFICATIVA

A quitosana é um biopolímero funcional com grande potencial de desenvolvimento, podendo gerar diferentes tipos de materiais com variadas funções. Conforme modificações na sua estrutura, a quitosana tem encontrado aplicações nas mais diversas áreas, possuindo um grande leque de aplicações longe de ser esgotado (MORIMOTO, 2001).

O uso da quitosana e a pesquisa por novas aplicações vêm crescendo muito nos últimos anos. A importância da quitina e quitosana ficam evidentes na Tabela 6.

Tabela 6 - Números de publicações científicas relacionadas à quitina e quitosana. Fonte: Scopus. Publicações a partir do ano 2000 (ARANAZ et al., 2009)

Pesquisa	Revisões	Artigos	Patentes
Quitina	182	2.741	9.064
Quitosana	401	5.959	20.041
Quitina/quitosana	119	2.040	11.804

O laboratório de Síntese Orgânica Aplicada da FCF/USP vem durante alguns anos (desde 2002) realizando pesquisas e publicações na área de Biomateriais, com ênfase em biopolímeros e quitosana. Desta maneira, ele tem acompanhado esse crescimento nas pesquisas sobre a quitosana e tem, também, contribuído com estudos sobre o assunto.

Atualmente, a produção comercial de quitosana é feita a partir de resíduos da indústria pesqueira (NWE; FURUIKE; TAMURA, 2011). Estudos relacionados à obtenção de quitosana a partir de outras fontes (que não crustáceos) não acompanham o crescimento de pesquisas na área de novas aplicações da quitosana.

A quitina e quitosana obtidas a partir de resíduos de crustáceos, em produção de escala industrial, apresentam-se com características físico-químicas inconsistentes. Essa variação nas características físico-químicas de diferentes amostras de quitina e quitosana podem ser explicadas pela sazonalidade do camarão, pela matéria-prima ser

de fonte variável e pelas variações e dificuldades nas condições no processo de obtenção (NWE; FURUIKE; TAMURA, 2011).

A produção de quitosana a partir de organismos aquáticos é ainda dependente das condições do ambiente, pois este pode afetar o cultivo de camarão, por exemplo (PARENTE et al., 2011). Ou seja, a poluição e contaminação das águas podem influenciar a qualidade do produto final ou ainda impossibilitar a sua produção. Temos como exemplo, além dos já citados na introdução, o Japão, um dos maiores produtores, pesquisadores e consumidores de quitosana, onde ocorreu (na cidade de Fukushima) um desastre ambiental com o vazamento nuclear (para as águas marítimas), ocasionando a contaminação da água, tornando-a radioativa (Anexo B). Além da qualidade da água, o cultivo de camarão pode ser afetado por contaminação viral ou bacteriana do camarão.

Na conferência internacional sobre quitina e quitosana realizada em 2006 em Montpellier, a International Conference on Chitin/Chitosan (ICCC), foi dito que os produtores de quitosana estão tendo alguma dificuldade em obter toda a matéria-prima de que necessitam. Produtores de rações animais, em especial, incluindo os que cultivam camarão, estão disputando com os produtores de quitosana pelos resíduos de crustáceos. Esta concorrência foi prevista em um trabalho apresentado na primeira conferência internacional (ICCC), realizada em 1978 (PERCEVAL, 1978) e pode se tornar um grande empecilho ao aumento da produção de quitosana se no futuro aplicações e usos de quitosana aumentarem em larga escala.

Diante do exposto acima, temos como uma fonte alternativa para a produção de quitosana, os blatódeos. Eles são organismos terrestres que apresentam uma reprodução consideravelmente rápida, se adaptam aos mais variados ambientes e têm custo de criação baixíssimo devido à sua fácil adaptação em relação ao ambiente e alimentação. Além disso, os blatódeos não possuem sazonalidade e ainda, realizam ecdises, podendo-se utilizar as exúvias para a produção de quitosana. Outra vantagem da produção de quitosana a partir de blatódeos é que no processo de obtenção não é necessária a realização do procedimento de desmineralização.

Por se tratar de um inseto que, culturalmente, provoca repulsa nas pessoas, pode haver um possível estigma inicial da quitosana produzida a partir de blatódeos no nosso país. Mas em países como a Índia e a China, a manipulação e até mesmo o consumo de insetos são comuns. Por exemplo, baratas foram utilizadas na medicina tradicional

chinesa para tratamento de tuberculose, cirrose, câncer de mama e de fígado e também como máscara de beleza facial pelo seu suposto efeito anti-idade (WANULE et al., 2014). Wanule e Sirsikir (2009) relatou a atividade antimicrobiana da barata *Periplaneta americana* contra importantes bactérias patogênicas para humanos.

A quitosana obtida de blatódeos pode ser utilizada, inicialmente, por exemplo, no tratamento de efluentes.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho é realizar a prospecção quantitativa e qualitativa de uma nova fonte renovável de quitosana.

Objetivos específicos

- ✓ Desenvolvimento de processo de obtenção de quitosana a partir de blatódeos (*Phoetalia pallida*).
- ✓ Determinação do rendimento do processo de obtenção de quitosana a partir de baratas.
- ✓ Caracterização das amostras de quitosana obtidas a partir de blatódeos mediante técnicas de espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), comportamento térmico (TG/DTG e DSC), difração de raios-x, viscosimetria e teste de solubilidade visando identificar as características e propriedades físico-químicas das mesmas.
- ✓ Comparação do processo de obtenção de quitosana a partir de baratas e a partir de camarão.
- ✓ Comparação das amostras de quitosana obtidas a partir de blatódeos com a quitosana obtida a partir da casca de camarão.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os blatódeos, *Phoetalia pallida* (Brunner, 1865), assim como as exúvias dos mesmos, utilizados na pesquisa são provenientes da criação do Laboratório de Artrópodes do Instituto Butantan, espécie livre de patógenos (SPF) e que são usados para alimentação de outros insetos, destinados à produção de antígenos e estudos de venenos.

A quitosana utilizada como padrão é da marca SIGMA-ALDRICH (GD= 75-85%; baixa massa molecular – viscosidade em Brookfield 20.000 cps)

Todos os reagentes utilizados nesse trabalho foram de grau técnico (hidróxido de sódio – Synth e ácido acético glacial – Synth). Para dosagens analíticas foram utilizados reagentes de grau analítico. A água utilizada no preparo de soluções e procedimentos, como lavagem e diálise, foi destilada.

As vidrarias, vasos, agitadores, medidores de pH, balanças analíticas, provetas são as disponíveis no Laboratório de Síntese Orgânica Aplicada (FBT, FCF, Universidade de São Paulo, Brasil).

Equipamentos:

Figura 10- Difratorômetro Rigaku Miniflex (a) e FTIR Bomem MB100 (b)

Figura 11- Calorímetro Exploratório Diferencial SHIMADZU, modelo DSC-60 (c) e Termograma SHIMADZU modelo DTG-60H (d)

Figura 12- Balança analítica METTLER TOLEDO modelo AG285

4.1. Processo para obtenção de quitosana a partir de blatódeos

4.1.1. Criação de blatódeos

Foram coletadas 2 baratas fêmeas ovadas (baratas grávidas) da espécie *Phoetalia Pallida* da criação de blatódeos do Laboratório de Artrópodes do Instituto Butantan. Consegue-se identificar facilmente as baratas fêmeas ovadas, pois estas apresentam a ooteca presa em seu abdômen. Foi seguido o protocolo de criação utilizado pelo Instituto Butantã.

As baratas foram pesadas (peso médio de 1,22 gramas) e colocadas individualmente em recipientes. Os recipientes (caixas plásticas) foram adaptados seguindo o padrão de criação do Instituto Butantã, em suas devidas proporções. Os recipientes foram identificados como: caixa 1 e caixa 2. Cada caixa possui 27,5 cm de comprimento, 13,8 cm de largura e 13 cm de altura.

Dentro dos recipientes foram colocadas (Figura 13):

- (1) Caixas de ovos (seguindo o modelo do Instituto Butantã) para fornecer um ambiente escuro para os blatódeos;
- (2) Algodão molhado para fornecer umidade;
- (3) Placa com mistura de rações.

Figura 13. Estrutura dos recipientes utilizados na criação das baratas

A dieta dos blatódeos foi feita a partir de um mix de rações. As rações foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Artrópodes do Instituto Butantã. Foram colocados, inicialmente, em placas 6 gramas de ração, sendo (Figura 14):

- (1) Ração para gato sabor peixe (Marca Gatto): 1 grama;
- (2) Ração para cobaio: 1 grama;
- (3) Ração para galinha postura e crescimento: 1 grama;
- (4) Ração para pássaro preto: 1 grama;
- (5) Mistura de aveia, flocos de milho, gérmen de trigo, farinha de banana e açúcar mascavo: 2 gramas.

Figura 14. Rações para a dieta das baratas

As caixas foram fechadas com uma tela para impedir a saída dos blatódeos de dentro dos recipientes e também a entrada de outros insetos (Figura 15). Outra medida de segurança realizada para impedir a saída das baratas foi a aplicação de vaselina na borda superior dos recipientes.

Figura 15. As caixas 1 e 2 fechadas com a tela

Os recipientes foram colocados em uma sala escura em temperatura ambiente. A limpeza dos recipientes foi realizada semanalmente, assim como a troca do algodão. Uma vez por mês foi feita a reaplicação de vaselina.

4.1.2. Processo de desacetilação

Os blatódeos, *Phoetalia pallida*, foram submetidos a um tratamento com solução de hidróxido de sódio 50% (p/v) em temperatura elevada (110-120 °C) por diferentes tempos: 1 hora, 2 horas, 3 horas, 6 horas, 10 horas e 20 horas. Neste procedimento, as partes lipídicas e proteicas são retiradas e são removidos os grupos acetil presentes na quitina, convertendo-a em quitosana.

4.1.3. Processo de purificação

No processo de purificação da quitosana, a solução foi filtrada e o resíduo sólido (quitosana) foi então lavado com água destilada até pH neutro (pH=7). Após a lavagem, a quitosana foi solubilizada em solução de ácido acético 1% (v/v) sob agitação a temperatura ambiente por 24 horas. Então, esta solução foi filtrada para se reter eventuais resíduos insolúveis. Para separação da quitosana, hidróxido de sódio foi adicionado à solução até o pH 7 ser alcançado, ocorrendo a precipitação da quitosana. O

sobrenadante foi descartado e em seguida foi realizada diálise da amostra e finalmente, a quitosana foi seca por liofilização.

4.1.4. Diálise

A solução de quitosana foi submetida à diálise em membrana semipermeável (membrana de celulose Viscofan 22 EU – 20 USA) para dessalinização da solução. O processo de diálise foi realizado por 72 horas, utilizando-se água destilada com troca da mesma a cada 12 horas. Durante o processo de diálise, foi verificado antes de cada troca de água o pH do meio e o pH na membrana; notou-se que em 72 horas de diálise o pH do meio e membrana estabilizava em 7.

4.1.5. Método de secagem por liofilização

Depois de dialisadas as amostras de quitosana foram submetidas ao processo de secagem por liofilização.

O método consiste na utilização de baixas temperaturas sob vácuo, para transformação da água do estado sólido diretamente para o estado gasoso por sublimação. A secagem das amostras sintetizadas foi realizada no Laboratório de Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. O equipamento utilizado foi o liofilizador LIOTOP modelo L 101.

O processo de liofilização é composto por dois estágios: primeiramente o material é congelado e depois o material é levado para o processo de secagem por sublimação. A quitosana foi previamente congelada em freezer, em uma temperatura de -70 °C. Em seguida, foi posta em liofilizador para secagem a uma temperatura de -47 °C e pressão de operação, aproximada, de 300umHg.

4.1.6. Determinação do rendimento do processo de obtenção de quitosana a partir de baratas

O rendimento do processo de obtenção de quitosana a partir de blatódeos foi calculado levando-se em conta o peso dos blatódeos e a quantidade de quitosana obtida. Foi realizado em triplicata (três béqueres – A, B e C - cada um contendo 10 gramas do

blatódeo *Phoetalia pallida* previamente congelada por 24 horas em freezer a -80 °C) e foi obtida uma média.

Determinou-se o rendimento do processo de obtenção de quitosana para cada tempo de reação na etapa de desacetilação (1 hora, 2 horas, 3 horas, 6 horas, 10 horas e 20 horas).

4.2. Caracterização das amostras de quitosana obtidas a partir de blatódeos

As quitosanas obtidas foram caracterizadas do ponto de vista físico-químico através da análise Espectroscópica na região do Infravermelho usando os modos de transmitância e absorbância (FTIR – *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), determinação do grau de desacetilação, Difração de Raios-x (DRX), testes de solubilidade, análises térmicas (DSC e TG/DTG) e determinação da Massa Molar Viscosimétrica Média (Mv).

4.3. Espectroscopia de Infravermelho (IV)

A avaliação dos grupos químicos e estrutura da quitosana foi realizada em Espectrômetro de Infravermelho com transformada de Fourier, FTIR, da marca Bomem, modelo MD 100, do Laboratório da Central Analítica, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. As amostras foram analisadas em KBr, e os espectros obtidos foram com resolução de 4 cm⁻¹, região espectral de 4000 a 400 cm⁻¹ e 40 varreduras.

O cálculo do Grau de Desacetilação (GD) foi realizado através da equação proposta por Domszy e Roberts:

$$GD=100-[(A_{1655}/A_{3450}) \times 100/1.33] \quad (\text{Equação 1})$$

Sendo A₁₆₅₅ e A₃₄₅₀ os valores das absorbâncias obtidas nos comprimentos de onda de 1655 cm⁻¹ e 3450 cm⁻¹, respectivamente, e 1,33 o fator correspondente à constante que representa a razão (A₁₆₆₅/A₃₄₅₀) para quitinas completamente acetiladas.

4.4. Difração de raios-x (DRX)

A Difração de Raios-X foi aplicada para determinar a estrutura do material polimérico. Dependendo da origem do polímero e do tratamento realizado em sua obtenção, a estrutura cristalina da quitosana pode sofrer considerável variação (ARANAZ et al., 2009).

As análises de difração de raios-x (DRX) foram realizadas pela Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ/USP). As análises da quitosana em pó foram feitas em equipamento Rigaku Miniflex com tubo de cobre ($\lambda = 1,54\text{\AA}$) no intervalo de $2\theta = 4$ a 90° empregando varredura contínua com velocidade de $0,06^\circ/\text{min}$. A corrente e tensão utilizadas foram de 30kV e 15mA, respectivamente.

A partir das áreas do difratograma foram identificadas a fração cristalina (I_C) e a fração amorfa (I_A) da amostra, e foi calculado o grau de cristalinidade (I_{CR}) a partir da seguinte equação:

$$I_{CR} = I_C - I_A / I_C \times 100 \quad \textbf{Equação 3}$$

4.5. Testes de solubilidade

As amostras de quitosanas obtidas foram testadas quanto à solubilidade em diferentes pHs em temperatura ambiente (25°C). A solubilidade das quitosanas foi determinada em água destilada, pH = 7.0; em solução de ácido acético 3% (v/v), pH = 4.0; e em solução de hidróxido de sódio 4% (v/v), pH = 12.0. Foram preparadas em tubos de ensaio soluções a 0,5% de cada amostra em cada meio. As amostras foram agitadas a cada 10 minutos por um período de 1 hora, seguidas de um repouso de 24 horas.

4.6. Análises Térmicas

O estudo do comportamento térmico da quitosana foi realizado utilizando a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e a Termogravimetria (TG/DTG).

4.6.1. Medidas Termogravimétricas (TG/DTG)

A termogravimetria (TG) é uma técnica na qual a variação (perda ou ganho) de massa de uma substância é detectada utilizando uma termobalança e determinada em função da temperatura e/ou do tempo (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001).

As curvas de Termogravimetria (TG) foram obtidas em um Termograma da SHIMADZU modelo DTG-60H, com razão de aquecimento de 10 °C/min sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (vazão de 30 mL.min⁻¹) com massa aproximadamente de 5 mg em cadinho de platina no intervalo de temperatura de 20-900 °C.

Foi escolhido a razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹ para realizar esse estudo nas amostras de quitosana, pois nesta razão o perfil das curvas se mostrou mais bem definido do que na razão de 20 °C min⁻¹ e possui um menor tempo de análise em relação aos 5 °C min⁻¹ (SANTOS, E. J., et al., 2003).

As curvas de Termogravimetria Derivativa (DTG), correspondente à derivada primeira das curvas TG, foram utilizadas para determinar com maior precisão os intervalos de temperatura correspondentes às percentagens de hidratação, decomposição de material orgânico e resíduo formado.

4.6.2. Medidas de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Quando uma substância sofre uma mudança (física ou química), observa-se uma variação correspondente na entalpia. Na Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) o processo é promovido por uma variação controlada da temperatura, em que o parâmetro medido é a variação de entalpia em função do tempo na amostra em estudo, sendo usada uma amostra inerte como referência (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001).

As curvas de DSC foram obtidas em um Calorímetro Exploratório Diferencial (SHIMADZU, modelo DSC-60), em atmosfera de N₂ com vazão de gás de 50 mL.min⁻¹, razão de aquecimento de 10 °C/min, em intervalo de temperatura entre 20-500 °C, em um cadinho fechado de alumínio.

4.7. Massa molar viscosimétrica média (Mv)

Um método simples e rápido para determinar a massa molar viscosimétrica média dos polímeros é a viscosimetria.

Foi utilizado o viscosímetro de Ubbelohde para determinar a massa molar viscosimétrica média através da medida do tempo de escoamento de soluções e do solvente.

Foram preparadas, para cada amostra de quitosana (Quito 1, 2, 3, 6, 10 e 20), soluções em 7 diferentes concentrações (1 g/L; 1,25 g/L; 1,5 g/L; 1,75 g/L; 2 g/L; 2,25 g/L; e 2,5 g/L), utilizando-se como solvente uma solução de 0,1 Mol/L de ácido acético e 0,2 Mol/L de cloreto de sódio.

Foram calculadas a medida da viscosidade relativa e da viscosidade específica, a partir das seguintes equações:

$$\text{Viscosidade relativa: } \eta_{\text{rel}} = t_{\text{solução}} / t_{\text{solvente}} \quad \text{Equação 4}$$

$$\text{Viscosidade específica: } \eta_{\text{esp}} = \eta_{\text{rel}} - 1 \quad \text{Equação 5}$$

$$\text{Viscosidade específica reduzida: } \eta_{\text{esp red}} = \eta_{\text{esp}} / c \quad \text{Equação 6}$$

$$\text{Viscosidade intrínseca: } [\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} (\eta_{\text{esp red}}) \quad \text{Equação 7}$$

Em que η_{esp} é a viscosidade específica para cada concentração de amostra e “c” é a concentração da solução de quitosana. A viscosidade intrínseca $[\eta]$ é o valor referente à extrapolação da reta das medidas de viscosidade quando se considera “c” igual a zero.

A equação mais utilizada que relaciona viscosidade e massa molecular é a equação de Mark-Houwink-Sakurada:

$$[\eta] = K \cdot Mv^a \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: $[\eta]$ é a viscosidade intrínseca;

Mv é a massa molar viscosimétrica média;

K e “a” são constantes viscosimétricas.

As constantes para o solvente utilizado (solução de 0,1 Mol/L de ácido acético e 0,2 Mol/L de cloreto de sódio) são $K = 1,81 \times 10^{-3}$ e “a” = 0,93.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Criação de blatódeos

Foi observado, que, após 25 dias da coleta das baratas fêmeas ovadas no Instituto Butantã, que os filhotes das baratas das caixas 1 e 2 haviam nascido.

Caixa 1:

Na caixa 1 observaram-se 9 filhotes vivos e 3 mortos.

Foi realizado o acompanhamento do nascimento e crescimento das baratas com verificação do peso (Tabela 7).

Tabela 7 - Peso das baratas nos meses de dezembro, janeiro, fevereiro, março, abril, maio, junho, julho, agosto, setembro e outubro

Mês	Descrição	Peso (g)
Dezembro	Fêmea ovada	1,22
Janeiro	Barata + 9 filhotes	1,52
Fevereiro	Barata + 9 filhotes	2,08
Março	Barata + 9 filhotes	2,57
Abril	Barata + 9 filhotes	2,66
Maio	Barata + 9 filhotes	2,71
Junho	Barata + 9 filhotes	2,83
Julho	Barata + 9 filhotes	2,83
Agosto	Barata + 9 filhotes	2,84
Setembro	Barata + 9 filhotes	2,989
Outubro	10 baratas adultas	3,365

Caixa 2:

Na caixa 2 foi observado o nascimento de 7 filhotes vivos e 2 mortos.

Foi realizado o acompanhamento do nascimento e crescimento das baratas com verificação do peso (Tabela 8).

Tabela 8 - Peso das baratas nos meses de dezembro, janeiro, fevereiro, março, abril, maio, junho, julho, agosto, setembro e outubro

Mês	Descrição	Peso (g)
Dezembro	Fêmea ovada	1,22
Janeiro	Barata + 7 filhotes	1,46
Fevereiro	Barata + 7 filhotes	2,01
Março	Barata + 7 filhotes	2,38
Abril	Barata + 7 filhotes	2,47
Maio	Barata + 7 filhotes	2,54
Junho	Barata + 7 filhotes	2,55
Julho	Barata + 7 filhotes	2,57
Agosto	Barata + 7 filhotes	2,60
Setembro	Barata + 7 filhotes	2,66
Outubro	8 baratas adultas	2,772

Foi observada uma maior taxa de crescimento (aumento no peso total das baratas) nos meses iniciais do ano (de janeiro a maio), seguidos pelos meses de agosto a setembro. Entre os meses de maio e agosto o aumento no peso foi quase irrelevante. Isso pode ser justificado pela temperatura, tendo em vista que a temperatura ideal para reprodução e crescimento dos blatódeos é na faixa dos 30 °C. Isso foi observado claramente nesse experimento, onde nos meses quentes o aumento de peso foi notavelmente superior aos meses de inverno.

Para aumentar a velocidade de crescimento das baratas, pode-se climatizar o ambiente de criação ou criar as baratas em cidades de clima quente.

5.2. Obtenção de quitosana a partir de blatódeos

Foram realizados ensaios exploratórios para obtenção de quitosana a partir de blatódeos. A espécie de barata utilizada foi *Phoetalia pallida* do Laboratório de Artrópodes do Instituto Butantan que participa conosco desse projeto, sendo estas livres de patógenos, cultivadas em biotérios.

Figura 16. Blatódeo *Phoetalia pallida*

Os blatódeos foram submetidos a tratamento com solução de hidróxido de sódio 50% (p/v) em temperatura de 120 °C por sete tempos diferentes (1, 2, 3, 6, 10 e 20 horas) (Tabela 9).

Tabela 9 - Legendas das amostras obtidas em função ao tempo de aquecimento

Legenda	Tempo de aquecimento (h)
Quito 1	1 hora
Quito 2	2 horas
Quito 3	3 horas
Quito 6	6 horas
Quito 10	10 horas
Quito 20	20 horas
Quito SA*	-----

*Amostra de quitosana de camarão SIGMA-ALDRICH utilizada com padrão

A solução foi então filtrada, o resíduo sólido que é a quitosana foi lavado para retirar o excesso de hidróxido de sódio, em seguida foi dissolvido em uma solução de ácido acético 1% (v/v) e depois filtrada novamente para retirada de eventuais resíduos. Em seguida, hidróxido de sódio foi adicionado até a solução atingir pH 7, ocorrendo a precipitação da quitosana (Figura 17).

Figura 17. Quitosana de blatódeos precipitada em solução de pH 7

Na etapa seguinte, a solução de quitosana foi submetida à diálise em membrana semipermeável por 72 horas para dessalinização da solução. Finalmente, a quitosana foi seca por liofilização. O processo de liofilização durou 3 dias, em que 1 dia foi para o congelamento da amostra e outros dois dias para sua completa secagem no equipamento liofilizador.

Na etapa de filtração vários elementos filtrantes foram testados (papel de filtro tipo xarope, malha sintética mista e malha 100% poliéster). O papel de filtro tipo xarope e o filtro de malha sintética (70% viscose e 30% poliéster) não apresentaram um escoamento adequado, ocorrendo o rompimento da malha. A trama 100% poliéster foi a escolhida para realizar os processos de filtração, pois foi resistente e apresentou um escoamento apropriado.

O processo de obtenção de quitosana a partir de blatódeos se mostrou mais vantajoso do que o processo de obtenção de quitosana de camarão:

- Reduzido número de etapas;
- Reduzido número de reagentes;
- Dispensa o tratamento com ácido clorídrico (poluente);
- Menor quantidade de efluentes gerados (possui apenas uma etapa de lavagem. enquanto na quitosana de camarão são quatro).

5.3. Teste de glutaraldeído com solução de quitosana de blatódeos

O primeiro teste realizado para se comprovar a obtenção de quitosana a partir de blatódeos foi o teste glutaraldeído. Foram adicionadas duas gotas de solução de glutaraldeído a 25% (v/v) em uma solução de quitosana de blatódeos em ácido acético

1% (v/v). Ocorreu a formação de um material extremamente viscoso e de coloração amarela, confirmando a presença de quitosana.

Quando ocorre a reação da quitosana com o glutaraldeído o meio reacional transforma-se rapidamente em gel. A quitosana faz reações de *cross-linking* com o glutaraldeído. Ela apresenta em sua estrutura química grupos NH_2 que são capazes de reagir em meio ácido com os grupos $\text{C}=\text{O}$ do glutaraldeído, formando Base de Schiff correspondente, com conseqüente reticulação das cadeias poliméricas, produzindo uma rede polimérica tridimensional. As Bases de Schiff resultantes apresentam ligações químicas $\text{C}=\text{N}$; estas são responsáveis pela coloração amarela do material (Figura 18).

Figura 18 - Solução de quitosana e glutaraldeído (a) e estrutura química da quitosana reticulada com glutaraldeído (b)

As amostras obtidas (Quito 1, Quito 2, Quito 3, Quito 6, Quito 10 e Quito 20) foram caracterizadas e comparadas a uma amostra de quitosana da marca Sigma-Aldrich obtida a partir de crustáceos. Esta quitosana foi utilizada como amostra padrão e será chamada no texto de Quito SA (ver Tabela 8 acima).

5.4. Espectroscopia Infravermelho (IV)

Por ter muitos picos de absorção, o espectro de infravermelho pode ser considerado a impressão digital da molécula: é praticamente inexistente a possibilidade de dois compostos diferentes apresentarem o mesmo espectro (SILVERSTEIN et al., 1994).

As Figuras 19, 20, 21, 22, 23, 24 e 25 exibem os espectros das amostras de quitosana Quito SA, 1, 2, 3, 6, 10 e 20 respectivamente, obtidos através da espectroscopia IV na região espectral dos 800 cm^{-1} até os 1600 cm^{-1} . Os espectros das

amostras das quitosanas obtidas a partir de blatódeos foram comparados com o espectro da quitosana padrão (Quito SA).

Figura 19- Espectro infravermelho da amostra de quitosana padrão Quito SA

Figura 20 - Espectro infravermelho da amostra Quito 1

Figura 21 - Espectro infravermelho da amostra Quito 2

Figura 22 - Espectro infravermelho da amostra Quito 3

Figura 23 - Espectro infravermelho da amostra Quito 6

Figura 24 - Espectro infravermelho da amostra Quito 10

Figura 25 - Espectro infravermelho da amostra Quito 20

Em relação à espectroscopia IV, a quitosana apresenta picos relevantes aproximadamente em 1656 cm^{-1} (C=O) da amida I, 1598 cm^{-1} (N-H) da amida II, 1422 cm^{-1} (O-H no plano) do álcool primário, e 1384 cm^{-1} (C-H) do grupo metil no N-acetil (OLIVEIRA et al., 2011; SILVERSTEIN, 2007). Os picos observados na região dos $850\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ devem-se aos estiramentos simétricos da ligação C-O-C. Foi demonstrada deformação angular em 1031 cm^{-1} δ (C-O-C), deformação em 1381 cm^{-1} δ (C=O-NH) e grupo CH_2 , e em 1422 cm^{-1} deformação simétrica do CH_3 . Estiramentos antissimétricos da ligação C-O-C foram identificados na região dos 1150 cm^{-1} . Em 1270 cm^{-1} aparece no espectro o estiramento C-OH. Na região de $3570\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ e 3450 cm^{-1} , estiramentos de O-H e NH (ZHANG, 2003).

Com os valores obtidos no espectro infravermelho foi possível calcular a percentagem de desacetilação de cada amostra (conforme descrito na introdução) e os resultados estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Grau de desacetilação (%GD) das amostras de quitosana

Amostra	Aquecimento	A_{1655}	A_{3450}	%GD
Quito SA	Padrão	0,52	0,654	41%
Quito 1	1 hora	2,07	2,94	45%
Quito 2	2 horas	0,636	0,978	51%

Amostra	Aquecimento	A₁₆₅₅	A₃₄₅₀	%GD
Quito 3	3 horas	0,06	0,102	56%
Quito 6	6 horas	1,0315	2,28	66%
Quito 10	10 horas	0,422	0,99	68%
Quito 20	20 horas	0,386	0,955	70%

A₁₆₅₅= valor de absorbância em 1655; A₃₄₅₀= valor de absorbância em 3450; %GD= percentagem do grau de desacetilação

A fim de se determinar o grau de desacetilação da quitosana, muitos métodos analíticos têm sido propostos, como titulação, ninhidrina, infravermelho (MELLO et al., 2006). O método mais utilizado em trabalhos publicados é espectroscopia de infravermelho. Diversos valores de GD podem ser obtidos, dependendo da metodologia de obtenção e da origem do polímero.

O valor obtido para o grau de desacetilação da amostra de quitosana padrão da SIGMA-ALDRICH pela técnica de espectroscopia de infravermelho (GD= 41%) não está de acordo com o valor de %GD descrito no rótulo da embalagem do produto (GD= 75- 85%).

Foi observado que quanto maior o tempo de aquecimento, maior a percentagem do grau de desacetilação: a amostra Quito 1 (com uma hora de aquecimento) apresentou %GD= 45%, enquanto a amostra Quito 20, %GD= 70%. Porém, o grau de desacetilação não aumentou de maneira diretamente proporcional ao aumento do tempo de aquecimento, como por exemplo: a amostra de Quito 10 foi aquecida durante 10 horas, já a amostra 20 pelo dobro de tempo (20 horas), mas o aumento na %GD foi apenas de 2 pontos percentuais, de 68% para 70%. A amostra com três horas de aquecimento (Quito 3) apresentou %GD de 56% e a amostra com o dobro de aquecimento (Quito 6), 66%, um aumento de 10 pontos percentuais no grau de desacetilação. A falta de proporcionalidade entre o aumento do grau de desacetilação e aumento no tempo de aquecimento pode ser explicado pela diminuição da abundância relativa dos grupos N-acetil: quanto mais desacetilada a amostra, o que resta para desacetilar é cada vez menor.

O grau de desacetilação da quitosana afeta suas propriedades físicas e químicas, como solubilidade, reatividade e biodegradabilidade, e consequentemente suas aplicações (ACHARYULU et al., 2013; WANULE et al., 2014).

Para se obter uma quitosana com grau de desacetilação mais elevado, pode-se aumentar o tempo de reação de aquecimento, ou pode-se realizar um pré-tratamento em NaOH em temperatura ambiente por 24 horas antes da reação de aquecimento, como descrito em Al Sagheer et al. (2009) e Abdou et al. (2008). Outra maneira, é realizar uma moagem dos blatódeos antes da etapa de desproteínação/desacetilação, aumentando assim a superfície de contato desses para a reação com o hidróxido de sódio, facilitando o processo.

5.5. Difração de raios-x

O emprego da difração de raios-x permite claramente distinguir a quitina da quitosana. O difratograma da quitina apresenta picos mais resolvidos e em maior quantidade quando comparado ao difratograma da quitosana, o que é atribuído à existência de uma maior quantidade de domínios cristalinos na quitina (ZHANG et al., 2005).

A Figura 26 mostra o difratograma obtido das amostras de quitosana sintetizadas a partir de blatódeos e da quitosana padrão (Quito 1, Quito 2, Quito 3, Quito 6, Quito 10, Quito 20, Quito SA). São observados três picos característicos: em 10°, em 19,8° um de alta intensidade e um de menor intensidade em 37,8°, o que caracteriza a fase cristalina do material. No entanto, existe uma ampla faixa abaixo dos picos que caracteriza a fase amorfa da matéria. Os resultados obtidos para a quitosana de barata estão de acordo com o descrito na literatura (OKUYAMA, K. et al., 2000; OGAWA et al., 2004; COSTA JR.; MANSUR, 2008) para quitosana obtida de crustáceos. Esses picos representam impressões digitais típicos de quitosana semicristalina (BANGYEKAN et al., 2006).

Figura 26 - Difratoograma das amostras Quito 1, Quito 2, Quito 3, Quito 6, Quito 10, Quito 20 e Quito SA

Na quitosana ocorrem interações inter e intramoleculares do tipo ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas, amino e carboxilas; assim, esta apresenta certa organização e por isso uma estrutura semicristalina. Foi proposto que a quitosana possui uma célula unitária com $a=0,895\text{nm}$, $b=1,697\text{nm}$ e $c=1,034\text{nm}$ com estrutura em ziguezague estabilizada por essas interações intermoleculares. Estes fatores dariam à quitosana uma célula unitária ortorrômbica (OGAWA et al., 2004).

A difração de raios-x é apropriada para a determinação do índice de cristalinidade da quitosana. O índice de cristalinidade (I_{CR}) pode ser determinado pela seguinte equação:

$$I_{CR} = \frac{I_C - I_A}{I_C} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Sendo: I_C e I_A as intensidades dos sinais das regiões cristalinas ($2\theta = 20^\circ$) e amorfas ($2\theta = 12^\circ$), respectivamente (LI et al., 1998).

Os índices de cristalinidade das amostras de quitosana estão descritos na Tabela 11.

Tabela 11 - Índice de cristalinidade das amostras de quitosana de blatódeos e da quitosana padrão

Amostras	Índice de cristalinidade (%)
Quito 1	62%
Quito 2	65%
Quito 3	58%
Quito 6	53%
Quito 10	60%
Quito 20	64%
Quito SA	80%

5.6. Análise Térmica (DSC e DTG)

As análises térmicas observam e avaliam mudanças nas propriedades físicas e químicas de uma amostra de substância submetida a determinadas condições controladas de temperatura. Dentre as técnicas utilizadas para análises térmicas, a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e a Termogravimetria (TG) são os métodos mais utilizados (RODRIGUES; MARCHETTO, 2002).

O estudo do comportamento térmico das amostras de quitosana foi realizado utilizando a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e a Termogravimetria Derivativa (DTG).

5.6.1. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As análises de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) dos polímeros de quitosana foram realizadas com o objetivo de se verificar as transições físicas e/ou químicas ocorridas durante o processo de decomposição.

As Figuras 27, 28, 29 e 30 mostram as curvas de DSC das amostras de quitosana obtidas a partir de blatódeos e da quitosana padrão, sob atmosfera de N₂ na faixa de temperatura entre 20 e 500 °C.

Figura 27 - Curva DSC da amostra de quitosana padrão Quito SA

Figura 28 - Curva DSC da amostra de quitosana Quito 1 e Quito 2

Figura 29 - Curva DSC da amostra de quitosana Quito 3 e Quito 6

Figura 30 - Curva DSC da amostra de quitosana Quito 10 e Quito 20

As curvas de DSC das quitosanas obtidas e da quitosana padrão apresentam dois picos, sendo um endotérmico próximo de 80 °C e um exotérmico próximo a 300 °C (Tabela 12).

Tabela 12 - Valores dos picos endotérmicos e exotérmicos das amostras de quitosana

Picos DSC (°C)		
Amostra	Endotérmico	Exotérmico
Quito 1	80	300
Quito 2	81	300
Quito 3	84	311
Quito 6	72	301
Quito 10	80	301
Quito 20	73	280
Quito SA	83	304

O pico endotérmico é atribuído à evaporação de substâncias voláteis e ao processo de desidratação. Esta área é dependente do processo de secagem da amostra, enquanto o ponto exotérmico é corresponde à decomposição do material, que continua além do limite de temperatura da análise. Os resultados das análises de DSC estão coerentes com o que foi observado por Sreenivasan (SREENIVASAN, 1998).

5.6.2. Termogravimetria

A análise termogravimétrica é um método simples e preciso para estudar o padrão de decomposição e estabilidade térmica de polímeros (ZOHURIAAN; SHOKROLAHI, 2004).

Os resultados dos ensaios de Termogravimetria (TG) estão representados nas Figuras 31, 32, 33 e 34, assim como as suas respectivas curvas da Termogravimetria Derivativa (DTG).

Figura 31 - Gráfico TG/DTG da amostra Quito SA

Figura 32 - Gráfico TG/DTG das amostras Quito 1 e Quito 2

Figura 33 - Gráfico TG/DTG das amostras Quito 3 e Quito 6

Figura 34 - Gráfico TG/DTG das amostras Quito 10 e Quito 20

A análise térmica realizada das amostras de quitosana por TG e DTG relaciona a porcentagem de perda de massa em função da temperatura. As amostras apresentaram primeiramente um processo de desidratação, seguido por dois processos de decomposição da quitosana por volta de 300 °C e 500°C.

De acordo com estudo realizado por Santos (2004), a quitosana sob atmosfera dinâmica de N₂, com vazão de 100 mL.min⁻¹, apresenta processo de desidratação seguido por apenas uma etapa de decomposição do polímero. Porém, no presente estudo, as curvas TG/DTG apresentaram dois processos de decomposição, o que pode ser atribuído à baixa vazão de N₂ utilizado (30 mL.min⁻¹), havendo presença de oxigênio no ambiente, possibilitando a queima do material carbonizado (formado na primeira etapa de decomposição). Em estudo termogravimétrico da quitosana, atmosfera de N₂ com vazão de 10 mL.min⁻¹, realizado por Zohuriaan e Shokrolahi (2004), a quitosana apresentou duplo padrão de decomposição, resultado semelhante ao encontrado nas amostras de quitosana obtidas a partir de baratas.

As curvas TG/DTG, em atmosfera de ar, da quitosana apresentam dois momentos de decomposição, um referente à carbonização e o outro à perda do material inorgânico (SANTOS et. al., 2003; SANTOS, 2004; ANTONINO, 2007).

O primeiro processo de decomposição pode ser conferido à degradação da cadeia polimérica da quitosana, ocasionando o processo de despolimerização e decomposição pelo calor da estrutura sacarídea, sendo então liberadas moléculas menores como amônia, água, metano e dióxido de carbono (ZOHURIAAN; SHOKROLAHI, 2004).

A decomposição da amostra não foi completa mesmo acima de 800 °C, restando ainda massa mensurável ao término do ensaio; porém, os resultados apresentam-se em acordo com os encontrados na literatura (MARTINS, 2009; SANTOS, 2004).

As quitosanas obtidas a partir de blatódeos apresentaram comportamento térmico semelhante à quitosana utilizada como padrão, obtida de crustáceos.

As perdas de massa, percentagem de resíduos e intervalo de temperatura, observados em cada etapa das curvas TG/DTG das amostras de quitosana, estão resumidos na Tabela 13.

Tabela 13 - Resultados de TG/DTG das amostras de quitosana

TG		
Evento Térmico	Intervalo Temperatura (°C)	% Perda de Massa
Q1.nH ₂ O → Q1 + H ₂ O	23-134	13%
Q1 → RC	186-387	50%
Decomposição RC	410-579	17%
RC	>600	20%
Q2.nH ₂ O → Q2 + H ₂ O	26-117	8%
Q2 → RC	190-405	55%
Decomposição RC	438-656	22%
RC	>600	15%
Q3.nH ₂ O → Q3 + H ₂ O	20-118	12%
Q3 → RC	206-360	51%
Decomposição RC	427-548	24%
RC	>600	13%
Q6.nH ₂ O → Q6 + H ₂ O	23-124	12%
Q6 → RC	182-364	44%

TG		
Evento Térmico	Intervalo Temperatura (°C)	% Perda de Massa
Decomposição RC	437	22%
RC	>600	22%
Q10.nH ₂ O → Q10 + H ₂ O	25-115	4%
Q10 → RC		
Decomposição RC	131-397	28%
RC	429-628	20%
	>650	48%
Q20.nH ₂ O → Q20 + H ₂ O	21-116	10%
Q20 → RC		
Decomposição RC	181-360	30%
RC	421-625	33%
	>600	27%
QSA.nH ₂ O → QSA + H ₂ O	20-119	13%
QSA → RC	181-360	49%
Decomposição RC	421-625	37%
RC	>600	1%

Q1= Quito 1; Q2= Quito 2; Q3= Quito 3; Q6= Quito 6; Q10= Quito 10; Q20= Quito 20; QSA= Quito AS;
RC= resíduo carbonizado

As amostras de quitosana apresentaram uma perda antecipada de água, entre 20-125 °C, o que é atribuído à dessorção de umidade, como a ligação de hidrogênio entre água e a estrutura sacarídea (ZOHURIAAN; SHOKROLAHI, 2004).

5.7. Solubilidade das amostras de quitosana obtidas

Estão representados na Tabela 14 os resultados dos testes de solubilidade das amostras de quitosana obtidas a partir de blatódeos, a 25 °C.

Tabela 14 - Solubilidade das amostras de quitosana Quito 1, Quito 2, Quito 3, Quito 6, Quito 10, Quito 20 e Quito SA a 20 °C

Solventes	Quito 1	Quito 2	Quito 3	Quito 6	Quito10	Quito 20	Quito SA
Meio neutro	–	–	–	–	–	–	–
Meio ácido	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Solventes	Quito 1	Quito 2	Quito 3	Quito 6	Quito10	Quito 20	Quito SA
Meio básico	–	–	–	–	–	–	–

(-) insolúvel; (+) pouco solúvel; (++) moderadamente solúvel; (+++) solúvel

Os resultados dos testes de solubilidade se mostraram coerentes ao esperado e descrito na literatura (SHI et al., 2006), sendo a quitosana solúvel em soluções ácidas ($\text{pH} < 5,5$), pois os grupamentos amino livres são protonados e a molécula se torna solúvel em meio ácido, e insolúvel em meio neutro e básico.

A solubilidade da quitosana em pH neutro e básico pode ser melhorada através de modificações químicas, como a introdução de grupos succinil e ftaloil, ou a despolimerização da cadeia polissacarídica (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006). Succinil-quitosana e ftaloil-quitosana são solúveis em meio alcalino ($\text{pH} 12,0$); isto acontece devido à salificação dos grupos carboxilatos, os quais encontram condições favoráveis de solubilização (BEZERRA, A. M., 2011).

5.8. Determinação da Massa molar viscosimétrica média (Mv)

Foi determinado o tempo médio de escoamento do solvente, solução de 0,1 Mol/L de ácido acético e 0,2 Mol/L de cloreto de sódio (Tabela 15), e assim obtidos os valores das viscosidades relativas, intrínsecas e específicas, e em seguida foi determinada a massa molar viscosimétrica média das amostras de quitosana obtidas a partir de baratas, através da equação de Mark-Houwink.

Tabela 15 – Tempo médio de escoamento do solvente puro no capilar

Tempo de escoamento para o solvente (s)			
t1	t2	t3	t médio
30,86	30,86	30,86	30,86

Os resultados de tempo de escoamento das soluções de quitosana nas 7 concentrações (1 g/L; 1,25 g/L; 1,5 g/L; 1,75 g/L; 2 g/L; 2,25 g/L; 2,5 g/L), os valores de viscosidades calculados (Tabelas 15,16, 17, 18 19 e 20) e os gráficos de

determinação da viscosidade intrínseca das amostras (Figuras 32, 33, 34, 35, 36 e 37) estão descritos abaixo:

Amostra Quito 1

Tabela 16 – Tempo de escoamento das soluções de quitosana da amostra Quito 1 em 7 concentrações (1 g/L; 1,25 g/L; 1,5 g/L; 1,75 g/L; 2 g/L; 2,25 g/L; 2,5 g/L) e os valores de viscosidades obtidos

Concentração (g/L)	Tempo médio	Viscosidade relativa	Viscosidade específica (nsp)	nsp/c (L/g)
1,0	32,92	1,067	0,067	0,067
1,25	33,72	1,093	0,093	0,075
1,50	35,02	1,135	0,135	0,09
1,75	38,42	1,245	0,245	0,14
2,0	42,59	1,38	0,138	0,19
2,25	46,83	1,5175	0,38	0,23
2,50	50,14	1,625	0,625	0,25

Com esses dados de viscosidade e nsp/c foi possível construir o gráfico abaixo (Figura 35) e determinar a viscosidade intrínseca, valor necessário para o cálculo da massa molar viscosimétrica média da quitosana.

Figura 35 - Gráfico de determinação da viscosidade intrínseca da amostra Quito 1

O valor obtido da viscosidade intrínseca para a amostra de quitosana de barata Quito 1 foi 0,0909.

Amostra Quito 2

Tabela 17 – Tempo de escoamento das soluções de quitosana da amostra Quito 2 em 7 concentrações (1 g/L; 1,25 g/L; 1,5 g/L; 1,75 g/L; 2 g/L; 2,25 g/L; 2,5 g/L) e os valores de viscosidades obtidos

Concentração (g/L)	Tempo médio	Viscosidade relativa	Viscosidade específica (nsp)	nsp/c (L/g)
1,0	31,47	1,02	0,02	0,02
1,25	32,40	1,05	0,05	0,04
1,50	33,63	1,09	0,09	0,06
1,75	35,72	1,16	0,16	0,09
2,0	38,88	1,26	0,26	0,13
2,25	41,27	1,34	0,34	0,15
2,50	43,97	1,42	0,42	0,17

Figura 36 - Gráfico de determinação da viscosidade intrínseca da amostra Quito 2

O valor obtido da viscosidade intrínseca para a amostra de quitosana de barata Quito 2 foi 0,0907.

Amostra Quito 3

Tabela 18 – Tempo de escoamento das soluções de quitosana da amostra Quito 3 em 7 concentrações (1 g/L; 1,25 g/L; 1,5 g/L; 1,75 g/L; 2 g/L; 2,25 g/L; 2,5 g/L) e os valores de viscosidades obtidos

Concentração (g/L)	Tempo médio	Viscosidade relativa	Viscosidade específica (nsp)	nsp/c (L/g)
1,0	31,50	1,021	0,021	0,021

Concentração (g/L)	Tempo médio	Viscosidade relativa	Viscosidade específica (nsp)	nsp/c (L/g)
1,25	32,29	1,046	0,046	0,037
1,50	33,64	1,090	0,090	0,060
1,75	36,26	1,175	0,175	0,100
2,0	39,50	1,280	0,280	0,140
2,25	41,27	1,337	0,337	0,150
2,50	43,97	1,425	0,425	0,170

Figura 37 - Gráfico de determinação da viscosidade intrínseca da amostra Quito 3

O valor obtido da viscosidade intrínseca para a amostra de quitosana de barata Quito 3 foi 0,0975.

Amostra Quito 6

Tabela 19 – Tempo de escoamento das soluções de quitosana da amostra Quito 6 em 7 concentrações (1 g/L; 1,25 g/L; 1,5 g/L; 1,75 g/L; 2 g/L; 2,25 g/L; 2,5 g/L) e os valores de viscosidades obtidos

Concentração (g/L)	Tempo médio	Viscosidade relativa	Viscosidade específica (nsp)	nsp/c (L/g)
1,0	31,45	1,019	0,019	0,019
1,25	32,02	1,037	0,037	0,03
1,50	32,38	1,049	0,049	0,041
1,75	33,68	1,091	0,091	0,052
2,0	36,66	1,188	0,188	0,094
2,25	39,89	1,129	0,129	0,130
2,50	43,20	1,400	0,400	0,160

Figura 38 - Gráfico de determinação da viscosidade intrínseca da amostra Quito 6

O valor obtido da viscosidade intrínseca para a amostra de quitosana de barata Quito 6 foi 0,0939.

Amostra Quito 10

Tabela 20 – Tempo de escoamento das soluções de quitosana da amostra Quito 10 em 7 concentrações (1 g/L; 1,25 g/L; 1,5 g/L; 1,75 g/L; 2 g/L; 2,25 g/L; 2,5 g/L) e os valores de viscosidades obtidos

Concentração (g/L)	Tempo médio	Viscosidade relativa	Viscosidade específica (nsp)	nsp/c (L/g)
1,0	31,63	1,025	0,025	0,025
1,25	32,48	1,052	0,052	0,042
1,50	33,49	1,085	0,085	0,057
1,75	35,18	1,140	0,140	0,080
2,0	37,65	1,220	0,220	0,110
2,25	41,27	1,337	0,337	0,150
2,50	44,75	1,450	0,450	0,180

Figura 39 - Gráfico de determinação da viscosidade intrínseca da amostra Quito 10

O valor obtido da viscosidade intrínseca para a amostra de quitosana de barata Quito 10 foi 0,0915.

Amostra Quito 20

Tabela 21 – Tempo de escoamento das soluções de quitosana da amostra Quito 20 em 7 concentrações (1 g/L; 1,25 g/L; 1,5 g/L; 1,75 g/L; 2 g/L; 2,25 g/L; 2,5 g/L) e os valores de viscosidades obtidos

Concentração (g/L)	Tempo médio	Viscosidade relativa	Viscosidade específica (nsp)	nsp/c (L/g)
1,0	31,41	1,018	0,018	0,018
1,25	31,98	1,036	0,036	0,029
1,50	33,54	1,087	0,087	0,058
1,75	35,50	1,150	0,150	0,086
2,0	37,03	1,200	0,200	0,100
2,25	39,75	1,288	0,288	0,128
2,50	43,20	1,400	0,400	0,160

Figura 40 - Gráfico de determinação da viscosidade intrínseca da amostra Quito 20

O valor obtido da viscosidade intrínseca para a amostra de quitosana de barata Quito 20 foi 0,0838.

Na Tabela 22 estão descritos os valores de massa molar viscosimétrica média (M_v) encontrados para as amostras de quitosana obtidas a partir de blatódeos.

Tabela 22 – Massa molar viscosimétrica média (Mv) das amostras de quitosana obtida a partir de baratas Quito 1, Quito 2, Quito 3, Quito 6, Quito 10 e Quito 20

Amostras	Mv (KDa)
Quito 1	113,42
Quito 2	113,16
Quito 3	122,30
Quito 6	117,45
Quito 10	114,23
Quito 20	103,93

As amostras de quitosana, assim como outros polímeros (polietilenoglicol e carboximetilcelulose, por exemplo), são classificadas segundo a distribuição de massa molecular em alta, média e baixa massa molecular. As quitosanas consideradas de baixa massa molecular estão na faixa de 100.000 g/mol ou 100 KDa, as de média na faixa de 500.000 g/mol ou 500 KDa e as de alta massa molecular, 1.000.000 g/mol ou 1.000 KDa (DEE; RHODE; WACHTER, 2001).

De acordo com os valores obtidos na Tabela 21, tem-se que todas as amostras de quitosana obtida a partir de blatódeos apresentaram valores de massa molecular viscosimétrica média em torno de 100 KDa, sendo assim, são quitosanas de baixa massa molecular.

Em relação à produção de quitosana a partir de camarão, a massa molecular de diferentes amostras é inconsistente: muitos valores podem ser encontrados dependendo da procedência e dos tipos de tratamento aos quais a amostra foi submetida (NWE; FURUIKE; TAMURA, 2011). As amostras de quitosana obtidas a partir de baratas apresentaram valores de massa molecular similares. Isto pode ser explicado pela padronização do processo de obtenção e por possuir facilitações nas condições do processo, devido ao menor número de etapas quando comprado à obtenção de quitosana a partir de crustáceos.

Muitas das propriedades funcionais e físico-químicas de um polímero são definidas pela sua massa molecular. No polímero de quitosana, características como solubilidade, viscosidade e atividade antibacteriana são influenciadas pela massa molecular.

Estudos realizados sobre a relação estrutura-propriedade mostrou que as quitosanas de baixa e média massa molecular e alta densidade de cargas positivas são mais efetivas para muitas aplicações (NWE; FURUIKE; TAMURA, 2011).

Quitosana de baixa massa molecular se mostrou não tóxica e não hemolítica e formou complexos com DNA, possibilitando sua utilização como componente de sistemas sintéticos de gene *delivery* (TIWARI, 2004). Ela pode ainda ser utilizada em variadas aplicações na área médica, como membranas e pós para redução do colesterol (IKEDA et al., 1993).

A quitosana de baixa massa molecular pode ainda ser usada como floculante na clarificação de efluentes (CRESTINI; KOVAC; GIOVANNOZZI-SERMANNI, 1996), na clarificação de bebidas (VILAI et al., 2006), na agricultura como fungicida na proteção de frutas (Wu et al., 2005) e como agente quelante de metais em resíduos perigosos (CRESTINI; KOVAC; GIOVANNOZZI-SERMANNI, 1996).

Zheng e Zhu (2003) demonstraram que a atividade antimicrobiana contra bactérias gram-negativas aumenta quanto menor a massa molecular da quitosana. A quitosana de baixa massa molecular penetra mais facilmente nessas bactérias, causando distúrbios no metabolismo.

5.9. Rendimento

O rendimento do processo de obtenção foi calculado levando-se em conta o peso dos blatódeos inteiros e foi considerado que os blatódeos apresentam 50% de quitina em sua composição, a literatura (VIANNA; BERNE; RIBEIRO, 2001) sugere uma variação de 49 a 55%. Na Tabela 23 estão descritos os valores do rendimento do processo de obtenção de quitosana para as amostras Quito 1, Quito 2, Quito 3, Quito 6, Quito 10 e Quito 20.

Tabela 23 – Rendimento do processo de obtenção de quitosana a partir de blatódeos para as amostras Quito 1, Quito 2, Quito 3, Quito 6, Quito10 e Quito 20

Amostra	Rendimento
Quito 1	18,24%
Quito 2	16,03%
Quito 3	15,77%

Quito 6	15,63%
Quito 10	15,52%
Quito 20	13,80%

O rendimento do processo de obtenção de quitosana a partir de blatódeos foi maior na amostra Quito 1, 18,24%, e menor na amostra Quito 20, 13,8%.

Observando a Tabela 23, percebe-se que quanto maior foi o tempo de aquecimento na etapa de desacetilação, menor foi o rendimento (a amostra Quito 20 apresentou o menor rendimento, seguido pelas amostras Quito 10, Quito 6, Quito 3, Quito 2 e Quito 1, a qual apresentou maior rendimento). Da mesma forma, quanto maior o grau de desacetilação (ver Tabela 10 – Grau de desacetilação (%GD) das amostras de quitosana no item 5.3. Espectroscopia Infravermelho (IV)), menor o rendimento. Isso pode ser explicado pela quebra das moléculas: quanto maior o tempo de reação/aquecimento, maior a quebra de moléculas, e pela retirada de grupamentos acetil, havendo uma redução de massa, diminuindo assim, o rendimento.

Entretanto, apesar dos baixos rendimentos do processo de obtenção de quitosana a partir de baratas, nota-se que estes foram maiores que os rendimentos da obtenção de quitosana a partir de crustáceos. Isto pode estar relacionado ao menor número de etapas e menor tempo de processo, diminuindo assim perdas.

Em nosso laboratório, Laboratório de Síntese Orgânica Aplicada da FCF/USP, foi observado que dos resíduos da carcinicultura (criação de camarão), 85% desse resíduo é teor de água, sendo apenas 15% de sólidos (casca seca), e dentre estes 15% de sólidos, apenas 20-22% é quitina.

Em estudo realizado por Santos, Cirilo e Nunes (2011), foi feita a determinação do rendimento do processo de obtenção de quitosana a partir de camarão. Foi adquirido o camarão *in natura*; este foi triturado, seco e triturado novamente, até a formação de um pó. O rendimento calculado em relação à farinha/pó foi de 5,06%. Nos trabalhos realizados por Henning (2009) e Moura et al. (2006), os rendimentos encontrados foram de 2,5% e 2,4%, respectivamente. Hossain e Igbal (2014) obteve um rendimento de 15,4%.

Bolat et al. (2010) determinou o rendimento da obtenção de quitosana a partir do resíduo seco de caranguejos, encontrando o valor de 4,65%.

5.10. Balanço de massa parcial

O consumo total de ração (desde o mês de dezembro até o mês de outubro) foi de 7,8 gramas de ração na caixa 1 e de 6,4 gramas de ração na caixa 2, sendo apresentado um consumo médio de 0,79 gramas de ração por 0,3409 gramas de barata durante a etapa de criação (10 meses). Tem-se, então, considerando o rendimento do processo de obtenção de 15,63%, para se obter 10 gramas de quitosana serão necessárias 3,75 baratas fêmeas ovadas (estipulando que cada barata reproduza 9 novas baratas) e aproximadamente 296 gramas de ração. A Figura 41 mostra o esquema do balanço de massa parcial da produção de quitosana desde a criação de baratas. Não foi considerado a ganha ou perda de gases, materiais voláteis, como amônia e outros produtos de excreção.

Figura 41 - Balanço de massa parcial da produção de quitosana a partir de baratas grávidas (fêmeas ovadas)

6. CONCLUSÃO

O polímero de quitosana pode ser utilizado em diversas aplicações tecnológicas. O investimento em novas pesquisas e aplicações continua aumentando, assim como o número de estudos e publicações sobre esse polissacarídeo.

O presente estudo mostrou que a quitosana pode ser obtida a partir de baratas, *Phoetalia pallida*. A quitosana obtida de blatódeos pode ser utilizada complementarmente às quitosanas de crustáceos já produzidas comercialmente. As baratas apresentam uma reprodução rápida e adaptam-se aos mais variados ambientes, possuem custo de criação baixo, pois se adaptam aos mais variados ambientes e alimentação, tornando assim viável sua criação para produção comercial de quitosana. Além disso, os blatódeos não possuem sazonalidade, e ainda realizam ecdises, podendo-se utilizar as exúvias para a produção de quitosana.

O processo de obtenção de quitosana a partir de baratas apresentou vantagens em relação ao processo de obtenção de quitosana a partir de crustáceos. Como vantagens desse processo, destacam-se: menor número de etapas, menor número de reagentes (não necessária a utilização de HCl) e um maior rendimento do processo. De acordo com a literatura (já citada nesse trabalho), o processo de obtenção de quitosana a partir de crustáceos é cerca de 5%, enquanto o rendimento do processo a partir de baratas foi em torno de 15%, dependendo do tempo de aquecimento da reação.

As amostras de quitosana obtidas a partir de blatódeos apresentaram características físico-químicas semelhantes à quitosana obtida a partir de crustáceos. Apresentaram valor de massa molecular médio de 115 KDa, sendo consideradas quitosana de baixa massa molecular. E apresentaram grau de desacetilação médio de 60%.

7. BIBLIOGRAFIA

ABRAM, A. P.; HIGUERA, I. Em *Quitina y quitosano: obtencion, caracterizacion y aplicaciones*; Abram, A. P., ed.; Programa Cyted 2004, - Pontificia Universidad Catolica del Peru/Fondo Editorial: Lima, 2004.

ACHARYULU; GOMATHI; SUDHA. Physico-chemical characterization of cross linked chitosan-polyacrylonitrile polymer blends. *Der Pharmacia Lettre*, v. 5, n. 2, p. 354-363, 2013.

ALEXIS, F., et al. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol. Pharmacol*, v. 5, p. 505–515, 2008.

ALLAN, G. G., FOX, J. R. AND KONG, N. A critical evaluation of the potential sources of chitin and chitosan. In Proceedings of the First International Conference on Chitin and Chitosan (R. A. A. Muzzarelli and E. R. Pariser, eds.) p. 64-78, 1978.

AL-SAGHEER, et al. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. *Carbohydrate Polymers*, v. 77, n. 2, p. 410-419, 2009.

AL-SAGHEER, et al. Extraction and FTIR Analysis of Chitosan from American cockroach, *Periplaneta americana*. *International Journal of Engineering Science and Innovative Technology*, v. 3, n. 3, p. 299, 2014.

ANTHONSEN, M. W.; VARUM, K. M.; SMIDSRØD, O. Solution properties of chitosans: conformation and chain stiffness of chitosan with different degrees of N-acetylation. *Carbohydrate Polymers*, v. 22, p. 193-201, 1993.

ANTONINO, N. A. Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundos da indústria pesqueira paraibana. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2007.

ARAKANE, Y., HOGENKAMP, D., ZHU, Y.C., KRAMER, K.J., SPECHT, C.A. Chitin synthase genes of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*: characterization, expression, linkage mapping and alternate exon usage. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v. 34, p. 291-304, 2004.

ARAKANE, Y., ZHU, Q., MATSUMIYA, M., MUTHUKRISHNAN, S., KRAMER, K.J., Properties of catalytic, linker and chitin-binding domains of insect chitinase. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v. 33, p. 631-648, 2003.

ARANAZ, et al. Functional characterization of chitin and chitosan. *Current Chemical Biology*, v. 3, p. 203-230, 2009.

AZEVEDO, V. V. C., et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v. 2.3, p. 27-34, 2007.

BABA et al. Mechanism of inhibitory effects of dextrinsulfate and heparin on replication of human immunodeficiency virus *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 85, p. 6132-6136, 1988.

BADAWY; MOHAMED. Chitin extration, Composition of Different Six Insect Species and Their Comparable Characteristics with That of the Shrimp. *Journal of American Science*, v. 11, n. 6, 2015.

BALASSA, L. L. AND PRUDDEN, J. F. Applications of chitin and chitosan in wound-healing acceleration. In *Proceedings of the First International Conference on Chitin and Chitosan* (R. A. A. Muzzarelli and E. R. Pariser, eds.) p. 296-305, 1978.

BALDRICK, P., Pharmaceutical excipient development: The need for preclinical guidance, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, v. 32, p. 210–218, 2000.

BANERJEE, T., et al. Labeling efficiency and biodistribution of technetium-99m labeled nanoparticles: interference by colloidal tin oxide particles, *Int. J. Pharm.*, v. 289, p. 189–195, 2005.

BANGYEKAN, C., AHT-ONG, D., & SRIKULKIT, K., Preparation and properties evaluation of chitosan-coated cassava starch films. *Carbohydrate Polymers*, v. 63, p. 61–71, 2006.

BEZERRA, A. M. Síntese e algumas avaliações físico-químicas e biológicas de derivados de quitosana de alta e baixa massa molecular. 2011. 60 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

BHATTACHARYA, D. et al., Bacterial chitinases: properties and potencial. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 27, p. 21-28, 2007.

BOLAT Y., et al. Chitin-Chitosan Yield of Fresh Water Crab (*Potamon potamios*, Olivier 1804) Shell. *Pakistan Veterinary Journal*, v. 30, p. 227-231, 2010.

BOOT, R. G. et al. Aerts, Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. *J. Biol. Chem.*, v. 276, p. 6770–6778, 2001.

BOURIOTIS, V. et al., *Trends Biotechnol.* , v. 18, p. 305, 2000.

BRINE, C. J. Chitin, Chitosan and Related Enzymes, J.P. Zikakis, Academic Press Inc. p. 17-23, 1984.

CANELLA, K.M.N.; GARCIA, R.B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel: influência do método de preparação e do solvente. *Química Nova*, v.24, n.1, p.13-17, 2001.

CAUCHIE, H. M., An attempt to estimate crustacean chitin production in the hydrosphere, *Advances in Chitin Science*, v.2, p. 32–39, 1997.

CHO, I.Y.; NO, H.K.; MEYERS, S.P.J. Physicochemical characteristics and functional properties of various commercial chitin and chitosan products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.46, n.9, p.3839-3843, 1998.

CLARK, G. L.; SMITH, A. F.; *J. Phys. Chem.* , v. 40, p. 863, 1936.

COSTA JR., E. S. MANSUR, H. S. Preparacao e caracterizacao de blendas de quitosana/poli(alcool vinilico) reticuladas quimicamente com glutaraldeido para aplicacao em engenharia de tecido. *Química Nova*, v. 31, n. 6, p. 1460-1466, set. 2008.

CRESTINI, C.; KOVAC; GIOVANNOZZI-SERMANNI. Production and isolation of chitosan by submerged and solid-state fermentation from *Lentinus edodes*. *Biotechnol. and Bioeng.*, v. 50, p. 207-10, 1996.

CUROTTO, E.; AROS, F. Quantitative determination of chitosan and the percentage of free amino groups. *Analytical Biochemistry*, v. 211, p. 240-241, 1993.

DALLAN, P. R. M., Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele. Tese de D.Sc., Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil. 2005.

DEUCHI, K. Decreasing effect of chitosan on the apparent fat digestibility by rats fed on a high-fat diet. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 1194; 58(9), p. 1613-1616.

DODANE, V.; VILIVALAM, V. D. Pharmaceutical applications of chitosan. *PSTT*, v. 1, n. 6, set. 1998.

DOMARD, A. A perspective on 30 years research on chitin and chitosan. *Carbohydrate Polymers*, n. 84, p. 696-703, 2011.

DORNISH, M., HAGEN, A., HANSSON, E., PECHEUR, C., VERDIER, F., SKAUGRUD, O., Safety of Protasan: ultrapure chitosan salts for biomedical and pharmaceutical use, *Advances in Chitin Science*, v. 2, p. 664-670, 1997.

EBERT, G., *Biopolymere*, Stuttgart: Teubner, 1993.

FUKAMIZO, T.; KRAMER, K. J., Mechanism of chitin hydrolysis by the binary chitinase system in insect moulting fluid. *Insect Biochemistry*, v. 15, p. 141-145, 1985.

GOULART, G.A.S. Obtenção e caracterização de micropartículas de quitosana contendo papaína. Campinas, 2006. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

HACKMAN, R. H., Chitin and the fine structure of insect cuticles, in: *Chitin and Benzoylphenyl Ureas* (Wright, J. E., Retnakaran, A., Eds.), Dordrecht: W. Junk, p. 1-32, 1987.

- HASLAM, S. M., Houston, K. M., Harnett, W., Reason, A. J., Morris, H. R., Dell, A., Structural studies of N-glycans of filarial parasites. Conservation of phosphorylcholine-substituted glycans among species and discovery of novel chito-oligomers, *Journal of Biology and Chemistry*, 1999.
- HIRANO, S., Production and application of chitin and chitosan in Japan, in: *Chitin and Chitosan* (Skjåk-Bræk, G., Anthonsen, T., Sandford, P., Eds.), London: Elsevier Applied Science, p. 37–43, 1989.
- HSU, S.-C.; DON, T.-M.; CHIU, W.-Y. Free radical degradation of chitosan with potassium persulfate. *Polym. Degrad. Stab.*, v. 75, p. 73–83, 2002.
- HUANG, K.-S., et al. Application of low-molecular-weight chitosan in durable press finishing. *Carbohydrate Polymers*, v. 73, n. 2, p. 254-260, 2008.
- HWANG, D.-C., DAMODARAN, S., Selective precipitation and removal of lipids from cheese whey using chitosan, *Journal of Agriculture Food Chemistry*, v. 43, p. 33–37, 1995.
- IKEDA, I. et al. Hydrolysates with cholesterol fatty absorption and metabolic consequences in rats. *J. Agric. Food Chem.*, v. 41, p. 431-435, 1993.
- ILLUM, L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm. Res.*, v. 15, p. 1326–1331, 1998.
- ILLUM, L. Chitosan and its uses as pharmaceutical excipient. *Pharm. Res.*, v.15, p.1326-1331, 1998.
- ILLUM, L.; FARRAJ, N. F.; DAVIS, S. S. Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs. *Pharm. Res.*, v. 11, p. 1186–1189, 1994.
- J.D. FUNKHOUSER, N.N. ARONSON Jr., Chitinase family gh18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family, *BMC Evol. Biol*, v. 7, p. 96, 2007.
- JIA, Z.; SHEN, D.; XU, W. Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan. *Carbohydrate Research*, v. 333, n. 1, p. 1-6, 2001.
- JOHNSON, E. L. AND PENISTON, Q. P. The production of chitin and chitosan. In *Proceedings of the First International Conference on Chitin and Chitosan* (R. A. A. Muzzarelli and E. R. Pariser, eds.) p. 80-87, 1978.
- KANTI, P. et al. Dehydration of ethanol through blend membranes of chitosan and sodium alginate by pervaporation. *Separation and Purification Technology*, v. 40, p. 259–266, 2004.
- KATO, Y.; ONISHI, H.; MACHIDA, Y. N-succinyl-chitosan as a drug carrier: water-insoluble and water-soluble conjugates. *Biomaterials*, v. 25, p. 907-915, 2000.

KAYA et al. Extraction and Characterization of Chitin and Chitosan with Antimicrobial and Antioxidant Activities from Cosmopolitan Orthoptera Species (Insecta). *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 20, p. 168-179, 2015.

KEAN; THANOU. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 62, p. 3–11, 2010.

KEAN, T.; THANOU, M. Chitin and chitosan—sources, production and medical applications, in: P.A. Williams, R. Arshady (Eds.), *Desk reference of Natural Polymers, their Sources, Chemistry and Applications*, Kentus Books, London, p. 327–361, 2009.

KEGG Pathway, Amino sugar and nucleotide sugar metabolism. 2009, Kanehisa.

KHAN, T.A.; PEH, K.K.; CHING, S.H. Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, v.5, n.3, p.205-212, 2002.

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

KIM, C.Y.; CHOIN, H.-M.; CHO, H.T. Effect of deacetylation on sorption of dyes and chromium of chitin. *Journal of Applied Polymer Science*, v.63, n.6, p.725-736, 1997.

KNAPCZYK, J. et al., Requirement of chitosan for pharmaceutical and biomedical application, in Skjak-Braek, G., Anthonsen, T. and Sanford, P., (eds), *Chitin and Chitosan-Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications*, Elsevier, London, p. 657- 663, 1989.

KNAUL, et al. Characterization of deacetylated chitosan and chitosanmolecular weight review. *Canadian Journal of Chemistry*, v.76, p. 1699-1706, 1988.

KNORR, D. Food Techonology. January, p. 114-120, 1991.

KOBELK, D. N. *Food Australia*, v. 42, p. 18-19, 1990.

KRAMER; MUTHUKRISHNAN. Chitin Metabolism in insects, *Elsevier*, p. 1-34, 2005.

KUBOTA, N. Molecula weight dependence of the properties of chitosan and chitosan hydrogel for use in sustained –release drug. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, v. 66, p.1807-1812, 1992.

KUMAR, M.N.V.R. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, v. 46, p. 1-27, 2000.

KURITA, K. Chemistry and application of chitin and chitosan. *Polymers Degradation and Stability*, v. 59, p. 117-120. 1998.

KURITA, K. Chitin and Chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine Biotechnology*, v. 8, p. 203-226, 2006.

LANG, G., Chitosan Derivatives - Preparation and Potential Uses in, in Zakaria, M.B., Wan Md. Wan Muda and Abdullah, Md. P. (ed.) Chitin and Chitosan: The Versatile Environmentally Friendly Modern Materials, Collection of Working Papers 28. Penrbit University Kebangsaan, Malaysia, Anpang Press Adn. Bhd., p. 109-118, 1995.

LANGOTH, N. et al. Thiolated chitosans: design and in vivo evaluation of a mucoadhesive buccal peptide drug delivery system, *Pharm. Res.*, v. 23, p. 573-579, 2006.

LI et al., *Applied Polymers*, v. 16, p. 83, 1998.

LINE; WEBER; LUKASIEWICZ. Dansereau, Reduction of background activity through radiolabeling of antifibrin fab' with 99mtc-dextran. *J. Nucl. Med.*, v. 41, p. 1264-1270, 2000.

LUCAS; SOARES; MONTEIRO. Caracterização de Polímeros, ed. 1, Brasil: E-papers Serviços Editoriais, 2001. p. 217. ISBN 85-87922-25-4.

MAGHAMI, G.G.; ROBERTS, G.A.F. Evaluation of the viscometric constants for chitosan. *Makromolekulare Chemie*, v.189, n.1, p.195-200, 1988.

MARTÍNEZ; FALOMIR; GOZALBO, Chitin: a structural biopolysaccharide, *Encyclopedia of Life Sciences*, p. 1-10, 2009.

MAZEAU, K.; WINTER, W. T.; CHANZY, H.; *Macromolecules*, v. 27, p. 7606, 1994.

MELLO, K.G.P.C., et al. Synthesis and physicochemical characterization of chemically modified chitosan by succinic anhydride. *Brazilian Archives of Biology and Techonology*, v. 49, n.4, p. 665-668, jul. 2006.

MERZENDORFER, H., Insect chitin syntases: a review, *Journal of Comparative Physiology*, v. 176, p-1-15, 2006.

MERZENDORFER, H.; ZIMOCH, H., Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *Journal of Experimental Biology*, v. 206, p. 4393-4412, 2003.

MIRA, A. Exuviae eating: a nitrogen meal?. *Journal of Insect Physiology*, v. 46, p. 605-610, 2000.

MONTEIRO Jr., O.A. Preparação, modificação química e calorimetria do biopolímero quitosana. 113 f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2000.

MORIMOTO, M.; SAIMOTO, H.; SHIGEMASA, Y. Biological activities of carbohydrate-branched chitosan derivatives. *Biomacromolecules*, v. 2, p. 1133-1136, 2001.

MOUSSIAN, B. et al., Involvement of chitin in exoskeleton morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Morphology*, v. 264, p. 117-130, 2005.

MULISCH, M., SCHERMULY, G., Chitin synthesis in lower organisms, in: *Chitin Handbook* (Muzzarelli, R. A. A., Peter, M. G., Eds.), Grottammare: Atec, 337-344, 1977.

MURRAY, A. E. AND HATTIS, D. Approaches to a practical assessment of supply and demand for chitin products in the United States. In *Proceedings of the First International Conference on Chitin and Chitosan* (R. A. A. Muzzarelli and E. R. Pariser, eds.) p. 30-44, 1978.

MUZZARELLI, R.A.A.; BELMONTE, M.M.; MUZZARELLI, B.; SIMONELLI, L. Materiali da medicazione a base di chitosani. In: CONVEGNO-SCUOLA, ASSOCIAZIONE ITALIANA DI SCIENZA E TECNOLOGIA DELLE MACROMOLECOLE "POLIMERI IN MEDICINA", 19, Gargnano, 1997. *Atti Gargnano*, p.307-336, 1997.

MUZZARELLI, R. A. A. Carboxymethylated chitins and chitosans, *Carbohydrate Polymers*, v.8, p. 1-21, 1988.

MUZZARELLI, R. A. A. Human enzymic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives, *Cell. Mol. Life Sci.*, v. 53, p. 131-140, 1997b.

MUZZARELLI, R. A. A., *Chitin*, Oxford: Pergamon Press, 1977.

MUZZARELLI, R. A. A., Depolymerization of chitins and chitosans with hemicellulase, lysozyme, papain and lipases, in: *Chitin Handbook* (Muzzarelli, R. A. A., Peter, M. G., Eds.), Grottammare: Atec, 153-163, 1997.

MUZZARELLI, R. A. A., Depolymerization of chitins and chitosans with hemicellulase, lysozyme, papain and lipases, in: *Chitin Handbook* (Muzzarelli, R. A. A., Peter, M. G., Eds.), Grottammare: Atec, 153-163, 1997a.

MUZZARELLI, R. A. A., et al., *Chitin in Nature and Technology*. New York: Plenum Press, 1986.

MUZZARELLI, R. A. A., Management of hypercholesterolemia and overweight by oral administration of chitosans, *Biomed. Health Res.* v. 16, p. 135-142, 1998.

MUZZARELLI, R. A. Chitin and its derivatives: new trends of applied research. *Carbohydrate Polymers*, v. 3, n 1, p. 53-75, 1983.

NEMTSEV, S.V.; ZUEVA, O. Yu; KHISMATULLIN, M.R.; ALBULOV, A.I. and VARLAMOV, V.P. Isolation of chitin and chitosan from honeybees. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 40, n. 1, p. 39-43, 2004.

NIFANT'EV, N. E.; CHERNETSKII, V. N. *Mendeleev Chemi. J.* 1998.

NO, K. H., MEYERS, S. P., Preparation of chitin and chitosan, in: Chitin Handbook (Muzzarelli, R. A. A., Peter, M. G., Eds.), Grottammare: Atec, p. 475–489, 1997.

NWE; FURUIKE; TAMURA. Chitin and chitosan from terrestrial organisms. Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivates. Biological Activities and Applications, Edited by: Se-Kwon Kim, p. 3-10, 2011.

OGAWA, K. et al. Dependence on the preparation procedure of the polymorphism and crystallinity of chitosan membranes. *Biosci. Biotech. Biochem.*, v.56. n.6, p. 858-862, 1992.

OGAWA, K. et al. Three D structures of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.34, p.1-8, 2004.

OKUYAMA, K. et al. Structural study of anhydrous tendon chitosan obtained via chitosan/acetic acid complex. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.26, p.285-293, 1999.

OKUYAMA, K., K. NOGUCHI, M. KANENARI, T. EGAWA, K. OSAWA AND K. OGAWA, Structural diversity of chitosan and its complexes. *Carbohydrate Polymers*, v. 41, p. 237-247, 2000.

OLIVEIRA, J., et al. Novel melt-processable chitosan-polybutylene succinate fibre scaffolds for cartilage tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, v.22, n.4-6, p.773-788, 2011.

OUCHI et al. Release behavior of 5-fluorouacil from chitosan gel microspheres modified chemically and their antitumor activities, in *Polymeric Materials Science and Engineering, Prpced. ACS Bio. Polym. Mat. Sci., Engin., ACS Books & Journal Division*, Washington, DC, v. 66, p. 360, 1992.

PANTALEONE D., YALPANI, M., SCOLLAR, M. Unusual susceptibility of chitosan to enzymic hydrolysis. *Carbohydr. Res.*, v. 237, p. 325-332, 1992.

PARENTE et al. Bactérias entéricas presentes em amostras de águas e camarão marinho *Litopenaeus vannamei* oriundos de fazendas de cultivo no estado do Ceará, Brasil. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 48, n. 1, p. 43-56, 2011.

PERCEVAL, P. M. The economics of chitin recovery and production. In *Proceedings of the First International Conference on Chitin and Chitosan* (R. A. A. Muzzarelli and E. R. Pariser, eds.) p. 45-53, 1978.

PETER, M. G., Chitin and chitosan from animal sources, *Biopolymers Online*, 2005.

PETER, M. G.; J. M. S.; Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. *Pure Applied Chemistry*. v. 4, p. 629-640, 1995.

RAO, M. S. Optimum parameters for production of chitin and chitosan from squilla (*S. empusa*). *Journal of Applied Polymer Science*, v. 103, n. 6, p. 3694–3700, 2007.

RIANDE, R. *Polymer viscoelasticity stress and strain in practice*. New York: Marcel Dekker, 2000. 879p.

RINAUDO, H., Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress Polymers 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 Macromolecules*, v. 15, p. 281, 1993.

RINAUDO; PAVLOV; DESBRIERES. Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. *Polymer*, v. 40, n. 25, p. 7029–7032, 1999.

ROBERTS, G.A.F. *Chitin chemistry*. London: Macmillan, 1992. 350p.

RODAS, A. C. D., Desenvolvimento de membranas como compostos dermo-epidérmicos, São Paulo: Instituto de Pesquisa Energética e Nucleares Autarquia associada à Universidade de São Paulo, 2004. (Tese, Doutorado em Ciências, Tecnologia Nuclear-Aplicações).

RODRIGUES, G. V.; MARCHETTO, O. Caracterização de materiais III: análises térmicas. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. Disponível em: <<http://www.materiais.ufsc.br/Disciplinas/EMC5733/Apostila.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2012.

S. HIRANO, S., SEINO, H., AKIYAMA, Y., NONAKA, I. Bio-compatibility of chitosan by oral and intravenous administrations, Proceedings of the ACS Division of Polymeric Materials: Science and Engineering, American Chemical Society, Los Angeles, California, 1988.

SANFORD, P. A. Chitosan: commercial uses and potencial applications. In: SKJAKBRAEK, G.; ANTHOMSENT, T.; SANFORD, P. A., (eds). Chitin and Chitosan-sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications. New York: Elsevier; London: Applied Science, p. 51-70, 1989.

SANTOS, J. E. et al. Caracterizacao de quitosanas comerciais de diferentes origens. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, Sao Carlos, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

SANTOS, J. E. Preparação, caracterização e estudos termoanalíticos de bases de Schiff biopoliméricas e seus complexos de cobre. Tese (Doutorado em Ciências – área química analítica). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

SANTOS, M.C.; CIRILO, A.T.O.; NUNES, M.L. Determinação do grau de desacetilação de quitosana obtida de camarão “Saburica” (*Macrobrachium jelskii*, Miers, 1877). *Scientia Plena*, v.7, n.9, p.1-4, 2011.

SCHRADER, B. Infrared and Raman Spectroscopy, Methods and Applications. VCH Publishers. Inc., New York, N Y, 1995.

SHI, C., et al. Therapeutic potencial of chitosan and its derivates in regenerative medicine. *Journal of Surgical Research*, v. 133, p. 185-192, 2006.

SHIN, Y. et al. *Advances in Chitin Science*, v. 2, n. 156, 1997.

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

SILVERSTEIN, R. M. et al. Identificação Espectrofotométrica de Compostos Orgânicos, 5ª ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p.387, 1994.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. Identificação espectrométrica de Compostos Orgânicos. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2007.

SINGLA, A. K.; CHAWLA, M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects – an update. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 53, p. 1047-1067, 2001.

SREENIVASAN, K. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 69(6), p. 1051–1055, 1998.

STEVENS, W. F., Proceedings, 8th ICC, Yamaguchi, Japan, September 20–23, 2000, in press, and personal communication, 2001.

THAKUR, V. K., THAKUR, M. K. Processing and characterization of natural cellulose fibers/thermoset polymer composites. *Carbohydrate polymers*, v. 109, p. 102, 2014.

THATTE, M. R. Synthesis and antibacterial assessment of water-soluble hydrophobic chitosan derivates bearing quaternary ammonium functionality. Louisiana State University. LA, 2001.

TIWARI, A. K. Antioxidants: new generation therapeutic base for treatment of polygenic disorders. *Curr. Sci.*, v. 86, p. 1092-1102, 2004.

- TORRES, M. A. et al. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 15, n. 4, p. 306-312, 2005.
- UENO, H., T. MORI, AND T. FUJINAGA. Topical Formulations and Wound Healing Applications of Chitosan. *Adv. Drug Delivery Rev.*, v. 52, n. 2, p. 105-115, 2001.
- VIANNA; BERNE; RIBEIRO. Desenvolvimento e longevidade de *Periplaneta americana* LINNEU, 1758 (Blattodea: Blattidae). *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 7, n. 2, p. 111-115, 2001.
- VILAI R., et al. Application of fungal chitosan for clarification of apple juice, *Process Biochem.*, v. 41, p. 589–593, 2006.
- WAGNER, G. P., Evolution and multi-functionality of the chitin system. *Molecular Ecology and Evolution Approaches and Applications*. Basel: Birkhauser, 1994.
- WANULE, D. D., SIRSIKAR, A.N. Antimicrobial activity of American Cockroach, *Periplaneta americana*. *Bioinfolet.*, v.6, n. 3, p. 219- 223, 2009.
- WEDMORE; MCMANUS; PUSATERI; HOLCOMB, A special report on the chitosan-based hemostatic dressing: experience in current combat operations. *J. Trauma*, v. 60, p. 655–658, 2006.
- WIECZOREK, A., MUCHA, M., Application of chitin derivatives and their composites to biodegradable paper coatings, *Adv. Chitin Science*. v. 2, p. 890–896, 1997.
- WOJTASZ-PAJAK, A., BRZESKI, M. M., MALESA-CIECWIERZ, M., Regulatory aspects of chitosan and its practical applications, in: *Chitin World* (Karnicki, Z. S., Wojtasz-Pajak, A., Brzeski, M. M., Bykowski, P. J., Eds.), Bremerhaven: Wirtschafstverlag NW, p. 435–445, 1994.
- WU, T., ZIVANOVIC, S. Determination of the degree of acetylation (DA) of chitin and chitosan by an improved first derivative UV method. *Carbohydrate Polymers*, v.73, p.248–253, 2008.
- YI, H. et al. Biofabrication with chitosan. *Biomacromolecules*, v.6, n. 6, p. 2881–2894, 2005.
- ZHANG, C., et al. Biological evaluation of n-octyl-o-sulfate chitosan as a new nano-carrier of intravenous drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v. 33, p. 415–423, 2008.
- ZHANG, C., et al. Pharmacokinetics, biodistribution, efficacy and safety of n-octyl-o-sulfate chitosan micelles loaded with paclitaxel. *Biomaterials*, v. 29, p. 1233–1241, 2008.

ZHANG, Y.; XUE, C.; XUE, Y.; GAO, R.; ZHANG, X. Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction, *Carbohydr. Res.*, v. 340, p. 1914–1917, 2005.

ZHENG, L-Y.; ZHU, J.-F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydrate Polymers*, v. 54, n.4, p. 527-530, 2003.

ZHENG; ZHU. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydrate Polymers*, v 54, n. 4, p. 527-530, 2003.

ZOHURIAAN, M.J.; SHOKROLAHI, F.; Thermal studies on natural and modified gums. *Polymer Testing*, v. 23, p. 575-579, 2004.

ANEXOS

ANEXO 1 – Reportagem do jornal Folha de São Paulo: “Agência da ONU defende consumo de insetos no combate à fome” (13 de Maio de 2013).

<http://www1.folha.uol.com.br/mundo/2013/05/1277862-agencia-da-onu-defende-consumo-de-insetos-no-combate-a-fome.shtml>
13/05/2013 - 16h35

Agência da ONU defende consumo de insetos no combate à fome

DAS AGÊNCIAS DE NOTÍCIAS

Relatório da FAO (agência da ONU de combate à fome) divulgado nesta segunda-feira, em Roma, afirma que os insetos são uma fonte de proteínas importante e têm um potencial inexplorado não só como alimento mas também como ração para gado. A criação é de baixo custo, ecológico e "delicioso", afirma.

De acordo com a agência, 2 bilhões de pessoas em culturas tradicionais já consomem mais de 1.900 espécies de insetos, sendo os mais utilizados os besouros, as lagartas, as abelhas, as vespas, as formigas, os grilos e os gafanhotos --que, por exemplo, têm mais conteúdo em ferro que a carne bovina.

Segundo o estudo, realizado em colaboração com a holandesa Universidade de Wageningen, os insetos são uma fonte facilmente acessível de alimentos nutritivos e ricos em proteínas que são facilmente encontrados nas florestas. O nicho gera empregos e renda em nível familiar, mas possui potencial em nível industrial.

São necessários 2 kg de ração para produzir 1 kg de insetos, enquanto o gado requer 8 kg de alimento para produzir 1 kg de carne, ainda conforme a FAO. A criação de insetos é simples, pois pode ser feita a partir de resíduos orgânicos, tais como restos de alimentos, e também a partir de compostos e estrume.

Os insetos também são ecológicos, argumenta a FAO. Eles usam muito menos água e produzem menos gases do efeito estufa do que o gado.

Mulher posa para campanha de consumo de insetos ocorrida em Bruxelas

"Não estamos dizendo que as pessoas devam comer animais", afirma Eva Muller, diretora da Divisão de Economia, Políticas e Produtos Florestais da FAO, em comunicado. "O que dizemos é que os insetos são só um dos recursos brindados pelas florestas, e que se encontra praticamente inexplorado seu potencial como alimento, e, sobretudo, como ração."

As leis da maioria dos países impedem algumas destas práticas, sobretudo a alimentação dos animais com resíduos, estrume líquido e resíduos alimentícios, e, por isso, a FAO quer "pesquisar mais, especialmente no que diz respeito à criação de insetos aproveitando o vazamento de resíduos".

O restaurante dinamarquês Noma, por exemplo, apontado em uma pesquisa como o melhor do mundo por três anos consecutivos, é conhecido por oferecer pratos com ingredientes como formigas e gafanhotos.

ANEXO 2- Vazamento nuclear para as águas marítimas na cidade de Fukushima, Japão.

Fonte: Google Earth – US Dept. of State Geographer

ANEXO 3- Reportagem do jornal Folha de São Paulo “Criadora de insetos quer certificá-los para dieta humana” (14 de julho de 2012).

<http://www1.folha.uol.com.br/fsp/mercado/54405-criadora-de-insetos-quer-certificar-los-para-dieta-humana.shtml>

São Paulo, sábado, 14 de julho de 2012

COMMODITIES

Criadora de insetos quer certificá-los para dieta humana

Farelo já é usado na alimentação animal, consumido em outros países e pode combater a desnutrição

Nutrinsecta trouxe chef para criar pratos como grilos cobertos com chocolate, que serão servidos na fábrica

TATIANA FREITAS
DE SÃO PAULO

Talvez você resista, mas o seu neto ainda vai adicionar insetos à dieta alimentar.

A maior demanda por proteína animal fará com que eles entrem no cardápio de grande parte da população mundial em 2050, prevê a Organização da ONU para Agricultura e Alimentação (FAO).

Uma empresa brasileira já se prepara para os novos tempos. A Nutrinsecta, produtora de grilos, besouros, baratas e moscas, aguarda certificação do Ministério da Agricultura para que seus insetos, hoje usados na alimentação animal, possam ser consumidos por humanos.

O fundador e sócio da Nutrinsecta, Luiz Otávio Pôssas, admite que a barreira cultural é grande, mas não é impossível de ser superada. "Virá com o tempo", afirma.

"Quando eu era jovem, todos achavam um absurdo o hábito japonês de comer peixe cru. Esse preconceito não existe mais", diz o empresário, que criou a cerveja Kaiser e a água de coco Kero Coco.

A certificação abrirá um novo nicho de mercado para os insetos, mas, segundo Pôssas, o foco da companhia deve continuar sendo complementos para ração animal.

No entanto, a Nutrinsecta já está montando um quiosque para degustação na fábrica de insetos, em Betim (MG). A empresa contratou um chef de Santa Catarina especialmente para desenvolver pratos como grilo coberto de chocolate -"parece um Bis"-, insetos à milanesa, ou misturados ao macarrão, como um yakisoba.

"As crianças que visitam o nosso projeto sempre pedem para experimentar", diz Gilberto Schickler, sócio da Nutrinsecta e zootecnista.

"Não tenho a intenção de estimular ninguém a consumir insetos. Mas quem quiser comer poderá", diz Pôssas.

EXPORTAÇÃO

Schrickler diz que não será necessário mudar o cardápio do brasileiro para vender insetos a humanos. Ele vê potencial para exportação.

Segundo Pôssas, em mais de cem países os insetos já fazem parte da dieta alimentar. A China é um exemplo.

Os preços, no entanto, ainda estão longe de serem competitivos. A Nutrinsecta vende um quilo de insetos por cerca de R\$ 200, em média. "Com escala de produção, esse valor pode cair drasticamente", diz o zootecnista.

O quilo da picanha, corte nobre bovino, é vendido entre R\$ 40 e R\$ 50 no varejo de São Paulo, em média.

NA RAÇÃO

O interesse de Pôssas pelos insetos começou por causa de sua criação de aves.

Buscando melhorar a alimentação das espécies, financiou uma pesquisa na Universidade Federal de Minas Gerais, que lhe apresentou a proteína de insetos.

De fácil digestão, ela é mais adequada à alimentação das aves criadas em cativeiro e rendeu bons resultados.

Hoje, a Nutrinsecta produz duas toneladas por mês de insetos, vendidos vivos ou desidratados para a empresa irmã MegaZoo, que faz a ração.

A maior parte é processada até virar uma farinha de proteína consumida por aves, peixes, répteis e primatas.

E, se a barreira para levar o inseto à boca é grande, esse farelo de insetos pode ser a saída para a introduzi-los à dieta. O consumo do inseto inteiro será possível, mas a maior demanda será para esse suplemento alimentar em forma de farelo.

Em congresso realizado no início deste ano, a farinha de proteína de insetos foi apontada pela FAO como eficiente no combate à desnutrição.

ANEXO 4- Informações para os Membros da Banca Julgadora de Doutorado. **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Secretaria de Pós-Graduação

**Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de
Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pofarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

ANEXO 5 - Declaração de dispensa de análise do Comitê de Ética em Pesquisa e/ou Comitê de Ética em Experimentação Animal.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA BIOQUÍMICO-FARMACÊUTICA
Av. Lineu Prestes, 580 - Bloco 16 - Cidade Universitária
05508-900 - São Paulo - SP

São Paulo, 15 de Setembro de 2015

Vimos declarar que o trabalho intitulado “Prospecção quantitativa e qualitativa de uma nova fonte renovável de quitosana” dispensa análise do Comitê de Ética em Pesquisa e/ou Comitê de Ética em Experimentação Animal.

Atenciosamente,

Adriana Maia Bezerra

Prof. Dr. Bronislaw Polakiewicz

Orientador

ANEXO 6 - Ficha do aluno.

15/09/2015

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9135 - 6575865/3 - Adriana Maia Bezerra

Email: adrianamaia@usp.br
Data de Nascimento: 06/06/1984
Cédula de Identidade: RG - 002.123.537 - RN
Local de Nascimento: Estado de Rio Grande do Norte
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutico - Universidade Federal do Rio Grande do Norte - Rio Grande do Norte - Brasil - 2008
Mestrado: Mestre em Ciências - Área: Tecnologia Químico-Farmacêutica - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2011

Curso: Doutorado
Programa: Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área: Tecnologia Químico-Farmacêutica
Data de Matrícula: 29/09/2011
Início da Contagem de Prazo: 29/09/2011
Data Limite para o Depósito: 29/09/2015
Orientador: Prof(a). Dr(a). Bronislaw Polakiewicz - 29/09/2011 até o presente. Email: bronipol@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 29/09/2011
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 13/11/2013
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 29/09/2011

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 20/07/2015

Impresso em: 15/09/2015 14:09:56

ANEXO 6 - Continuação

15/09/2015

JANUS - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9135 - 6575865/3 - Adriana Maia Bezerra

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Disp.	Situação
FBT5708-2/3	Estratégias e Gerenciamentos de Processos Farmacêuticos e Biotecnológicos	29/02/2012	09/05/2012	45	3	100	A	N	Concluída
FBT5736-5/2	Métodos Gerais de Esterilização com Aplicações no Campo Farmacêutico	05/03/2012	07/05/2012	90	6	100	A	N	Concluída
FBT5788-4/2	Princípios de Fermentação Contínua	07/05/2012	10/06/2012	75	5	100	A	N	Concluída
PQI5849-2/5	Fundamentos da Proteção Ambiental e da Segurança de Processos Industriais (Escola Politécnica - Universidade de São Paulo)	11/06/2012	03/09/2012	120	8	83	B	N	Concluída
FBF5805-1/1	Delimitação de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	02/08/2012	05/09/2012	45	3	80	B	N	Concluída
FBF5810-1/1	Tópicos Avançados em Fármaco e Medicamentos. Espectroscopias Raman e no Infravermelho Próximo Associadas à Quimiometria: Aplicação no Desenvolvimento e no Controle em Processo de Medicamentos com Base Nanotecnológica	24/06/2013	30/06/2013	30	2	100	A	N	Concluída
FBT5773-7/2	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica	07/10/2013	15/12/2013	30	2	90	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	25	29
Estágios:			
Total:	0	25	29

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 20/07/2015

Impresso em: 15/09/2015 14:09:58