

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS**

Rayane Santa Cruz Martins de Queiroz Antonino

**PRODUÇÃO DE QUITOSANA A PARTIR DE EXOESQUELETO DE CAMARÃO
(*Litopenaeus vannamei* Boone) PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**

Campina Grande – PB

2016

Rayane Santa Cruz Martins de Queiroz Antonino

**PRODUÇÃO DE QUITOSANA A PARTIR DE EXOESQUELETO DE CAMARÃO
(*Litopenaeus vannamei* Boone) PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais como requisito parcial à obtenção do título de **Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais**.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook

Agência Financiadora: CAPES

Campina Grande – PB

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

A635p Antonino, Rayane Santa Cruz Martins de Queiroz.
Produção de quitosana a partir de exoesqueleto de camarão
(*Litopenaeus vannamei Boone*) para aplicações biomédicas /
Rayane Santa Cruz Martins de Queiroz Antonino. – Campina
Grande, 2016.
66 f.: il. color.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais)
– Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e
Tecnologia, 2016.
"Orientação: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook".
Referências.

1. Quitina. 2. Quitosana. 3. Litopenaeus vannamei Boone. I.
Fook, Marcus Vinicius Lia. III. Título.

CDU 677.473(043.3)

VITAE DO CANDIDATO

- Bacharela em Farmácia pela UEPB (2014).

Rayane Santa Cruz Martins de Queiroz Antonino

**PRODUÇÃO DE QUITOSANA A PARTIR DE EXOESQUELETO DE CAMARÃO
(*Litopenaeus vannamei* Boone) PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais como requisito parcial à obtenção do título de **Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais**.

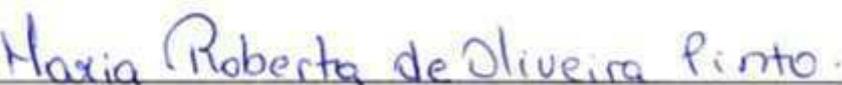
Aprovado em: 22/03/2016



Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook

Orientador

UAEMa – UFCG



Prof.^a Dr.^a Maria Roberta de Oliveira Pinto

Examinador

DQ/CCT– UEPB



Pesquisador Dr. Rossemberg Cardoso Barbosa

Examinador

CERTBIO– UFCG

"A minha cabeça é incapaz de
expressar o meu agradecimento a
Deus, tudo que há de melhor na
vida, Ele me deu."

Nilza Maria Santa Cruz Martins
(in memoriam)

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da Vida e por tudo que me deu e me dá todos os dias.

Aos meus pais, João e Ceíça, que são o meu exemplo de força, determinação, respeito, responsabilidade e família.

Aos meus avós maternos, João e Nilza (*in memoriam*), que não mediram esforços para me mostrar que a família é a base da sociedade. A eles, eu entrego as mais doces e sinceras lembranças de uma infância rodeada de amor e carinho.

Aos meus irmãos, Thâmisa, Ibysson e Raysse pelo apoio durante toda esta caminhada. E seus respectivos cônjuges, Renner, Marina e Marcos André.

A minha família amada, que estão comigo sempre. Dos momentos mais leves até a grandes dificuldades. Meu muito obrigada.

Ao meu amor, Rodrigo, que cuidadosamente me ajudou em cada etapa desta pesquisa, sabendo diferenciar o pessoal do profissional.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook, pela confiança desde o início, ao me receber em seu laboratório, até a compreensão em momentos difíceis. As conversas e conselhos de um “pai científico”.

Ao meu coordenador do grupo, Dr. Rodrigo Lima, que sempre se mostrou entusiasmado e confiante na rotina laboratorial. Aos conselhos e até mesmo as intervenções quando necessário.

Aos grandes pesquisadores, Prof. Dr. Carlos Peniche e Prof. Dr. Raúl Carrodegua, que estiveram comigo em momentos desta pesquisa, não medindo esforços para o melhor andamento científico desta.

Aos meus meninos da Produção, Bianca, Eunice, Raid e Vitor, muito obrigada pela paciência, pela alegria, pelas risadas e por todo o trabalho desenvolvido. Com vocês esse trabalho se tornou muito mais leve.

Aos amigos do CERTBIO, em especial Paulinha e D. Val, que com um sorriso no rosto e um abraço apertado tornavam o dia mais doce. A seu Sérgio, Josilene que sempre se mostraram prontos para qualquer atividade.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

RESUMO

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, sendo a quitosana seu principal derivado. A quitosana é um polissacarídeo composto por unidades de N-acetil-glucosamina e N-glucosamina unidas por ligações $\beta(1-4)$. Suas propriedades de biocompatibilidade, baixa toxicidade e biodegradabilidade, a tornam um polímero de escolha em aplicações biomédicas e farmacêuticas. Encontra-se quitina em insetos, fungos e em exoesqueletos de crustáceos, sendo esta última a fonte de mais fácil obtenção. Sendo assim, objetiva-se produzir quitosana a partir de exoesqueletos de camarão (*Litopenaeus vannamei* Boone) visando aplicações biomédicas. Primeiramente, fez-se necessário o beneficiamento da casca de camarão, para posterior tratamento químico. Sendo, portanto, retirado da casca a fase mineral, a fase proteica, os pigmentos, extraindo assim, a quitina, e posterior desacetilação da mesma para finalmente, obter a quitosana. Foram determinados tempos diferentes nas etapas do processo a fim de se obter características distintas entre os lotes. Foram realizados ensaios de caracterização química e física da quitosana obtida a fim de verificar a pureza, como também a variabilidade nas características obtidas quanto ao processamento. As amostras de quitosana possuem aspecto de pó e de coloração branca. O método de desmineralização foi eficiente, observado pelo teor de cinzas abaixo de 0,063%; o grau de desacetilação está acima de 90%, tal resultado corrobora com a solubilidade adequada da quitosana em soluções diluídas de ácidos fracos, e o baixo teor de insolúveis determinado; por meio do ensaio de difração de raios X (DRX) foi possível a identificação dos picos característicos da quitosana e sua distinção com a quitina; a massa molecular obtida por viscosimetria, determinou que a quitosana obtida nos cinco lotes, podem ser caracterizadas como de médio peso molecular; e quanto ao aspecto morfológico, foi possível observar semelhança da superfície entre os cinco lotes da quitosana obtida. Assim, as amostras de cada lote obtiveram resultados satisfatórios para os ensaios de caracterização para aplicações farmacêuticas e biomédicas.

Palavras-chave: Quitina. Quitosana. *Litopenaeus vannamei* Boone.

ABSTRACT

Chitin is the second most abundant polysaccharide in nature, the chitosan being its main derivative. Chitosan is a polysaccharide composed of N-acetyl-glucosamine and N-glucosamine units linked by β (1-4) linkages. Their properties of biocompatibility, low toxicity and biodegradability, make a polymer of choice for biomedical and pharmaceutical applications. It lies chitin in insects, fungi and the exoskeletons of crustaceans, the latter being the source easier to obtain. Thus, the objective is to produce chitosan from shrimp exoskeletons (*Litopenaeus vannamei* Boone) aiming for biomedical applications. First, it became necessary the processing of shrimp shells for further chemical treatment. It is, therefore, taken from the bark mineral phase, the proteinaceous phase, pigments, thereby drawing, chitin, and subsequent deacetylation thereof to finally obtain chitosan. They were determined at different times of the process steps in order to obtain different characteristics between batches. Chitosan chemical and physical tests were performed as obtained in order to verify purity as well as the variability in characteristics obtained on processing. Chitosan samples have aspect powder and white coloration. The method was efficient demineralization, observed by an ash content below 0.063%; The deacetylation degree is above 90%, this result confirms adequate solubility of chitosan in dilute solutions of weak acids, and certain low insoluble content; using the test X-ray diffraction (XRD) it was possible to identify the characteristic peaks of chitosan and its distinction with chitin; the molecular weight obtained by viscometry determined that the chitosan obtained in five batches, can be characterized as average molecular weight; and as the morphologic aspect, it observed like the surface of the five lots of chitosan obtained. Thus, samples from each batch satisfactory results for the characterization tests for pharmaceutical and biomedical applications.

Keywords: Chitin. Chitosan. *Litopenaeus vannamei* Boone.

PUBLICAÇÕES

UFCG. Instituto Nacional da Propriedade Industrial (Campina Grande, PB). Rayane Santa Cruz Martins de Queiroz Antonino. **Produção de quitina e quitosana a partir de exoesqueleto de camarão**. BR10201600457, 12 fev. 2016.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura molecular da celulose e da quitina.	18
Figura 2 – Esquema ilustrativo do arranjo das cadeias poliméricas para as três formas de quitina (Campana-Filho et al., 2007).....	20
Figura 3 – Esquema ilustrativo para estrutura hierárquica da quitina em cutículas de artrópodes (Raabe et al., 2005; Pillai et al., 2009).....	21
Figura 4 – Fluxograma esquemático das etapas de extração de quitina e obtenção de quitosana.	22
Figura 5 – Estruturas moleculares da quitina e da quitosana.	26
Figura 6 – Derivados da quitosana. Adaptado de (Campana Filho et al., 2007).	27
Figura 7 – Patentes que utilizam quitosana entre os anos de 2000 e 2010 nas áreas de cosmética, farmácia, medicina, alimentos e agricultura. Adaptado de (Peniche e Becherán, 2015).	29
Figura 8 – Fluxograma do processo de produção de quitosana.	34
Figura 9 – Imagens obtidas por MEV da casca de camarão (<i>Litopenaeus vannamei</i> Boone) com ampliações a) 150x, b) 200x e c) 2000x.	41
Figura 10 – Imagens obtidas por MEV da casca de camarão após desmineralização com ampliações a) 500x, b) 1000x e c) 2000x.	42
Figura 11 – Imagens obtidas por MEV da casca de camarão após desproteinização (quitina) com ampliações a) 500x, b) 500x e c) 1500x.....	42
Figura 12 – Imagens obtidas por MEV da quitosana – Lote I com ampliações a) 500x, b) 4000x e c) 4000x.....	43
Figura 13 – Imagens obtidas por MEV da quitosana – Lote II com ampliações a) 500x, b) 1000x e c) 2000x.....	43
Figura 14 – Imagens obtidas por MEV da quitosana – Lote III com ampliações a) 500x, b) 1000x e c) 2000x.....	43
Figura 15 – Imagens obtidas por MEV da quitosana – Lote IV com ampliações a) 1000x, b) 1500x e c) 2000x.....	43
Figura 16 – Imagens obtidas por MEV da quitosana – Lote V com ampliações a) 1000x, b) 2000x e c) 2000x.....	44
Figura 17 – Teor de insolúveis (%) para as amostras de quitosana em solução de ácido acético 1% (v/v).	46

Figura 18 - Espectros FTIR obtidos com pastilha de KBr para as amostras de quitosana 1 - Lote I, 2 - Lote II, 3 - Lote III, 4 - Lote IV e 5 - Lote V.	47
Figura 19 - Espectro FTIR obtido com pastilha de KBr da amostra Lote I mostrando a representação das linhas de base adotadas.	48
Figura 20 - Primeira Derivada do espectro UV das soluções de Ácido Acético e dos padrões de N-acetil-D-Glucosamina em soluções de Ácido Acético.	49
Figura 21 - Curva de calibração de N-acetil-glucosamina para o método da primeira derivada.	50
Figura 22 - Espectro UV-Visível e a primeira derivada para as amostras de quitosana.	50
Figura 23 - Curvas de viscosidade reduzida (η_{sp}/C) versus concentração C (g/mL) da solução de quitosana juntamente com o ajuste linear referente a cada amostra.....	52
Figura 24 – Padrão de difração de raios X para quitina e quitosana (Lote I).	54
Figura 25 - Padrões de difração de raios X para as amostras de quitosana.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ocorrência de quitina em organismos vivos.	18
Tabela 2 – Parâmetros das células unitárias das formas polimórficas da quitina.	19
Tabela 3 – Principais aplicações de quitina e quitosana na área biomédica e farmacêutica.	30
Tabela 4 – Critérios para cloridrato de quitosana e quitosana na Farmacopeia Europeia 6.0 e na Farmacopeia dos Estados Unidos 34-NF 29.	31
Tabela 5 – Lotes das amostras e seus respectivos tempos de reação.	33
Tabela 6 – Resultado de EDS para as amostras da casca beneficiada, desmineralizada, quitina e de quitosana para cada lote.	44
Tabela 7 - Teor de cinzas sulfatadas para as amostras de quitosana.	45
Tabela 8 - Valores obtidos para os GD% por FTIR e pela primeira derivada (UV-Vis) para as amostras de quitosana.	51
Tabela 9 - Valores obtidos para viscosidade intrínseca $[\eta]$ e massa molecular viscosimétrica (M_v) para as amostras de quitosana.	53
Tabela 10 - Graus de cristalinidade (%GCr) obtidos por DRX para as amostras de quitosana.	55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1	Quitina	17
2.1.1	Fonte e Estrutura Química.....	17
2.1.2	Estrutura física.....	19
2.1.3	Método de extração	21
2.2	Quitosana	24
2.2.1	Produção de quitosana.....	24
2.2.2	Estrutura química e propriedades	25
2.2.3	Derivados e aplicações.....	27
2.2.3.1	Aplicações biomédicas e farmacêuticas	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1	Materiais	33
3.2	Metodologia	33
3.2.1	Preparação das Amostras	33
3.2.1.1	Beneficiamento da matéria-prima.....	35
3.2.1.2	Desmineralização.....	35
3.2.1.3	Desproteínização	35
3.2.1.4	Despigmentação	35
3.2.1.5	Desacetilação	36
3.2.2	Caracterização das Amostras.....	36
3.2.2.1	Morfologia	36
3.2.2.2	Teor de cinzas	36
3.2.2.3	Solubilidade e Teor de insolúveis	37
3.2.2.4	Grau de desacetilação	37
3.2.2.5	Massa Molecular	38
3.2.2.6	Perfil cristalino.....	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	Morfologia/EDS.....	41
4.2	Teor de cinzas	45
4.3	Solubilidade e Teor de insolúveis.....	46

4.4	Grau de desacetilação	47
4.5	Massa Molecular	52
4.6	Perfil cristalino	53
5	CONCLUSÃO	56
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	57
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1 INTRODUÇÃO

Heteropolissacarídeo formado a partir de ligações $\beta(1-4)$ de D-glucosamina com N-acetil-D-glucosamina, a quitosana é um copolímero obtida por meio de desacetilação alcalina da quitina. Esta é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, podendo ser extraído de diversas fontes na natureza. Possui função energética e estrutural (Kumirska et al., 2011; Ngo et al., 2015).

A quitosana vem sendo bastante estudada e aplicada em diversas áreas, como, indústria de fertilizantes, aplicações físico-químicas, indústria alimentícia, e fortemente na área biomédica, devido as suas propriedades: biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa toxicidade, aceleração na formação de fibroblastos em tecidos vivos, aceleração da coagulação sanguínea, atividade antimicrobiana e antifúngica, complexação de metais pesados, propriedades flocculantes para limpeza de efluentes industriais e controle de pragas na agricultura. A aplicação de quitosana como biomaterial está diretamente relacionada à baixa toxicidade, à biocompatibilidade e à biodegradabilidade. A biodegradabilidade da quitina e da quitosana é bem estabelecida devido à estrutura química similar com o ácido siálico, um dos principais componentes celulares dos seres eucariontes (Uragami e Tokura, 2006; Shukla et al., 2013; Chiappisi e Gradzielski, 2015).

Diferenças entre as estruturas da quitina e da quitosana distinguem-nas em insolúvel e solúvel, respectivamente, frente a soluções diluídas de ácidos orgânicos. Esta restrição de solubilidade da quitina, faz com que a quitosana tenha mais fácil processamento e tenha mais aplicações práticas quando comparada à quitina, visto que os solventes para a quitina são tóxicos ao organismo humano (Kumirska et al., 2010).

As fontes naturais de quitina podem ser artrópodes, crustáceos, moluscos, fungos, micro-organismos. Dentre as fontes naturais, os crustáceos representam a classe com maior proporção de quitina, 15 a 20% em relação ao peso seco, podendo variar de acordo com a espécie e a sazonalidade (Thirunavukkarasu et al., 2011). Outro aspecto relevante a ser abordado em relação à obtenção de quitina e subsequente produção de quitosana por meio de exoesqueletos de crustáceos é a sustentabilidade do processo. Ou seja, uma fonte renovável que não é aproveitada pela indústria alimentícia e acaba gerando um resíduo sólido (Tahim, 2008).

O aproveitamento desse resíduo sólido derivado das carapaças de crustáceos para extração da quitina, torna esta cadeia de produção sustentável, renovável e reciclável. Uma vez que, aquilo que teoricamente não seria mais utilizado para determinados fins, vira matéria-prima para obtenção de produtos altamente aplicáveis para outras finalidades. A obtenção de quitina de exoesqueletos de crustáceos caracteriza este processo (Rego et al., 2010).

No Brasil, a demanda de crustáceos, como o camarão, especificamente no nordeste brasileiro é bastante relevante. A criação de camarão em cativeiro no nordeste brasileiro vem aumentando, uma vez que as condições ambientais favorecem a criação, como também a procura por esta fonte alimentícia é considerável (Castro e Pagani, 2004). No Brasil, algumas indústrias utilizam camarão para produção de quitosana. A quitosana obtida ainda não se encontra em grau de pureza adequado para direta aplicação, precisando ainda de processos de purificação. Sendo necessária a importação da quitosana para aplicação em pesquisas e desenvolvimento de produtos na área biomédica, com grau de pureza adequado (Cosgrove, 2010).

Dessa forma, o desenvolvimento de processo para extração de quitina e subsequente produção de quitosana a partir de exoesqueletos de camarão (*Litopenaeus vannamei* Boone) utilizando tecnologia nacional, para aplicações biomédicas e farmacêuticas é o objetivo deste trabalho.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão da literatura deste trabalho está organizada em dois tópicos, dentro dos quais serão abordados aspectos históricos, estruturais, químicos, físicos, propriedades e aplicações da quitina e de seu principal derivado, a quitosana. Como também, algumas pesquisas e metodologias que buscam obter quitosana.

2.1 Quitina

2.1.1 Fonte e Estrutura Química

Polissacarídeo nitrogenado, a quitina é classificada como um dos mais abundantes materiais orgânicos, sendo o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, estando atrás apenas da celulose (Muzzarelli et al., 1986; Younes e Rinaudo, 2015). Outras macromoléculas nitrogenadas como, o ácido murânico, ácido hialurônico, condroitina e heparina contêm o grupamento amina, contudo não se apresentam em grande abundância como a quitina. Este fato se deve à ocorrência da quitina em variadas fontes para extração, sendo elas, em animais, como, crustáceos, moluscos, insetos, em parede celular de alguns fungos e bactérias (Goycoolea et al., 2000), conforme apresenta a Tabela 1.

Com função estrutural e protetora, a quitina é um polímero linear organizado por ligações β (1-4) de vários grupamentos (2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranoose) ou N-acetil-D-glucosamina (Kumirska et al., 2010). A quitina e a celulose apresentam enorme semelhança estrutural, com diferença apenas na presença do grupamento acetamida no carbono 2 da quitina (Figura 1). Esta similaridade estrutural entre estes dois polímeros reflete na mesma função biológica, sendo, papel estrutural e na defesa dos organismos que as contêm (Pillai et al., 2009).

Tabela 1 – Ocorrência de quitina em organismos vivos.

Organismo	Estrutura	Quitina		Outros componentes	
		%Fração orgânica	Tipo cristalino	Inorgânicos	Orgânicos
FUNGI	Parece celular e				
<i>Ascomyceta</i>	membrana	Vestígios a 45%	-	-	Polissacarídeos, como glucomanans
<i>Basidiomyceta</i>	estrutural do				
<i>Phycomyceta Imperfecti</i>	micélio, caule e esporos.				
ALGAE	Parade celular	+	-	-	Celulose
<i>Chlorophyceae</i>					
MOLLUSCA	Carapaças; cerdas; rádula;			Carbonato de cálcio;	
<i>Polyplacophora</i>	mandíbulas;	12-37%	α ; β ; γ	Ferro; Sílica	Proteínas
<i>Gastropoda</i>	conchas				
<i>Cephalopoda</i>	calcificadas				
ARTHROPODA					
<i>Crustacea</i>	Exoesqueletos; cutículas	20-80%	α	Carbonato de cálcio	Proteínas; Resinas
<i>Diplopoda</i>					
<i>Insecta</i>					
<i>Arachnida</i>					

Fonte: Adaptado de (Roberts, 1992).

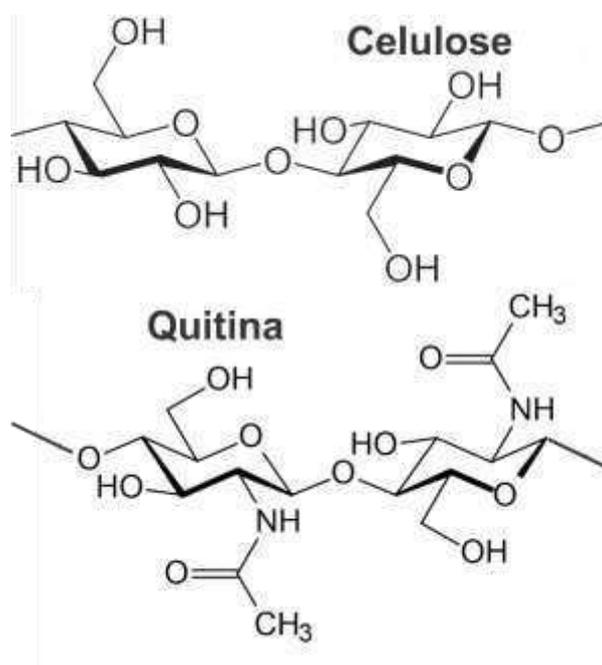


Figura 1 – Estrutura molecular da celulose e da quitina.

Isolada por Braconnot em seu trabalho, pela primeira vez, a quitina foi obtida de alguns fungos superiores, estando ainda na sua forma impura (Braconnot, 1811). A partir desta pesquisa outros trabalhos foram realizados a fim de extrair de diferentes fontes e purificá-la. Doze anos após o isolamento feito por Braconnot, o nome quitina (do grego - χιτων, túnica ou revestimento) foi atribuído pela primeira vez por Odier (Odier, 1823). Sendo assim, a literatura descreve quatro critérios químicos estruturais para a determinação da quitina (Roberts, 1992), sendo:

- a) Os componentes monossacarídeos;
- b) O tipo de anel – piranose ou furanose;
- c) Posicionamento da ligação glicosídica entre os sucessivos monossacarídeos; e
- d) Estereoquímica da ligação glicosídica.

Este polímero não está na forma isolada em suas devidas fontes, estando complexado com outras macromoléculas, como, proteínas e até mesmo, compostos inorgânicos, como carbonato de cálcio. Na literatura apenas dois tipos de diatomáceas *Thalassiosira fluviatilis* e *Cyclotella cryptica* foram reportadas com a presença da quitina na sua forma pura, ou simplesmente, isolada (Falk et al., 1966; Dweltz et al., 1968).

2.1.2 Estrutura física

Altamente ordenada, a quitina apresenta estrutura cristalina evidenciada em estudos por técnicas, como Difração de raios X (DRX), demonstrando padrões distintos e parâmetros característicos das respectivas células unitárias (Dweltz, 1961; Gardner e Blackwell, 1975; Minke e Blackwell, 1978)(Tabela 2).

Tabela 2 – Parâmetros das células unitárias das formas polimórficas da quitina.

Estrutura Polimórfica	a (Å)	b (Å)	c (Å)	Grupo Espacial	γ (graus)
α-quitina	4,74	18,86	10,32	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	90,0
β-quitina	4,85	9,26	10,38	P2 ₁	97,5
γ-quitina	4,70	28,4	10,30	P2 ₁	90,0

Fonte: (Campana-Filho et al., 2007).

Estudos estes demonstram que a quitina pode ser encontrada sob três formas polimórficas, α , β , γ , e cada forma apresenta um arranjo de cadeias e estruturas cristalinas distintas, que as levam a propriedades variadas (Pastor De Abram e Higuera, 2004). A α -quitina encontra-se com cadeias antiparalelas em diferentes lamelas ou folhas, o que favorece a existência de numerosas ligações de hidrogênio inter- e intra-cadeias da mesma lamela e de lamelas vizinhas. A β -quitina em cadeias paralelas, o que dificulta o estabelecimento de ligações de hidrogênio intermoleculares envolvendo cadeias de lamelas adjacentes e resulta em material menos densamente empacotado. E a γ -quitina a cada duas cadeias paralelas uma cadeia antiparalela, sendo esta última forma menos estudada e conhecida, sugerindo-se ainda que possa ser uma distorção das duas formas anteriores (Roberts, 1992; Campana-Filho et al., 2007)(Figura 2).

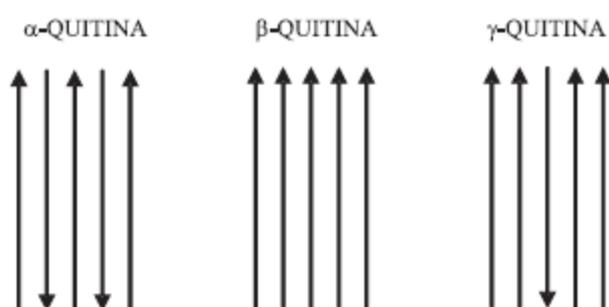


Figura 2 – Esquema ilustrativo do arranjo das cadeias poliméricas para as três formas de quitina (Campana-Filho et al., 2007).

A forma mais abundante na natureza é a α -quitina, como também mostra ser a forma mais estável, quando em comparação às formas β -quitina e γ -quitina, visto que a conversão das últimas formas na primeira é irreversível. A forma mais abundante, α -quitina, é encontrada em estruturas rígidas e resistentes, como a cutícula de artrópodes, e nesses casos ocorre fortemente associada a proteínas, materiais inorgânicos ou ambos. As outras formas, β -quitina e γ -quitina, encontram-se em estruturas flexíveis, contudo também resistentes (Rudall, 1955; 1969; Rudall e Kenchington, 1973; Rudall, 2011).

A estrutura das ligações químicas e a estrutura cristalina das cadeias da quitina, acarretam numa solubilidade limitada deste polímero em solventes. A literatura reporta a solubilidade da quitina em solventes fortes como, HCl, H₂SO₄ em elevadas concentrações e outros ácidos. Contudo a massa molecular da quitina diminui a partir

da dissolução desta nos solventes, devido à degradação da cadeia polimérica. Solventes como, tetróxido de dinitrogênio-N,N-dimetilformamida (DMF), lítio-cloro-N,N-dimetilacetamida (LiCl/DMAc), hexafluoroisopropanol e hexafluoroacetato são referidos para a solubilização da quitina, sem degradação polimérica. A dificuldade de solubilização da quitina leva a aplicações mais restritas, gerando uma menor aplicabilidade em pesquisas biomédicas, quando em comparação com seu principal derivado, a quitosana (Uragami e Tokura, 2006; Younes et al., 2016).

2.1.3 Método de extração

Apesar da abundância natural da quitina, muito da biomassa desta não é aproveitada como matéria-prima, divergindo da celulose. A estimativa global para o total anual de quitina que está acessível é de 150×10^3 toneladas de biomassa, dentre o qual, 56×10^3 toneladas de krill, 39×10^3 toneladas de mariscos (caranguejo, camarão, lagosta), 32×10^3 toneladas de fungos, 22×10^3 toneladas de ostras e 1×10^3 toneladas de lula (*Goycoolea et al.*, 2000).

As principais fontes de matéria-prima para obtenção de quitina em escala laboratorial são exoesqueletos de alguns crustáceos, como, caranguejo, lagosta e camarão. Nestes casos, a quitina (20-30%) está associada com proteínas (30-40%), material inorgânico, principalmente o carbonato de cálcio (30-50%), lipídeos (0-14%) e pigmentos, como astaxantina, cantaxantina, luteína e β -caroteno (Synowiecki e Al-Khateeb, 2003; Hayes et al., 2008; Al Sagheer et al., 2009)(Figura 3).

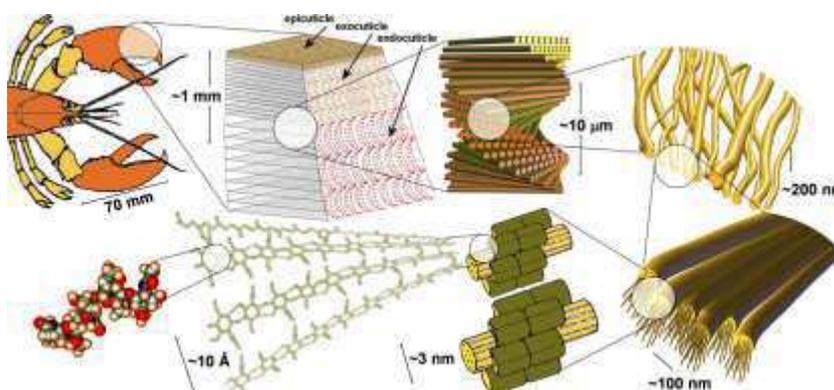


Figura 3 – Esquema ilustrativo para estrutura hierárquica da quitina em cutículas de artrópodes (Raabe et al., 2005; Pillai et al., 2009).

Apesar dos inúmeros trabalhos, não existe um procedimento padrão para retirada destes componentes, algumas vezes considerados como impurezas na obtenção de quitina. De forma geral, a obtenção de quitina a partir de exoesqueletos de crustáceos pode ser esquematizada em quatro etapas de processamento, sendo, beneficiamento da matéria-prima, desmineralização, desproteínização e despigmentação (Roberts, 1992)(Figura 4).



Figura 4 – Fluxograma esquemático das etapas de extração de quitina e obtenção de quitosana.

Vários trabalhos que tem como finalidade a extração de quitina e subsequente produção de quitosana citam inúmeras metodologias e rotas de produção, pelas quais pode-se obter quitosana com diferentes características e propriedades. O processo de desmineralização tem como objetivo a retirada do material inorgânico (minerais) da matéria-prima. Esta etapa é frequentemente realizada por um ataque ácido, citando, ácido clorídrico (HCl), ácido nítrico (HNO₃), ácido sulfúrico (H₂SO₄), ácido acético (CH₃COOH), ácido fórmico (HCOOH) e outros (Younes et al., 2016). Dentre estes exemplos o ácido clorídrico é o mais utilizado, e a reação de desmineralização para retirada do carbonato de cálcio segue conforme equação (1). Quanto ao ambiente térmico, alguns trabalhos citam a possibilidade de temperaturas entre 0 a 100°C, contudo temperatura mais elevadas do que a ambiente favorecem a hidrólise da cadeia polimérica, sendo, portanto, mais referido na literatura a desmineralização em temperatura de 20 – 30°C (WInterowd, 1995; Domard e Domard, 2001).



Buscando minimizar este efeito, foi utilizado ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) em ambiente alcalino, seguido por outro tratamento ácido (Foster e Hackman, 1957). A fim também de minimizar os efeitos agressivos dos tratamentos químicos, busca-se obter quitina por rotas biotecnológicas, como via enzimática ou processos por fermentação (via ácido láctico) microbiana, utilizando *Lactobacillus salvarius*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus acidilactici* e *Bacillus* como alternativa para a desmineralização da quitina em exoesqueletos de crustáceos (Beaney et al., 2005; Ghorbel-Bellaaj et al., 2012; Francisco et al., 2015).

Outra etapa de fundamental importância para a extração da quitina é a desproteínização, na qual consiste em remover a parte proteica presente na matéria-prima. Muitos estudos relacionam determinadas proteínas contidas no exoesqueleto de crustáceos com a incidência de alergias a estes animais. O que ressalta ainda mais a importância de retirá-las, a fim de garantir segurança. Um variado número de reagentes pode ser utilizado nesta etapa, sendo ataque alcalino em temperaturas moderadas a altas, 25°C a 100°C, o mais reportado. São citados carbonato de sódio (Na_2CO_3), bicarbonato de sódio (NaHCO_3), hidróxido de potássio (KOH), carbonato de potássio (K_2CO_3), hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), sulfito de sódio (Na_2SO_3), bissulfito de sódio (NaHSO_3), bissulfito de cálcio ($\text{Ca}(\text{HSO}_3)_2$), fosfato de sódio (Na_3PO_4), sulfeto de sódio (Na_2S) e, não menos importante, o hidróxido de sódio (NaOH), sendo este último o mais citado na literatura (Martin, 1982; Roberts, 1992; Goycoolea et al., 2000).

Por meio de processos biotecnológicos, foi sugerido o uso de enzimas proteolíticas, como pepsina e tripsina para a extração da fração proteica (Broussignac, 1968). Como também, investiga-se o uso de enzimas proteolíticas, proteinase, papaína, até mesmo, proteinases de bactérias, com um tratamento prévio usando EDTA (Gagne e Simpson, 1993).

O exoesqueleto de crustáceos contém algumas classes de pigmentos, principalmente, carotenoides, astacene, astaxantina, cantaxantina, luteína e β -caroteno, sendo estes os responsáveis pela coloração avermelhada das cascas e carapaças dos crustáceos. Estes componentes podem ser removidos por meio de extração com solventes polares, como etanol e acetona. Reagentes inorgânicos também podem ser utilizados, sendo, permanganato de potássio (KMnO_4), hipoclorito de sódio (NaOCl), dióxido de enxofre (SO_2), bissulfito de sódio (NaHSO_3), hipossulfito

de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Chen e Meyers, 1982; Muzzarelli e Peter, 1997; No e Meyers, 1997).

2.2 Quitosana

2.2.1 Produção de quitosana

Para a obtenção de quitosana, faz-se necessária uma transformação química na quitina, realizando uma reação de desacetilação como visto na Figura 4. Na qual consiste na modificação do grupamento acetamida em amina. A amina (D-glucosamina) acima de 50% em relação ao grupamento acetamida (N-acetil-D-glucosamina) caracteriza a obtenção de quitosana. A presença da subunidade D-glucosamina permite que a quitosana possa ser solúvel em soluções aquosas de ácidos orgânicos, ficando com a amina no seu estado protonado (Shukla et al., 2013). Em princípio a amida pode ser hidrolisada em condições ácidas e alcalinas, contudo a hidrólise ácida não é recomendada pela susceptibilidade da ligação glicosídica ser hidrolisada. Como também em sistemas heterogêneos ou homogêneos (Roberts, 1992; Goycoolea et al., 2000). Em síntese,

- a) Desacetilação heterogênea de quitina no estado sólido em meio aquoso;
- b) Desacetilação homogênea de quitina intumescida em meio aquoso.

Sabe-se que tanto para condições heterogêneas ou homogêneas de reação, para acontecer a desacetilação, faz-se necessária condições adequadas de processamento, como concentração do reagente, tratamento prévio, tamanho das partículas, quantidade de poros, temperatura (Muzzarelli e Rocchetti, 1985; Muzzarelli e Peter, 1997; Younes et al., 2014). A desacetilação em condições heterogêneas promove um grau de desacetilação (%GD) em torno de 85-95%. Em condições homogêneas de processamento, obtêm-se um %GD entre 70-90% (Nemtsev et al., 2002). Variações no %GD entre as duas formas de processamento e na distribuição uniforme dos grupamentos acetamida ao longo da cadeia são diferenças observadas no produto final, quitosana, provocando diferenças quanto à solubilização, à polidispersão, à massa molecular média e à viscosidade (Younes e Rinaudo, 2015). Rinaudo e Domard reportam que a solubilidade da quitosana pode ser caracterizada não apenas pelo %GD, mas também pela maneira como os grupamentos estão distribuídos na cadeia (Rinaudo e Domard, 1989).

Dessa forma, ataques alcalinos em altas temperaturas são os mais realizados para a desacetilação, contudo não é estabelecido um método padrão. Alguns reagentes como, hidróxido de potássio (KOH), hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), fosfato de sódio (Na_3PO_4) e hidróxido de sódio (NaOH) são citados para a desacetilação em condições alcalinas (Rigby, 1936). As altas concentrações de soluções alcalinas, juntamente com temperaturas elevadas, sugerem o menor tempo possível para que ocorra a desacetilação de forma adequada. Caso contrário, a degradação da cadeia polimérica se dá de forma muito intensa (Sannan et al., 1975; 1976; 1977). Condições variadas nesta etapa do processamento influenciam em algumas propriedades da quitosana como, grau de acetilação e massa molecular média da cadeia polimérica (Huei e Hwa, 1996; Rege e Block, 1999; Berger et al., 2005).

Processos biotecnológicos baseados na desacetilação da quitina por via enzimática são uma alternativa para minimizar os efeitos da rota química. Algumas enzimas denominadas desacetilases de quitina são utilizadas a fim de hidrolisar as ligações N-acetamida com o objetivo de se obter quitosana (Hamer et al., 2015). Estas enzimas podem ser obtidas em algumas espécies de fungos e insetos como, *Mucor rouxii*, *Aspergillus nidulans*, *Absidia coerulea* e *Colletotrichum lindemuthianum*. A obtenção de quitosana por reações enzimáticas é uma alternativa para maior controle das propriedades e características do produto final como, grau de acetilação, massa molecular média. Sendo uma alternativa que ainda está em escala laboratorial, devido à sensibilidade do processamento (Younes et al., 2014; Younes e Rinaudo, 2015).

2.2.2 Estrutura química e propriedades

Principal derivado da quitina, a quitosana foi reconhecida e descrita primeiramente por Rouget em 1859, por meio de tratamento à base de soluções concentradas de KOH, do qual obteve-se uma "quitina modificada", com solubilidade em soluções diluídas de ácidos orgânicos e com diferença na coloração (Rouget, 1859). Em 1894 Hoppe-Seyler descreveu a metodologia com KOH a 180°C usando carapaças de caranguejo, escorpião e aranhas, obtendo um produto altamente solúvel em solução de ácido acético e ácido clorídrico, ficando insolúvel pela adição de soluções alcalinas. Hoppe-Seyler nomeou o produto da sua pesquisa de quitosana, diferentemente de Rouget (Hoppe-Seyler, 1894).

A quitosana é um polímero linear com monossacarídeos de N-acetil-D-glucosamina com D-glucosamina ou 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosose unidos por meio de ligações glicosídicas $\beta(1-4)$. Diferentemente da quitina, a presença de grupamentos amina livres nos monossacarídeos D-glucosamina, promovem a solubilidade da quitosana em soluções diluídas de ácidos orgânicos, devido à protonação do grupamento amina quando em solução (Figura 5)(Kumirska et al., 2010).

Assim como a quitina, a quitosana no estado sólido apresenta estruturas organizadas e ordenadas quanto ao perfil cristalino coexistindo com regiões amorfas. Como também, o fator de cristalinidade e a estrutura molecular são fatores básicos e chaves para o perfil de solubilidade, propriedades mecânicas, e outras propriedades funcionais da quitosana (Goycoolea et al., 2000).

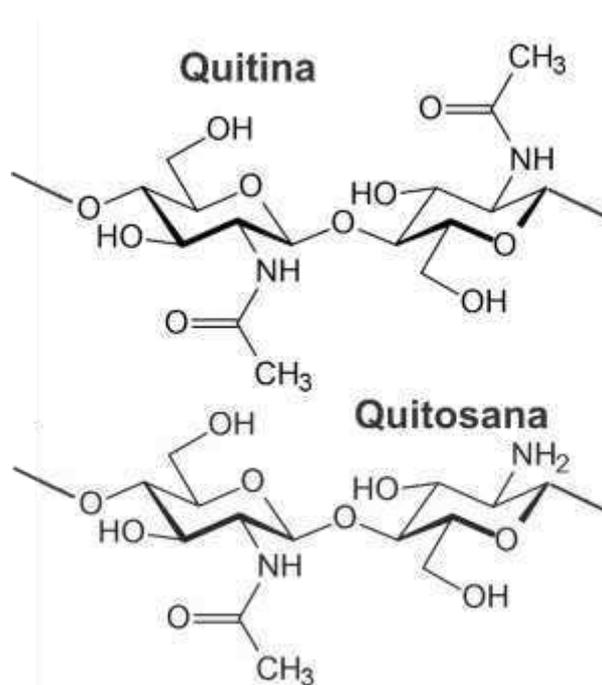


Figura 5 – Estruturas moleculares da quitina e da quitosana.

A quitosana tem uma alta reatividade química e bioquímica quando comparada à quitina, devido à porção D-glucosamina conter um grupamento amina livre. A quitosana é um dos poucos polieletrólitos catiônicos tanto para macromoléculas naturais quanto sintéticas. Este é um dos fatores que promove o interesse mundial em quitosana na área industrial de alimentos, cosméticos, biomédica, agricultura e outras. Além disto, outras propriedades como, biocompatibilidade com o organismo humano,

baixa toxicidade, biodegradabilidade, atividade antimicrobiana e antifúngica, aceleração na formação de fibroblastos dentre outras inúmeras propriedades, tornam a quitosana uma excelente alternativa em pesquisas biomédicas e em várias áreas e aplicações industriais (Kumirska et al., 2011).

2.2.3 Derivados e aplicações

Por meio da amina livre e reativa da quitosana várias modificações químicas podem ser realizadas a fim de se obter derivados da quitosana, com propriedades e aplicações bem definidas. No sentido de superar as limitações de solubilidade tanto da quitina como da quitosana, conversões estruturais destes polímeros em derivados tem sido sugeridas (Kim et al., 1997; Campana Filho e Desbrieres, 2000).

Dessa forma, reações de conversão do polímero em derivados a fim de aumentar o espectro de solubilidade em uma maior faixa de pH com propriedades específicas para determinada aplicação estudada, geralmente ocorrem nos grupamentos $-NH_2$ e $-OH$ (Chen et al., 2015). Com o intuito de promover a solubilização da quitosana em meios neutros a alcalinos, muitas reações de carboximetilação, de sais de amônio quaternário, de N-alkilação e N-acilação são realizadas (Abreu e Campana-Filho, 2005; Petit et al., 2015)(Figura 6).

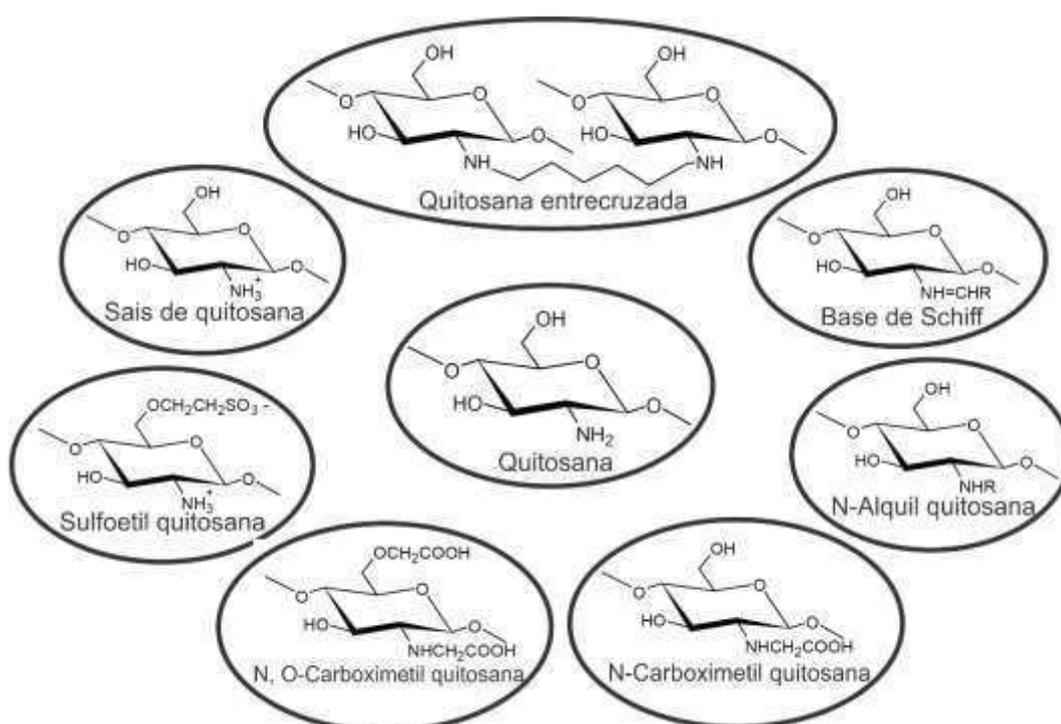


Figura 6 – Derivados da quitosana. Adaptado de (Campana Filho et al., 2007).

A O-carboximetilação da quitosana é geralmente executada por reação do polímero com ácido monocloroacético em suspensão de isopropanol/solução aquosa de hidróxido de sódio à temperatura ambiente. Os derivados carboximetilados de quitosana (O-, N- e O,N-carboximetilquitosana) são solúveis em ampla faixa de pH e apresentam propriedades que os qualificam para uso em muitas aplicações na área médica (Kennedy et al., 1996; Costain et al., 1997; Campana Filho e Fiamingo, 2015). A preparação de sais de amônio quaternário de quitosana introduz cargas positivas permanentes nas cadeias do polímero devido à quaternização dos átomos de nitrogênio dos grupos amino. A N,N,N-trimetilquitosana (TMQ), por exemplo, é solúvel em amplo intervalo de pH (Curti et al., 2003) e alguns trabalhos têm comprovado sua eficiência como auxiliar na absorção de drogas no intestino (Thanou, Mm et al., 2000; Thanou, M et al., 2000; Senra, 2015).

Os trabalhos têm se dedicado a esclarecer a relação entre as condições empregadas na N-metilação de quitosana e as características estruturais da TMQ resultante (Hamman e Kotze, 2001; Snyman et al., 2002; Senra et al., 2015), como também entre as características estruturais e as propriedades de TMQ, tais como a capacidade de auxiliar na absorção de drogas, toxicidade (Hamman e Kotze, 2001) e atividade mucoadesiva (Snyman et al., 2003).

2.2.3.1 Aplicações biomédicas e farmacêuticas

Observa-se um aumento considerável em patentes no mundo que envolvem o uso de quitosana em diferentes áreas como, agricultura, cosmética, indústria alimentícia e aplicações biomédicas e farmacêuticas. As bases de dados e publicações mostram um crescente número de pesquisas que envolvem quitosana e seus derivados (Cheung et al., 2015; Peniche e Becherán, 2015)(Figura 7).

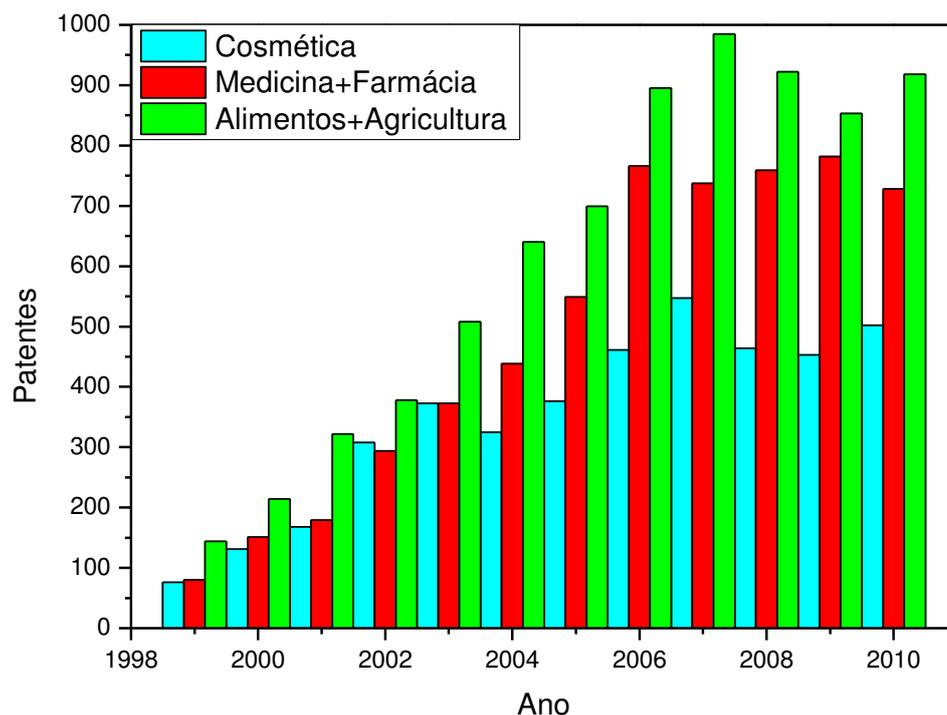


Figura 7 – Patentes que utilizam quitosana entre os anos de 2000 e 2010 nas áreas de cosmética, farmácia, medicina, alimentos e agricultura. Adaptado de (Peniche e Becherán, 2015).

As propriedades da quitina e da quitosana, para determinadas aplicações, tornam-nas bastante atrativas em aplicações farmacêuticas e biomédicas. Quitina e mais facilmente a quitosana podem ser processadas, dependendo da aplicação, em diferentes conformações como, pó, filmes, fibras, esponjas, pérolas, solução, gel, cápsulas. Assim, a quitosana pode ser usada por via oral, nasal, ocular, de forma implantável, injetável, tendo bastante atenção para a engenharia de tecidos, cosmetologia, aplicações farmacêuticas, tanto para farmacotécnica como em sistemas de liberação de fármacos, e aplicações biomédicas, como curativos, fios de sutura, implantes (Peniche e Becherán, 2015; Younes e Rinaudo, 2015).

Quitosana ou compósitos formados a partir desta com outros polímeros sintéticos ou naturais e até mesmo compostos cerâmicos são utilizados como materiais para liberação de fármacos como, micropartículas, encapsulação de fármacos, proteínas, peptídeos, genes, sistemas matriciais. Na engenharia de tecidos, como gel, *scaffolds*. No reparo tecidual e cicatrização de feridas. Como excipiente farmacêutico (Anitha et al., 2014). As possibilidades de aplicações e formas para

sistemas de quitina e quitosana nas áreas biomédicas e farmacêuticas estão sumarizadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Principais aplicações de quitina e quitosana na área biomédica e farmacêutica.

Formas	Aplicações
Pérolas	Liberação de fármacos
Microesferas	Imobilização de enzimas
Nanopartículas	Encapsulação de fármacos
Revestimento	Modificadores de superfície Sutura
Fibras	Regeneração óssea
Nanofibras	<i>Scaffold</i> para regeneração de tecido nervoso Cicatrização dérmica
Filmes	Membranas de dialises Atividade antitumoral Adsorvente para dispositivos médicos e farmacêuticos
Pó	Pó para luvas cirúrgicas Imobilização de enzimas Curativo hemostático
Espunjas	Curativo Liberação de fármacos Pele artificial Cosméticos
Soluções	Agente bacteriostático Agente hemostático Agente antitumoral Engenharia de tecido Curativos para tratamentos
Gel	molhados Implantes Revestimentos
Comprimidos	Diluyente Excipiente

Fonte: Adaptado de (Younes e Rinaudo, 2015).

Para aplicações biomédicas e farmacêuticas exige-se um grau de qualidade e pureza adequadas da quitosana para determinadas finalidades. O processamento desde a matéria-prima até o produto final, a quitosana, é de fundamental importância para a qualidade e segurança do produto, tendo em vista determinadas aplicações. Busca-se produzir quitosana para variadas aplicações, contudo, para aplicações biomédicas, faz-se necessário determinar parâmetros que assegurem a segurança, qualidade e eficácia (Szymańska e Winnicka, 2015). Embora a aplicabilidade de produtos à base de quitosana destinados à área biomédica amplie cada vez mais, ainda falta requisitos claros e bem definidos acerca do uso de quitosana como excipiente farmacêutico. As primeiras monografias sobre quitosana e cloridrato de quitosana foram reportadas pela primeira vez nas Farmacopeias Europeia e dos Estados Unidos, respectivamente (Europe, 2007; USA, 2011)(Tabela 4).

Tabela 4 – Critérios para cloridrato de quitosana e quitosana na Farmacopeia Europeia 6.0 e na Farmacopeia dos Estados Unidos 34-NF 29.

Parâmetros	Critérios de aceitação	
	Far. Eur. 6.0 Cloridrato de quitosana	USP 34-NF 29 Quitosana
Aspecto do pó	Pó fino branco ou quase branco	n.d.
Grau de desacetilação	70,0 – 95,0%	70,0 – 95,0%
Polidispersão*	n.d.	0,85 – 1,15
pH de solução de 1% (g/mL)	4,0 – 6,0	n.d.
Perda por dessecação*	n.d.	≤5,0%
Teor de cinzas	≤1%	≤0,5%
Insolúveis	≤0,5%	≤1,0%
Metais pesados	≤40ppm	≤10ppm
Ferro	n.d.	≤10ppm
Proteínas	n.d.	≤0,2%
Contaminação microbiana	n.d.	Ausência de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>

Legenda: * determinado em 1g de amostra; n.d. não determinado. **Fonte:** Adaptado de (Europe, 2007; USA, 2011).

Encontra-se comercialmente quitosana em vários graus de pureza, massa molecular e grau de desacetilação. A variada fonte e processamento para obtenção da quitosana levam a grandes diferenças na qualidade e propriedades dos produtos. O processamento para obtenção da quitosana envolve etapas básicas de purificação como, desmineralização e desproteínização, contudo, ainda assim, pode-se encontrar impurezas como, elevado teor de cinzas, metais pesados e proteínas. O grau de pureza da quitosana é um fator que afeta não só as propriedades biológicas como, biodegradabilidade e a baixa toxicidade, mas pode afetar também a solubilidade e a estabilidade (Cheung et al., 2015; Szymańska e Winnicka, 2015).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Acetato de Sódio – (Grupo Química, lote: 1093)

Ácido Acético Glacial - (Neon, lote: 21352)

Ácido Clorídrico – (Isofar, lote: 141861)

Ácido Sulfúrico – (Synth, lote: 151095)

Água destilada – CERTBIO

Brometo de Potássio – (Neon, lote: 3166)

Casca de camarão *Litopenaeus vannamei* Boone – (Fazenda Aquamaris S.A.)

Etanol – (Toscano, lote: 259)

Hidróxido de Sódio – (Neon, lote: 21025)

N-acetil-glucosamina – (Sigma Aldrich, lote:SLBF8809V)

3.2 Metodologia

3.2.1 Preparação das Amostras

As amostras foram preparadas conforme a Tabela 5. Diferentes tempos de reação nas etapas do processo foram testados a fim de se obter diferentes características e propriedades variadas.

Tabela 5 – Lotes das amostras e seus respectivos tempos de reação.

LOTES	DESMINERALIZAÇÃO	DESPROTEINIZAÇÃO	DESACETILAÇÃO
1	24 horas	3 horas	6 horas
2	6 horas	3 horas	4 horas
3	2 horas	3 horas	6 horas
4	0,5 hora	3 horas	6 horas
5	6 horas	3 horas	6 horas

A Figura 8 resume esquematicamente como se deu o processo de produção de quitosana deste trabalho, desde o recebimento da matéria-prima até a obtenção do produto final, a quitosana.

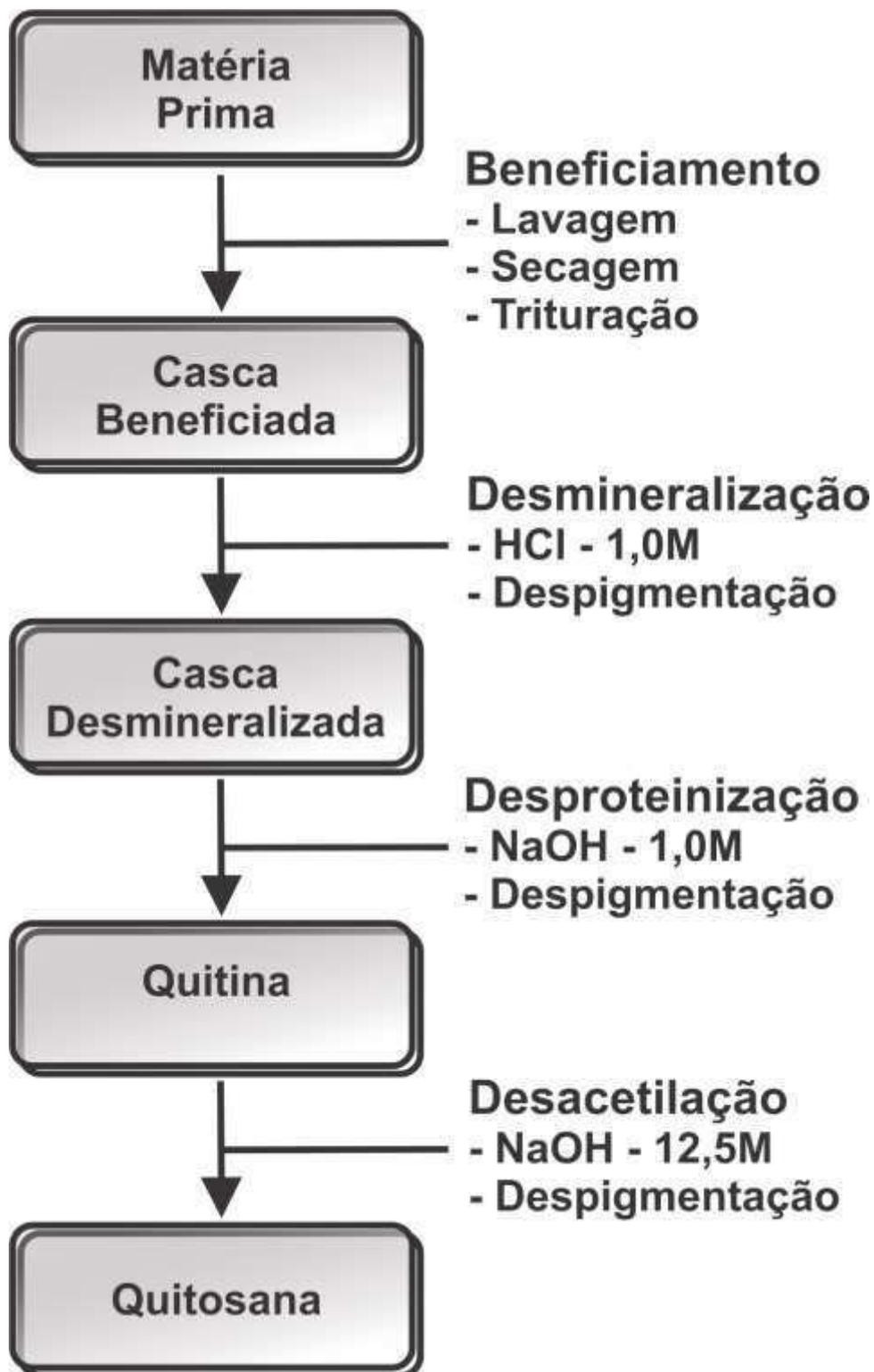


Figura 8 – Fluxograma do processo de produção de quitosana.

3.2.1.1 Beneficiamento da matéria-prima

A matéria-prima utilizada neste trabalho foi a casca de camarão da espécie *Litopenaeus vannamei* Boone fornecida pela Fazenda Aquamaris S.A. O beneficiamento da casca deu-se pelas seguintes etapas: recebimento da casca e seleção das partes que foram utilizadas; retirada de impurezas, seguida de lavagem com água corrente; secagem em estufa com circulação de ar a 90°C por 6 horas e seguinte trituração, utilizando um triturador de lâminas até 40-50 mesh.

3.2.1.2 Desmineralização

O processo de desmineralização foi realizado por meio de hidrólise ácida em uma reação heterogênea, utilizando a razão massa/volume (1g/10mL). A solução de ácido clorídrico a 1 mol/L foi vertida sobre o pó da casca de camarão, sob agitação mecânica 250 rpm (rotação por minuto) em temperatura de 25°C e tempos variados conforme os lotes. Após o término da reação, a casca desmineralizada foi filtrada à vácuo e lavada com água destilada até obter pH neutro, e posterior secagem em estufa a 70°C.

3.2.1.3 Desproteíntização

A etapa de desproteíntização é iniciada com a casca devidamente desmineralizada e seca. A reação heterogênea deu-se em um ambiente alcalino de solução de hidróxido de sódio a 1 mol/L, com uma razão de (1g/20mL), sob agitação mecânica 250 rpm e temperatura de 80°C por 180 minutos. Após o tempo de reação, a quitina foi lavada e filtrada conforme o processo da etapa de desmineralização, e posterior secagem em estufa a 70°C.

3.2.1.4 Despigmentação

A despigmentação foi efetuada em cada etapa após o processo de lavagem e filtração. Foi utilizado o etanol como solvente para o pigmento ficando em contato com o material por um tempo de 10 minutos, e posterior secagem em estufa a 70°C.

3.2.1.5 Desacetilação

A desacetilação ocorreu em um ambiente fortemente alcalino, utilizando solução de hidróxido de sódio 12,5 mol/L, utilizando a quitina extraída das etapas anteriores. A reação heterogênea com razão de (1g/15mL) foi submetida ao congelamento em ultrafreezer por 24 horas Posteriormente, o material congelado foi aquecido à temperatura de 115°C sob agitação mecânica 250 rpm por períodos de 4 ou 6 horas. Após o tempo de reação, a quitosana foi filtrada com água destilada até pH neutro, e posterior secagem em estufa a 70°C. Quando seca, a quitosana foi triturada em triturador de lâminas até 40 – 50 mesh.

3.2.2 Caracterização das Amostras

3.2.2.1 Morfologia

A análise morfológica das amostras foi obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura de bancada Hitachi, modelo TM-1000, profundidade de foco de 1 mm, resolução de 30 nm, e potencial de aceleração de elétrons 15 KV, baixo vácuo e pressão variada (1 a 270 Pa). O MEV é equipado com detector de espectroscopia de energia dispersiva (EDS).

3.2.2.2 Teor de cinzas

Para determinar a quantidade de matéria inorgânica presente nas amostras foi realizado um ensaio (em triplicada) do teor de cinzas sulfatadas, segundo a Farmacopeia Brasileira 5ª Edição Vol. 1 – 5.2.10 (Brasil, 2010). Nesse procedimento, aproximadamente 1g da amostra (em triplicata) foi colocada em cadinho de porcelana previamente calcinado, esfriado em dessecador, tarado e, em seguida, umedecida com 1mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄). Em seguida, o cadinho foi brandamente aquecido até a incineração a uma temperatura não superior a 600°C ± 50°C por 30 minutos. Então, o cadinho foi esfriado e o resíduo foi umedecido com 1mL de H₂SO₄. Prontamente, aquece-se o cadinho ponderadamente até 600°C ± 50°C, para a carbonização. Logo após, o cadinho foi esfriado, pesado e incinerado novamente por

mais 30 minutos. O procedimento foi repetido até que a diferença entre pesagens consecutivas fosse menor que 0,5 mg. Por fim, foi calculado o percentual de cinzas sulfatadas em relação às amostras iniciais, utilizando a equação 2.

$$\%Cinzas\ sulfatadas = \frac{P2-P1}{P3} \times 100 \quad (2)$$

onde;

P1 = Peso do cadinho após a calcinação e esfriamento (tara do cadinho);

P2 = Peso do cadinho com amostra após a calcinação e esfriamento em dessecador;

P3 = Peso da amostra inicial.

3.2.2.3 Solubilidade e Teor de insolúveis

A quitosana obtida em cada lote foi avaliada quanto à solubilidade em solução ácida diluída de ácido acético a 1% (v/v). O teor de insolúveis foi quantificado de acordo com o proposto pela ASTM F2103-11 “*Standard Guide for Characterization and Testing of Chitosan Salts as Starting Materials Intended for Use in Biomedical and Tissue- Engineered Medical Product Applications*” (Astm, 2011), na qual propõe a quantificação em massa do total de resíduos insolúveis retidos por filtração em comparação com a massa inicial.

3.2.2.4 Grau de desacetilação

O %GD das amostras foi determinado a partir das técnicas espectroscópicas, infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e espectroscopia de UV-Visível.

O equipamento utilizado para a análise foi o Spectrum 400 Perkin Elmer utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr), com razão de 1:60 (amostra:KBr), em uma faixa de varredura de 400 a 4000 cm^{-1} . Por FTIR a determinação do %GD seguiu as metodologias propostas por (Domszy e Roberts, 1985; Roberts, 1992; Brugnerotto et al., 2001), sendo utilizado linhas de base para o cálculo das áreas integradas dos picos centrais característicos da amida I (1655 cm^{-1}) e do grupamento hidroxila (3450 cm^{-1}), como também dos picos centrais do grupamento amida III (1320 cm^{-1}) e do grupamento CH_2 (1420 cm^{-1}), conforme a equação 3, 4 e 5, respectivamente. E assim, posterior tratamento matemático dos dados obtidos.

$$\%GD = 100 - \left(\frac{A_{1655}}{A_{3450}} \right) \times \left(\frac{100}{1,33} \right) \quad (3)$$

$$\%GD = 100 - \left(\frac{A_{1655}}{A_{3450}} \right) \times 115 \quad (4)$$

$$\%GD = 100 - \left(\left(\frac{A_{1320}}{A_{1420}} \right) - 0,3822 \right) / 0,03133 \quad (5)$$

O equipamento utilizado para análise foi o espectrômetro UV-Visível Cary 50 Bio - Varian com cubeta de quartzo com caminho ótico de 1cm e volume de 4mL com faixa de varredura compreendida entre 190 – 240 nm. Foi utilizada a metodologia da primeira derivada para a determinação do %GD das amostras de quitosana proposta por (Muzzarelli e Rocchetti, 1985). Foram preparadas três soluções de ácido acético 0,005 mol/L, 0,01 mol/L e 0,015 mol/L para determinação do ponto invariante da concentração de ácido acético. Soluções de N-acetil-glucosamina foram preparadas tendo como solvente solução de ácido acético 0,01 mol/L, nas seguintes concentrações, 10, 15, 20, 25, e 30mg/L para obtenção da curva de calibração, na qual foram plotados os valores das concentrações no eixo das abcissas, e no eixo das ordenadas os valores para a diferença entre as distâncias do ponto invariante das soluções de ácido acético para as soluções de N-acetil-glucosamina.

As soluções de quitosana para cada lote foram preparadas com concentração de 1mg/mL em solução de ácido acético 0,01 mol/L. De forma semelhante ao método empregado para curva de calibração, foi calculado na curva da primeira derivada, a diferença entre as distâncias. Sendo assim, foram calculados os %GD de acordo com a curva de calibração. E posterior tratamento matemático dos dados obtidos.

3.2.2.5 Massa Molecular

A massa molecular (MM) das amostras foi obtida por viscosimetria intrínseca. A técnica está baseada na equação de Mark Houwink Sakurada (equação 6). Foi utilizado um viscosímetro de Ubbelohde, como sistema solvente solução de ácido acético e acetato de sódio 0,3 mol/L /0,2 mol/L, utilizando um banho termostático de silicone a 25°C. Os valores para as constantes utilizadas foram $K=0,076$ mL/g e $\alpha=0,76$ (Rinaudo et al., 1993).

$$[\eta] = K \cdot M_v^\alpha \quad (6)$$

onde;

$[\eta]$ = Viscosidade intrínseca;

$K; \alpha$ = Constantes viscosimétricas;

M_v = Massa molecular viscosimétrica média.

Foram medidos os tempos de escoamento para o sistema solvente (t_0) e para as soluções de quitosana diluídas (t). A partir da razão entre os tempos de escoamento (t/t_0), foi obtido o valor da viscosidade relativa (η_{rel}), conforme equação 7.

$$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{t\rho}{t_0\rho_0} \cong \frac{t}{t_0}, \rho \approx \rho_0 \quad (7)$$

A partir da viscosidade relativa, obteve-se a viscosidade específica (η_{sp}) conforme equação 8.

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = \frac{\eta}{\eta_0} - 1 \quad (8)$$

A razão entre a viscosidade específica e a concentração das soluções de quitosana, permitiram o cálculo da viscosidade reduzida (η_{red}) conforme equação 9.

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c} = \frac{\eta_{rel} - 1}{c} = \frac{\left(\frac{\eta}{\eta_0} - 1\right)}{c} \quad (9)$$

A partir disto, obteve-se uma curva da viscosidade reduzida (η_{sp}/C) em função da concentração (C) para cada amostra com soluções de quitosana em distintas e conhecidas concentrações. A partir da curva construída e com ajuste linear adequado, foi extrapolado o valor de $[\eta]$ no eixo das ordenadas, e assim, posterior tratamento matemático dos valores obtidos de acordo com a equação 6 e com os valores, antes citados, das constantes viscosimétricas.

3.2.2.6 Perfil cristalino

Para avaliação do perfil cristalino das amostras foi empregando um difratômetro modelo XRD 7000 (Shimadzu), com radiação Cu K α ($\lambda=1,5418 \text{ \AA}$), passo de varredura $0,02^\circ$ e varredura angular de $5^\circ < 2\theta < 40^\circ$, tensão de 40kV e corrente 30mA. O grau de cristalinidade (%GCr) foi calculado estimando a relação entre a contribuição da fase amorfa e da fase cristalina de acordo com o proposto por (Osorio-Madrado et al., 2010) (equação 10).

$$\%GCr = 100 \times A_{Crist} / A_{Total} \quad (10)$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Morfologia/EDS

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica que possibilita a obtenção de imagens com poder de resolução elevado, quando comparado à microscopia óptica. Permitindo através da técnica a análise dos aspectos morfológicos de materiais. Como também, a análise espectroscópica por energia dispersiva, determinando a composição química dos mesmos.

A partir das imagens obtidas por MEV da casca beneficiada de camarão, após as etapas de desmineralização e desproteíntização, assim como da quitosana obtida para cada lote, pode-se observar diferenças nas superfícies das partículas, evidenciando que o tratamento químico modifica o aspecto morfológico do material.

Para as imagens da casca beneficiada (Figura 9), observa-se uma superfície compacta com diferentes níveis de estrutura, assim como, a presença de partículas menores com forma arredondada destacada com cor branca na superfície, sendo associadas à fase mineral, o carbonato de cálcio, como pode-se constatar no EDS da área total e no EDS pontual (Tabela 6).

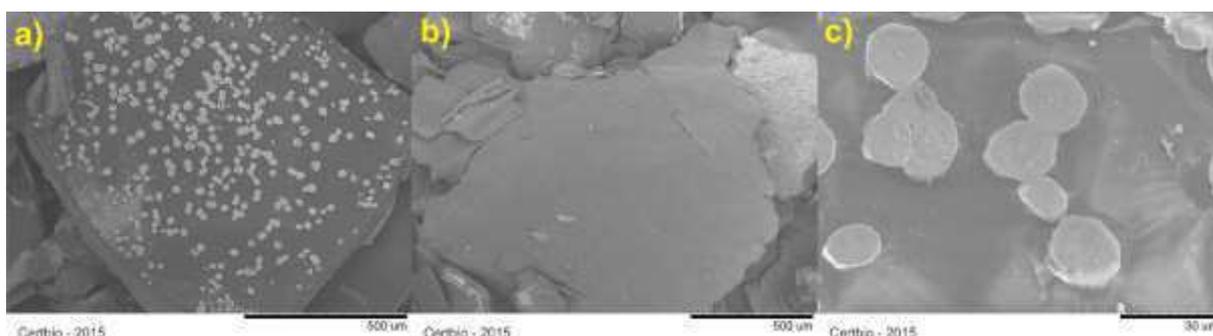


Figura 9 – Imagens obtidas por MEV da casca de camarão (*Litopenaeus vannamei* Boone) com magnificações a) 150x, b) 200x e c) 2000x.

Para as imagens da casca após a desmineralização (Figura 10), observou-se um aspecto distinto em comparação à casca beneficiada. Para esta etapa, nota-se a presença de canais de poros na superfície da casca (a) (Baticados et al., 1987). Observou-se também, a mudança no aspecto da superfície, estando as partículas, visivelmente com aspecto fibroso, indicando o efeito do tratamento químico.

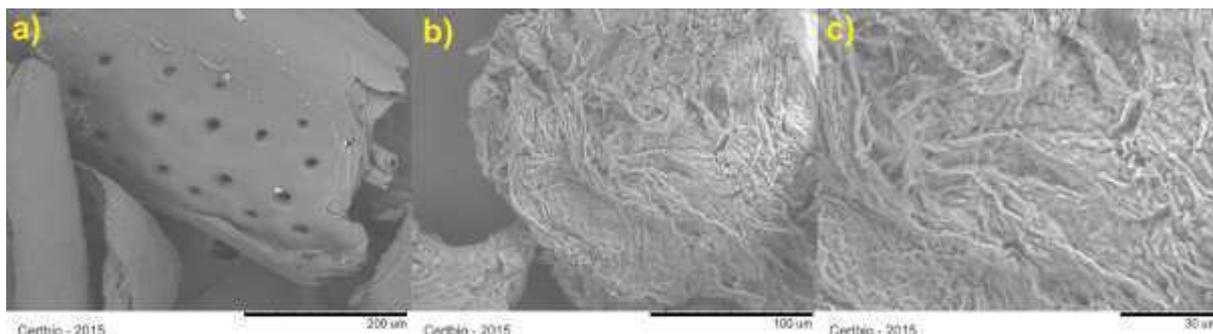


Figura 10 – Imagens obtidas por MEV da casca de camarão após desmineralização com magnificações a) 500x, b) 1000x e c) 2000x.

As imagens obtidas da quitina, ou seja, da casca após a desmineralização e desproteíntização (Figura 11), também apresentaram uma mudança de aspecto em relação à casca beneficiada. Nota-se a partir das imagens, o aspecto fibroso mais acentuado comparado à etapa de desmineralização.

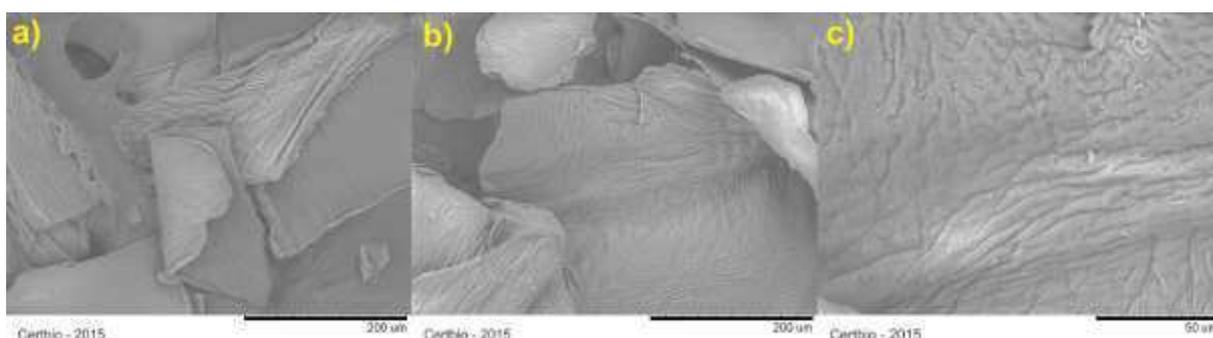


Figura 11 – Imagens obtidas por MEV da casca de camarão após desproteíntização (quitina) com magnificações a) 500x, b) 500x e c) 1500x.

As imagens obtidas por MEV para a quitosana de cada lote I, II, III, IV e V (Figura 12, Figura 13, Figura 14, Figura 15 e Figura 16), respectivamente, apresentaram-se semelhantes quanto ao aspecto morfológico. Observou-se, também, o aspecto fibroso da superfície para todos os cinco lotes, e o perfil multicamadas nas bordas das partículas.

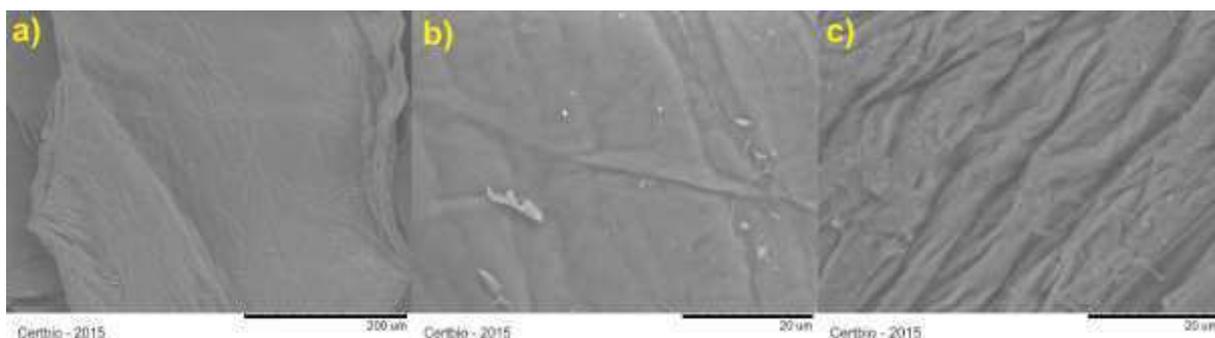


Figura 12 – Imagens obtidas por MEV da quitosana – Lote I com magnificações a) 500x, b) 4000x e c) 4000x.

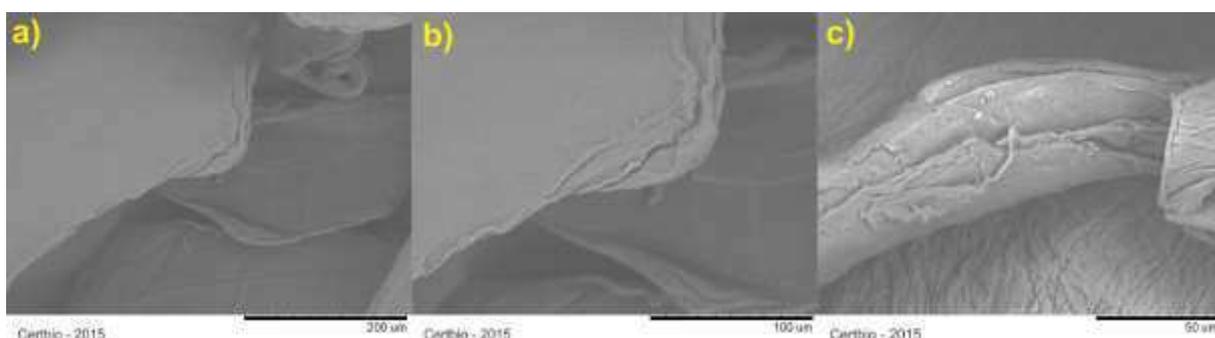


Figura 13 – Imagens obtidas por MEV da quitosana – Lote II com magnificações a) 500x, b) 1000x e c) 2000x.

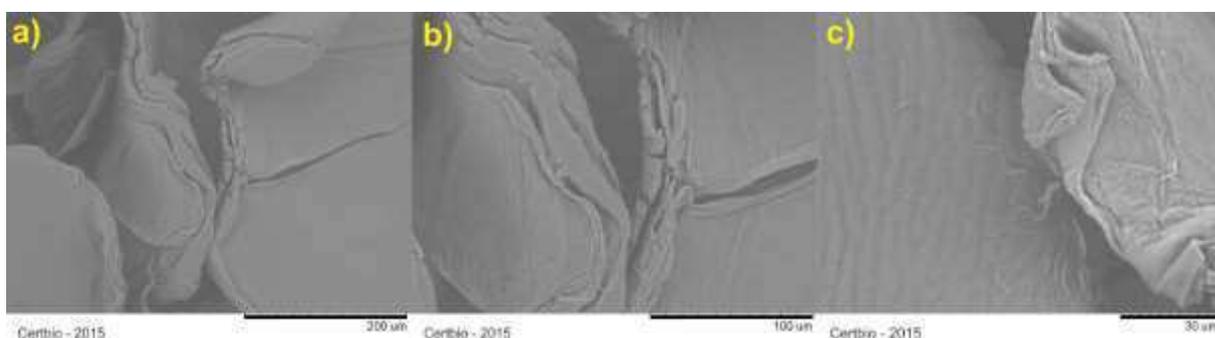


Figura 14 – Imagens obtidas por MEV da quitosana – Lote III com magnificações a) 500x, b) 1000x e c) 2000x.

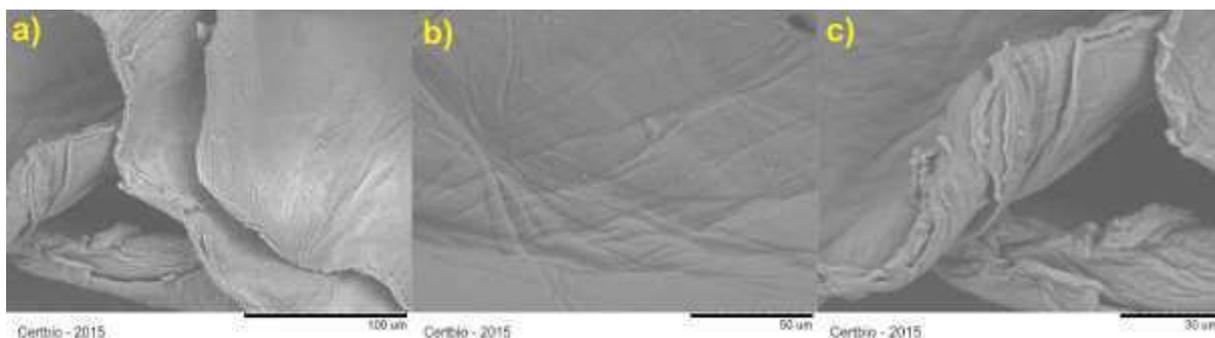


Figura 15 – Imagens obtidas por MEV da quitosana – Lote IV com magnificações a) 1000x, b) 1500x e c) 2000x.

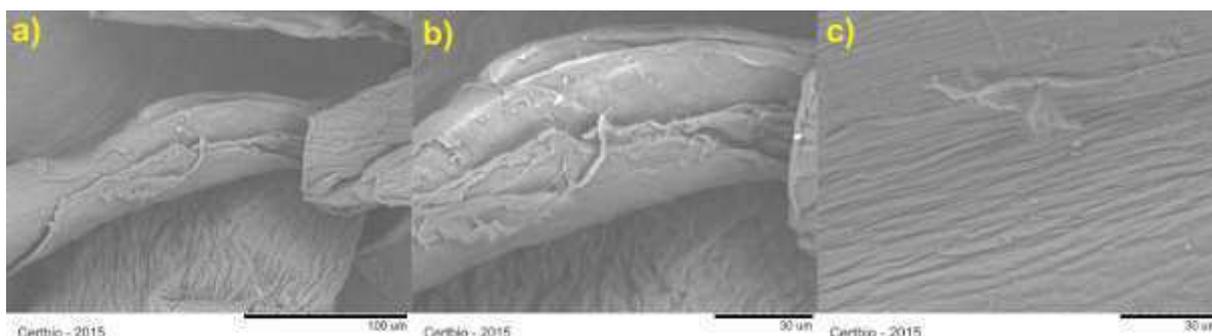


Figura 16 – Imagens obtidas por MEV da quitosana – Lote V com magnificações a) 1000x, b) 2000x e c) 2000x.

Na Tabela 6 são exibidos os resultados qualitativos para a composição química da casca beneficiada em dois pontos distintos, após a desmineralização, após a desproteínização (quitina), como para a quitosana de cada lote obtidos por EDS.

Tabela 6 – Resultado de EDS para as amostras da casca beneficiada, desmineralizada, quitina e de quitosana para cada lote.

Amostra	Carbono (m%)	Oxigênio (m%)	Nitrogênio (m%)	Cálcio (m%)
Casca*	29,77	28,68	7,33	34,23
Casca	42,10	32,38	12,51	13,02
DM**	56,70	32,30	11,00	0,00
Quitina	50,51	40,33	9,16	0,00
Lote 1	45,36	43,06	11,57	0,00
Lote 2	46,03	41,65	12,32	0,00
Lote 3	44,26	44,18	11,56	0,00
Lote 4	45,80	43,36	10,84	0,00
Lote 5	50,70	41,99	7,31	0,00

Legenda: * Resultado para região rica em círculos brancos; ** Casca desmineralizada.

Os resultados obtidos para a casca, evidenciam uma percentagem em massa para cálcio considerável de 13%, estando relacionado à fase mineral, carbonato de cálcio. Para a análise pontual das partículas menores com forma arredondada foi observado um percentual de cálcio de 34%, indicando que a composição química destas partículas é predominantemente cálcio.

Os resultados para a casca após a desmineralização confirmam a eficiência neste processo, uma vez que, não foi mais identificado cálcio na amostra, estando presente, portanto, carbono, nitrogênio e oxigênio, elementos representativos do material analisado. Para a quitina também não se observou a presença de cálcio, como também não foi identificado nenhum outro elemento possível de contaminação ou impurezas.

Para as amostras de quitosana dos cinco lotes, foi evidenciado a presença de carbono, nitrogênio e oxigênio, elementos representativos da quitosana. Não foi identificado cálcio em nenhuma amostra, como também, nenhum outro elemento químico possível de contaminação ou impurezas.

4.2 Teor de cinzas

O teor de cinzas sulfatadas para as amostras de quitosana estabelece um critério de pureza quanto à fase mineral ou possível contaminação com outros compostos minerais ou até mesmo metálicos. Os resultados obtidos para o teor de cinzas das amostras de quitosana para cada lote estão sumarizados na Tabela 7.

Tabela 7 - Teor de cinzas sulfatadas para as amostras de quitosana.

Amostra (n=3)	Teor de cinzas (%)
Lote 1	0,007
Lote 2	0,063
Lote 3	0,053
Lote 4	0,010
Lote 5	0,047

Os resultados obtidos para o teor de cinzas são satisfatórios quanto ao exigido pelos compêndios oficiais para quitosana e seus derivados com elevado grau de pureza, visando aplicações biomédicas. Para as amostras, o teor de cinzas ficou entre 0,007 – 0,063% estando dentro das especificações normatizadas pela USP 34-NF 29, visto que esta estabelece valores abaixo de 0,5% de cinzas.

A etapa de desmineralização das amostras se mostrou efetiva e capaz de retirar a fração mineral encontrada na casca do camarão, estando na sua maioria

representada pelo carbonato de cálcio. O resultado para o lote 4 mostra que o tempo de 30 minutos de desmineralização foi efetivo para a descarbonatação da matéria-prima empregada.

4.3 Solubilidade e Teor de insolúveis

A solubilidade da quitosana em soluções aquosas de ácidos orgânicos é um parâmetro de extrema importância tanto para o processamento quanto para determinadas aplicações. Uma maneira prática de diferenciar a quitosana da quitina é a solubilidade daquela em soluções aquosas de ácidos orgânicos, quando em comparação com a quitina, que, por sua vez, solubiliza-se em solventes mais específicos.

De forma objetiva a solubilidade da quitosana quando em solução de ácidos fracos é realizada de maneira visual. Quando na solução existe a presença de partículas insolúveis e dispersas no sistema, infere-se que a quitosana não é totalmente solúvel, podendo ser alguma impureza, grau de desacetilação baixo ou problemas na obtenção. Uma maneira mais precisa de análise da solubilidade da quitosana é avaliar o teor de insolúveis presentes em solução por análise da massa residual restante, quando em comparação à massa inicial de quitosana pesada para a solução (Figura 17).

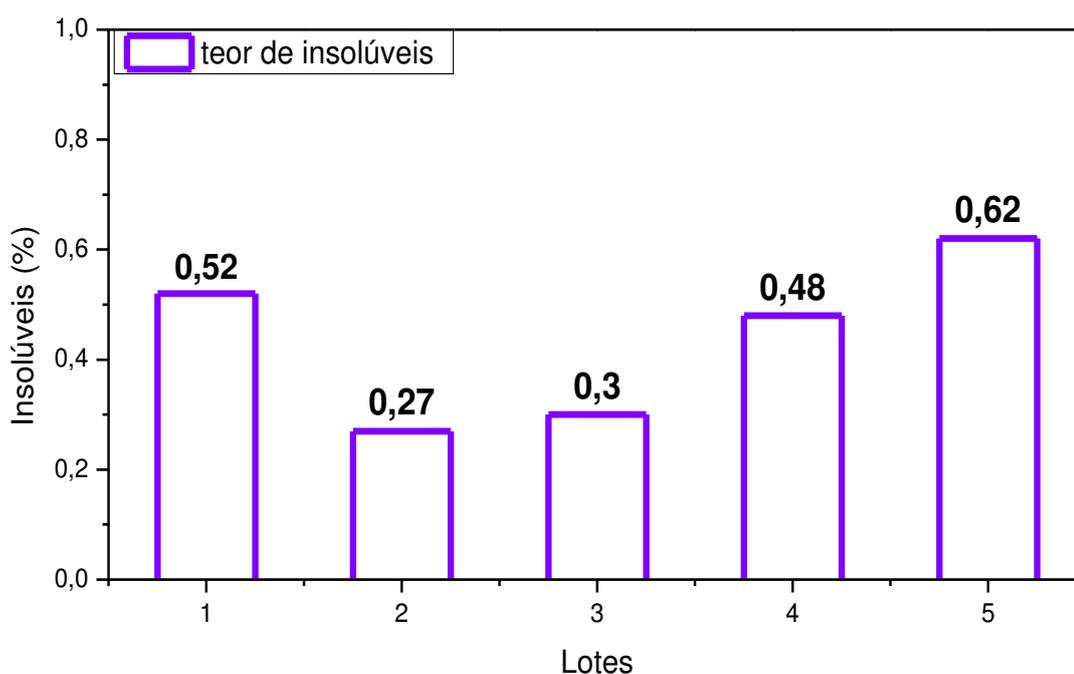


Figura 17 – Teor de insolúveis (%) para as amostras de quitosana em solução de ácido acético 1% (v/v).

Os valores obtidos para o teor de insolúveis das amostras de quitosana para cada lote se apresentaram dentro das especificações da USP 34 NF-29, estando, portanto, abaixo de 1,0%. A partir deste resultado, infere-se que a obtenção de quitosana se deu de forma adequada e satisfatória para aplicações biomédicas e farmacêuticas quanto ao teor de insolúveis. Uma vez que, a presença de insolúveis pode ser ocasionada por impurezas, processo de desacetilação ineficaz, perfil cristalino e distribuição dos grupamentos acetamida na cadeia polimérica, conforme afirmam Rinaudo e Domard (Rinaudo e Domard, 1989).

4.4 Grau de desacetilação

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é uma ferramenta laboratorial bastante versátil e sensível, que possibilita a identificação de ligações químicas em compostos, por meio da interação do feixe de infravermelho com a energia das ligações químicas, compreendendo o espectro rotacional e vibracional. Através dos espectros obtidos por FTIR, pode-se visualizar as bandas características da quitosana (Figura 18).

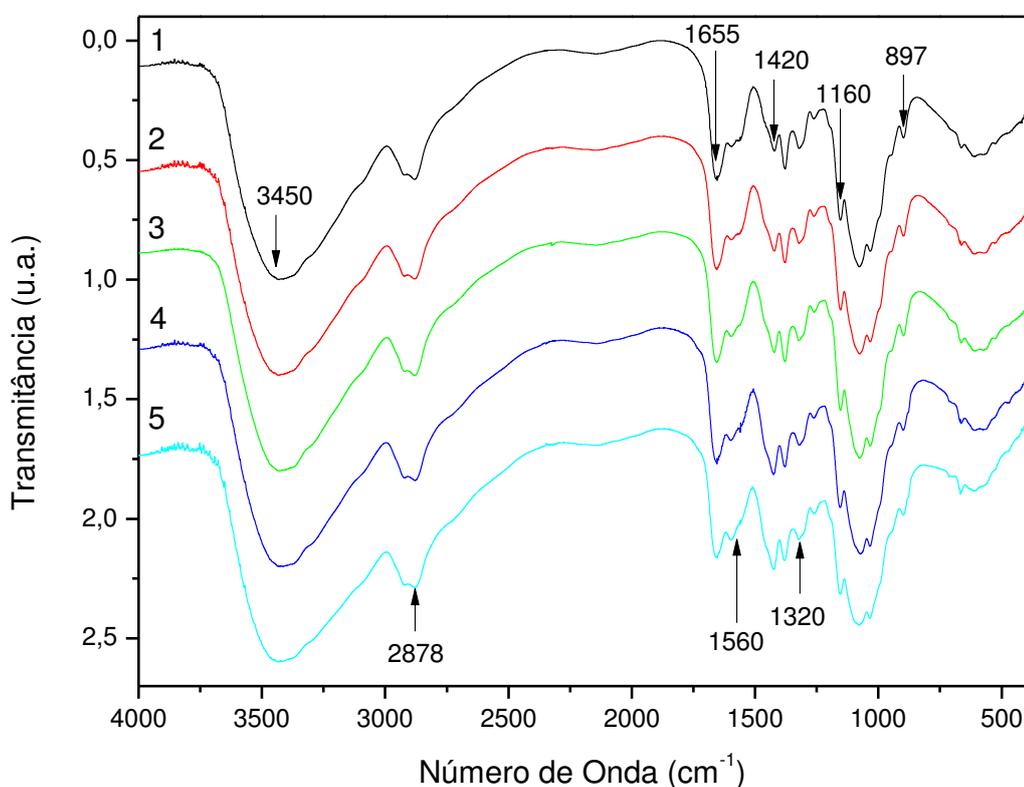


Figura 18 - Espectros FTIR obtidos com pastilha de KBr para as amostras de quitosana 1 - Lote I, 2 - Lote II, 3 - Lote III, 4 - Lote IV e 5 - Lote V.

Dessa forma, os espectros obtidos para os cinco lotes mostraram-se semelhantes quanto às bandas características da quitosana, sendo elas, amida I em 1655 cm^{-1} , ou da amida II em 1560 cm^{-1} , o estiramento de OH em 3450 cm^{-1} , o estiramento de C-H em $2870 - 2880\text{ cm}^{-1}$, a banda centrada em 1420 cm^{-1} como referência a ligação $-\text{CH}_2$, a amida III em $1315 - 1320\text{ cm}^{-1}$, o alongamento assimétrico de C-O-C em torno de 1160 cm^{-1} e a banda em 897 cm^{-1} referente à ligação glicosídica C-O-C (Kumirska et al., 2010). A semelhança entre os espectros das amostras obtidas por FTIR evidenciam a reprodutibilidade na produção de quitosana, quanto ao perfil das ligações químicas.

A partir dos resultados de FTIR obtidos para as amostras de quitosana, determinou-se o grau de desacetilação, por ser uma técnica simples e acessível. Foram obtidas as quatro linhas de base, sendo elas, B1 com pico central em 3450 cm^{-1} , B2 com pico central em 1655 cm^{-1} , B3 com pico central em 1420 cm^{-1} e B4 com pico central em 1320 cm^{-1} (Figura 19).

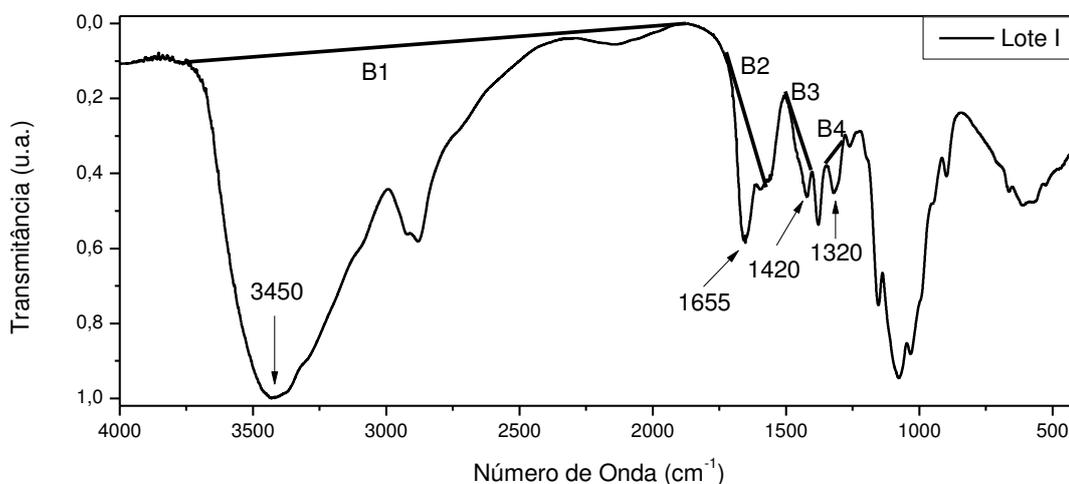


Figura 19 - Espectro FTIR obtido com pastilha de KBr da amostra Lote I mostrando a representação das linhas de base adotadas.

Outra técnica empregada neste trabalho para a determinação do %GD está baseada na primeira derivada do espectro de UV-Visível proposto por Muzzarelli (Muzzarelli e Rocchetti, 1985). Determinou-se o ponto invariante, sendo este em 199 nm , por meio do comportamento da primeira derivada das soluções de ácido acético (Figura 20).

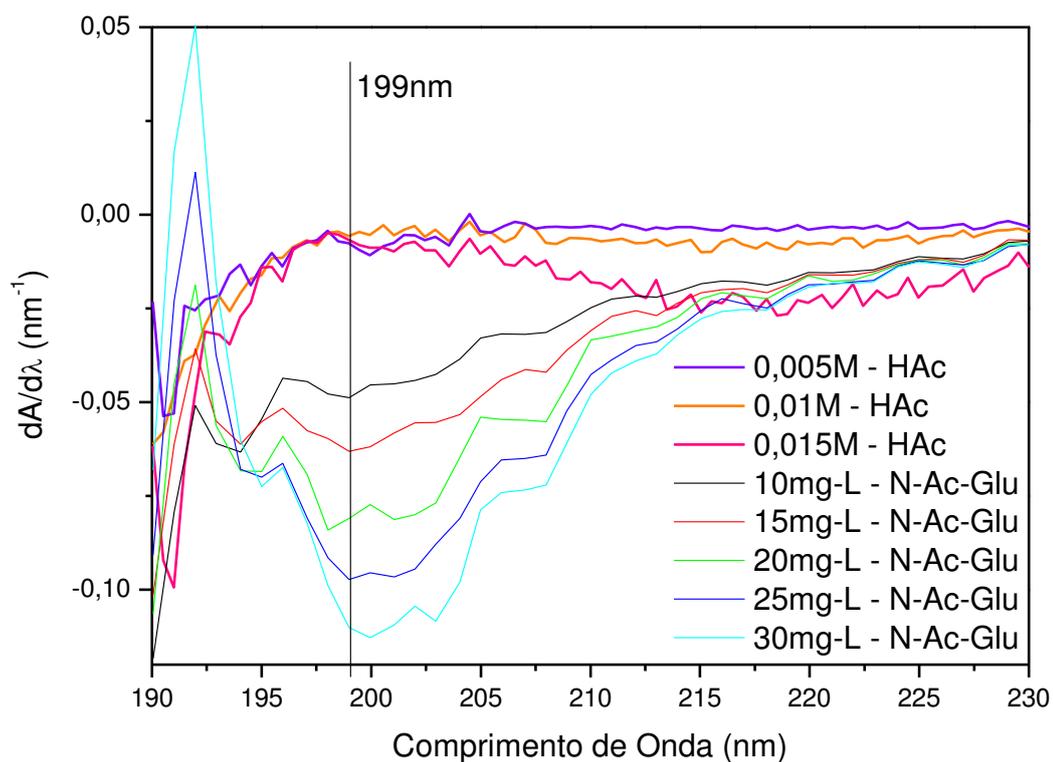


Figura 20 - Primeira Derivada do espectro UV das soluções de Ácido Acético e dos padrões de N-acetil-D-Glucosamina em soluções de Ácido Acético.

Para a realização dos cálculos que determinam o %GD, a curva de calibração construída a partir de soluções de N-acetil-glucosamina com concentrações conhecidas e determinadas (10, 15, 20, 25 e 30 mg/L), obteve um satisfatório ajuste linear com fator de correlação de 0,9997, permitindo assim, calcular os %GD com maior confiabilidade e correlação entre os valores (Figura 21).

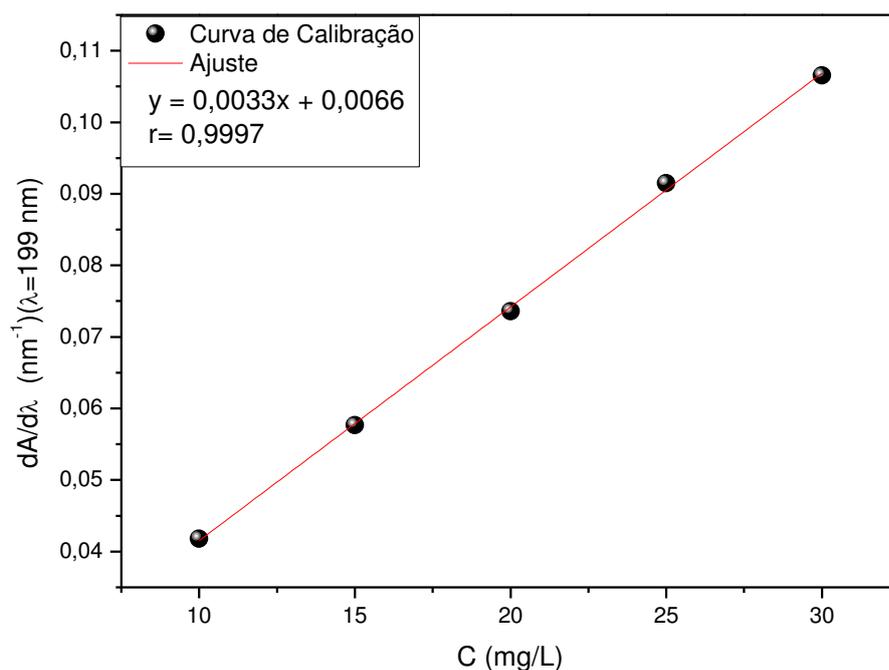


Figura 21 - Curva de calibração de N-acetil-glucosamina para o método da primeira derivada.

Foram, então, obtidas as primeiras derivadas dos espectros das soluções de quitosana (1mg/mL) de cada lote (Figura 22) para determinação do %GD de cada amostra.

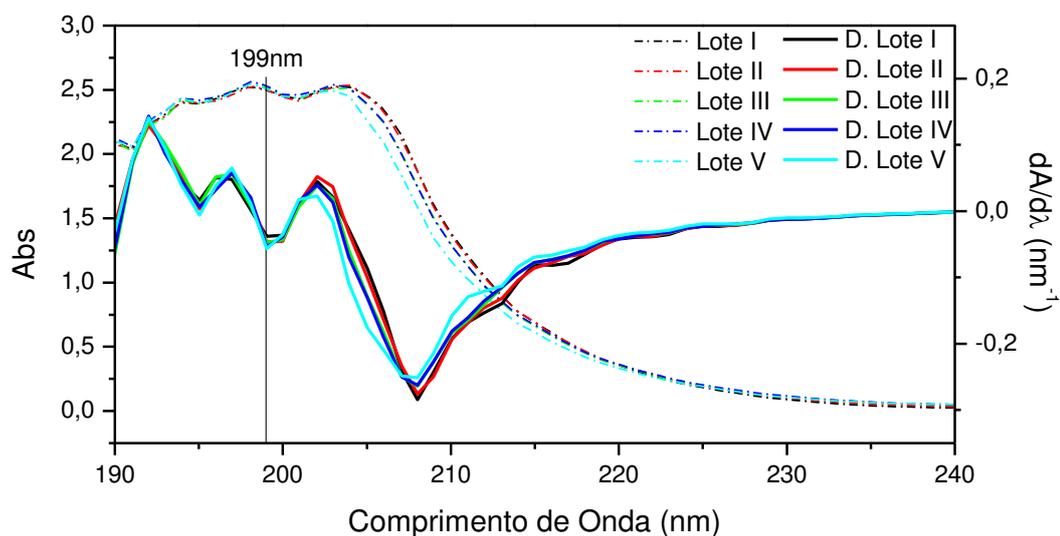


Figura 22 - Espectro UV-Visível e a primeira derivada para as amostras de quitosana.

Os resultados para o %GD das amostras (Tabela 8) utilizando duas metodologias distintas, espectroscopia no infravermelho e no UV-Visível foram, de modo geral, todos acima de 90% de desacetilação, tanto para as amostras com 6

horas de desacetilação como também para a amostra com 4 horas. Sendo, portanto, a desacetilação em uma única etapa e com 4 ou 6 horas eficaz para obtenção de %GD acima de 90%.

Tabela 8 - Valores obtidos para os GD% por FTIR e pela primeira derivada (UV-Vis) para as amostras de quitosana.

Amostra (n=3)	FTIR			UV-Vis
	Roberts	Domszy e Roberts	Brugnerotto	
Lote 1	97,2%	95,8%	92,7%	93,7%
Lote 2	97,3%	95,9%	92,1%	91,1%
Lote 3	97,4%	96,0%	92,2%	91,4%
Lote 4	97,5%	96,1%	91,9%	91,1%
Lote 5	97,5%	96,1%	92,4%	91,3%

Observa-se que os resultados obtidos tendo como base a equação proposta por Roberts foram semelhantes para todos os lotes, ficando em 97% com variações para as casas decimais. O mesmo se observou para a equação de Domszy e Roberts, em que os %GD estão entre 95% - 96%. E para a equação de Brugnerotto, os valores obtidos ficam em torno de 92% de desacetilação para todos os lotes. Os resultados para a primeira derivada por UV-Vis ficaram em torno de 91% - 93% de desacetilação.

Diante dos resultados obtidos, evidencia-se que não há notória variação entre as amostras quando se utiliza a mesma equação, embora, perceba-se uma diferença entre os %GD quando em comparação com as três equações utilizadas para a técnica de FTIR.

Os resultados obtidos pela primeira derivada da UV-Vis não exibem grandes variações para %GD, e estão muito próximos aos valores obtidos pela equação proposta por Brugnerotto. Sugerindo uma maior confiabilidade na determinação do %GD, visto que são técnicas distintas, e conforme a literatura, a metodologia de determinação do %GD pela primeira derivada UV-Vis apresenta maior acurácia e robustez para a mensuração dos valores, sendo uma técnica amplamente utilizada na rotina laboratorial (Da Silva et al., 2008; Kumirska et al., 2010). Assim como, a equação proposta por Brugnerotto também aporta uma relação de bandas mais sensível para a determinação do %GD (Brugnerotto et al., 2001).

Dessa forma, os valores obtidos utilizando a equação de Brugnerotto e pelo método da primeira derivada do UV-Vis mostram-se mais seguros e consideráveis quanto à mensuração do %GD para as amostras de quitosana.

4.5 Massa Molecular

A massa molecular da quitosana é um parâmetro relevante tendo em vista as propriedades físicas, químicas e biológicas da quitosana frente a determinadas aplicações. Dentre as inúmeras técnicas que possibilitam a mensuração da massa molecular de polímeros, a determinação por viscosimetria intrínseca se destaca pelo baixo custo, simplicidade e confiabilidade.

As curvas de calibração para cada amostra (Figura 23), com soluções de quitosana em distintas e conhecidas concentrações, obtiveram ajuste linear satisfatório, exibindo um coeficiente de correlação acima de 0,99%.

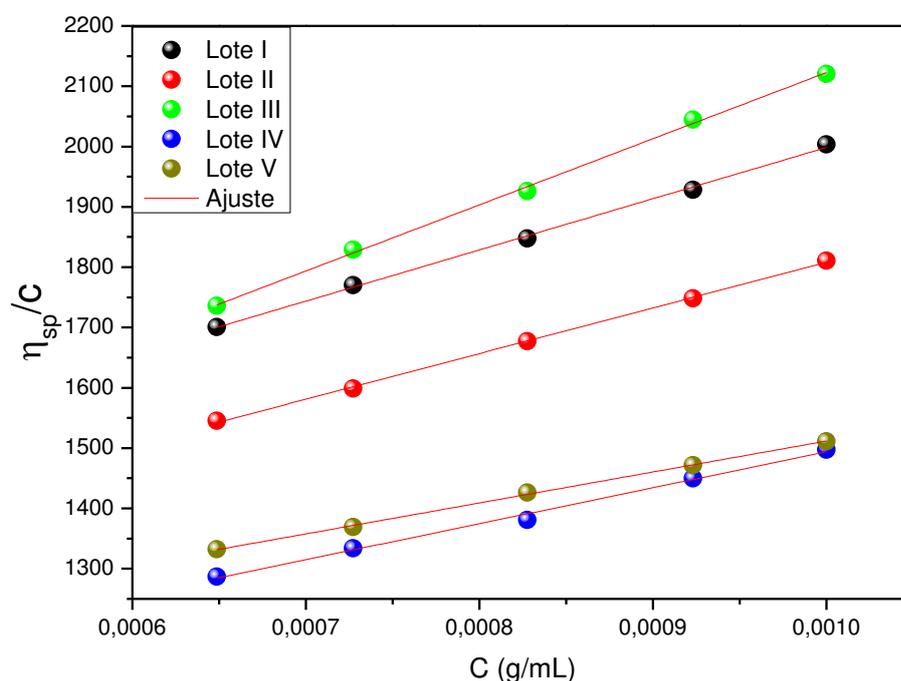


Figura 23 - Curvas de viscosidade reduzida (η_{sp}/C) versus concentração C (g/mL) da solução de quitosana juntamente com o ajuste linear referente a cada amostra.

Com base nos valores das constantes K e α foi possível calcular o valor da M_v (Massa Molecular viscosimétrica) conforme a equação 6. Os resultados obtidos da

massa molecular por viscosimetria intrínseca das amostras de quitosana para cada lote estão na Tabela 9.

Tabela 9 - Valores obtidos para viscosidade intrínseca $[\eta]$ e massa molecular viscosimétrica (M_v) para as amostras de quitosana.

Amostra (n=3)	Viscosidade Intrínseca $[\eta]$	Massa Molecular (M_v)
Lote 1	1150 ± 15	3,2E+05
Lote 2	1051 ± 9	2,8E+05
Lote 3	1030 ± 19	2,7E+05
Lote 4	898 ± 19	2,3E+05
Lote 5	998 ± 6	2,6E+05

Os resultados obtidos para massa molecular viscosimétrica de cada lote apresentam-se semelhantes e numa faixa entre 3,2E+05 – 2,3E+05 g/mol, sendo assim, uma quitosana de médio peso molecular (Szymańska e Winnicka, 2015).

A partir dos resultados obtidos, infere-se que variações no tempo de desmineralização não provocaram mudanças consideráveis na massa molecular, uma vez que todas as amostras passaram pelo mesmo tratamento alcalino para a desproteínização, como também, de desacetilação. Inferindo-se que o tratamento alcalino estabeleceu uma forte influência na massa molecular das amostras, estando estas, numa faixa de médio peso molecular.

4.6 Perfil cristalino

A difração de raios X (DRX) é uma técnica de caracterização de materiais amplamente utilizada. Na qual é possível obter informações estruturais como, arranjo atômico, bem como, o perfil cristalino de um material. Para o padrão de difração de raios X da quitina, observou-se os picos centrados em 9,3°, 12,7°, 19,2°, 20,6°, 23,4°, 26,5° e 39,2° - 2 θ que correspondem aos planos cristalográficos (002), (012), (101), (110), (103), (031), (211), respectivamente (Figura 24). A partir dos picos determinados no DRX da quitina, identificou-se a presença de α -quitina (Carlström, 1957; Kumirska et al., 2010). A α -quitina possui propriedades de menor solubilidade,

menor reatividade com solventes e é menos susceptível ao intumescimento quando comparada à β -quitina.

A α -quitina e a quitosana diferem em seus padrões de DRX, uma vez que só são observados dois picos principais para a quitosana. Para a quitosana, a diminuição da cristalinidade observada, deve-se à diminuição das intensidades e o aumento das larguras a meia altura para os picos mais intensos, centrados em 10° e $20^\circ - 2\theta$, indicando assim, que o processo de desacetilação foi efetivo (Figura 24).

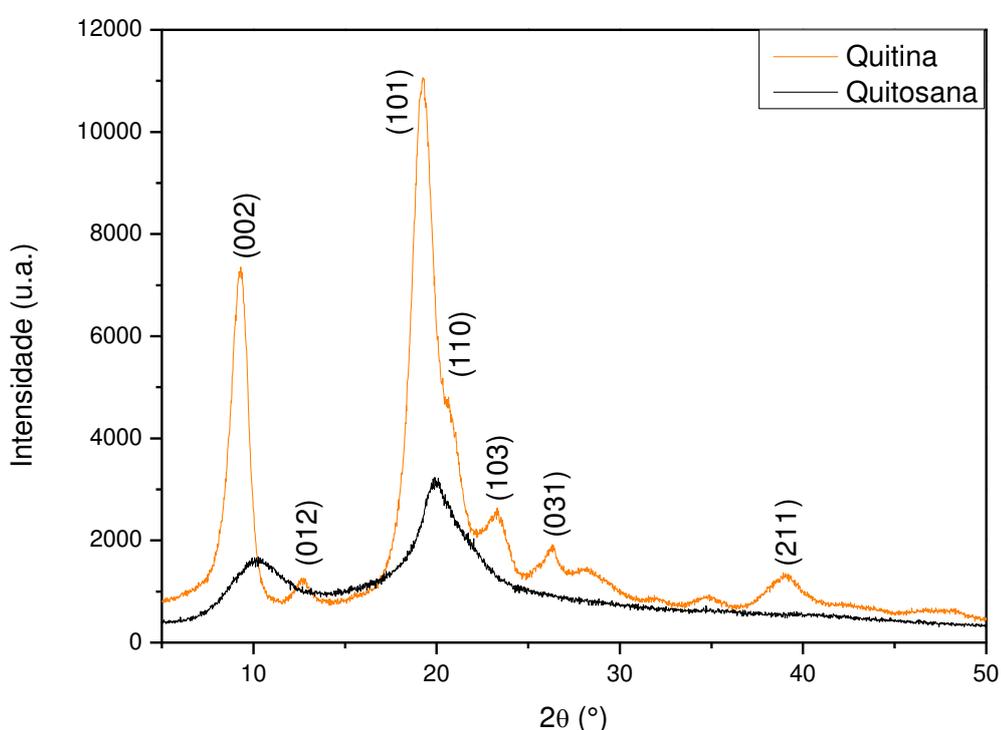


Figura 24 – Padrão de difração de raios X para quitina e quitosana (Lote I).

A partir dos padrões de difração de raios X para as amostras em pó de quitosana, analisou-se o perfil cristalino das mesmas (Figura 25). Com base nos DRX, observa-se que os picos característicos da quitosana centrados em 10° e $20^\circ - 2\theta$, referentes aos planos cristalográficos (002) e (101), respectivamente. Estes estão presentes em todos os padrões de difração de raios X para as amostras dos cinco lotes produzidos. A similaridade nos DRX das amostras indica a reprodutibilidade do processamento e que o tratamento para desacetilação foi efetivo.

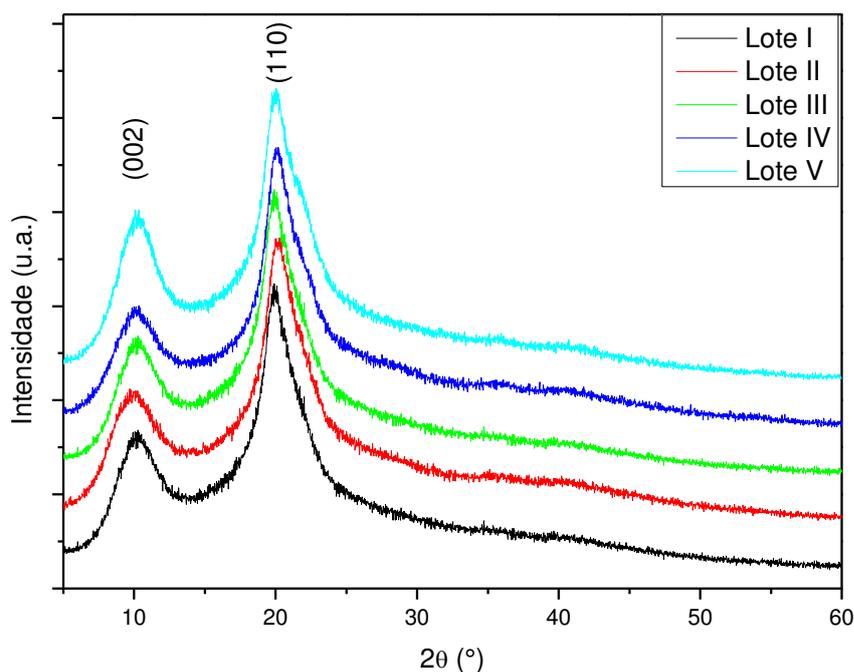


Figura 25 - Padrões de difração de raios X para as amostras de quitosana.

O %GCr para as amostras de quitosana foram mensuradas de acordo com a equação 10 e estão sumarizadas na (Tabela 10).

Tabela 10 - Graus de cristalinidade (%GCr) obtidos por DRX para as amostras de quitosana.

Amostra	%GCr
Lote 1	34%
Lote 2	45%
Lote 3	40%
Lote 4	40%
Lote 5	46%

Diante dos resultados obtidos, observa-se que o lote I apresenta um menor %GCr quando comparado com os outros lotes, provavelmente tudo indica que isto está atribuído ao longo período de ataque ácido, desmineralização de 24 horas. Os lotes II, III, IV e V apresentaram um %GCr em torno de 40%, sugerindo, provavelmente, que os períodos de tempo de ataque ácido não influenciaram tão fortemente, uma vez que não foram processos tão longos.

5 CONCLUSÃO

O beneficiamento da casca de camarão, a desmineralização, a desproteínização para extração da quitina, e a desacetilação para produção de quitosana foram efetivas.

A quitosana obtida tem aspecto de pó, coloração branca e obteve resultados satisfatórios para os primeiros ensaios de caracterização. O método de desmineralização foi eficiente, sendo obtido teor de cinza abaixo de 0,063%, como também a ausência de cálcio observada por EDS das amostras de quitosana. Assim como a desacetilação, uma vez que, o grau de desacetilação está acima de 90%. Tal resultado corrobora com a solubilidade adequada da quitosana em soluções diluídas de ácidos fracos, e o baixo teor de insolúveis determinado em solução. Por meio do ensaio de DRX foi possível a identificação dos picos característicos da quitosana e sua distinção com a quitina. A massa molecular obtida por viscosimetria determinou que a quitosana obtida nos cinco lotes, podem ser caracterizadas como médio peso molecular. E quanto ao aspecto morfológico, foi possível observar a semelhança entre os cinco lotes quanto ao aspecto da superfície da quitosana obtida.

Sendo assim, pode-se afirmar que o método empregado para obtenção de quitosana em escala laboratorial é satisfatório, prático, permitindo ainda, adequação nas etapas de produção visando específicas propriedades e características químicas, físicas e biológicas da quitosana obtida. Para a determinação de grau farmacêutico ainda são sugeridas outras análises, como, teor de proteínas, metais pesados entre outras. É válido ressaltar que o desenvolvimento desde trabalho buscou a produção de quitosana a nível laboratorial.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Visando adequações e o aperfeiçoamento dos resultados obtidos com esta pesquisa, propõe-se outras caracterizações ao material obtido, quanto ao seu perfil químico e biológico.

É válido ainda, a otimização das etapas de produção, como na etapa de desmineralização, desproteinização e desacetilação, visando um processo mais eficiente. Tempos de reações adequados para obtenção de determinadas características no produto.

Sugere-se a utilização de subprodutos (proteínas, fase mineral), reciclagem de reagentes, otimização do consumo de água destilada e tratamento de resíduos, quando se objetiva um processo em larga escala e por meio de processos biotecnológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, F. R. D.; CAMPANA-FILHO, S. P. Preparation and characterization of carboxymethylchitosan. **Polímeros**, v. 15, n. 2, p. 79-83, 2005. ISSN 0104-1428.

AL SAGHEER, F.; AL-SUGHAYER, M.; MUSLIM, S.; ELSABEE, M. Z. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 2, p. 410-419, 2009. ISSN 0144-8617.

ANITHA, A.; SOWMYA, S.; KUMAR, P. S.; DEEPTHI, S.; CHENNAZHI, K.; EHRLICH, H.; TSURKAN, M.; JAYAKUMAR, R. Chitin and chitosan in selected biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 9, p. 1644-1667, 2014. ISSN 0079-6700.

ASTM. **F2103-11 Standard Guide for Characterization and Testing of Chitosan Salts as Starting Materials Intended for Use in Biomedical and Tissue-Engineered Medical Product Applications** West Conshohocken, PA, USA: ASTM International 2011.

BATICADOS, M.; COLOSO, R.; DUREMDEZ, R. Histopathology of the chronic soft-shell syndrome in the tiger prawn *Penaeus monodon*. **Diseases of aquatic organisms**, v. 3, n. 1, p. 13-28, 1987. ISSN 0177-5103.

BEANEY, P.; LIZARDI-MENDOZA, J.; HEALY, M. Comparison of chitins produced by chemical and bioprocessing methods. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, n. 2, p. 145-150, 2005. ISSN 1097-4660.

BERGER, J.; REIST, M.; CHENITE, A.; FELT-BAEYENS, O.; MAYER, J.; GURNY, R. Erratum to "Pseudo-thermosetting chitosan hydrogels for biomedical application". **International Journal of Pharmaceutics**, v. 1, n. 296, p. 162, 2005. ISSN 0378-5173.

BRACONNOT, H. Sur la nature des champignons. **Ann Chim Phys**, v. 79, p. 265-304, 1811.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 1: 91 p. 2010.

BROUSSIGNAC, P. Chitosan, a natural polymer not well known by the industry. **Chim. Ind. Genie Chim**, v. 99, n. 9, p. 1241-1247, 1968.

BRUGNEROTTO, J.; LIZARDI, J.; GOYCOOLEA, F.; ARGÜELLES-MONAL, W.; DESBRIERES, J.; RINAUDO, M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. **Polymer**, v. 42, n. 8, p. 3569-3580, 2001. ISSN 0032-3861.

CAMPANA-FILHO, S. P.; BRITTO, D. D.; CURTI, E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R. L. Extraction, structures and properties of alpha-AND beta-chitin. **Quimica Nova**, v. 30, n. 3, p. 644-650, 2007. ISSN 0100-4042.

CAMPANA FILHO, S.; DESBRIERES, J. Chitin, chitosan and derivatives. **Natural polymers and agrofibers composites**, p. 41-61, 2000.

CAMPANA FILHO, S. P.; FIAMINGO, A. Comportamento térmico de membranas de carboximetilquitosana: Efeitos da massa molar média e do grau de reticulação. **Brazilian Journal of Thermal Analysis**, v. 7, p. 149-152, 2015. ISSN 2316-9842.

CAMPANA FILHO, S. P.; SIGNINI, R.; CARDOSO, M. B. Propriedades e Aplicações de Quitosana. **Químicos Processos Químicos**, p. 9, 2007.

CARLSTRÖM, D. The crystal structure of α -chitin (poly-N-acetyl-D-glucosamine). **The Journal of biophysical and biochemical cytology**, v. 3, n. 5, p. 669-683, 1957. ISSN 0021-9525.

CASTRO, A. A.; PAGANI, G. D. Secagem e composição química da cabeça de camarão (*Litopenaeus vannamei* Boone) a diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 6, n. 2, p. 123-129, 2004.

CHEN, H. M.; MEYERS, S. P. Extraction of astaxanthin pigment from crawfish waste using a soy oil process. **Journal of Food Science**, v. 47, n. 3, p. 892-896, 1982. ISSN 1750-3841.

CHEN, Y.; YE, Y.; JING, Y.; GAO, Y.; GUO, Y.; TAN, H. The Synthesis of the Locating Substitution Derivatives of Chitosan by Click Reaction at the 6-Position of Chitin. **International Journal of Polymer Science**, v. 2015, 2015. ISSN 1687-9422.

CHEUNG, R. C. F.; NG, T. B.; WONG, J. H.; CHAN, W. Y. Chitosan: an update on potential biomedical and pharmaceutical applications. **Marine drugs**, v. 13, n. 8, p. 5156-5186, 2015.

CHIAPPISI, L.; GRADZIELSKI, M. Co-assembly in chitosan–surfactant mixtures: thermodynamics, structures, interfacial properties and applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 220, p. 92-107, 6// 2015. ISSN 0001-8686. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001868615000573> >.

COSGROVE, J. **The Global Chitosan Market: Increasing application prospects are contributing to a continued positive outlook**: Nutraceuticals World, Edition 2010.

COSTAIN, D. J.; KENNEDY, R.; CIONA, C.; MCALISTER, V. C.; LEE, T. D. Prevention of postsurgical adhesions with N, O-carboxymethyl chitosan: examination of the most efficacious preparation and the effect of N, O-carboxymethyl chitosan on postsurgical healing. **Surgery**, v. 121, n. 3, p. 314-319, 1997. ISSN 0039-6060.

CURTI, E.; DE BRITTO, D.; CAMPANA-FILHO, S. P. Methylation of chitosan with iodomethane: effect of reaction conditions on chemoselectivity and degree of substitution. **Macromolecular Bioscience**, v. 3, n. 10, p. 571-576, 2003. ISSN 1616-5195.

DA SILVA, R. M.; MANO, J. F.; REIS, R. L. Straightforward Determination of the Degree of N-Acetylation of Chitosan by Means of First-Derivative UV Spectrophotometry. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 209, n. 14, p. 1463-1472, 2008. ISSN 1521-3935.

DOMARD, A.; DOMARD, M. Chitosan: structure-properties relationship and biomedical applications. **Polymeric biomaterials**, v. 2, p. 187-212, 2001.

DOMSZY, J. G.; ROBERTS, G. A. Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analysing chitosan. **Die Makromolekulare Chemie**, v. 186, n. 8, p. 1671-1677, 1985. ISSN 0025-116X.

DWELTZ, N. The structure of β -chitin. **Biochimica et biophysica acta**, v. 51, n. 2, p. 283-294, 1961. ISSN 0006-3002.

DWELTZ, N.; COLVIN, J. R.; MCINNES, A. Studies on chitan (β -(1 \rightarrow 4)-linked 2-acetamido-2-deoxy-D-glucan) fibers of the diatom *Thalassiosira fluviatilis*, Hustedt. III. The structure of chitan from X-ray diffraction and electron microscope observations. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 1513-1521, 1968. ISSN 0008-4042.

EUROPE. **The European Pharmacopeia**. EUROPE, C. O. Strasburg, France. 2: 1490-1491 p. 2007.

FALK, M.; SMITH, D.; MCLACHLAN, J.; MCINNES, A. Studies on chitan (β -(1 \rightarrow 4)-linked 2-acetamido-2-deoxy-d-glucan) fibers of the diatom *thalassiosira fluviatilis* hustedt: ii. Proton magnetic resonance, infrared, and x-ray studies. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 44, n. 19, p. 2269-2281, 1966. ISSN 0008-4042.

FOSTER, A.; HACKMAN, R. Application of ethylenediaminetetra-acetic acid in the isolation of crustacean chitin. 1957.

FRANCISCO, F.; SIMORA, R. M.; NUNAL, S. Deproteination and demineralization of shrimp waste using lactic acid bacteria for the production of crude chitin and chitosan. **AAFL Bioflux**, v. 8, n. 1, p. 107-115, 2015. ISSN 1844-8143.

GAGNE, N.; SIMPSON, B. Use of proteolytic enzymes to facilitate the recovery of chitin from shrimp wastes. **Food Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 253-263, 1993. ISSN 0890-5436.

GARDNER, K.; BLACKWELL, J. Refinement of the structure of β -chitin. **Biopolymers**, v. 14, n. 8, p. 1581-1595, 1975. ISSN 1097-0282.

GHORBEL-BELLAJ, O.; YOUNES, I.; MAÂLEJ, H.; HAJJI, S.; NASRI, M. Chitin extraction from shrimp shell waste using *Bacillus* bacteria. **International journal of biological macromolecules**, v. 51, n. 5, p. 1196-1201, 2012. ISSN 0141-8130.

GOYCOOLEA, F.; ARGÜELLES-MONAL, W.; PENICHE, C.; HIGUERA-CIAPARA, I. Chitin and chitosan. In: (Ed.). **Developments in Food Science**, v.41, 2000. p.265-308. ISBN 0167-4501.

HAMER, S. N.; CORD-LANDWEHR, S.; BIARNÉS, X.; PLANAS, A.; WAEGEMAN, H.; MOERSCHBACHER, B. M.; KOLKENBROCK, S. Enzymatic production of defined chitosan oligomers with a specific pattern of acetylation using a combination of chitin oligosaccharide deacetylases. **Scientific reports**, v. 5, 2015.

HAMMAN, J.; KOTZE, A. Effect of the type of base and number of reaction steps on the degree of quaternization and molecular weight of N-trimethyl chitosan chloride. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 27, n. 5, p. 373-380, 2001. ISSN 0363-9045.

HAYES, M.; CARNEY, B.; SLATER, J.; BRÜCK, W. Mining marine shellfish wastes for bioactive molecules: Chitin and chitosan ndash; Part A: extraction methods. **Biotechnology journal**, v. 3, n. 7, p. 871-877, 2008. ISSN 1860-7314.

HOPPE-SEYLER, F. Ueber chitin und cellulose. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 27, n. 3, p. 3329-3331, 1894. ISSN 1099-0682.

HUEI, C. R.; HWA, H.-D. Effect of molecular weight of chitosan with the same degree of deacetylation on the thermal, mechanical, and permeability properties of the prepared membrane. **Carbohydrate polymers**, v. 29, n. 4, p. 353-358, 1996. ISSN 0144-8617.

KENNEDY, R.; COSTAIN, D. J.; MCALISTER, V. C.; LEE, T. D. Prevention of experimental postoperative peritoneal adhesions by N, O-carboxymethyl chitosan. **Surgery**, v. 120, n. 5, p. 866-870, 1996. ISSN 0039-6060.

KIM, C. H.; CHOI, J. W.; CHUN, H. J.; CHOI, K. S. Synthesis of chitosan derivatives with quaternary ammonium salt and their antibacterial activity. **Polymer Bulletin**, v. 38, n. 4, p. 387-393, 1997. ISSN 0170-0839.

KUMIRSKA, J.; CZERWICKA, M.; KACZYNSKI, Z.; BYCHOWSKA, A.; BRZOZOWSKI, K.; THOMING, J.; STEPNOWSKI, P. Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. **Mar Drugs**, v. 8, n. 5, p. 1567-636, 2010. ISSN 1660-3397 (Electronic) 1660-3397 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20559489> >.

KUMIRSKA, J.; WEINHOLD, M. X.; THÖMING, J.; STEPNOWSKI, P. Biomedical activity of chitin/chitosan based materials—influence of physicochemical properties apart from molecular weight and degree of N-acetylation. **Polymers**, v. 3, n. 4, p. 1875-1901, 2011.

MARTIN, R. E. Chemistry & biochemistry of marine food products. 1982.

MINKE, R.; BLACKWELL, J. The structure of α -chitin. **Journal of molecular biology**, v. 120, n. 2, p. 167-181, 1978. ISSN 0022-2836.

MUZZARELLI, R. A.; JEUNIAUX, C.; GOODAY, G. W. Chitin in nature and technology. International Conference on Chitin and Chitosan 1985: Senigallia, Italy), 1986, Plenum Press.

MUZZARELLI, R. A.; PETER, M. G. **Chitin handbook**. Atec, 1997. ISBN 8886889011.

MUZZARELLI, R. A.; ROCCHETTI, R. Determination of the degree of acetylation of chitosans by first derivative ultraviolet spectrophotometry. **Carbohydrate Polymers**, v. 5, n. 6, p. 461-472, 1985. ISSN 0144-8617.

NEMTSEV, S.; GAMZAZADE, A.; ROGOZHIN, S.; BYKOVA, V.; BYKOV, V. Deacetylation of chitin under homogeneous conditions. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 521-526, 2002. ISSN 0003-6838.

NGO, D.-H.; VO, T.-S.; NGO, D.-N.; KANG, K.-H.; JE, J.-Y.; PHAM, H. N.-D.; BYUN, H.-G.; KIM, S.-K. Biological effects of chitosan and its derivatives. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 200-216, 10// 2015. ISSN 0268-005X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X15002246> >.

NO, H. K.; MEYERS, S. Preparation of chitin and chitosan. **Chitin handbook**, v. 1, p. 475-489, 1997.

ODIER, A. **Mémoire sur la composition chimique des parties cornées des insectes**. 1823.

OSORIO-MADRAZO, A.; DAVID, L.; TROMBOTTO, S.; LUCAS, J.-M.; PENICHE-COVAS, C.; DOMARD, A. Kinetics study of the solid-state acid hydrolysis of chitosan: Evolution of the crystallinity and macromolecular structure. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 5, p. 1376-1386, 2010. ISSN 1525-7797.

PASTOR DE ABRAM, A.; HIGUERA, I. Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. **Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD). Resultados del proyecto CYTED IV**, v. 14, 2004.

PENICHE, C.; BECHERÁN, L. Quitosano como plataforma tecnológica en productos biofarmacéuticos y aplicaciones dérmicas. In: SOUSA, H. C. D.; BRAGA, M. E., *et al* (Ed.). **Biomateriais aplicados ao desenvolvimento de sistemas terapêuticos avançados**, 2015. cap. 3, p.111-146. ISBN 9892608801.

PETIT, C.; REYNAUD, S.; DESBRIERES, J. Amphiphilic derivatives of chitosan using microwave irradiation. Toward an eco-friendly process to chitosan derivatives. **Carbohydrate polymers**, v. 116, p. 26-33, 2015. ISSN 0144-8617.

PILLAI, C.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in polymer science**, v. 34, n. 7, p. 641-678, 2009. ISSN 0079-6700.

RAABE, D.; SACHS, C.; ROMANO, P. The crustacean exoskeleton as an example of a structurally and mechanically graded biological nanocomposite material. **Acta Materialia**, v. 53, n. 15, p. 4281-4292, 9// 2005. ISSN 1359-6454. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359645405003265> >.

REGE, P. R.; BLOCK, L. H. Chitosan processing: influence of process parameters during acidic and alkaline hydrolysis and effect of the processing sequence on the resultant chitosan's properties. **Carbohydrate Research**, v. 321, n. 3, p. 235-245, 1999. ISSN 0008-6215.

REGO, M. A. S.; DA SILVA, E. F. B.; CALAZANS, N. K. F.; DE PAULA MENDES, P. PANORAMA DA PRODUÇÃO EM CATIVEIRO DO CAMARÃO BRANCO *Litopenaeus vannamei* NO BRASIL E NO MUNDO. 2010.

RIGBY, G. W. **Substantially undegraded deacetylated chitin and process for producing the same**: Google Patents 1936.

RINAUDO, M.; DOMARD, A. Solution properties of chitosan. **Chitin and chitosan**, p. 71-86, 1989.

RINAUDO, M.; MILAS, M.; LE DUNG, P. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 15, n. 5, p. 281-285, 1993. ISSN 0141-8130.

ROBERTS, G. A. F. **Chitin chemistry**. London: Macmillan, 1992. xvi, 350 p. ISBN 0333524179.

ROUGET, C. Des substances amylacees dans le tissue des animux, specialement les Articules (Chitine). **Compt Rend**, v. 48, p. 792, 1859.

RUDALL, K. The distribution of collagen and chitin. Symp. Soc. Exp. Biol, 1955. p.49-71.

_____. Chitin and its association with other molecules. Journal of Polymer Science Part C: Polymer Symposia, 1969, Wiley Online Library. p.83-102.

_____. The chitin/protein complexes of insect cuticles. **Advances in insect physiology**, v. 1, p. 257-313, 2011.

RUDALL, K.; KENCHINGTON, W. The chitin system. **Biological Reviews**, v. 48, n. 4, p. 597-633, 1973. ISSN 1469-185X.

SANNAN, T.; KURITA, K.; IWAKURA, Y. Studies on chitin, 1. Solubility change by alkaline treatment and film casting. **Die Makromolekulare Chemie**, v. 176, n. 4, p. 1191-1195, 1975. ISSN 0025-116X.

_____. Studies on chitin, 2. Effect of deacetylation on solubility. **Die Makromolekulare Chemie**, v. 177, n. 12, p. 3589-3600, 1976. ISSN 0025-116X.

_____. Studies on chitin. V. Kinetics of deacetylation reaction. **Polymer Journal**, v. 9, n. 6, p. 649-651, 1977. ISSN 0032-3896.

SENRA, T. D.; SANTOS, D. M.; DESBRIÈRES, J.; CAMPANA-FILHO, S. P. Extensive N-methylation of chitosan: evaluating the effects of the reaction conditions by using

response surface methodology. **Polymer International**, v. 64, n. 11, p. 1617-1626, 2015. ISSN 1097-0126.

SENRA, T. D. A. **N, N, N-trimetilquitosana e N-(2-hidróxi)-propil-3-trimetilamônio quitosana: preparação, caracterização e estudo de suas interações com decanossulfonato de sódio**. 2015. Universidade de São Paulo

SHUKLA, S. K.; MISHRA, A. K.; AROTIBA, O. A.; MAMBA, B. B. Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 46-58, 8// 2013. ISSN 0141-8130. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813013002262> >.

SNYMAN, D.; HAMMAN, J.; KOTZE, J.; ROLLINGS, J.; KOTZE, A. The relationship between the absolute molecular weight and the degree of quaternisation of N-trimethyl chitosan chloride. **Carbohydrate polymers**, v. 50, n. 2, p. 145-150, 2002. ISSN 0144-8617.

SNYMAN, D.; HAMMAN, J. H.; KOTZE, A. F. Evaluation of the mucoadhesive properties of N-trimethyl chitosan chloride. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 29, n. 1, p. 61-69, 2003. ISSN 0363-9045.

SYNOWIECKI, J.; AL-KHATEEB, N. A. Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. 2003. ISSN 1040-8398.

SZYMAŃSKA, E.; WINNICKA, K. Stability of Chitosan—A Challenge for Pharmaceutical and Biomedical Applications. **Marine drugs**, v. 13, n. 4, p. 1819-1846, 2015.

TAHIM, E. F. Inovação e meio ambiente: o desafio dos arranjos produtivos de cultivo de camarão em cativeiro no Estado do Ceará. **Rio de Janeiro: UFRJ**, 2008.

THANOU, M.; KOTZE, A.; SCHARRINGHAUSEN, T.; LUESSEN, H.; DE BOER, A.; VERHOEF, J.; JUNGINGER, H. Effect of degree of quaternization of N-trimethyl chitosan chloride for enhanced transport of hydrophilic compounds across intestinal Caco-2 cell monolayers. **Journal of Controlled Release**, v. 64, n. 1, p. 15-25, 2000. ISSN 0168-3659.

THANOU, M.; VERHOEF, J.; JUNGINGER, H. Trimethylated chitosan derivatives are effective and safe penetration enhancers for oral peptide drug delivery and absorption. **STP Pharma Sciences**, v. 10, n. 4, p. 315-319, 2000. ISSN 1157-1489.

THIRUNAVUKKARASU, N.; DHINAMALA, K.; MOSES INBARAJ, R. Production of chitin from two marine stomatopods *Oratosquilla* spp.(Crustacea). **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 1, p. 353-359, 2011.

URAGAMI, T.; TOKURA, S. **Material science of Chitin and Chitosan**. Tokyo Berlin ; New York: Kodansha ; Springer, 2006. xiv, 284 p. ISBN 3540328130 (alk. paper).

USA. **The United States Pharmacopeia**. Rockville, MD, USA: The United States Pharmacopeial Convention. Second Supplement.: 5361–5365 p. 2011.

WLINTEROWD, J. G. Chitin and chitosan. **Food polysaccharides and their applications**, v. 67, p. 441, 1995. ISSN 0824793536.

YOUNES, I.; GHORBEL-BELLAAJ, O.; CHAABOUNI, M.; RINAUDO, M.; SOUARD, F.; VANHAVERBEKE, C.; JELLOULI, K.; NASRI, M. Use of a fractional factorial design to study the effects of experimental factors on the chitin deacetylation. **International journal of biological macromolecules**, v. 70, p. 385-390, 2014. ISSN 0141-8130.

YOUNES, I.; HAJJI, S.; RINAUDO, M.; CHAABOUNI, M.; JELLOULI, K.; NASRI, M. Optimization of proteins and minerals removal from shrimp shells to produce highly acetylated chitin. **International journal of biological macromolecules**, v. 84, p. 246-253, 2016. ISSN 0141-8130.

YOUNES, I.; RINAUDO, M. Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. **Marine drugs**, v. 13, n. 3, p. 1133-1174, 2015.