

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

DEFESA DA TESE

**DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE QUITINA E
OBTENÇÃO QUITOSANA PARA APLICAÇÃO EM BIOMATERIAIS**

Aluna: **ANNA SYLVIA RAMOS DE RANGEL MOREIRA CAVALCANTI**

Orientador: PROF. DR. MARCUS VINICIUS LIA FOOK

CAMPINA GRANDE
ABRIL/2014

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

ANNA SYLVIA RAMOS DE RANGEL MOREIRA CAVALCANTI

**DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE QUITINA E OBTENÇÃO
QUITOSANA PARA APLICAÇÃO EM BIOMATERIAIS**

Tese de Doutorado submetida à banca examinadora, aprovada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito para obtenção do título de doutor na área de Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientador: PROF. DR. MARCUS VINICIUS LIA
FOOK

CAMPINA GRANDE
ABRIL/2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

C376d Cavalcanti, Anna Sylvia Ramos de Rangel Moreira.
Desenvolvimento do processo de extração de quitina e obtenção
quitosana para aplicação em biomateriais / Anna Sylvia Ramos de Rangel
Moreira Cavalcanti. – Campina Grande, 2014.
111 f. : il. color.

Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade
Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia.

"Orientação: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook".

Referências.

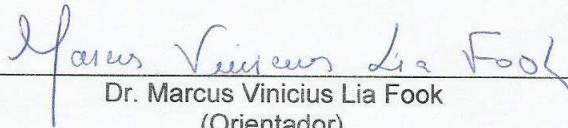
1. Resíduos Alimentares. 2. Quitina. 3. Quitosana. 4. Produção
Biopolímeros 5. Biomateriais I. Fook, Marcus Vinicius Lia. II. Título.

CDU 620.1(043)

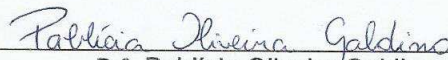
**Desenvolvimento do Processo de Extração de Quitina e Obtenção Quisotana
para Aplicação em Biomateriais.**

ANNA SYLVIA RAMOS DE RANGEL MOREIRA CAVALCANTI

Tese Aprovada em 17/04/2014 pela banca examinadora constituída dos seguintes
membros:



Dr. Marcus Vinicius Lia Fook
(Orientador)
UAEMa/UFCG



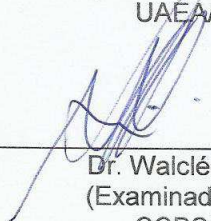
Dr^a. Pablicia Oliveira Galdino
(Examinadora Externa)
CCHA/UEPB



Dr. Rômulo Feitosa Navarro
(Examinador Externo)
UAEMa/UFCG



Dr. Hugo Lisboa
(Examinador Externo)
UAEMa/UFCG



Dr. Walclécio Morais Lira
(Examinador Externo)
CCBS/UEPB

**CAMPINA GRANDE
ABRIL/2014**

Dedico esta tese

Ao meu pai Mario Eduardo e à minha mãe Sueli;

Ao meu marido Marconi e à nossa filha Marianna;

Aos meus irmãos Maria Eduarda e Rafael Felipe;

A Hugo Lisboa;

E a todos que ocupam um lugar especial no meu coração.

Agradeço, primeiramente, a Deus, por me permitir estar aqui, por abrir meus caminhos, por minha alegria e capacidade em servir, pela força interior para superar todas as dificuldades, por todas as bênçãos de amor recebidas;

À minha família, pelo AMOR incondicional, pela educação e pelos exemplos de vida;

Ao Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook, pela orientação, pela confiança depositada durante todo o processo de desenvolvimento desta Tese, pelas valiosas contribuições para minha formação acadêmica e profissional, e, principalmente, pela amizade;

Ao Prof. Dr. Hugo Lisboa, pelo encorajamento, pela credibilidade depositada nesta Tese, pelas contribuições para meu crescimento profissional, pela paciência e amizade nesses quatro anos. Tenho-o, na verdade, como um exemplo a ser seguido;

Aos demais professores, pelas contribuições durante as fases de projeto, seminário, qualificação e defesa da Tese;

Aos professores do Programa de Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais da UFCG;

Aos amigos do CERTBIO, aos amigos da Igreja, aos colegas de trabalho, aos meus alunos e a todos que fazem parte de minha vida;

À Capes, pelo apoio financeiro.

Só existem dois dias na vida em que nada pode ser feito.
Um se chama ontem e o outro se chama amanhã
Dalai Lama

Havendo força de vontade, nada para nós é custoso.
Mestre Irineu

SUMÁRIO

SUMÁRIO	VIII
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XII
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Objetivo Geral.....	17
1.1.1 Objetivos Específicos.....	17
1.2 MOTIVAÇÃO.....	18
1.3 REFERÊNCIAS DA LITERATURA.....	21
2 ESTUDO DA MORFOLOGIA DA CASCA DE CAMARÃO	24
2.1 INTRODUÇÃO	24
2.2 REVISÃO DA LITERATURA	25
2.3 ESTRUTURAS E PROPRIEDADES DA QUITINA.....	29
2.4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
2.4.1 Materiais	32
2.4.2 Caracterização.....	33
2.4.3 Método	34
2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
2.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (Mev)	34
2.6 CONCLUSÃO	44
2.7 REFERÊNCIA DA LITERATURA.....	44
3 ESTUDO DA EXTRAÇÃO DA QUITINA.....	48
3.1 INTRODUÇÃO	48
3.2 REVISÃO DA LITERATURA	49
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS	54
3.3.1 Materiais	54
3.2.2 Caracterização.....	55
3.3.2 Metodologia de Extração	56
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
3.3.1 Análise Visual	58
3.4 CONCLUSÃO	63
3.5 REFERÊNCIA DA LITERATURA.....	64
4 ESTUDO DA SAZONALIDADE DO CAMARÃO	68
4.1 INTRODUÇÃO	68
4.2 REVISÃO DA LITERATURA	69
4.3 MATERIAIS E MÉTODOS	69
4.3.1 Materiais.....	69
4.3.2 Método.....	70
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
4.4.1 Primeira pesagem – março.....	70
4.4.2 Segunda pesagem – junho.....	71

4.4.3 Terceira pesagem – setembro	71
4.4.4 Quarta pesagem – dezembro	72
4.5 CONCLUSÃO	74
4.6 REFERÊNCIA DA LITERATURA.....	74
5 ESTUDO DA PRODUÇÃO DE QUITOSANA	76
5.1 INTRODUÇÃO	76
5.2 REVISÃO DA LITERATURA	76
5.2.1 Multietapas de desacetilação para obtenção de quitosana	80
5.3 MATERIAIS E MÉTODOS	82
5.3.1 Materiais.....	82
5.3.2 Metodologia de Desacetilação.....	82
5.3.3 Caracterização	83
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
5.4.1 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier- FTIR	84
5.4.2 Difração de Raios X.....	89
5.4.3 Insolúveis	92
5.4.4 Viscosidade dinâmica ou aparente.....	93
5.5 CONCLUSÃO	94
5.6 REFERÊNCIA DA LITERATURA.....	94
6 APLICAÇÃO DA QUITOSANA EM BIOMATERIAIS	98
6.1 INTRODUÇÃO	98
6.2 REVISÃO DA LITERATURA	98
6.2.1 Biomateriais.....	98
6.2.2 Aplicações com quitosana de baixo peso molecular para biomateriais.....	102
6.2.3 Dispositivos produzidos com quitosana de baixo peso molecular.....	105
6.3 CONCLUSÃO.....	106
6.4 REFERÊNCIA DA LITERATURA.....	106
7 PERSPECTIVAS FUTURAS	110

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Anatomia externa do camarão	25
Figura 2 - Ilustração esquemática sobre a constituição do exoesqueleto do camarão.	26
Figura 3 - Interação das proteínas com a quitina.	28
Figura 4 - Estrutura química da celulose e da quitina.	30
Figura 5 - Conformação da α -quitina (à esquerda) e β -quitina, à direita	31
Figura 6 - Representação das ligações por pontes de hidrogênio da α -quitina (à esquerda) a β -quitina, à direita.....	32
Figura 7 - Micrografias da amostra da casca de camarão na forma bruta com aumento de 80X.....	35
Figura 8 - Micrografia da amostra da casca de camarão na forma desmineralizada com aumento de 180X	36
Figura 9 - Micrografia da amostra da casca de camarão na forma desproteinizada com aumento de 180X.....	36
Figura 10 - Micrografias das amostras da casca bruta (A), desmineralizada (B) e desproteinizada (C) com aumento de 500X	37
Figura 11 - MEV da amostra bruta (A) e desproteinizada (B) respectivamente com aumento 500X	37
Figura 12 - Micrografia da secção transversal da casca bruta revela a (A) Epicutícula (B) Exocutícula (C) Endocutícula.....	38
Figura 13 - Micrografia MEV da secção transversal da casca desmineralizada	39
Figura 14 - Micrografia MEV da secção transversal da casca desproteinizada	40
Figura 15 - EDS espessura da casca bruta.....	41
Figura 16 - EDS espessura da casca desmineralizada.....	42
Figura 17 - EDS espessura da casca desproteinizada.....	43
Figura 18 - Ilustração do processo de desmineralização	51
Figura 19 - Ilustração do Processo de desproteinição.....	53
Figura 20 - Amostras de casca em três granulometrias (A) abaixo de 53 μ m, (B) 53-150 μ m e (C) acima de 150 μ m.....	54
Figura 21 - Amostras de camarão na estufa	56
Figura 22 - Casca pós-processo de desmineralização.....	57
Figura 23 - Casca pós-processo de desproteinição	58
Figura 24 - amostra do exoesqueleto de camarão bruto	59
Figura 25 - Amostra do exoesqueleto de camarão após desproteinição	59
Figura 26 - Espectro da pastilha de quitina	60
Figura 27– Evidência da divisão do pico de absorção de amida I em.....	62
Figura 28 - amostra do DRX da quitina	63
Figura 29- Tabela de porcentagem da composição da casca.....	73
Figura 30 - conversão da quitina em quitosana.....	77
Figura 31 - Ilustração esquemática do processo de desacetilação	79
Figura 32 - Ilustração esquemática do efeito da estrutura morfológica quitina	81

Figura 33 - Espectros de infravermelho de cada amostra desacetilada	84
Figura 34 - Grau de desacetilação em função do tempo de reação	85
Figura 35 - Quantidade de insolúveis presentes nas amostras	86
Figura 36 - Espectros de infravermelho da quitosana pelo processo multietapas	87
Figura 37 - Grau de desacetilação em função do tempo de reação com as 3 equações	88
Figura 38 - Grau de desacetilação em função do tempo de reação pelo método 1 e 2	88
Figura 39 - amostra do DRX da quitosana	89
Figura 40 - Grau de intensidade em 20°	90
Figura 41 - DRX multietapas (A) 1+1+1, (B) 1+2+2 e (C) 1+3+3.	91
Figura 42 - Grau de intensidade em 10°	91
Figura 43 - Quantidade de insolúveis presentes nas amostras de quitosana multietapas	92
Figura 44 - Taxa de deformação da quitosana 1+3+3	93
Figura 45 - Materiais investigados como Biomateriais	99
Figura 46 - Membrana produzida com quitosana de baixo peso molecular ...	105
Figura 47 -. Scaffold produzido com quitosana de baixo peso molecular	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fontes naturais de quitina	18
Tabela 2 - Determinação do Grau de Acetilação (%DA) com diferentes equações.....	62
Tabela 3 - Resumo dos picos detectados por DRX na quitina obtida.	63
Tabela 4 - Pesagem para as etapas de extração em março	70
Tabela 5 - Tabela de porcentagem da composição da casca em março	70
Tabela 6 - Pesagem para as etapas de extração em Junho	71
Tabela 7- Tabela de porcentagem da composição da casca em junho	71
Tabela 8 - Pesagem para as etapas de extração em setembro	71
Tabela 9- Tabela de porcentagem da composição da casca em setembro	72
Tabela 10 - Pesagem para as etapas de extração em dezembro	72
Tabela 11 - Tabela de porcentagem da composição da casca em dezembro .	72
Tabela 12 - Resumo das etapas de desacetilação.....	83

RESUMO

O avanço na história da humanidade pode ser rastreado através do progresso na utilização de materiais. Recentemente, materiais provenientes de resíduos da indústria pesqueira, como quitina e seu derivado principal, a quitosana, passaram a ser considerados como alternativas de grande potencial, para área biomédica. Portanto, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento do processo de extração de quitina e obtenção da quitosana para aplicação em Biomateriais. Em um trabalho pioneiro, foram realizados ensaios de Microscopia Eletrônica Varredura (MEV) e Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS), durante a extração de quitina, onde foi possível observar a disposição dos componentes na casca de camarão identificando as zonas de maior acumulação. Foram realizados ensaios, Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada De Fourier (FTIR, DRX) tanto na extração de quitina quanto na obtenção de quitosana, tendo sido obtidos valores entre 2% a 6% de desacetilação na etapa da extração de quitina e até 60% de desacetilação para quitosana utilizando método com única etapa. Pelo método de multietapas, tendo 7h de desacetilação em três etapas, os resultados confirmaram uma quitosana com grau de desacetilação de 90%, totalmente solúvel. Ainda por meio do ensaio de viscosidade dinâmica e FTIR, enquadrou-se como quitosana de baixo peso molecular. Também foram determinados os rendimentos da quitina em diferentes épocas do ano, confirmando que se pode utilizar a casca ao longo do ano e estudar diferentes metodologias de FTIR para a determinação do grau de desacetilação tanto da quitina quanto da quitosana.

Palavras-Chaves: Resíduos alimentares; Quitina; Quitosana; Produção Biopolímeros; Biomateriais.

ABSTRACT

The progress in human history can be traced through progress in the use of materials. Recently, materials from the fishing industry, as chitin and production of its main derivative, chitosan, have been considered as alternatives of great potential for the biomedical area. Therefore, this work aims to study and develop the process of chitin extraction and the production of chitosan for biomaterials applications. In a pioneering work, Scanning Electronic Microscopy and X-ray Dispersion Spectroscopy tests were performed during the extraction of chitin, where it was possible to observe the arrangement of the various components in shrimp shells identifying the areas of greatest accumulation. Fourier Transform Infra-Red and X-ray Diffraction tests were performed both on the extraction of chitin and chitosan production. For chitin where values between 2%- 6% where and up to 60% deacetylation to chitosan using method with single step. By the multistep process, having 7h deacetylation in 3 steps, with a satisfactory results of chitosan with a deacetylation degree of 90% and fully soluble chitosan. From dynamic viscosity test and FTIR fitted into low as chitosan molecular weight. Also yields of chitin in different seasons and different methods for the degree of deacetylation determination through FTIR were successfully studied.

Keywords: Food waste; Chitin; Chitosan; Production; Biomaterials; Biopolymers.

Capítulo I

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A importância da ciência na engenharia de materiais ao longo da história é facilmente perceptível observando simplesmente as nomenclaturas que os historiadores têm usado, por exemplo, para os diferentes períodos da história da humanidade: Idade da Pedra, do Bronze e do Ferro. Da mesma forma, o avanço na história da humanidade pode ser rastreado por meio do progresso em materiais e de técnicas de processamento desde o desenvolvimento do aço produzido para armas até o silício usado para *chips* em sistema de informática. Porém, no final do século 20, descobriu-se que a humanidade tinha efetivamente avançado no desenvolvimento da tecnologia, mas que ainda havia muito que aprender a partir da natureza (OLSZTA 2004).

Com essa nova descoberta, impulsionada pelo crescimento da conscientização da sociedade em relação ao desenvolvimento sustentável, um novo ramo da ciência dos materiais foi desenvolvido a fim de estudar componentes orgânicos. Os polissacarídeos, como uma classe de macromoléculas naturais, passam a ser vistos como grande potencial de uso, e amplamente estudados para área biomédica. Entre as novas famílias de polímeros naturais, cuja relevância é cada vez mais evidente, têm-se a quitina e o seu derivado principal, a quitosana, considerada um material de grande importância para os avanços das ciências e que apresenta várias vantagens por ser biocompatível e biodegradável (GIL e FERREIRA, 2006; AZEVEDO, 2007).

Além disso, a quitosana também é considerada como material com grandes possibilidades para modificações estruturais com almejadas propriedades para aplicações específicas. Pesquisa e desenvolvimento em quitina e quitosana alcançam, atualmente, um nível de intensas atividades em várias partes do mundo (PILLAI, 2009).

Os exoesqueletos são fontes dessas substâncias químicas, importantes tanto do ponto de vista econômico quanto ambiental, pois são provenientes de resíduos da indústria pesqueira. Tradicionalmente, a quitina é preparada principalmente a partir de resíduos sólidos de cascas de camarão e caranguejo. E, por ter um aproveitamento relativamente barato, tornou-se de

grande interesse não apenas como um recurso subutilizado, mas também como um novo biomaterial (ANTONINO, 2007).

Dentro deste contexto, o Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste - CERTBIO, criado em 2006, tem atuado no desenvolvimento e avaliação de biomateriais, sendo a maioria de suas atividades de pesquisa direcionada ao uso de quitosana.

1.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver o processo de extração de quitina e obtenção de quitosana para aplicação como Biomateriais, visando ao desenvolvimento destes produtos, quitina e quitosana, com tecnologia nacional.

1.1.1 Objetivos Específicos

- Estudar os aspectos morfológicos da casca do camarão;
- Extrair quitina da casca de camarão;
- Estudar a efetividade da desmineralização, por meio da análise da porcentagem (%) do cálcio, e a efetividade da desproteínização, por meio da análise da porcentagem (%) de proteínas;
 - Produzir quitosana com grau de desacetilação 80 - 90% com diferentes massas molares;
 - Estudar a efetividade da desacetilação, pela análise da cristalinidade e do grau de desacetilação da quitosana;
 - Aplicar a quitosana produzida como dispositivo biomédico utilizado no CERTBIO.

1.2 MOTIVAÇÃO

A biomassa tem despertado grande interesse nos pesquisadores por ser fonte renovável de energia. Dentre os diversos materiais naturais que potencialmente têm se destacado nos últimos anos, os polissacarídeos têm sido os mais pesquisados (ANTONINO, 2007).

Os polissacarídeos consistem em polímeros de condensação de elevado peso molecular formados por milhares de unidades monossacarídeos unidas entre si por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4), formando longas cadeias lineares ou ramificadas. As unidades de monossacarídeos que os constituem podem ser de natureza básica, neutra ou ácida, o que resulta em um grupo de compostos mais abundantes e diversificados na natureza. Podem ser encontrados em plantas, animais e micro-organismos (fungos e bactérias), os quais possuem duas funções biológicas principais, seja como forma armazenadora de energia ou como material estrutural (GIL e FERREIRA, 2006; MCMURRY, 1997).

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, ficando atrás somente da celulose, que é um importante componente orgânico dos artrópodes. Embora encontrada em exoesqueletos de crustáceos e nas paredes celulares de alguns fungos, a maior parte de sua produção aparece na forma de exoesqueletos de animais marinhos. Na Tabela 1, encontram-se as principais fontes naturais existentes de quitina (CRAVEIRO et al., 2004).

Tabela 1 - Fontes naturais de quitina

Animais Marinhos	Insetos	Micro-organismos	Humanos
Anelídios	Escorpiões	Algas verdes	Unhas
Moluscos	Aranhas	Leveduras	
Celenterados	Formigas	Fungos	
Lagosta	Besouros	Esporos	
Camarão	Baratas	Algas Marrons	
Caranguejo	Abelhas		
Krill	Borboletas		

Fonte: Adaptado de CRAVEIRO, 2004.

Considera-se o mar como principal fonte de quitina, uma vez que esta, comparativamente à celulose, não requer grandes espaços para sua produção. Conclui-se que os animais marinhos apresentam uma maior vantagem em relação aos vegetais, em termos de fonte renovável e sustentável de biopolímero. Embora a composição varie com a espécie e com a sazonalidade, a carapaça dos crustáceos é constituída de 15% a 20% de quitina no peso seco (LONGHINOTTI et al., 1996; SHAHIDI et al., 1999).

Outro fator importante a ser ressaltado é que a quitina é um subproduto da indústria pesqueira, pouco aproveitada em nosso país, enquanto a estimativa mundial para produção industrial de quitina, a partir de carapaças de crustáceos, é de 60.000 toneladas anuais. Esses resíduos biológicos contêm, em média, cerca de 10% de quitina no peso seco. A produção mundial anual de quitina purificada é cerca de 1.600 toneladas, sendo o Japão e os EUA os principais produtores (THIRUNAVUKKARASU et al., 2011).

Para derivados da quitina, há uma estimativa recente de faturamento, no mercado mundial, que chegará a US \$ 63 bilhões, enquanto o mercado global de quitosana atingirá mais de US \$ 21 bilhões até o ano de 2015. A região Ásia-Pacífico (incluindo o Japão) foi líder do mercado de quitosana com uma estimativa de 7,8 mil toneladas em 2010 e uma previsão de 12 mil toneladas em 2015. Os EUA representam o segundo maior mercado para a quitosana, com uma dimensão de mercado, em 2010, de 3,6 mil toneladas. Seu preço de mercado varia muito, em média é vendida a US\$ 5,0 por quilograma, para produtos com aplicação agrícola e ultrapassando US\$1000,0 para aplicações biomédicas (COSGROVE, 2010).

Neste contexto, espera-se que a produção brasileira contemple um novo cenário, tendo em vista que a criação de camarão em viveiros está se tornando uma atividade crescente no Brasil, principalmente no nordeste brasileiro, onde se concentram as melhores condições ambientais para o pleno desenvolvimento da atividade (CASTRO e PAGANI, 2004).

Segundo Sinimbu (2012), da Embrapa Meio-Norte, o camarão branco (*Litopenaeus vannamei* Boone) predomina em 95% das criações no Brasil, sendo o nordeste responsável por cerca de 92% de toda a produção brasileira dessa espécie. Juntos, os estados do Rio Grande do Norte e Ceará respondem

por 70% da produção. Em 2010, segundo a Associação Brasileira de Criadores de Camarão, a produção brasileira chegou a 80 mil toneladas.

Quanto à adaptação de espécies, Rego (2010) afirma que houve vários momentos de ajustes e adaptações, como também algumas crises de produção, até se chegar à espécie *Litopenaeus vannamei*, que foi totalmente adaptada às condições ambientais de cultivo e reprodução em cativeiro e às tecnologias de cultivo adotadas pelos pesquisadores brasileiros.

Introduzida, no Brasil, na década de oitenta, a procura pelo camarão *Litopenaeus vannamei* Boone, que não é nativo desta região, ocorreu devido ao acelerado crescimento dessa atividade de beneficiamento, conversões alimentares excelentes e grande capacidade de adaptação às diferentes condições climáticas. No Estado da Paraíba, a Fazenda Aquamaris S.A, situada na cidade de João Pessoa, é uma das empresas responsáveis pela produção de camarões brancos em cativeiro, cujo subproduto, a casca, foi utilizado para o desenvolvimento desta pesquisa. (CASTRO & PAGANI, 2004).

O cultivo de camarão em cativeiro apresenta uma vantagem sobre o ambiente costeiro e marinho, pois a qualidade da água, que é a principal variável para o êxito da atividade, deve ser livre de poluentes, especialmente dos metais pesados presentes em águas profundas (TAHIM, 2008).

No beneficiamento desse crustáceo, a cabeça e o exoesqueleto são geralmente removidos, o que representa aproximadamente 52,83% do seu peso total (14,81g). Tendo em vista a grande aceitação dessa espécie para exportação, Vasconcelos e Silveira (2004) realizaram um estudo acerca do rendimento e da composição química dos diversos componentes estruturais do camarão branco e obtiveram, como resultado para o rendimento do exoesqueleto, o valor de 9,69%. E, para o estudo da composição química do camarão, os valores encontrados foram de 14,94% de proteína e 6,05% de minerais e 2,52% de lipídeos.

Apesar da grande aceitação do camarão branco, seus resíduos continuam sendo descartados sem qualquer tipo de aproveitamento tecnológico. Surgindo, então, a importância de seu reaproveitamento, tendo em vista o excelente potencial para aplicações biomédicas, tornando-se, para essa finalidade, a matéria-prima mais valorizada (COSGROVE, 2010).

1.3 REFERÊNCIAS DA LITERATURA

ANTONINO, Nilton de A. **Otimização do processo de btenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundo da Indústria Pesqueira Paraibana** . João Pessoa, 2007. 88p. : il. Dissertação (Mestrado em Química), Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, 2007.

AZEVEDO, V.; CHAVES, S.; BEZERRA, D.; LIA FOOK, M.; COSTA A. Quitina E Quitosana: Aplicações Como Biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**. v.2.3 p.27-34, (2007).

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

COSGROVE, J. **The global chitosan market**. Nutraceuticals World, 2010. Disponível em: http://www.nutraceuticalsworld.com/contents/view_online-exclusives/2010-12-02/the-global-chitosan-market/. Acesso em 07 de Julho de 2012

CRAVEIRO A. A.; CRAVEIRO, A. C.; QUEIROZ D.C., **Quitosana: A fibra do futuro**. Fortaleza (Brasil): PADETEC – Parque de Desenvolvimento Tecnológico, 2004, capítulo 3.

GIL, M. H.; FERREIRA, P. Polissacarídeos como biomateriais. **Química**. v.100, p.72-74, 2006.

LONGHINOTTI, I.; FURLAN, L.; LARANJEIRA, M.C.M.; FÁVERE, V.T. Adsorção de azul de metileno e croconato amarelo sobre o biopolímero quitina. **Química Nova**, v. 19, p.221-223, 1996.

MCMURRY, J. **Química orgânica**. 4^o ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos. Editora S.A.1997. 576p

OLSZTA M. J.; CHENG, X.; JEE, S. S.; KUMAR, R.; KIM, Y. Y.; KAUFMAN, M. J,. Bone structure and formation: A new perspective. **Materials Science and Engineering: R: Reports**. v. 58, n. 3-5, p.77–116, 2007.

PILLAI, C. K. S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science**, v. 34, n.7, p.641–78, 2009.

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**. JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX 2010 – UFRPE: Recife, 18 a 22 de outubro, 2010.

SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J. K. V.; & JEON, Y. J. Food. Applications of chitin and chitosan. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, p. 37–51, 1999

SINIMBU, F. Mais camarão em menos tempo. EMBRAPA, 2012. Disponível em: <http://www.diadecampo.com.br/zpublisher/materias/Materia.asp?id=26824&secao=Pacotes%20Tecnol%F3gicos>. Acesso em: 25 de Julho de 2012.

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

THIRUNAVUKKARASU, N.; DHINAMALA, K.; MOSES INBARAJ, R. Production of chitin from two marine stomatopods *Oratosquilla* spp. (Crustacea). **J. Chem. Pharm. Res.**, v. 3, n. 1, p.353-359, 2011.

VASCONCELOS, M. M. M.; SILVEIRA, V.M.M.A. Rendimento e composição química dos componentes estruturais do camarão branco, *Litopenaeus vannamei*, cultivado no município de Acaraú/CE. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 19, 2004, Recife. **Anais...** Recife: SBCTA, 2004. CD Room.

Capítulo II

ESTUDO DA MORFOLOGIA DO CAMARÃO¹

¹ Trabalho publicado na revista "Journal of Chitin and Chitosan Science" e intitulado originalmente como "Morphological Study of Chitin Extraction"

2 ESTUDO DA MORFOLOGIA DA CASCA DE CAMARÃO

2.1 INTRODUÇÃO

O camarão é um dos principais representantes da classe dos crustáceos. O termo crustáceo derivada do latim *crusta*, que significa crosta ou pele grossa, que é responsável pelo revestimento e proteção do corpo do animal. Pertencem ao grupo dos Artrópodes, sendo caracterizados por apêndices articulados, simetria bilateral, corpo segmentado e exoesqueletos rígidos (RIBEIRO-COSTA e ROCHA, 2002).

Entre os produtos da pesca, o camarão é um alimento bastante apreciado pelos consumidores. A pesca extrativa do camarão pode ser feita no mar ou em água doce, em escala industrial ou artesanal. Na tentativa de se evitarem desastres ecológicos mais significativos e com o esgotamento dos recursos pesqueiros onde muitos estoques atingiram seus índices máximos de exploração, a carcinicultura surgiu como alternativa que apresenta grande potencial de suprimento desse produto (SEBRAE, 2008)

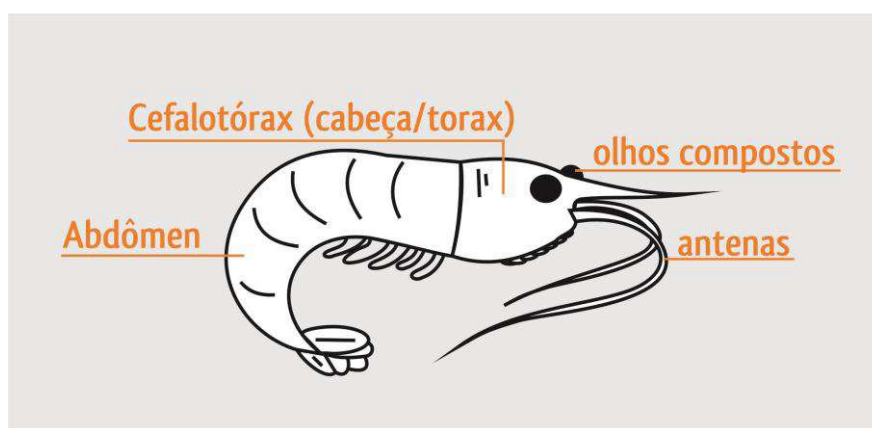
Com relação à produção mundial de camarão entre os anos de 1998 e 2008, esta passou de 3.629.976 toneladas para 6.519.671 toneladas, representando um aumento de 244% nos referidos 10 anos (FAO, 2010). O potencial do Brasil para exploração da carcinicultura marinha é de 600.000 hectares, com a utilização de apenas um terço (1/3) dessa área (200.000 hectares), o que corresponderia a um número pouco superior ao explorado pelo Equador (180.000 hectares) e a apenas 25% da área utilizada atualmente no Vietnã (850.000 hectares). Com a utilização tecnológica atual, seria possível, no Brasil, a obtenção de uma produção de 1.000.000 toneladas de camarão ao ano, gerando 750.000 empregos diretos e uma receita de R\$ 10 bilhões de reais, com captação de US\$ 2, 0 bilhões de divisas. Esses números são significativos para transformar, por exemplo, a socioeconomia rural da região litorânea do Nordeste brasileiro. De acordo com autores citados, isso irá representar uma produção de 100.000 exoesqueletos de camarão, que, se não forem direcionados para a indústria de processo, esse material poderá provocar danos ao meio ambiente. (ROCHA E ROCHA, 2010).

Entre as espécies de camarão mais comumente produzidas e processadas pela indústria alimentícia brasileira, destaca-se o camarão cinza ou *Litopenaeus vannamei* ou simplesmente *vannamei*, originário do Oceano Pacífico, introduzido, no Brasil, na década de oitenta e, atualmente, o mais cultivado, correspondendo a 95% da produção nacional (CASTRO e PAGANI, 2004).

2.2 REVISÃO DA LITERATURA

Os camarões possuem um corpo alongado e comprimido lateralmente, terminando em um leque caudal. O corpo está dividido em duas partes: a cabeça e o tórax que juntos são nomeados cefalotórax e abdômen. O cefalotórax é formado por 14 segmentos, seis pertencentes à cabeça e oito ao tórax. Esses segmentos formam uma peça única, a carapaça. Ainda estão presentes na cabeça, dois pares de antenas e um par de olhos compostos. Na região torácica, encontram-se apêndices (externos e internos) relacionados com a defesa, a captura de alimento, a locomoção e a reprodução. O abdômen é constituído por seis segmentos seguidos de uma estrutura pontiaguda, o telso. A morfologia externa do camarão pode ser visualizada na Figura 1 (SEBRAE 2008).

Figura 1 - Anatomia externa do camarão



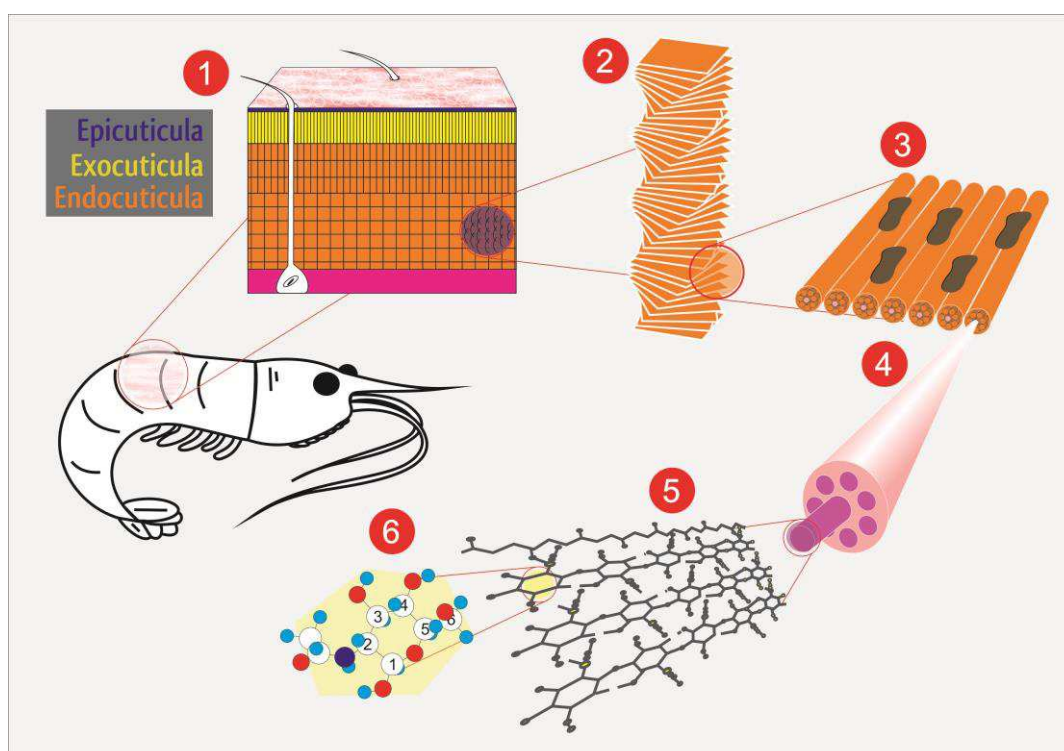
Um aspecto importante para aceitabilidade do camarão pelos consumidores é a sua coloração alaranjada associada ao frescor e à qualidade do produto. Essa coloração é provocada pela presença de pigmentos de

carotenoides naturais, denominados por astaxantina, que estão presos às moléculas de proteína que os mascaram. A dissociação do pigmento carotenoide ocorre quando os camarões são submetidos ao cozimento, tingindo a cutícula fortemente de cor laranja. Além de promover a pigmentação, os carotenoides são importantes para o crescimento, a sobrevivência e o desempenho geral do animal. Embora o padrão de cor seja determinado geneticamente, algumas mudanças de coloração estão normalmente associadas com mudanças ontogenéticas, sexuais, alimentares ou sazonais (FONTANA, 2000).

Os pigmentos dos camarões localizam-se na cutícula, cuja função é proporcionar suporte mecânico para o corpo, servindo como uma “armadura” contra as cargas impostas pelos predadores e pelo meio ambiente. Também permite a mobilidade ao auxiliar na formação de articulações e de pontos de ligação com os músculos (RAABE et al, 2005).

A cutícula é composta por duas camadas, a epicutícula e a procutícula. Esta última formada por três subcamadas: a exocutícula, a endocutícula e uma camada membranácea. Todas representadas na ilustração (Figura 2) a seguir (PROMWIKORN et al., 2005).

Figura 2 - Ilustração esquemática sobre a constituição do exoesqueleto do camarão



Na imagem 1 da Figura 2, observa-se que a epicutícula é mais externa, é uma camada bem fina que, segundo Giraud-Guille (1984), não contém proteína e quitina, embora uma pesquisa recente, realizada por Seidl e Ziegler (2012), comprove indícios de quitina na epicutícula. Verifica-se também uma camada mais espessa, nomeada procutícula, que é uma camada mineralizada por calcita, onde também se encontra o complexo quitina-proteína.

Segundo Promwikorn et al., (2005), em termos de composição química, o exoesqueleto possui materiais inorgânicos e orgânicos, numa proporção de 60:40. Os materiais inorgânicos presentes na cutícula incluem o cálcio, o cloreto de magnésio, o cobre manganês, o fósforo, o potássio, o enxofre. E os materiais orgânicos incluem a glicoproteína de lipídios, as proteínas, os glicosaminoglicanos, os mucopolissacarídeos, os carboidratos, e a quitina. Sendo a epicutícula rica em carboidratos, lipídeos, cálcio e proteína, contudo sem fibras de colágeno. Logo, o carboidrato presente na epicutícula está sob a forma de uma glicoproteína, que pode ser um precursor da quitina. Os mesmos autores afirmam que a presença de proteínas e carboidrato na camada exocutícula e membranosa também indicam a presença de quitina.

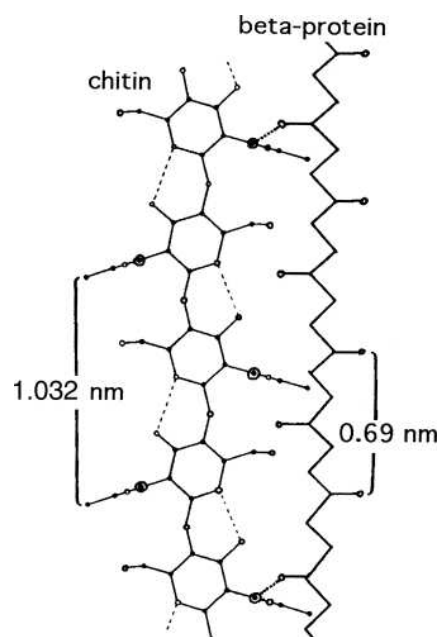
Na imagem 2 da Figura 2, é ilustrada uma estrutura repetitiva que forma pequenas camadas que vão se sobrepondo umas às outras na procutícula. Segundo Giraud-Guille (1998), essas camadas horizontais são visíveis tanto nas camadas pigmentadas quanto na camada principal e na camada membranosa. Essas camadas são facilmente reconhecidas pelos padrões arqueados visíveis em seções oblíquas. As microfibrilas (imagem 4) e suas diferentes associações formam um material fibroso, que se encontra na horizontal e é regularmente sobreposto em toda a espessura da procutícula. No entanto, através da espessura da procutícula, as fibras giram continuamente. Esses padrões correspondem à estrutura helicoidal (imagem 2), onde cada camada corresponde a uma rotação de 180° , conforme descrito por Bouligand (GIRAUD-GUILLE e BOULIGAND, 1986).

Entre as camadas do complexo quitina-proteína, estão presentes os cristais de sais minerais (imagem 3), que são típicos de crustáceos, tanto aquáticos quanto terrestres. Os sais são principalmente carbonatos, presentes como calcita e que, possivelmente, servem para proteger o camarão das forças mecânicas externas (VINCENT, 2002).

Segundo Mikkelsen et al., (1997) os cristais de cálcio podem ser observados na Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) como uma mancha branca na forma de estrela típica, que surge de um padrão dendrítico de crescimento. Como visto na imagem 2, o exoesqueleto do camarão consiste de várias camadas, e os pontos brancos (representados no desenho pela cor marrom na imagem 3) são formados entre essas camadas .

Ao contrário dos cristais de cálcio que ficam alojados na superfície das camadas, o complexo quitina-proteína fica enovelado nas camadas. Esse complexo é conhecido por apresentar grandes variações entre as camadas, embora presente nas três camadas da procutícula. Ainda não é possível determinar a força da interação interfacial entre a quitina e a proteína (fibrá-matriz), mas, segundo Vincent (2002), especula-se que, nas fases iniciais do desenvolvimento da cutícula, a quantidade de proteína por unidade de quitina é muito menor do que nas cutículas maduras. Deduz-se que a proteína presente nas camadas interage, preferencialmente, com a quitina. Portanto, a adição da matriz na quitina é um processo de, no mínimo, duas fases. As nanofibrilas de quitina são, primeiramente, revestidas com uma proteína específica; e, em seguida, o resto da proteína é adicionado, havendo uma interação das proteínas com a quitina. A Figura 3 exemplifica como ocorre essa interação:

Figura 3 - Interação das proteínas com a quitina



Fonte: VINCENT, 2002

A proteína é, provavelmente, sintetizada dentro da cutícula, e, certamente, secretada a partir da epiderme. Ela interage com a quitina em uma zona estreita (a camada de Schmidt) com quantidades relativamente grandes de água (cerca de 90%), presumivelmente, para conduzir as interações hidrofóbicas entre quitina e proteínas (VINCENT, 2002).

O fato é que a localização exata de quitina é incerta. O padrão é geralmente hexagonal e é constituído por alvéolos claros enovelados em uma matriz escura. Rudall (1965) e Neville (1975) propuseram que a quitina corresponde às áreas claras, enquanto que a parte escura nas imagens da cutícula por MEV foram atribuídas aos componentes proteicos. No entanto, esses estudos foram questionados, pois se verificou que o padrão alveolar pode ser observado independentemente da percentagem de quitina nas cutículas (GIRAUD-GUILLE, 1984).

2.3 ESTRUTURAS E PROPRIEDADES DA QUITINA

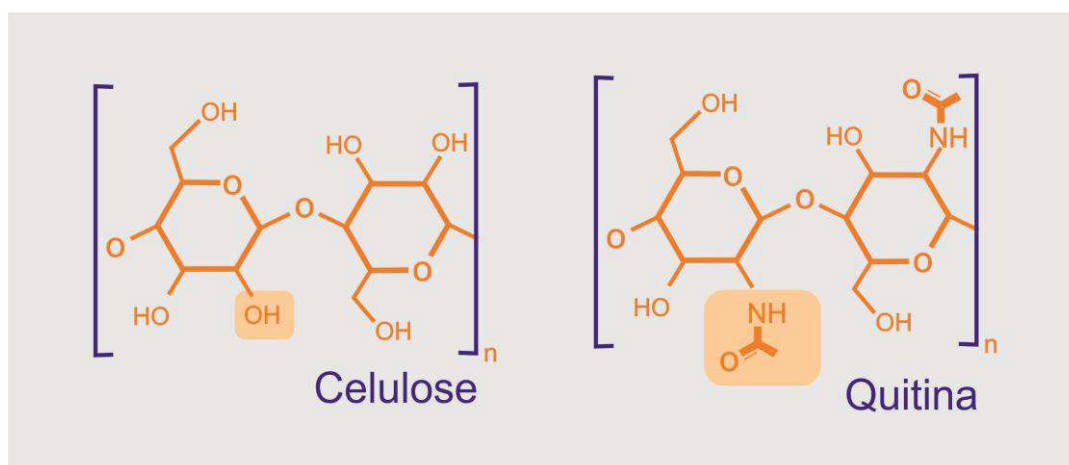
A quitina foi descoberta em 1811, em cogumelos, pelo professor francês Henri Braconnot, recebendo a denominação inicial de “fugine”, substituída, posteriormente, pelo termo “quitina”, derivado da palavra grega “khitón”. O termo significa carapaça ou caixa de revestimento, uma vez que a função na natureza é de revestimento e proteção de invertebrados. Entretanto, só mais tarde, em 1843, Payen detectou a presença de nitrogênio na estrutura da quitina. O conteúdo de nitrogênio na quitina varia de 5 a 8 %, dependendo da quantidade de proteína residual (RINAUDO, 2006; DOS SANTOS, 2003).

A quitina é um pó incolor, que apresenta estrutura irregular com parte cristalina, parte amorfa e insolúvel em água, solventes orgânicos, ácidos diluídos e soluções alcalinas. Ela dissolve-se em ácidos minerais concentrados; porém, devido à degradação da cadeia polimérica, uma das poucas possibilidades de solubilizar a quitina é empregar uma solução de N,N-dimetilacetamida contendo 5% de cloreto de lítio (MATHUR e NARANG, 1990).

Estruturalmente, a quitina é semelhante à celulose. Alguns pesquisadores consideram-na um derivado da celulose por causa da grande similaridade entre os polímeros que a compõem, exceto pela celulose conter

grupo hidroxila (-OH) e a quitina conter um grupo N-acetil (-NHCOCH₃) na posição C2 dos monômeros, como pode ser observado na Figura 4. Ambos podem servir como suporte a componentes estruturais celulares e superfície corpórea (MERZENDORFER, 2005).

Figura 4 - Estrutura química da celulose e da quitina

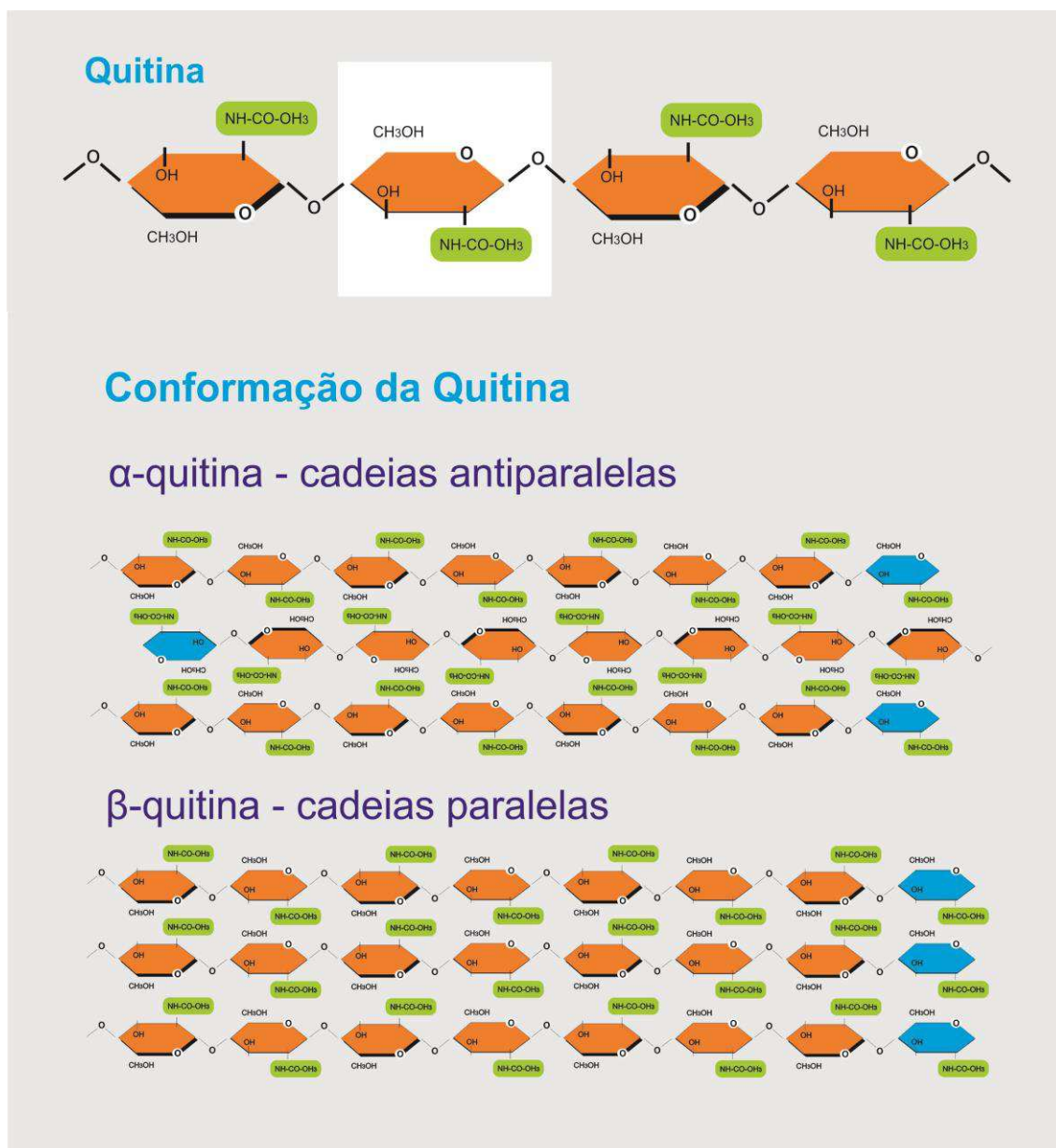


A quitina é um polissacarídeo linear contendo cadeias β-(1-4)-2-acetamida-2-dexosi-D-glicose, que estão espontaneamente reunidas em microfibrilas de diâmetro e comprimento variados após a síntese do polímero e transporte para o espaço extracelular. Ela é semicristalina com as cadeias organizadas em folhas (ou lamelas) paralelas. Nos domínios cristalinos, o arranjo das cadeias nas folhas possui variações. A quitina é conhecida por existir em, pelo menos, duas formas polimórficas cristalinas, denominadas de α-quitina e β-quitina. Também existe a γ-quitina, mas, segundo Rinaudo (2006), é uma variante da α-quitina.

Em cutícula de crustáceos, a quitina ocorre na forma de α-quitina, fortemente associada a proteínas e materiais inorgânicos ou ambos, e apresenta grau de cristalinidade acima de 85%. Em moluscos, cascas de braquiópodes e algumas larvas, a quitina encontra-se na forma de β-quitina. As formas de quitina são encontradas em estruturas menos rígidas, mas resistentes, e apresentam grau de cristalinidade de aproximadamente 72%. Em ambas as estruturas, as cadeias de polissacarídeos são paralelas interligadas por pontes de hidrogênio. As duas formas diferem na direção das cadeias em folhas sucessivas (FALINI et al, 1996).

A α -quitina está arranjada com uma conformação antiparalela, enquanto a β -quitina apresenta cadeias paralelas. Essa organização está representada na Figura 5.

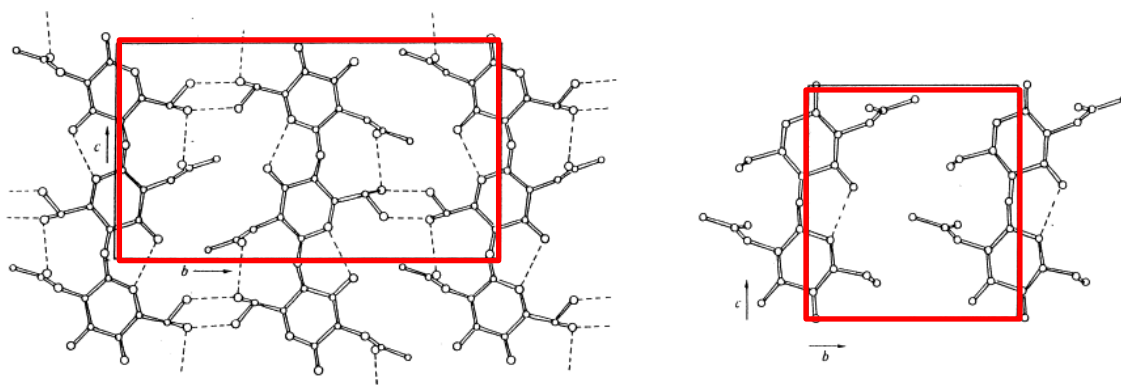
Figura 5 - Conformação da α -quitina (à esquerda) e β -quitina, à direita



A α -quitina é a forma mais estável e o alinhamento antiparalelo pode contribuir significativamente para a resistência mecânica promovendo um empacotamento denso entre as microfibrilas. Esta disposição que permite uma máxima ligação entre macromoléculas por pontes de hidrogênio é também responsável por sua insolubilidade. Enquanto no arranjo espacial β -quitina há

uma redução do grau de empacotamento e o número de pontes de hidrogênio intercadeia é reduzido, o número de pontes de hidrogênio formado com moléculas de água aumenta. Devido a uma menor força intermolecular, exhibe maior reatividade, intumescimento em água e solubilidade. As ligações de hidrogênio são feitas por dos grupos N-acetil e podem ser visualizada na Figura 6 (KHOR, 2002).

Figura 6 - Representação das ligações por pontes de hidrogênio da α -quitina (à esquerda) a β -quitina, à direita



Fonte: (adaptado de KURITA, 2001); LISBOA, 2011

Segundo Campanha Filho et al. (2007), os diferentes arranjos no estado sólido exibem propriedades diferentes. A α -quitina é um sólido denso, insolúvel em água, mas capaz de adsorver e reter umidade. A β -quitina tem aspecto fibroso e também não se solubiliza em água, mas como seu empacotamento é menos denso, adsorve mais umidade que a α -quitina.

Por fim, surge a γ -quitina, considerada uma variação da α -quitina, que se conforma em cadeias paralelas que se alternam com uma antiparalela. A α -quitina é a forma mais abundante. As formas β - e γ -quitina podem ser convertidas à forma α por tratamentos adequados, mas tal conversão é irreversível. (ANTONINO, 2007).

2.4 MATERIAIS E MÉTODOS

2.4.1 Materiais

- **Matérias-primas**

As cascas (sem a cabeça) dos camarões *Litopenaeus vannamei* criados em cativeiro, fornecidos pela Fazenda Aquamaris S.A, situada na cidade de João Pessoa - Paraíba.

- **Reagentes**

Ácido clorídrico (HCl) 36-38% - Vetec para etapa de desmineralização;

Hidróxido de sódio (NaOH) – Synth para a etapa de desproteínização.

2.4.2 Caracterização

Os ensaios de caracterização foram realizados no laboratório CERTBIO, localizado da Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande. Nesta etapa inicial, Capítulo 2, foram realizados os ensaios no MEV e EDS.

- **Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS)**

A Microscopia Eletrônica de Varredura, MEV, é um método que pode fornecer rapidamente informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida. O MEV é um instrumento muito versátil e usado rotineiramente para a observação e análise de características microestruturais de objetos sólidos. A principal razão de sua utilização é a alta resolução que pode ser obtida quando as amostras são observadas (DEDAVID et al., 2007).

O princípio de um microscópio eletrônico de varredura consiste em utilizar um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do detector a uma tela catódica cuja varredura está perfeitamente sincronizada com aquela do feixe incidente (DEDAVID et al., 2007).

Atualmente, a maioria dos equipamentos de microscopia eletrônica de varredura vem acoplada com o detector de energia dispersiva (EDS). A análise por EDS é uma ferramenta muito importante do MEV para a caracterização de

materiais, pois permite ao pesquisador identificar a composição de sua amostra, mesmo que, qualitativamente, em pontos específicos da imagem.

Para o processo de caracterização usado neste trabalho, foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura de bancada, modelo TM-1000, marca Hitachi, com aumentos de 180X até 10.000X, com profundidade de foco de 1 mm, resolução de 30 nm, 15 KV, baixo vácuo e pressão variada (1 a 270 Pa), sem recobrimento metálico.

2.4.3 Método

Neste tópico, são apresentados e discutidos os resultados obtidos na caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X a partir da casca de camarão *Litopenaeus vannamei*. Foi avaliada a morfologia da casca em cada etapa do processo de extração até obtenção da quitina pura.

Importante ressaltar que, para essa análise, foi selecionado somente o exoesqueleto, usado em todas as etapas da extração de quitina de forma integral, sem moagem.

As análises dos resultados foram divididas em duas partes, tanto na superfície quanto nas seções transversais (ângulo de 90°).

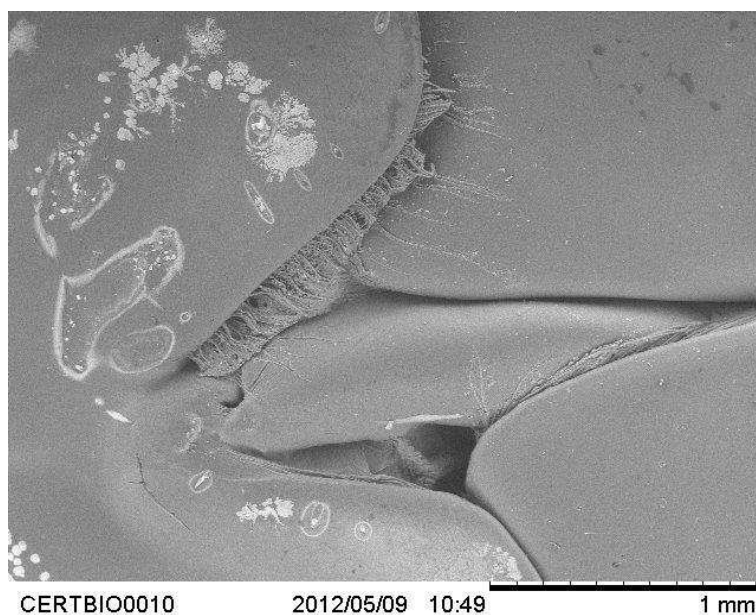
2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

- **MEV – Caracterização da seção horizontal (superfície)**

Nos resultados obtidos da caracterização realizada na parte superior da casca, não foi possível identificar as diferentes camadas que constituem a casca, mas foi possível observar mudanças na sua estrutura durante as etapas de desmineralização e desproteíntização. A micrografia da casca de camarão em seu estado bruto como apresentada consta na Figura 7.

Figura 7 - Micrografias da amostra da casca de camarão na forma bruta com aumento de 80X



Na imagem, é possível observar a presença de áreas mais claras na superfície, algumas delas em forma de estrela típica, que podem estar relacionadas a depósitos de carbonato de cálcio na forma de cristais. Esses cristais podem ser atribuídos, de acordo com a literatura, à forma polifórmica do carbonato de cálcio, à calcita, e aparecem e crescem dentro da rede orgânica fibrilar, resultando na composição de um material rígido que forma o exoesqueleto.

A cada nova cutícula calcificada, acontece uma nucleação e, conseqüentemente, crescimento destes cristais. Os primeiros aparecem na parte mais externa da camada pigmentada, onde os minerais progridem em eixos verticais, em direção à camada principal (procutícula), com velocidades diferentes. Porém, essa mineralização permanece apenas no espaço entre as fibras orgânicas, não ocorrendo na camada membranosa (GIRAUD-GUILLE, 1990). As micrografias das cascas de camarão em seu estado desmineralizado e desproteínizado estão apresentadas nas Figuras 8 e 9.

Figura 8 - Micrografia da amostra da casca de camarão na forma desmineralizada com aumento de 180X

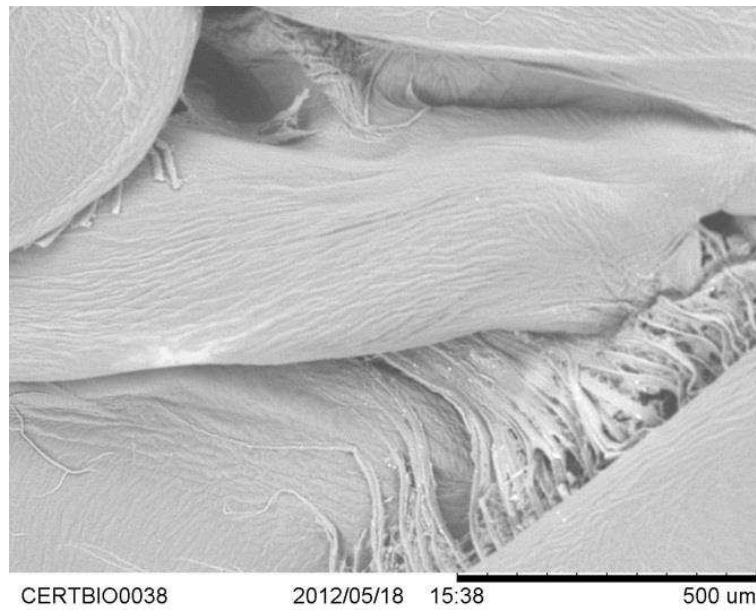
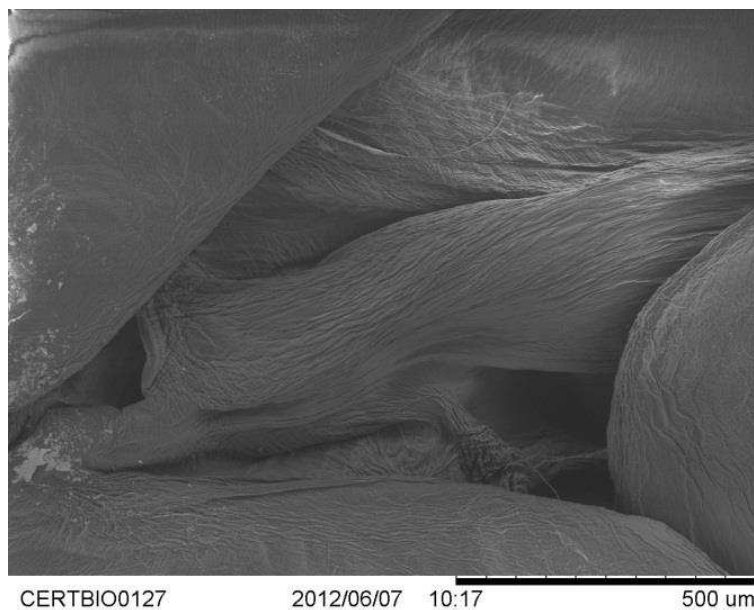


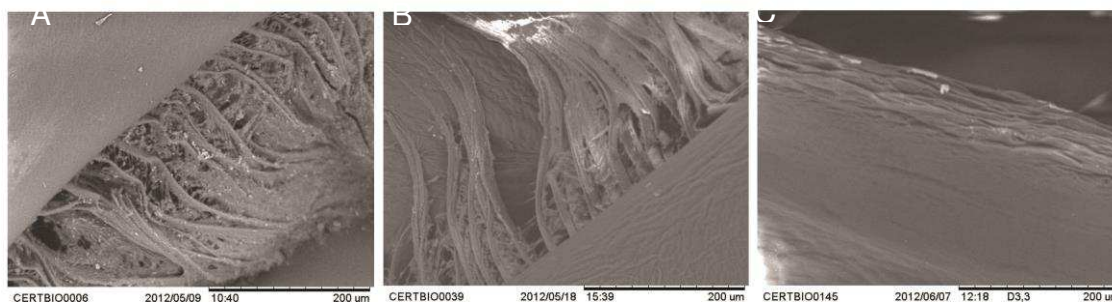
Figura 9 - Micrografia da amostra da casca de camarão na forma desproteïnizada com aumento de 180X



Após o tratamento químico da desproteïnização e da desmineralização, conforme exposto nas Figuras 8 e 9, observou-se uma mudança de perfil na superfície, deixando o material com uma aparência fibrosa. Esse fenômeno de alteração na superfície é descrito por Pillai (2009) como uma indicação da obtenção da quitina pura.

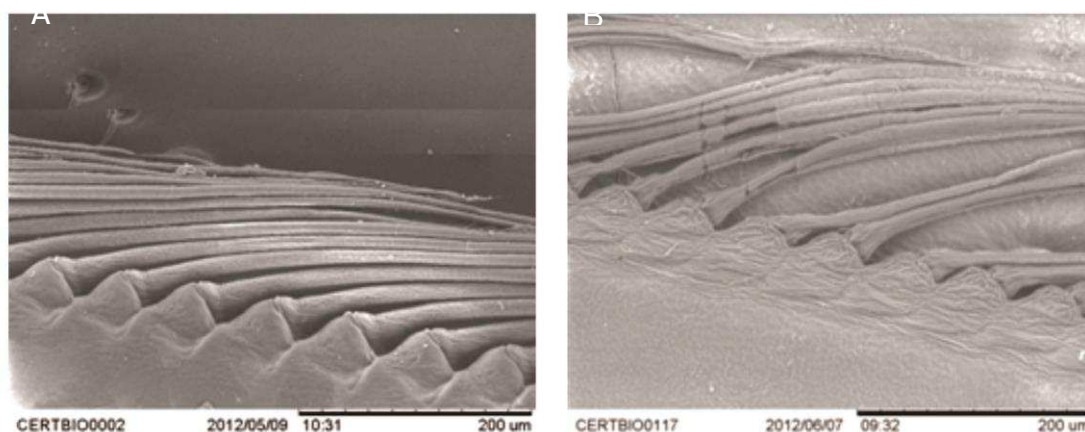
Outra observação é que alguns apêndices (internos) presentes, tanto na casca bruta quanto na etapa da desmineralização, desaparecem na etapa da desproteínização. Essa observação também pode ser visualizada nas micrografias da Figura 10.

Figura 10 - Micrografias das amostras da casca bruta (A), desmineralizada (B) e desproteínizada (C) com aumento de 500X



Segundo Guille (1998), as carapaças possuem uma matriz orgânica, organizada por estruturas hierárquicas que são evidenciadas por um padrão de seções arqueadas, observadas por microscopia eletrônica de varredura. Essas seções produzem um efeito de sobreposições das orientações sucessivas. Essas seções orientadas podem ser observadas nas Figuras 11A e 11B.

Figura 11 - MEV da amostra bruta (A) e desproteínizada (B) respectivamente com aumento 500X



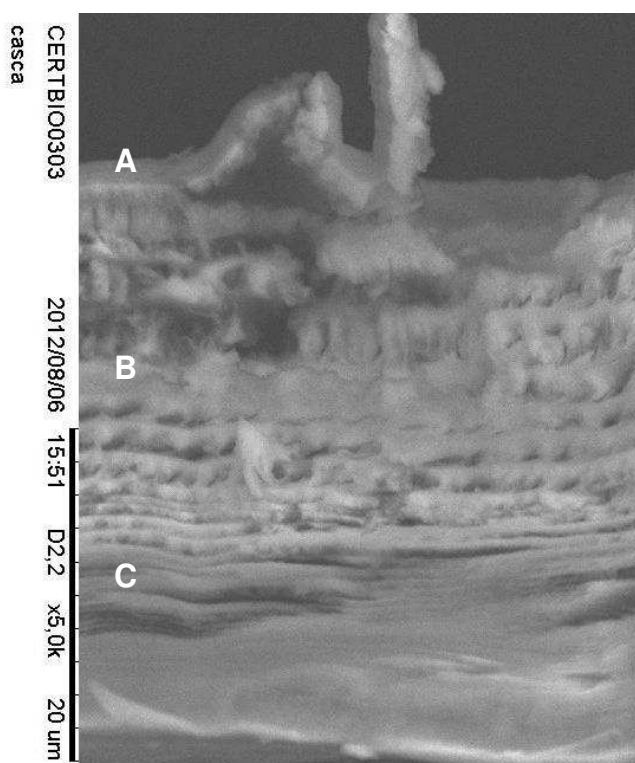
Foi observado também que não há mudanças entre a casca bruta (Figura 11A) e a casca desmineralizada (Figura 11B). A princípio, não se observa uma mudança estrutural, pois a parte mineral está depositada apenas na superfície do complexo proteína-quitina. Porém, na Figura 11B, após a

remoção da proteína, observa-se uma soltura dos apêndices (interno) na superfície da casca. Neste fenômeno, ocorre uma diminuição da reticulação após a retirada da parte proteica, tornando a estrutura mais frágil e admitindo a sua grande importância estrutural.

- **MEV – Caracterização da secção transversal**

A caracterização da seção transversal da casca de camarão torna-se importante para a visualização das camadas características do exoesqueleto desses animais e o consequente efeito do tratamento de desmineralização e desproteínização. As Figuras 12, 13 e 14 representam as micrografias das seções transversais das amostras da casca de camarão bruto, desmineralizada e desproteínizada, respectivamente. Na Figura 12, encontra-se a micrografia da seção transversal da amostra da casca bruta.

Figura 12 - Micrografia da secção transversal da casca bruta revela a (A) Epicutícula (B) Exocutícula (C) Endocutícula

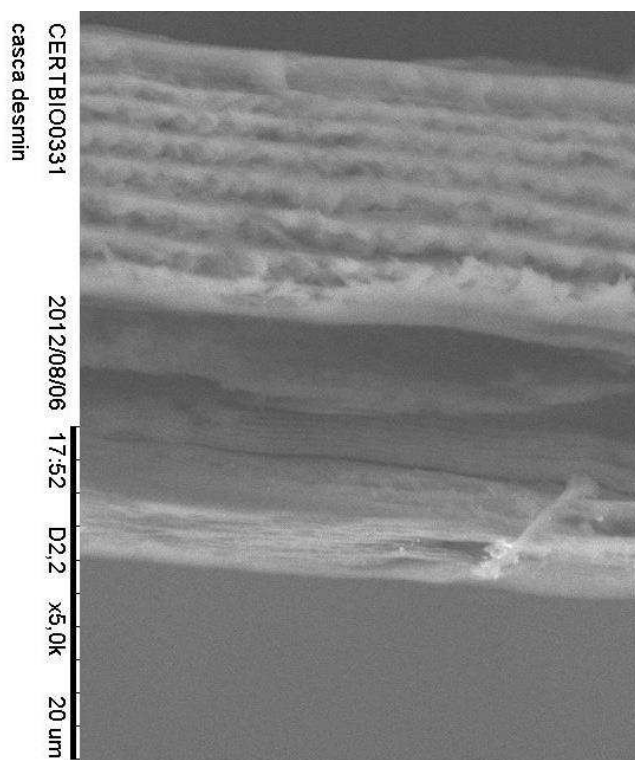


Na Figura 12, é possível identificar com facilidade a epicutícula (A), a exocutícula (B) e a endocutícula (C). Foi analisada, nesta imagem, a espessura da epicutícula, descrita na literatura por Giraud-Guille (1984), como uma

camada fina. Na procutícula, constituída pela exocutícula e endocutícula, surge uma estrutura repetitiva que forma pequenas camadas que se vão sobrepondo umas às outras. Estas camadas são originárias de células que vão secretando, empurrando sucessivamente as camadas mais velhas até o exterior. Estas camadas menores têm como principais componentes o complexo quitina-proteína, bem como a calcita depositada sobre as nanofibrilas formadas pelo referido complexo. Verifica-se ainda uma densidade superior da epicutícula, em relação às outras camadas, possivelmente devido à acumulação de maior quantidade de cálcio nesta área.

Na Figura 13, amostra desmineralizada, verifica-se uma alteração da coloração em algumas zonas, endocutículas, quando comparada à Figura 12.

Figura 13 - Micrografia MEV da secção transversal da casca desmineralizada

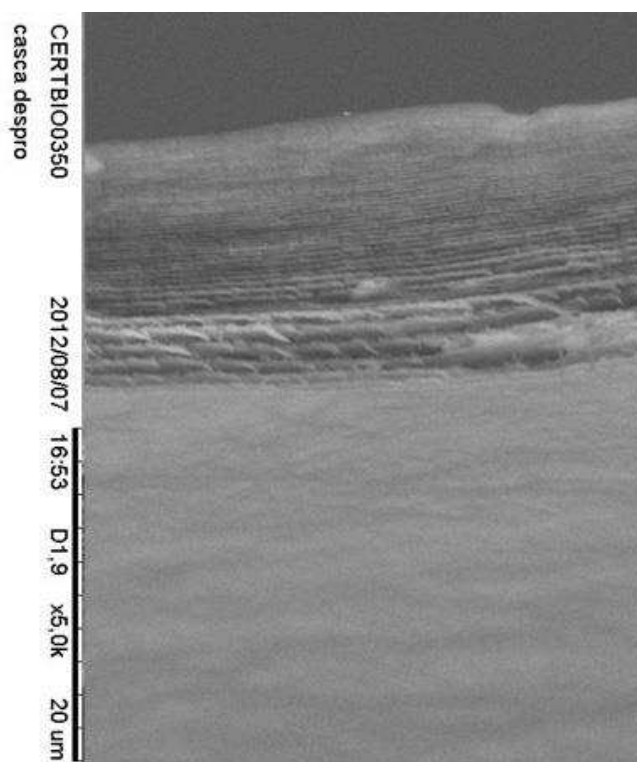


Acredita-se que, devido à remoção do cálcio presente nessa área, houve uma maior evidência da estrutura quitina-proteína. É possível verificar um aumento no tamanho de cada subcamada à medida que elas se aproximam da epicutícula, que desaparece, confirmando que esta camada é constituída majoritariamente por cristais de carbonato de cálcio.

Esse aumento de tamanho nas pequenas camadas constituídas pelo complexo quitina-proteína pode estar relacionado com a possibilidade de o cálcio realizar alguma reação de aderência com os aminoácidos, funcionando, desta forma, como um reticulante na estrutura, e, com a sua remoção, as macromoléculas do complexo ganham liberdade. Esse aumento é verificado pela facilidade do inchamento da casca quando em contato com as soluções aquosas. Esta discussão sustenta a seleção da desmineralização como o primeiro processo de extração de quitina.

Na Figura 14, amostra desproteïnizada, é considerada como quitina, pois essa é a única fase restante. A casca apresenta zonas mais densas especialmente nas junções, como pode ser observado na Figura a seguir.

Figura 14 - Micrografia MEV da secção transversal da casca desproteïnizada



Nesta Figura, já não é possível diferenciar com clareza as camadas constituintes, prevalecendo apenas um comportamento do esqueleto quitinoso, que deverá servir como suporte para a integração dos outros componentes.

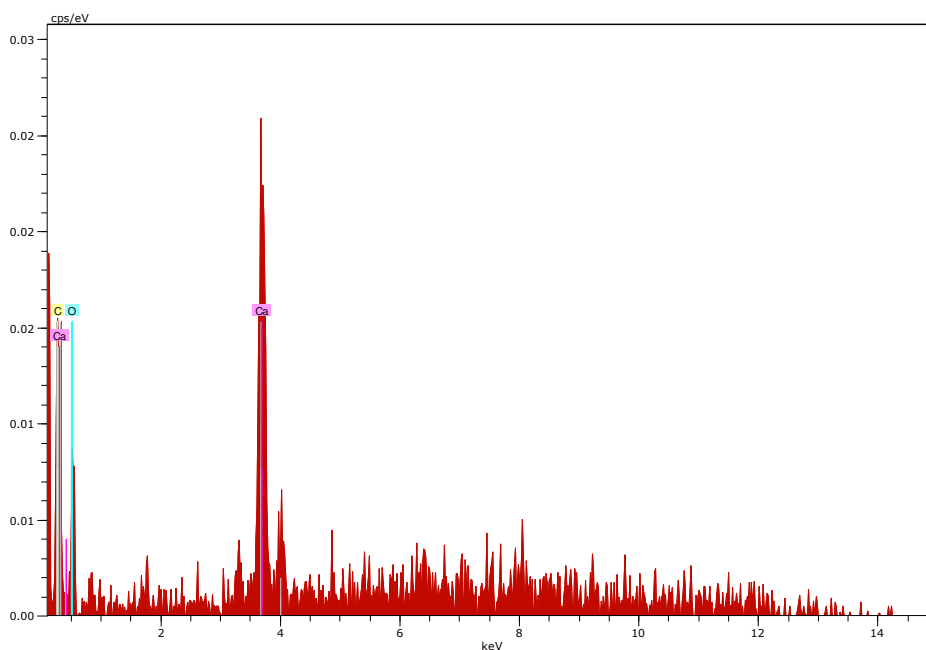
Na estrutura da amostra, constata-se ainda uma organização por subcamadas, que, à medida que se aproximam da zona da epicutícula (exterior), tornam-se cada vez menores. Conclui-se que os processos de

extração não foram suficientes para desorganizar a estrutura quitinosa, podendo, assim, explicar as dificuldades da desacetilação da α -quitina, relacionados às questões difusionais para o interior das cadeias poliméricas da quitina.

2.5.2 Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS)

Na análise realizada Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS), foram identificados os elementos químicos presentes no exoesqueleto do camarão em seu estado bruto, desmineralizada e desproteïnizada, respectivamente. Na Figura 15, encontra-se o espectro de EDS da casca de camarão no estado bruto.

Figura 15 - EDS espessura da casca bruta



Espectro: casca bruta

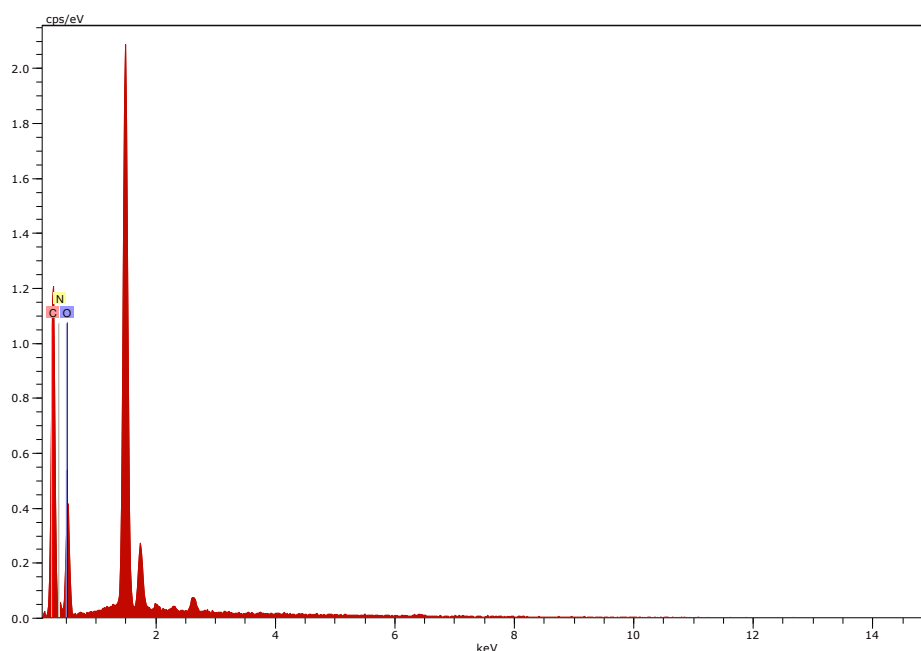
Elementos	AN	Series	norm. C	Atom. C
	[wt.%]	[at.%]		
Carbono	6	K-series	49,63	63,34
Oxigênio	8	K-series	29,98	28,72
Cálcio	20	K-series	19,11	7,31
Fosfóro	15	K-series	1,28	0,63
			Total:100,00	100,00

No espectro representado na Figura 15, pode-se constatar a presença de C, O, Ca e P. A presença destes elementos confirma a análise realizada por meio da microscopia eletrônica de varredura, já discutida anteriormente.

Segundo Cárdenas et al. (2004), encontra-se, nas carapaças dos crustáceo sem pré-tratamento, o cloreto de sódio (NaCl), atribuído à água do mar. Contudo, não se observa a presença deste elemento químico por se tratar de uma amostra proveniente de viveiros construídos em antigas salinas e áreas antes ocupadas por manguezais (CAVALCANTI, 2003).

Na Figura 16, encontra-se o resultado obtido por EDS, após a casca de camarão ser desmineralizada. Antes de discutir a Figura, vale ressaltar que o maior pico remete ao alumínio atribuído ao porta amostra do equipamento.

Figura 16 - EDS espessura da casca desmineralizada



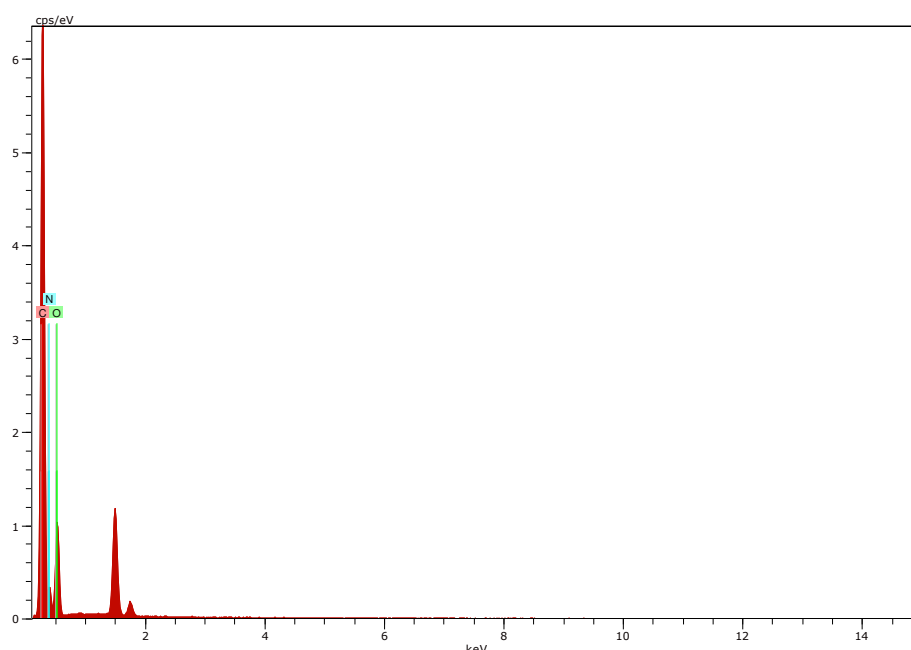
Espectro: casca desmineralizada

Elementos	AN	Series	norm. C	Atom. C
	[wt.%]	[at.%]		
Carbono	6	K-series	50,73	56,99
Oxigênio	8	K-series	37,14	31,32
Nitrogênio	7	K-series	12,13	11,68
			Total:100,00	100,00

No segundo espectro da análise EDS, verifica-se o desaparecimento do cálcio, confirmando-se que o processo utilizado foi eficiente na desmineralização da estrutura. Surge ainda a presença de nitrogênio atribuído ao grupo acetamida, que não foi detectado na casca bruta, possivelmente devido à superior concentração de elementos como o cálcio e o carbono que mascararam a detecção deste elemento.

Na Figura 17, encontra-se o espectro de EDS da casca de camarão desproteïnizada.

Figura 17 - EDS espessura da casca desproteïnizada



Espectro: casca desproteïnizada

Elementos	AN	Series	norm. C	Atom. C
	[wt.%]	[at.%]		
Carbono	6	K-series	56,13	61,65
Oxigênio	8	K-series	25,31	20,87
Nitrogênio	7	K-series	18,56	17,48
			Total:100,00	100,00

No terceiro espectro da análise EDS, verifica-se que o C, O e o N permanecem como os elementos químicos principais, e, tal como indicado na introdução deste trabalho, são os elementos presentes na quitina, havendo apenas um aumento do nitrogênio ocasionado pelo desaparecimento do cálcio no processo anterior. A razão teórica entre o elemento carbono e nitrogênio

para a quitina é de 0,14, tendo sido obtido um valor de 0,27 com estas análises de EDS. Esta discrepância indica que a quitina obtida ainda tem uma fração do complexo quitina-proteína, sendo tal justificado pela dificuldade da permeação de NaOH para a solubilização total da proteína. Desta forma, seria necessária uma desproteíntização mais longa, porém, no caso da produção de quitosana, é considerado desnecessária.

2.6 CONCLUSÃO

O estudo sobre a morfologia e composição química da casca do camarão *Litopenaeus vannamei* Boone, executado durante as três etapas da extração de quitina, foi um trabalho pioneiro. A partir das caracterizações que foram realizadas, foi possível identificar a disposição dos diversos componentes na casca de camarão, identificando-se zonas de maior acumulação de cada componente, e, compreendendo alguns fenômenos, por exemplo, a mudança de perfil na superfície que se tornou fibrosa, assim como o desaparecimento de algumas camadas que constituem a casca, associadas ao processo de extração.

Atribui-se à quitina um efeito determinante sobre a estrutura da carcaça, cujo complexo deve ser responsável pelas características mecânicas do invólucro e pode servir como inspiração para o desenvolvimento de novos Biomateriais.

2.7 REFERÊNCIA DA LITERATURA

ANTONINO, Nilton de A. **Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundo da indústria** pesqueira Paraibana . João Pessoa, 2007. 88p. : il. Dissertação (Mestrado em Química), Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, 2007.

CAMPANA-FILHO, S.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F.; CARDOSO, M.; BATTISTI, M.; SIM, P.; GOY, R.; SIGNINI, R.; LAVALL, R. Extração, estruturas e propriedades de α - e β -Quitina. **Química Nova**, São Carlos, v. 30, n. 3, p.644-650, 2007.

CASTRO, A. A.; PAGAN, G. D. Secagem e composição química da cabeça de camarão (*Litopenaeus vannamei* Boone) a diferentes temperaturas. **Revista**

Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v. 6, n. 2, p.123-129, 2004.

CAVALCANTI, L. B. **Variações das condições hidrológicas e da clorofila a associadas ao cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei***. Tese, 2003. Recife f.148

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G.; **Microscopia eletrônica de varredura: Aplicações e preparação de amostras : Materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007

FALINI, G., ALBECK, G. S., WEINER, S., ADDADI, L., Control of aragonite or calcite polymorphism by mollusk shell macromolecules. **Science**, v. 271, p. 67–69. 1996.

FAO – Food and Agriculture Organization the United Nations (2010). The State of World Fisheries and Aquaculture. Rome, Italy: FAO/UN.

FONTANA, J. D.; MENDES, S. V.; PERSIKE, D. S.; PASSOS, M. CAROTENÓIDES: Cores atraentes e ação biológica. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. n. 13, v. 13, mar/abr., 2000.

GIRAUD-GUILLE M-M. Fine structure of the chitin–protein system in the crab cuticle. **Tissue Cell**, v.16, p. 75–92, 1984.

GIRAUD-GUILLE, M-M.; BOULIGAND, Y. Chitin-protein molecular organization in arthropod. **Chitin in Nature and Technology**, Springer p. 29-35, 1986.

GIRAUD-GUILLE, M.-M. Plywood structures in nature. **Current Opinion in Solid State & Materials Science**, v. 3, p. 221-228, 1998.

LISBOA, H.M. **Produção de quitosano e desenvolvimento de novos materiais a partir de resíduos alimentares**. 2011. 214 f. Tese (Ciência e Engenharia de Materiais), Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.

KHOR, E. Chitin: fulfilling a biomaterials promise. **Book reviews / Biomaterials**, Elsevier, v. 23, p. 3913–3915, 2002.

MERZENDORFER, Hans; ZIMOCH, Lars. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 24, p. 4393-4412, 2003.

MIKKELSEN, A.; BALLING ENGELSEN, S. ; HANSEN, H. C. B. ; LARSEN, O. ; SKIBSTED, L. H. Calcium carbonate crystallization in the alfa-chitin matrix of the shell of pink shrimp, *Pandalus borealis*, during frozen storage. **Journal of Crystal Growth**, v.177 , p.125 134, 1997.

NEVILLE, A. C.; Parry, D. A.; WOODHEAD-Galloway, J. A quitina crystallite em artrópodes cutícula. **Journal of Cell Science**, v. 21, n. 1, p.73-82, 1976.

PROMWIKORN W.; BOONYOUNG P.; KIRIRAT P. Histological characterization of cuticular depositions throughout the molting cycle of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Songklanakarin J. Sci. Tech.* v. 27, 499p. , 2005.

RIBEIRO-COSTA, C. S.; ROCHA, R. M. 2002. **Invertebrados: Manual de aulas práticas**. Holos Editora, Ribeirão Preto. 226 p.

RAABE, D; ROMANO, P; SACHS, C. The crustacean exoskeleton as an example of a structurally and mechanically graded biological nanocomposite material. **Acta Materialia**, v.53, p. 4281–4292-509, 2005.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications, **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603–632, 2006.

ROCHA, I. P.; ROCHA, D. M. Análise da produção e do mercado interno e externo do camarão cultivado, **ABCC**, n. 1, p.18-23, 2010.

DOS SANTOS, José E. et al. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

SEBRAE. **Aqüicultura e pesca: camarões**. Estudos de mercado. SEBRAE/ESPM, 2008.

SEIDL B, ZIEGLER A. Electron microscopic and preparative methods for the analysis of isopod cuticle. **ZooKeys**, v. 176 p.73-85, 2012.

VINCENT, J. F. V., Arthropod cuticle: A natural composite shell system. Composites Part A. - **Applied Science and Manufacturing**, v. 33, n. 10, p. 1311-1315, 2002.

Capítulo III

ESTUDO DA EXTRAÇÃO DE QUITINA

3 ESTUDO DA EXTRAÇÃO DA QUITINA

3.1 INTRODUÇÃO

A produção aquícola no ano de 2010 atingiu 60 milhões de toneladas, representando um valor econômico estimado em US\$ 119 bilhões. Desta produção, 5,7 milhões de toneladas (9,6% do total) referem-se a crustáceos distribuídos entre os de água doce (6,4%), água salobra (57,2%) e água marinha (3,8%). A produção de espécies marinhas é dominada por camarão branco (*Litopenaeus vannamei*), incluindo a produção substancial em água doce (FAO, 2012).

Durante o processamento industrial, são gerados outros materiais de origem não intencional que apresentam papel significativo na contaminação ambiental, como o acúmulo de matérias-primas e insumos, o que implica a geração de resíduos, que geralmente são clandestinamente enterrados (aterro sanitário) ou jogados no mar ou em rios (FREIRE *et al.*, 2000).

Diversas tecnologias têm surgido para possibilitar a utilização dos resíduos como fonte alimentar de boa aceitabilidade (OLIVEIRA, 2010; GONÇALVES, 2011). Os resíduos da industrialização do pescado podem ser direcionados para várias modalidades de aproveitamento: alimentos para consumo humano ou animal (rações); fertilizantes ou adubos orgânicos; produtos químicos e, ainda, o aproveitamento de produtos funcionais como quitosana, cálcio de ostra, óleo rico em $\omega 3$ e outros produtos de alto valor agregado (NUNES, 2011).

À medida que a geração de resíduos de camarões e siris é significativa e tais resíduos são constituídos por quitina, proteínas, carbonato de cálcio e pigmentos, tem havido grande interesse em seu reaproveitamento, como alternativa à sua disposição final, com vistas ao desenvolvimento de produtos de valor agregado (CRAVEIRO *et al.*, 2004).

A extração de quitina, a partir da biomassa, a exemplo do que acontece com a extração de celulose de fibras vegetais, envolve a execução de tratamentos químicos sequenciais, destinados a eliminar as substâncias que a acompanham nesses tratamentos (MOURA *et al.* 2005).

Ainda não existe um processo padrão para obtenção de quitina. Seu modo de preparação varia de acordo com os parâmetros e aplicação que se desejam para ela. Sua extração envolve etapas de pré-tratamento, tais como, desmineralização, desproteíntização, despigmentação e secagem (TOLAIMATE et al. 2003).

Portanto, o objetivo específico do Capítulo 3 é definir o método a ser utilizado para extração da quitina a partir da casca de camarão da espécie *Litopenaeus vannamei*, estudando a efetividade da desmineralização, por meio da análise da porcentagem (%) do cálcio e a efetividade da desproteíntização por meio da análise da porcentagem (%) de proteínas.

3.2 REVISÃO DA LITERATURA

Para extrair a quitina a partir da casca do camarão, a primeira etapa é o pré-tratamento, que é feito com água corrente. Essa é uma das operações preliminares à obtenção de quitina, e tem como objetivo a separação do material grosseiro, entre eles o material vegetal, porções de tecido e outros materiais que eventualmente possam acompanhar o resíduo (TOLAIMATE et al., 2003).

Após a lavagem, a matéria-prima deve ser encaminhada para a secagem com o objetivo de remover a umidade da casca. Para realizar essa etapa, existem dois tipos de pré-tratamentos. O primeiro, patenteado por Mukherjee (2001), consiste na tentativa de modificar a estrutura cristalina da quitina para amorfa secando a casca a uma temperatura de cerca de 80 °C durante 48h e, em seguida, efetuando um rápido resfriamento da casca de forma a “congelar” o novo arranjo amorfo. E a segunda forma, adotada por Percot et al (2003), consiste em adicionar as cascas em solução de cloreto de sódio e deixá-los secar durante 2 a 3 dias, vindo, em seguida, a lavagem e, posteriormente, a liofilização.

Embora a segunda opção pareça uma forma mais sustentável, pois economiza energia, precisa de uma área ampla e adequada de exposição solar dependendo da quantidade elevada de casca. Todavia, para atender à produção industrial, devem-se submeter as amostras a temperaturas entre os

60-80 °C em estufa parecem ideais. Tolaimate et al. (2000) afirmam que as cascas secas de camarão podem ser armazenadas durante longos períodos de tempo sem que haja deterioração.

Após seco, o material é encaminhado para a moagem, tendo como objetivo reduzir o volume, transformando casca em pó. Assim, por meio de um sistema de peneiramento, pode ser triturado até atingir a granulometria desejada.

A etapa de desmineralização tem como objetivo a remoção da parte mineral da casca do crustáceo, principalmente carbonato de cálcio. Este tratamento é feito com ácidos, sendo o ácido clorídrico (HCl) o mais utilizado, assim como é possível utilizar soluções aquosas de diferentes ácidos, como ácido nítrico (HNO₃), ácido sulfúrico (H₂SO₃), ácido carboxílico (HCOOH), ácido acético (H₃CCOOH). Após a filtração, seguem-se lavagens até atingir um pH neutro. O processo de desmineralização é realizado com concentrações entre 0,275 e 2M, com tempos que variam de 15 min a 48h, à temperatura ambiente ou mais baixa. Condições rigorosas devem ser evitadas, pois provocam severa despolimerização e consequente degradação das propriedades ligadas ao caráter macromolecular (LISBOA, 2011).

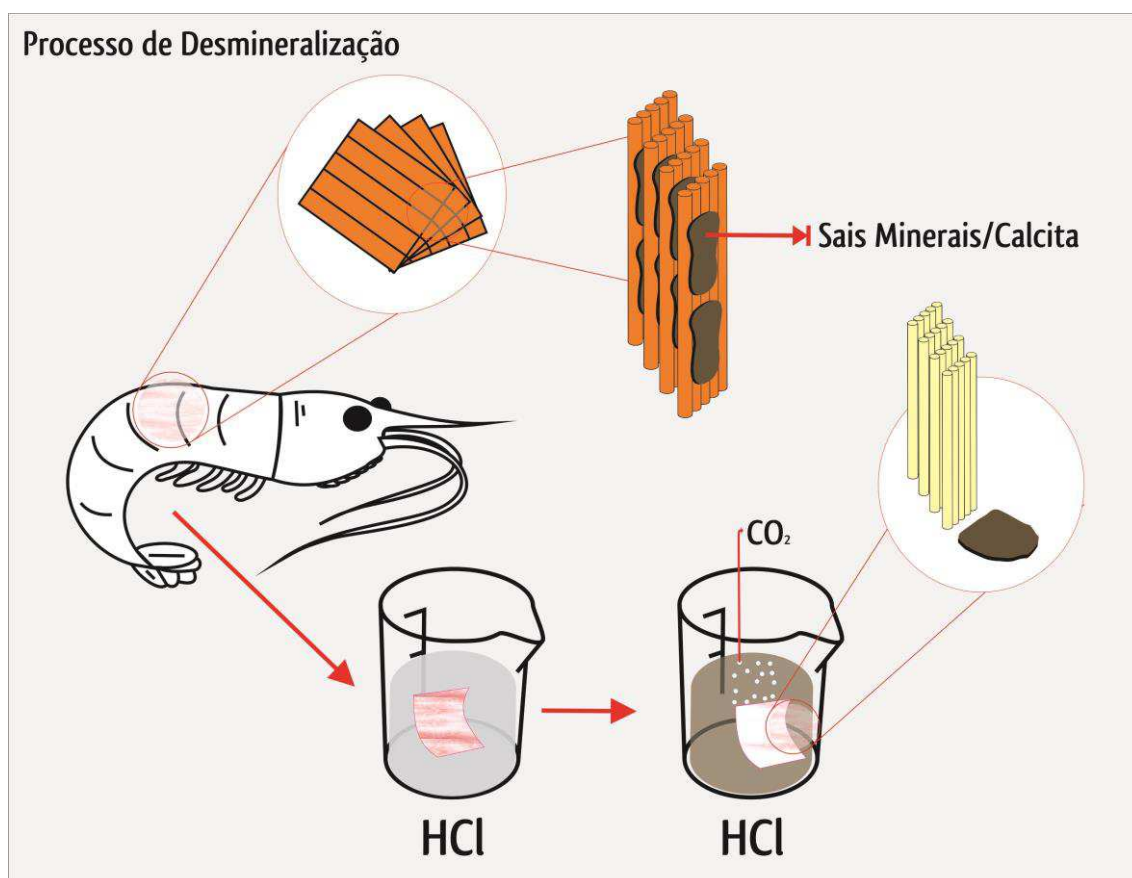
Uma alternativa para se evitar a quebra da massa molar, sugerida por Roberts e colaboradores (1997), é a utilização de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), que torna o processo mais brando; porém, menos eficiente que o tratamento com ácido diluído. O tratamento com soluções diluídas de ácido clorídrico, por tempos curtos e à temperatura ambiente, assegura a completa remoção dos sais minerais sem promover a degradação das cadeias, mas a otimização do processo deve levar em conta a determinação prévia do teor de minerais da matéria-prima (ROBERTS *et al.*,1997; LISBOA, 2011).

Segundo Mikkelsen e colaboradores (1997), quando os camarões são capturados vivos, a casca aparece transparente com tonalidade alaranjada devido ao carotenóide astaxantina no interior da casca. Algum tempo depois, quando o armazenamento dessas cascas é feito com congelamento para que não ocorra a degradação, a tonalidade alaranjada desaparece dando lugar a pontos brancos devido à migração do cálcio para a superfície da casca (MIKKELSEN *et al.*,1997). Logo, vários fatores, incluindo o tratamento químico

e temperatura de armazenamento, podem influenciar, mas não inibir a formação e crescimento de cristais. Os cristais de carbonato de cálcio presentes em cutículas nucleiam e crescem formando a calcita. A disposição das camadas em forma helicoidal facilita o processo de formação e deposição dos cristais devido ao aumento da superfície para a nucleação.

Esta etapa do processo de desmineralização pode ser visualizada na Figura 18.

Figura 18 - Ilustração do processo de desmineralização



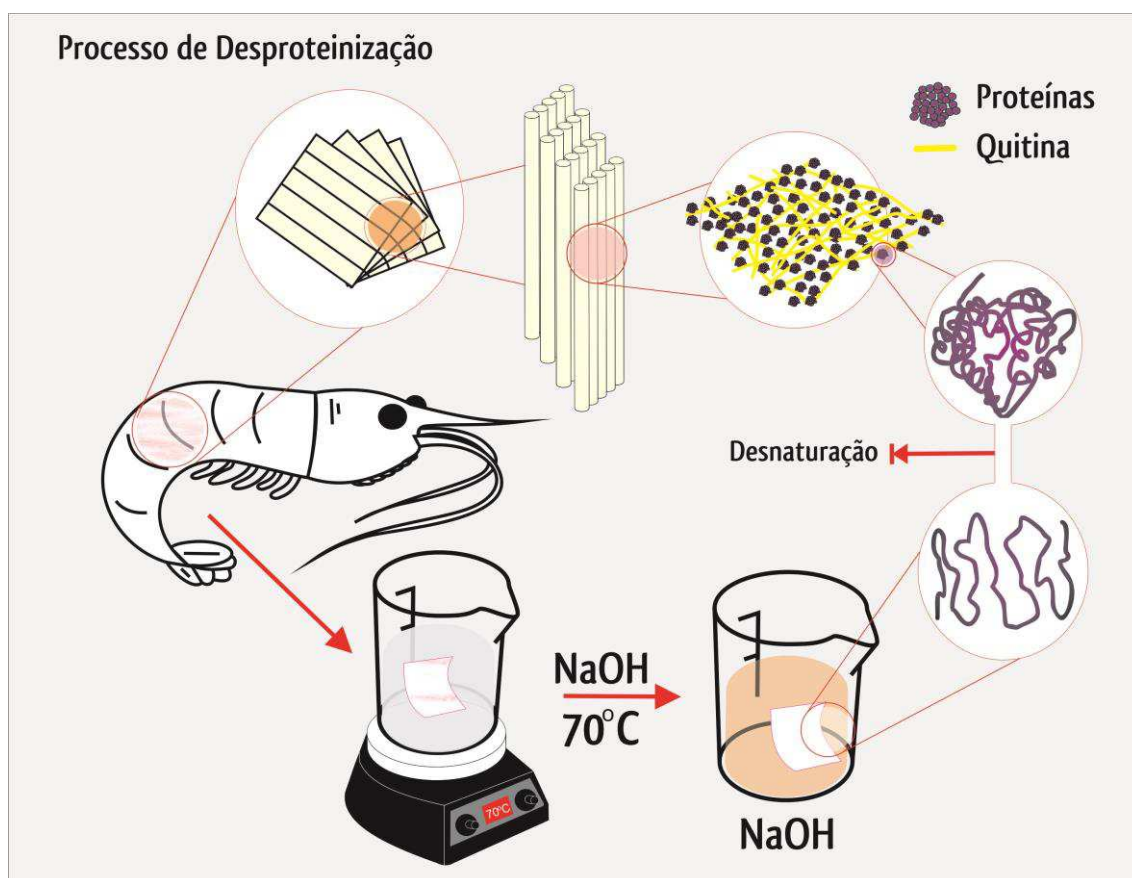
De fato, a desmineralização é facilmente alcançada por envolver a decomposição do carbonato de cálcio em sais de cálcio solúveis em água, com a liberação de dióxido de carbono, principalmente se os cristais de cálcio estiverem presentes na superfície. Nesse caso, sua remoção torna-se ainda mais fácil. Pode-se entender a desmineralização como uma reação simples entre o ácido e o carbonato de cálcio do tipo (para a reação com HCl) como mostrado a seguir:



Após a etapa de desmineralização, a matéria-prima pode seguir para a estufa ou pode continuar na etapa posterior, que seria a desproteínização. A etapa de desproteínização tem a função de remover a fração proteica da casca, podendo ser eliminada por tratamentos com soluções aquosas de diferentes substâncias, como hidróxido de sódio (NaOH), carbonato de sódio (Na_2CO_3), bicarbonato de sódio (NaHCO_3), hidróxido de potássio (KOH), carbonato de potássio K_2CO_3 , hidróxido de cálcio Ca(OH)_2 . Contudo, o emprego de NaOH (1-10%), sob agitação e temperatura, é a prática mais comum. O processo de desproteínização consiste em adicionar solução de hidróxido de sódio à matéria-prima com concentrações de 0,275 a 2 mol/L. Tipicamente, usa-se 1 mol/L, com tempos que variam de 1 a 72h, a temperaturas que variam de 65 a 100 °C. Entretanto, as condições reacionais devem ser brandas, para evitar ou minimizar, a ocorrência de hidrólise dos grupos acetamida presentes na quitina e também sua despolimerização (CAMPANHA FILHO, 2007).

Os tratamentos enzimáticos (pepsina, tripsina, alcalases e outras proteases podem ser empregadas) são mais brandos e menos eficientes que o tratamento químico e, embora ainda não sejam empregados em larga escala, propiciam o aproveitamento potencial do hidrolisado proteico pela indústria alimentícia (CAMPANHA FILHO, 2007). Também foi feita uma ilustração (Figura 19), mostrando o processo de desproteínização.

Figura 19 - Ilustração do Processo de desproteinização



Nesta etapa, faz-se necessária a destruição das fortes ligações covalentes entre a quitina e as proteínas mediante elevação da temperatura. A proteína, que tem como característica ser enovelada, quando submetida ao calor, sofre a quebra de algumas ligações químicas intramoleculares, provocando uma desnaturação. Esta separação entre o complexo proteína-quitina realiza-se com alguma dificuldade, alterando também a sua estrutura. Como apresentado no Capítulo 2, deve-se observar a fragilidade da reticulação após a etapa de desproteinização (LISBOA, 2011).

Para aplicação biomédica, a remoção completa das proteínas é essencial, pois certos componentes seus são os principais responsáveis pela existência de muitos casos de alergias relacionados a marisco na população humana (KHOR, 2002).

A última etapa, processo de despigmentação, tem por objetivo a remoção dos pigmentos. Esse processo nem sempre é necessário, deve ser realizado apenas se os pigmentos ainda estiverem presentes. Nesse caso, essa etapa é realizada após as etapas de desmineralização e

desproteinização. Almejando a obtenção da matéria-prima branca, a remoção do pigmento pode ser realizada por extração com solventes, sendo que o etanol e a acetona são os mais empregados, ou por branqueamento, com permanganato de potássio (KMnO_4), hipoclorito de sódio (NaOCl) ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A remoção destes pigmentos é feita por oxidação das ligações duplas carbono-carbono presentes na molécula (HENRY et al., 2000).

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Materiais

- **Matéria-prima:**

Amostras de exoesqueletos de camarão *Litopenaeus vannamei* moídos (com granulometrias variadas $53\mu\text{m}$, $53\text{-}150\mu\text{m}$ e acima de $150\mu\text{m}$), como visualizadas na Figura 20.

Figura 20 - Amostras de casca em três granulometrias (A) abaixo de $53\mu\text{m}$, (B) $53\text{-}150\mu\text{m}$ e (C) acima de $150\mu\text{m}$



- **Reagentes:**

Ácido clorídrico (HCl) 36-38%(v/v) Vetec;
Hidróxido de sódio (NaOH) Synth;
Di-metil acetamida (DMAC), Sigma-Aldrich, PA;
Cloreto de lítio (LiCl), Sigma-Aldrich, PA;
Brometo de potássio, Sigma-Aldrich, PA.

3.3.2 Caracterização

Os ensaios de caracterização foram realizados no laboratório CERTBIO, localizado da Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais, da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

- **Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier- FTIR**

Pela técnica de Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada De Fourier (FT-IR), é possível estudar a interação da radiação eletromagnética com a matéria, sendo um dos seus principais objetivos o estudo dos níveis de energia. Isso é possível porque as ligações químicas das substâncias e as massas dos átomos envolvidos nessas ligações possuem frequência de vibração específica (ALBUQUERQUE, 2008).

Para a caracterização da quitina, utilizou-se a espectroscopia de absorção na região do infravermelho. A amostra foi misturada com brometo de potássio e prensada sob a forma de pastilhas. Os espectros foram obtidos em um espectrofotômetro Perkim Helmer, Spectrum 400, (equipamento), o nos comprimentos de onda de 400-4000 cm^{-1} , com uma resolução de 4 cm^{-1} e 64 varrimentos. Foi ainda realizada uma análise com diversas equações para a determinação do grau de acetilação da quitina produzida.

O grau de desacetilação foi determinado com o uso das equações 1, 2 e 3 apresentadas abaixo. Para as equações 1 e 3, foi realizada uma linha de base entre 1800 cm^{-1} e 1600 cm^{-1} , e para a equação 2 foi realizada uma linha de base entre 1800 cm^{-1} e 1600 cm^{-1} .

$$\% \text{Grau de Acetilação} = \frac{A_{1655} + A_{1630}}{A_{3450}} \cdot 100 \quad \text{(Eq. 1)}$$

$$\% \text{Grau de Acetilação} = \frac{A_{1560}}{A_{1070}} \cdot 100 \quad \text{(Eq. 2)}$$

$$\% \text{Grau de Acetilação} = \frac{A_{1655}}{A_{3450}} \cdot 115 \quad \text{(Eq. 3)}$$

- **Difração de Raios X**

A técnica da difração de raios X é apropriada para determinação dos índices de cristalinidade de quitosana e quitina. Para a realização deste ensaio, foi utilizado o equipamento XRD SHIMADZU 7000, no intervalo de ângulos 2θ de 5° a 45° , com uma velocidade de varrimento de $1^\circ/\text{minuto}$.

3.3.3 Metodologia de Extração

A metodologia adotada foi descrita por LISBOA (2011), apresentada a seguir.

- **Pré-Tratamento**

As cascas foram colocadas em caixas térmicas e depois armazenadas sob refrigeração (aproximadamente -19°C) até o uso. Em seguida, foi realizada a lavagem manual, embora não houvesse resíduos. Depois, o material resultante foi colocado em bandejas de alumínio e encaminhado para estufa (Figura 21) onde permaneceu pelo período de 24 horas, a uma temperatura aproximadamente de 80°C .

Figura 21 - Amostras de camarão na estufa



Uma pequena quantidade de cascas de camarão foi reservada para análise morfológica, discutida no Capítulo 2. As demais foram submetidas ao processo de moagem e peneiradas com granulometrias diferenciadas (menor que 53 μm , 53-150 μm , e acima de 150 μm).

- **Desmineralização**

Inicialmente, pesaram-se 10g de casca com uma granulometria acima de 150 μm . Em seguida, prepararam-se 200 ml de uma solução aquosa de HCl a 1mol/L. Adicionaram-se as cascas de camarão à solução aquosa e deixou-se reagir por 20 min à temperatura ambiente e sob agitação constante. Na sequência, filtrou-se a vácuo o meio reacional e lavou-se com água destilada até atingir pH neutro. Depois, submeteu-se à secagem até atingir um peso constante e registrou-se o peso final.

Figura 22 - Casca pós-processo de desmineralização



- **Desproteínização**

Prepararam-se 200 ml de uma solução aquosa de NaOH a 1mol/L e, em seguida, adicionaram-se as cascas de camarão desmineralizadas à solução aquosa e deixou-se reagir por 3 horas à temperatura de 80 $^{\circ}\text{C}$, sob agitação constante. Na sequência, filtrou-se a vácuo o meio reacional e lavou-se com água destilada até atingir pH neutro. Depois, submeteu-se à secagem até atingir um peso constante e registrou-se o peso final.

Figura 23 - Casca pós-processo de desproteinização



3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Análise Visual

A análise visual, descrita neste Capítulo 3, permite caracterizar as modificações observadas durante a preparação das etapas da extração de quitina, importante para o desenvolvimento desta Tese.

Partindo do recebimento das amostras, observa-se um exoesqueleto com uma coloração em tons de cinza, embora seja transparente. Essa cor “cinza” refere-se à cor do camarão cru, uma vez que estas amostras foram submetidas à secagem na estufa, e o exoesqueleto adquiriu uma cor laranja, provocada pela presença da astaxantina, que interage fortemente com carreadores naturais (caroteno proteínas) em sítios de acomodação em certos domínios da molécula proteica para as cabeças polarizadas (oxigenadas) do pigmento (FONTANA, 1996). A seguir, na Figura 24, tem-se uma amostra pós-secagem do exoesqueleto.

Figura 24 - amostra do exoesqueleto de camarão bruto



Depois de secas, as amostras passaram pelo processo de desmineralização. Observou-se, primeiramente, ao se inserir a casca do camarão em uma solução aquosa de HCl, a formação de bolhas na solução, atribuídas à liberação de CO_2 . Essa amostra permaneceu imersa e sob agitação durante 20 minutos, e, após esse período, observou-se que o borbulhamento foi desaparecendo. Após o término desta etapa, foi observado que a cor laranja tornou-se branca, mas não completamente, aparecendo a cor laranja na solução após a reação. Também foi verificado um inchamento na casca, anteriormente discutido, no Capítulo 2.

No final da etapa de desproteínização, aparentemente, todo o pigmento foi retirado, tornando a casca totalmente transparente, que, após a secagem, ganhou uma coloração branca (Figura 25). Observou-se também, ao término desta etapa, uma coloração escura na solução cuja casca sofreu a reação.

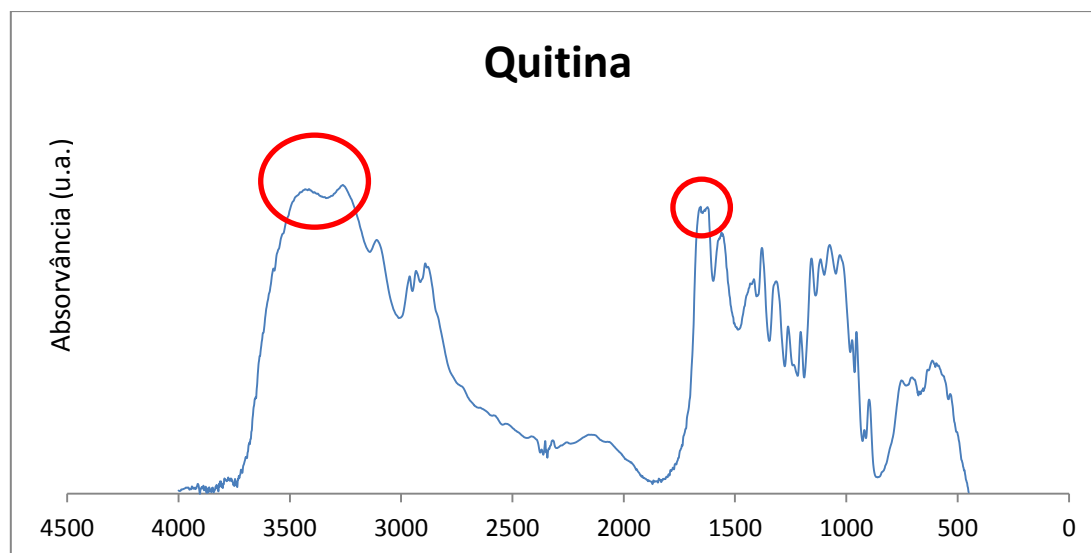
Figura 25 - Amostra do exoesqueleto de camarão após desproteínização



3.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier- FTIR

Na figura 26, está representada uma confirmação do espectro da quitina após sua extração.

Figura 26 - Espectro da pastilha de quitina



As bandas observadas no espectro de infravermelho, mostradas na Figura 26 como uma consequência das vibrações, aproximam-se dos dados da estrutura de quitina obtidos por Lisboa (2011), como: amida I em 1630 cm^{-1} e 1655 cm^{-1} , amida II em 1560 cm^{-1} , grupo hidróxilo presente em 3450 cm^{-1} , ligação C-H em 2878 cm^{-1} , banda de oxigênio em 1160 cm^{-1} , ligação C-O; 1070 cm^{-1} ; ligação C-O em 1030 cm^{-1} e 897 cm^{-1} .

Na região de 3500 cm^{-1} , pode-se observar um ombro visualizado apenas na quitina, atribuído ao grupo hidroxilo. Os grupos O-H ligados ao carbono da posição 6 do anel de glicopiranosose e o grupo C=O das acetamidas indicam a estrutura mais ordenada da quitina, gerando maior empacotamento. As bandas em torno de 3260 cm^{-1} e 3100 cm^{-1} no espectro de quitina podem ser atribuídas aos grupos N-H da acetamida em ligações intermoleculares de hidrogênio.

Na região de C-H, correspondente ao intervalo 3000 cm^{-1} - 2800 cm^{-1} , o espectro de quitina apresenta bandas intensas e em maior número devido ao elevado teor de acetamidas. No intervalo 1800 cm^{-1} a 1500 cm^{-1} , são observadas as bandas denominadas de amida I e de amida II; no espectro de

quitina, onde podem ser observados dois sinais de intensidades semelhantes, próximos de 1660 cm^{-1} e de 1625 cm^{-1} , correspondentes à banda de amida I.

3.3.3 Determinação do Grau de Acetilação

Para determinar o grau de desacetilação, foram utilizadas as equações 1 e 2, desenvolvidas por Shigemasa (1996), que relacionou diferentes razões entre bandas de Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier e resultados obtidos por ressonância magnética (SHIGEMASA et al., 1996). Existem outras equações, nomeadas de equação de Roberts que relacionam a absorção do grupo hidroxilo (OH), que serve de referência e se situa no comprimento de onda 3450 cm^{-1} com a absorção do grupo amida I (NH-). O grupo OH serve de referência interna, uma vez que a presença do grupo não é alterada pela extração, ao passo que o grupo amida I perde intensidade ao longo do processo devido à remoção do grupo acetil, tanto na desmineralização como na desproteínização, e, mais intensamente, durante a desacetilação, que será analisada posteriormente.

$$\% \text{Grau de Acetilação} = \frac{A_{1655} + A_{1630}}{A_{3450}} \cdot 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\% \text{Grau de Acetilação} = \frac{A_{1560}}{A_{1070}} \cdot 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\% \text{Grau de Acetilação} = \frac{A_{1655}}{A_{3450}} \cdot 115 \quad (\text{Eq. 3})$$

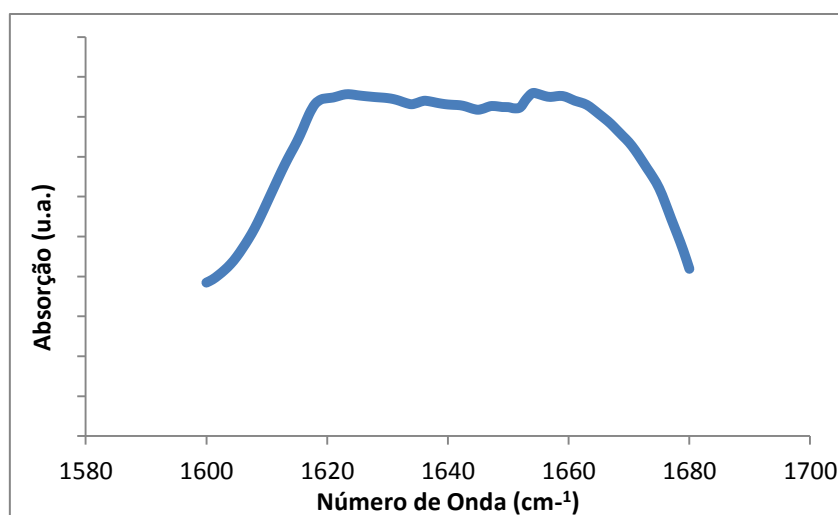
No entanto, no trabalho de Shigemasa (1996), verificou-se que a equação 3 não era aplicável para todo o espectro de graus de desacetilação, funcionando linearmente apenas para graus de acetilação entre 70-100%. Decidiu-se, portanto, averiguar a validade das equações obtidas, tomando como base que a quitina deveria possuir um grau de acetilação entre 90 a 100%. Os resultados encontram-se na Tabela 2. Os resultados foram ainda tratados com uma linha de base entre os 1600 e 1800 cm^{-1} , tal como indicado pelo trabalho de Shigemasa (1996).

Tabela 3 - Determinação do Grau de Acetilação (%DA) com diferentes equações

Equação	Pico de Análise	Pico de Referência	%DA
1	$A_{1655}+A_{1630}=0,96$	$A_{3450}=0,97$	98%
2	$A_{1560}=0,75$	$A_{1070}=0,79$	94%
3	$A_{1655}=0,447$	$A_{3450}=0,97$	52%

Analisando a Tabela 3, confirma-se que os resultados obtidos pela equação 3 não se enquadram com os valores esperados. De fato, verifica-se pelas Figuras 26 e 27, que o grupo amida I encontra-se dividido em dois picos, pelo que a absorção da banda 1630 cm^{-1} deverá ser considerada tal como é feito na equação 1.

Figura 27– Evidência da divisão do pico de absorção de amida I em dois (picos 1633 cm^{-1} e 1650 cm^{-1})

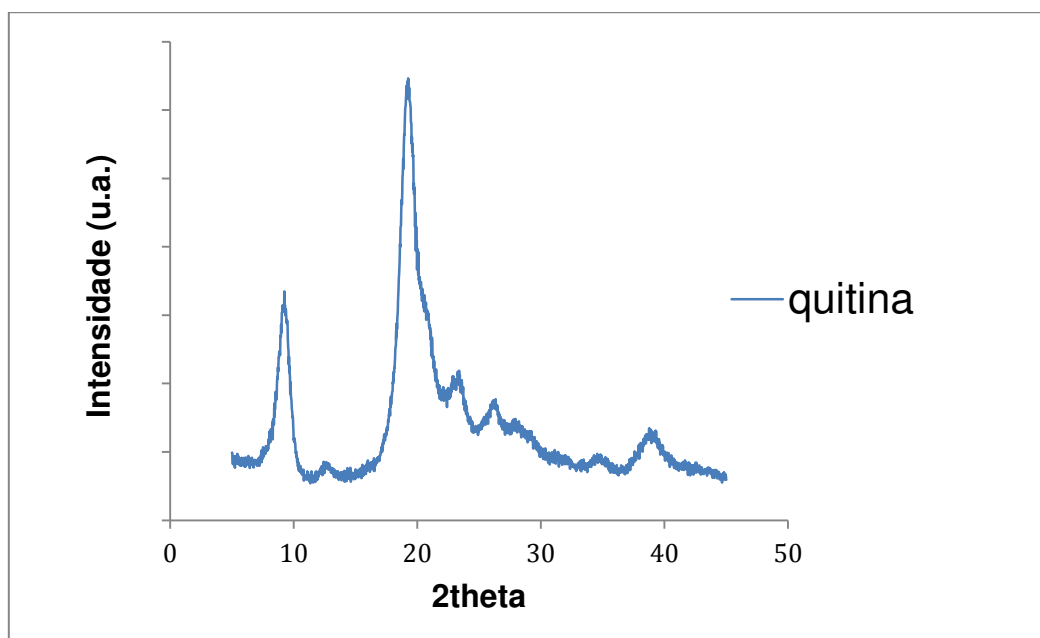


3.3.4 Difração de Raios X

Pela difração de raios X, consegue-se distinguir a quitina de partida e seus derivados desacetilados. Na literatura, encontra-se o difratograma da quitina apresentando dois picos característicos (Figura 28), assim como

também é caracterizada por sinais mais resolvidos e em maior número do que observado nos difratogramas de quitosana, atribuída à existência dos domínios cristalinos (CAMPANA-FILHO et al., 2007).

Figura 28 - amostra do DRX da quitina



No difratograma da quitina, observaram-se os seguintes picos, apresentados na Tabela 4:

Tabela 4 - Resumo dos picos detectados por DRX na quitina obtida

Pico	Angulo 2θ	Plano Cristalográfico
I	9,24	020
II	12,3	021
III	19,2	110
IV	23,1	120
V	25,9	130
VI	27,6	013
VII	34,3	-
VIII	38,4	-

Analisando a intensidade dos picos, verifica-se que existem dois picos mais significativos, um de menor intensidade no ângulo $2\theta=9,24^\circ$ e outro de

alta intensidade no ângulo $2\theta=19,2^\circ$, que evidenciam a parte cristalina. Utilizando-se a Lei de Bragg, verifica-se que tais picos correspondem aos planos cristalográficos de Miller de (020) para o primeiro, e (110) para o segundo. Esses dados estão em conformidade com a literatura para a α -quitina, com o trabalho realizado por Campana-Filho e colaboradores em 2007 (CAMPANA-FILHO et al., 2007).

3.5 CONCLUSÃO

Foi possível, a partir da metodologia proposta, a obtenção da quitina pura, como evidenciam os resultados obtidos por FTIR, DRX bem como pela cor branca da casca. Conclui-se ainda que o método empregado para a extração da quitina tem um efeito reduzido na desacetilação da macromolécula, tendo sido obtidos valores entre 2% e 6% de desacetilação. Os picos detectados por DRX confirmam a elevada cristalinidade da quitina.

3.6 REFERÊNCIA DA LITERATURA

ALBUQUERQUE, Carlos A. **Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de sistema nanoscópicos bioativos**, 2008. Dissertação em Engenharia de Materiais, Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal de Itajubá, Itajubá – MG.

CAMPANA-FILHO, S. P.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R.; LAVALLET R. L. Extração, estruturas e propriedades de α - e β -quitina. **Quim. Nova**, v. 30, n. 3, p. 644-650, 2007.

CRAVEIRO A. A.; CRAVEIRO, A. C.; QUEIROZ D.C., **Quitosana: A fibra do futuro**. Fortaleza (Brasil): PADETEC – Parque de Desenvolvimento Tecnológico, 2004, capítulo 3.

FAO – Food and Agriculture Organization the United Nations (2012). *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Rome, Italy: FAO/UN.

FREIRE, R.S., Pelegrini, R.; KUBOTA, L.T.; DURÁN, N. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. **Química Nova**, . n. 23, v.4, pg. 504-511, 2000.

FONTANA, J. D.; MENDES, S. V.; PERSIKE, D. S.; PASSOS, M. Carotenóides: Cores atraentes e ação biológica. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. v. 13, n. 13, mar/abr., 2000.

GONÇALVES, A. A. (Org.). Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação. São Paulo: Atheneu, 2011

HENRY, L. K.; PUSPITASARI-NIENABER, N. L.; MANUEL JARÉN-GALÁN, M.; BREEMEN, R. B. V.; CATIGNANI, G. L.; SCHWARTZ, S. J. Effects of ozone and oxygen on the degradation of carotenoids in an aqueous model system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5008-5013, 2000.

KHOR, E. Chitin: fulfilling a biomaterials promise. **Book reviews / Biomaterials**, Elsevier. v. 23 p. 3913–3915, 2002.

LISBOA, H.M. **Produção de quitosano e desenvolvimento de novos materiais a partir de resíduos alimentares**. 2011. Tese (Ciência e Engenharia de Materiais), Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.

MIKKELSEN, A. ; BALLING ENGELSEN, S. ; HANSEN, H. C. B. ; LARSEN, O. ; SKIBSTED, L. H. Calcium carbonate crystallization in the alfa-chitin matrix of the shell of pink shrimp, *Pandalus borealis*, during frozen storage. **Journal of Crystal Growth**. v. 177, p. 125 134, 1997.

MOURA, J.M.; FERREIRA, F.C.; SILVA, F.M.M.; RIZZI, J.; PINTO, L.A.A. Obtenção de quitina a partir de carapaças de siri (*Maia squinado*): Uso de um planejamento experimental na etapa de desmineralização, **Vetor**, v. 15. p. 7-17, 2005.

MUKHERJEE, Debi P., Method for producing chitin or chitosan, US Patent 6310188B1, Oct. 30, 2001.

NUNES, M.L. Farinha de pescado. . Farinha de pescado. In: Gonçalves, A. A. (ed.). São Paulo: Atheneu. p. 362-371, 2011.

OLIVEIRA, J.S. Composição centesimal de fishburguer elaborado a partir da farinha do resíduo do camarão. **V Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica – CONNEPR**, 2010.

PERCOT, A.; Viton, C.; Domard, A. Optimization of chitin extraction from shrimp shells. **Biomacromolecules**, v.4, p.12–18, 2003. ISSN 1525-7797.

ROBERTS, G. A. F. **Chitin chemistry**, Mc Millan Press Ltd: London, 1992.

SHIGEMASA Y., et al., Evaluation of different absorbance ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of deacetylation in chitin **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 18, p. 237-242, 1996.

TERBOJEVICH, M.; CARRARO, C.; COSANI, A.. Solution studies of the

Chitin-Lithium Chloride-N,N-Dimethylacetamide System. **Carbohydrate Research**, v. 180, p. 73-86, 1988.

TERBOJEVICH, M., COSANI, A., BIACHI, E., MARSANO, E., Solution behavior of chitin in dimethylacetamide/LiCl. In: Domard, A.; Jeniaux, C.; Muzzarelli, R.; Roberts, G. **Advances in Chitin Science** v. 1. p. 333-339, 1996.

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

TOLAIMATE, A.; DESBRIÈRES, J.; RHAZI, M.; ALAGUI, A. Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties. **Polymer**, v. 44, p. 7939-7952, 2003.

Capítulo IV

ESTUDO DA SAZONABILIDADE DAS AMOSTRAS DE CAMARÃO

4 ESTUDO DA SAZONALIDADE DO CAMARÃO

4.1 INTRODUÇÃO

O resíduo da industrialização do camarão pode ser utilizado para a produção de diversos produtos. Os descartes de camarão, provenientes da captura e das operações de bordo, são lançados ao mar e os resíduos da industrialização, em alguns casos, são descartados em áreas adjacentes às instalações industriais. Esses procedimentos vão, gradualmente, criando sérios problemas de poluição ambiental (TRUNG, 2006; PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2011).

Sabe-se que a quitina pode ser obtida de diversas fontes, sendo os crustáceos uma das principais, devido, sobretudo, à sua abundância e pelo fato de se tratar de um resíduo alimentar e, portanto, de baixo custo. O aproveitamento do resíduo como o exoesqueleto do camarão pode ser utilizado para extração de quitina, que dá ao resíduo um alto valor agregado.

Apesar de ser uma matéria-prima com amplo potencial de aplicação, ainda não existe um processo padrão para extração de quitina, encontrando-se sempre flutuações de características de espécie para espécie e até mesmo de lote para lote (KHOR, 2002). Embora essa composição varie com a espécie e a sazonalidade, podem-se classificar esses rejeitos como constituídos de 30 a 40% de proteínas; 30 a 50% de carbonato de cálcio, e 30 a 40% de quitina (PETER, 1995).

Assim, o seu modo de preparação não só varia de acordo com os parâmetros e aplicação que se deseja, mas também com a fonte utilizada para a sua extração. Quando se considera o processo de extração da quitina a partir dos crustáceos, para além da espécie e/ou características finais de quitina, também existe a questão da sazonalidade, uma vez que o desenvolvimento daquelas espécies animais varia ao longo do ano (BESSA-JUNIOR & GONÇALVES, 2013)

Deste modo, o objetivo específico do Capítulo 4 é realizar um estudo sobre a variação da casca do camarão *Litopenaeus vannamei* ao longo do ano.

4.2 REVISÃO DA LITERATURA

De acordo com Rocha e Rocha (2010), o crescimento médio anual da aquicultura mundial, observado entre 1998 e 2008 foi de 6,50%, sendo para produção extrativa, no mesmo período, de 0,45% e provavelmente essa tendência será mantida até 2013. Dos quatro grandes grupos de organismos aquáticos, destacam-se na produção mundial de aquicultura: peixes (49,49%), plantas aquáticas (23,09%), moluscos (19,16%) e crustáceos (7,33%).

De acordo com seu crescimento, os camarões mudam regularmente seus exoesqueletos (muda = molting). As fêmeas desovam uma vez por ano em um período que compreende o final do verão (abril) ao início do outono, período de incubação até a primavera. Logo após o momento de eclosão dos ovos do camarão, esses passam por uma primeira muda. Registros indicam que os camarões sofrem cerca 2 a 4 mudas adicionais antes de uma nova desova de ovos. Supõe-se ainda que não ocorre muda quando o camarão carrega os ovos (SHUMWAY, PERKINS, SCHICK, e STICKNEY, 1985).

O processo de muda envolve a produção de quitinases e enzimas envolvidas na biossíntese da quitina, o que sugere que a qualidade da quitina pode variar com a estação (RODDE ET AL, 2008). Portanto, neste Capítulo 4, foi realizado um estudo envolvendo da pesagem e medidas de rendimentos dos três componentes principais das amostras: sais minerais (cinzas), proteínas e quitina. Foram registradas as porcentagens do peso seco das cascas de camarão colhidas em diferentes épocas do ano.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 Materiais

- **Matéria-prima:**
10 gramas de amostra de exoesqueletos de camarão moídos com granulometrias acima de 150 μm .
- **Reagentes:**
Ácido clorídrico (HCl) 36-38% Vetec;
Hidróxido de sódio (NaOH) Synth.

4.3.2 Método

Tal como no capítulo anterior, para este experimento foram utilizados 10 gramas da amostra (acima de 150 μm) para serem submetidos à extração de quitina. Durante a execução de cada etapa, foi determinado o peso seco e registrados os valores do rendimento da casca de camarão, com o intuito de obter informações sobre a porcentagem de sais minerais, proteínas e quitina.

4.3.3 Primeira pesagem – março

Na Tabela 5, estão os pesos obtidos no final de cada etapa para as cascas de camarão obtidas em março de 2013:

Tabela 5 - Pesagem para as etapas de extração em março

	Peso (g)	Perda Parcial (g)
Casca Inicial	10	-
Casca desmineralizada	6,5	3,5
Casca desproteïnizada	2,7	3,8

Tendo em vista que, em cada etapa, apenas um dos constituintes é removido, as porcentagens obtidas nesse processo da extração de quitina encontram-se na Tabela 6:

Tabela 6 - Tabela de porcentagem da composição da casca em março

Elementos	Composição
Minerais	35%
Proteínas	38%
Quitina	27%

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Segunda pesagem – junho

Na Tabela 7, apresentam-se os pesos obtidos no final de cada etapa para as cascas de camarão obtidas em junho de 2013:

Tabela 7 - Pesagem para as etapas de extração em Junho

	Peso (g)	Perda Parcial (g)
Casca Inicial	10	-
Casca desmineralizada	6,2	3,8
Casca desproteïnizada	2,7	3,5

As porcentagens obtidas nesse processo da extração de quitina encontram-se na Tabela 8:

Tabela 8 - Tabela de porcentagem da composição da casca em junho

Elementos	Composição
Minerais	38%
Proteínas	35%
Quitina	27%

4.4.2 Terceira pesagem – setembro

Na Tabela 9, apresentam-se os pesos obtidos no final de cada etapa para as cascas de camarão obtidas em setembro de 2013:

Tabela 9 - Pesagem para as etapas de extração em setembro

	Peso (g)	Perda Parcial (g)
Casca Inicial	10	-
Casca desmineralizada	6,8	3,2
Casca desproteïnizada	2,9	3,9

As porcentagens obtidas nesse processo da extração de quitina encontram-se na Tabela 10:

Tabela 10- Tabela de porcentagem da composição da casca em setembro

Elementos	Composição
Minerais	32%
Proteínas	39%
Quitina	29%

4.4.3 Quarta pesagem – dezembro

Na Tabela 11, encontram-se os pesos das cascas de camarão obtidos no final de cada etapa, em dezembro de 2013:

Tabela 11 - Pesagem para as etapas de extração em dezembro

	Peso (g)	Perda Parcial (g)
Casca Inicial	10	-
Casca desmineralizada	6,4	3,6
Casca desproteïnizada	2,4	4

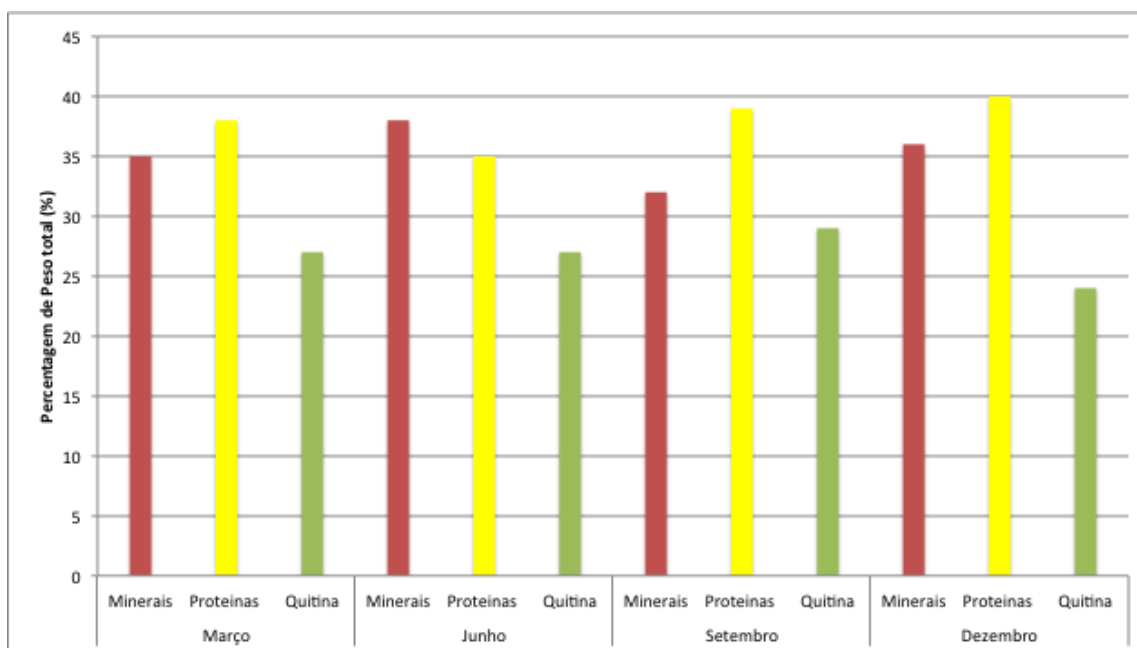
As porcentagens obtidas nesse processo de extração de quitina estão descritas na Tabela 12:

Tabela 2 - Tabela de porcentagem da composição da casca em dezembro

Elementos	Composição
Minerais	36%
Proteínas	40%
Quitina	24%

Na Figura 29, encontram-se resumidos os resultados obtidos para cada período de tempo.

Figura 29- Tabela de porcentagem da composição da casca



Verifica-se que ocorre variação dos valores de minerais, proteínas e quitina ao longo do ano. As variações dos valores obtidos para cada um dos componentes da casca estão de acordo com aqueles apresentados pela maior parte da literatura. No que toca à quitina, ela está presente em maior quantidade no mês de setembro, e quantidade semelhante no mês de março e junho, sendo encontrada em quantidade menor no mês de dezembro. Já no que toca a proteínas, elas encontram um pico por altura de dezembro e menor quantidade em junho. Os minerais atingem um pico máximo em junho e mínimo em setembro.

Desta forma, considera-se que a melhor época para recolha de casca de crustáceos com a finalidade de produzir quitina e quitosana seja o mês de setembro, uma vez que esta se encontra em maior quantidade. Verifica-se ainda que a percentagem em minerais é mínima, o que facilita o processo de desmineralização e a quantidade de proteínas é máxima, o que permite prever uma necessidade de desproteínização mais intensa para a casca recolhida neste período.

4.5 CONCLUSÃO

Através do presente estudo, foi possível concluir que existem diferenças ao longo do ano na casca de camarão. Apesar de se considerarem pequenas as diferenças, estas permitem realizar uma programação em relação às etapas extrativas e, assim, conseguir otimizar o processo.

4.6 REFERÊNCIA DA LITERATURA

BESSA-JUNIOR P. A.; GONÇALVES, A. A. Análises econômica e produtiva da quitosana extraída do exoesqueleto de camarão. **Actapesca** n.1, v.1, pg. 13-28, 2013

KHOR, E. Chitin: fulfilling a biomaterials promise. **Book reviews / Biomaterials**, Elsevier. v.23 p. 3913–3915, 2002.

PETER, M.G.; Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. *Journal of Macromolecular Science*. **Pure and Applied Chemistry**, n. 32, p. 629-640, 1995.

PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Extração de pigmentos carotenoides (Capítulo 4.9 – p. 445-453). In: Gonçalves, A. A. (Ed.). *Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação*. São Paulo: Atheneu, 2011.

ROCHA, I. P.; ROCHA, D. M. Análise da produção e do mercado interno e externo do camarão cultivado, **ABCC**, n. 1, p.18-23, 2010.

RODDE ET AL., A seasonal study of the chemical composition and chitin quality of shrimp shells obtained from northern shrimp (*Pandalus borealis*) **Carbohydrate Polymers**. v. 71, p. 388–393, 2008.

SHUMWAY, S. E.; PERKINS, H. C.; SCHICK, D. F.; STICKNEY, A. P. Synopsis of biological data on the pink shrimp, **Pandalus borealis** Kryer, 1838. NOAA Technical Report NMFS 30. 57pp, 1985.

TRUNG,T.S.; THEIN-HAN, W.W.; QUI, N.T.; NG, C.H.; STEVENS, W.F. Functional characteristics of shrimp chitosan and its membranes as affected by the degree of deacetylation. **Bioresource Technology** n. 97, v.4, p. 659-663, 2006.

Capítulo V

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE QUITOSANA

5 ESTUDO DA PRODUÇÃO DE QUITOSANA

5.1 INTRODUÇÃO

A quitosana é obtida a partir da reação de desacetilação da quitina, em um processo que pode ser executado por diferentes metodologias. A quitosana é um copolímero formado por unidades de 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose, de composição variável quanto à proporção relativa dessas unidades (ROBERTS, 1992).

A quitosana foi descoberta por Rouget em 1859, ao ferver a quitina em uma solução concentrada de hidróxido de potássio. Ele obteve um produto solúvel em ácidos orgânicos, ao contrário da experiência com quitina que apenas mudou de coloração para marrom. Mas o nome quitosana foi proposto em 1894 por Hoppe Seyler, que verificou que esta substância possuía a quantidade de nitrogênio igual à quitina original (ROBERTS, 1992). A estrutura deste importante polímero apenas ficou totalmente conhecida no ano de 1950 (CAMPANHA FILHO, 2007).

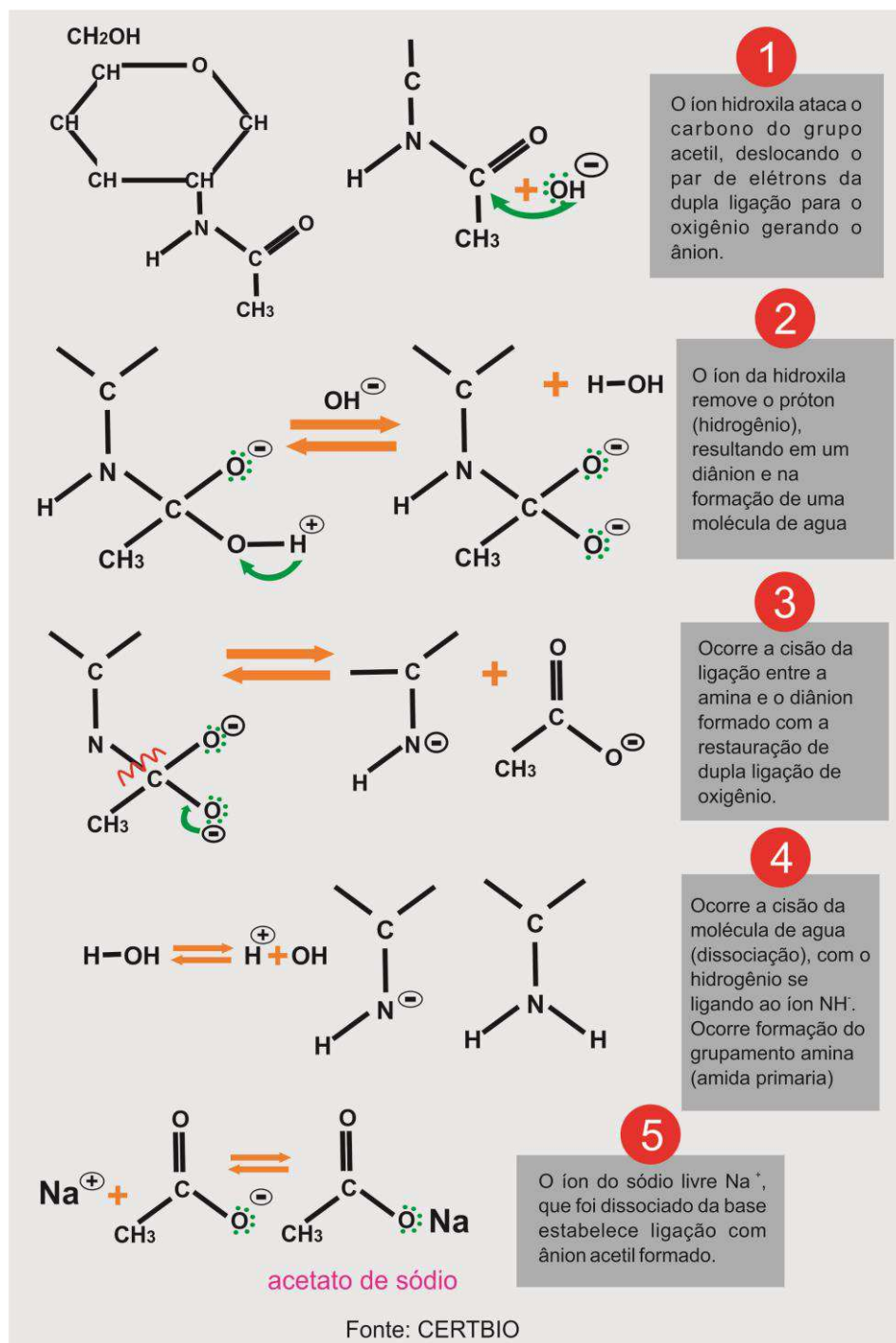
A quitosana é de interesse comercial, devido à sua elevada percentagem de nitrogênio (6,89%) em comparação com a celulose sinteticamente substituída (1,25%). A quitosana foi produzida industrialmente por volta de 1971, no Japão e EUA, países líderes do mercado mundial deste produto. Por volta de 1993, o Brasil também passou a comercializar quitina e quitosana em larga escala, sendo esta última atualmente comercializada por diversos fornecedores em variados graus de pureza, peso molecular e grau de desacetilação. Dentre as empresas brasileiras que produzem quitosana, duas têm obtido destaque na produção e comercialização destes biopolímeros. São elas: Polymar Indústria Comércio Exportação e Importação, situada em Fortaleza-CE, e Kito Química Fina, localizada em Palhoça-SC (KUMAR, 2000; SANTOS, 2004).

5.2 REVISÃO DA LITERATURA

A quitina possui um grupo funcional característico de N-Acetil, trata-se de uma amida secundária. Para realizar a conversão da quitina em quitosana,

realiza-se uma hidrólise alcalina, usando uma base forte. Essa conversão ocorre a partir da reação de desacetilação, que será descrita na Figura seguinte.

Figura 30 - conversão da quitina em quitosana



Certamente, o parâmetro que diferencia quitosana e quitina é o grau de desacetilação ou grau de acetilação, já que são complementares entre si para o valor de 100% do grau determinado. Esta é uma das características químicas

mais importantes, que pode influenciar no desempenho e em diversas aplicações da quitosana. O termo quitosana é usado para identificar 50% de unidades desacetiladas, enquanto a quitina produz muito mais acetilados. Contudo, o correto grau de desacetilação que diferencia a quitina da quitosana não está totalmente definido (GOY et al, 2004)

Quando realizada em meio alcalino, a desacetilação da quitina raramente é completa. Assim, condições muito severas de reação podem provocar degradação das cadeias poliméricas. Tais reações são empregadas na desacetilação da quitina por hidrólise alcalina, e o emprego de soluções alcalinas concentradas, por tempos prolongados e a temperaturas elevadas, é evitado quando o objetivo é a obtenção de quitosana de massa molar elevada (ROBERTS, 1992).

A desacetilação da quitina pode ser realizada por processos químicos (via heterogênea) ou enzimáticos (via homogênea). Porém, esse último é de aplicação restrita a laboratórios de pesquisa, pois o custo de extração de purificação é muito elevado e a eficiência é muito baixa, obtendo quitosana pouco cristalina e baixa massa molar. O processo químico da desacetilação de quitina, que se realiza com hidrólise alcalina, é o procedimento mais empregado para grau médio de acetilação moderado (% GA= 15-30%), pois utiliza bases fortes, altas temperaturas e intervalos prolongados de tempo (CARDOSO, 2008).

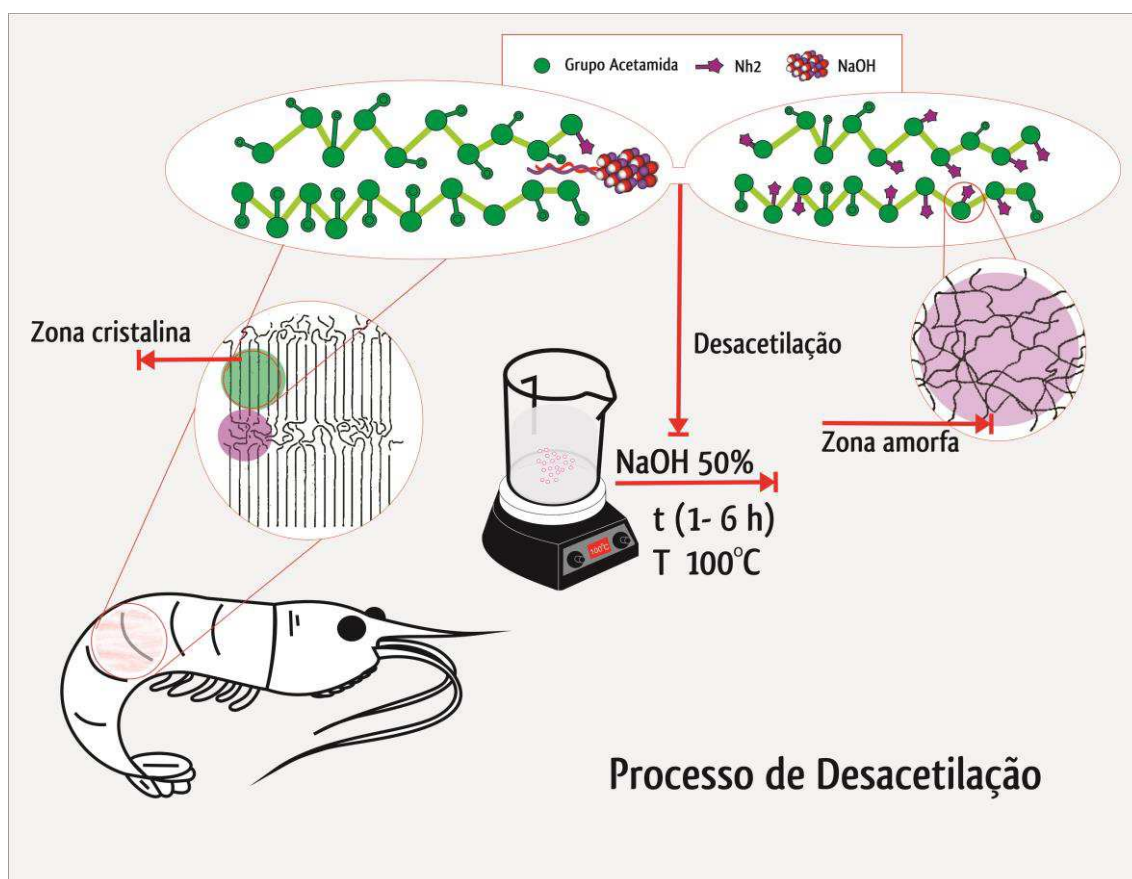
A reação de desacetilação da quitina envolve a remoção dos grupamentos de acetamida ($-\text{NHCOCH}_3$) que são transformados, em graus variados, em grupos amino ($-\text{NH}_2$), dando origem à quitosana. A versatilidade da quitosana depende principalmente destes grupos amino altamente reativos. O grau de desacetilação depende principalmente do método de purificação e das condições de reação para sua obtenção. Portanto, é importante caracterizar a quitosana por meio da determinação do grau de desacetilação antes da sua utilização. Essa caracterização é muito importante, devido à ocorrência no mercado de comercialização indevida de quitina como quitosana (BAXTER et al., 1992).

Considera-se que o grau de desacetilação e o peso molecular essenciais na determinação da qualidade e as variações das propriedades da quitosana,

resultantes de vários fatores relacionados ao processo de fabricação, podem influenciar nas características do produto final.

Para obtenção de quitosana, utiliza-se, geralmente, a quitina suspensa em soluções aquosas concentradas de NaOH ou KOH (40 - 60%) por tempo variáveis (0,5 - 24 h) e a temperaturas relativamente elevadas (50 - 130 °C), como ilustrado na Figura 31. As características da quitosana obtida são determinadas pela concentração da solução alcalina e razão quitina/solução alcalina, tamanho das partículas de quitina, temperatura, tempo e atmosfera de reação. As condições mais severas promovem acentuada desacetilação, resultando em acentuada despolimerização via hidrólise alcalina das pontes glicosídicas o que limita fortemente sua aplicação (CAMPANA-FILHO, 2007).

Figura 31 - Ilustração esquemática do processo de desacetilação



O que acontece, no processo de desacetilação, é que a quitosana, que tem uma estrutura morfológica semicristalina, constituída de unidades acetiladas e menos cristalinas, e unidades desacetiladas, que são mais

cristalinas devido às ligações intermoleculares por pontes de hidrogênio - o que explica a forte resistência da quitina à desacetilação, quando em contato com a solução de NaOH 50% permitirá a quebra dessas unidades e vão enfraquecer as ligações intramoleculares, conseqüentemente reduzindo a cristalinidade até que estas se tornem amorfas, pois o acesso do reagente aos sítios reativos da quitina ocorre principalmente nas regiões não ordenadas das cadeias. (BLACKWELL 1980).

A forma aleatória (amorfa) favorece a solubilização do polímero, fato muito importante para obtenção de quitosana. Para que esses polímeros sejam solúveis em solução de ácido, é necessário que as cadeias estejam extensivamente desacetiladas (CARDOSO 2008). Portanto, o grau de desacetilação tem influencia direta na solubilidade da quitosana, por determinar o conteúdo de grupos amino livres, diferenciando-o da quitina (PETER, 1995).

É a solubilidade que permite a distinção mais simples e rápida, pois a quitosana é solúvel em soluções aquosas, enquanto que na quitina este é o principal fator limitante da sua utilização. O fato de ser solúvel em meio ácido diluído forma um polímero catiônico, com a protonação (adição de prótons) do grupo amino (NH_3^+), que confere propriedades especiais diferenciadas em relação às fibras vegetais, como a celulose (LARANJEIRA & FÁVERE, 2009; AZEVEDO et al., 2007).

Tendo em vista a importância do grau de desacetilação e a dificuldade em se obterem cadeias majoritariamente desacetiladas, alguns estudos estão sendo realizados por pesquisadores aplicando o método de vários estágios de desacetilação.

5.2.1 Multietapas de desacetilação para obtenção de quitosana

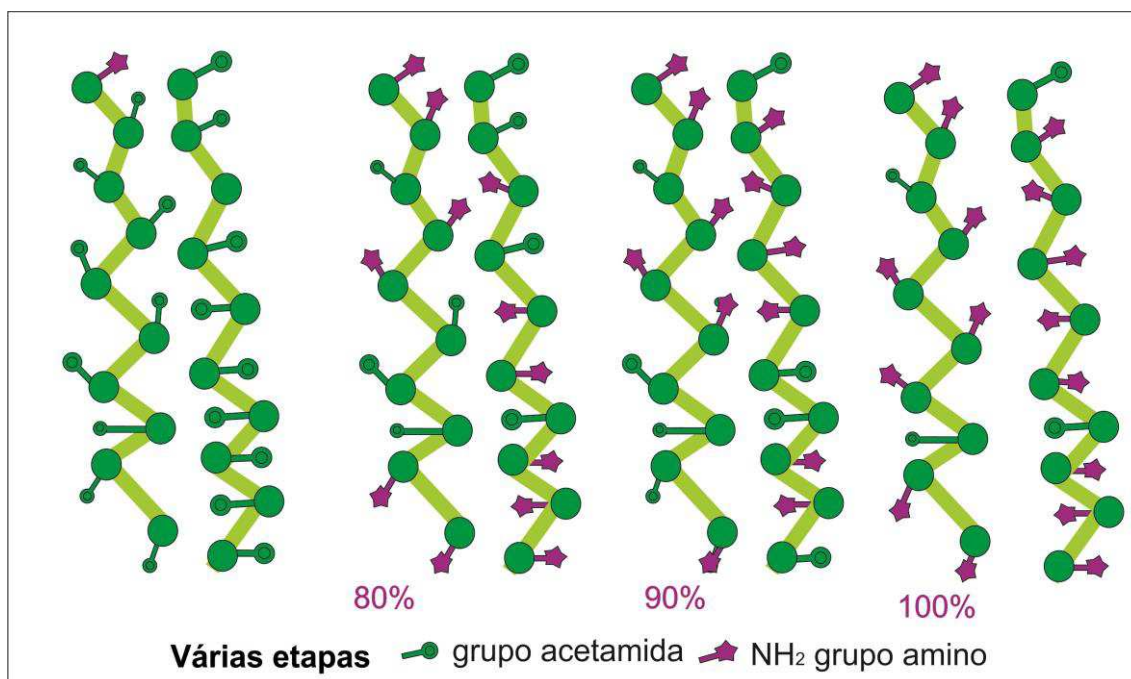
Como citado no tópico anterior, alguns estudos recentes na obtenção de quitosana estão aplicando uma nova metodologia, cujo objetivo é obter produtos mais desacetilados e solúveis.

Um estudo realizado por Yaghobi & Hormozi (2010) mostrou diferenças significativas entre os procedimentos multietapas e únicos. Segundo os autores, esse novo método foi eficaz para aumentar o grau de desacetilação da quitina e, conseqüentemente, ideal para a quitosana com aplicação biomédica.

Em geral, em uma única etapa de desacetilação, teoricamente, a quitina reage mais rapidamente, mas, por outro lado, a quitosana originada pela primeira etapa de desacetilação resulta em produtos com grau de acetilação relativamente elevado. As condições morfológicas da quitina podem assumir uma função limitada da acessibilidade quanto à molécula de NaOH (YAGHOBI & HORMOZI 2010; CARDOSO, 2008).

Logo, o tratamento multietapas pode tornar os grupos acetamida mais acessíveis, devido às alterações morfológicas induzidas, como representando na Figura 32.

Figura 32 - Ilustração esquemática do efeito da estrutura morfológica quitina em desacetilação multietapas



Tendo por base esta interpretação, o processo de desacetilação multietapas pode ser mais vantajoso, pois, embora as etapas subsequentes sejam menos eficientes do que a primeira, novos sítios são atingidos e a otimização das condições pode levar à desacetilação mais completa (CARDOSO, 2008).

Também outro fator relevante desta etapa seria a lavagem após cada etapa, pois efetuando a lavagem após cada fase do tratamento alcalino, provavelmente, ocasionar-se-á um inchaço em um maior número de partículas

de quitina, tornando-as mais expostas ao processo de desacetilação (YAGHOBI & MIRZADEH, 2004).

5.3 MATERIAIS E MÉTODOS

5.3.1 Materiais

- **Matéria-prima:**

Cascas de camarão da espécie *Litopenaeus vannamei*.

- **Reagentes:**

Hidróxido de sódio (NaOH), Vetec

Ácido acético glacial (CH₃COOH), Sigma Aldrich.

5.3.2 Metodologia de Desacetilação

A desacetilação da quitina foi realizada por dois métodos diferentes:

- **Método 1:**

No método 1, prepararam-se 250mL de uma solução aquosa de NaOH, a 12,5 M. Em seguida, pesou-se 1 grama de quitina, mediram-se 20mL de NaOH a 12,5M, e colocou-se num *erlenmeyer* de 50mL. Na sequência, colocou-se o *erlenmeyer* numa placa de aquecimento com agitação magnética, e aqueceu-se até atingir a temperatura de 100°C. Quando a solução atingiu esta temperatura, adicionou-se a quitina. Depois, deixou-se reagir por “X” h e, ao fim deste tempo, filtrou-se. O produto sólido foi lavado com água até pH neutro e, finalmente, o produto sólido foi seco até atingir peso constante. O mesmo procedimento repetiu-se para X horas = 1h, 2h, 3h, 4h, 5h e 6h;

- **Método 2:**

No método 2, prepararam-se 250mL de uma solução aquosa de NaOH, a 12,5 M. Em seguida, pesou-se 1 grama de quitina e mediram-se 20mL de NaOH a 12,5M, e colocou-se num *erlenmeyer* de 50mL. Na sequência, colocou-se o *erlenmeyer* numa placa de aquecimento com agitação magnética,

e aqueceu-se até atingir a temperatura de 100°C. Quando a solução atingiu esta temperatura, adicionou-se a quitina. Depois, deixou-se reagir por 1h e, ao fim deste tempo, filtrou-se a solução. Ao filtrado foi novamente adicionado uma solução de NaOH 12,5M a 100°C, deixando-se reagir por um período de tempo indicado na Tabela 13. No fim de cada etapa de desacetilação, o produto sólido foi filtrado. No final das etapas de desacetilação, o produto sólido foi filtrado, lavado até pH neutro e seco até atingir peso constante;

Tabela 13 - Resumo das etapas de desacetilação

Método	Etapas	Horas de desacetilação
I (6 amostras)	Singulares	1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h
II (3 amostras)	Múltiplas	1h+1h+1h; 1h+2h+2h; 1h+3h+3h

5.3.3 Caracterização

Os ensaios de caracterização foram realizados no laboratório CERTBIO, localizado da Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

Foram realizadas três caracterizações do Capítulo 3: Espectroscopia na Região do Infravermelho com transformada de Fourier- FTIR, Difração de Raios X, Insolúveis e Viscosimetria Dinâmica ou Aparente.

- **Viscosimetria Dinâmica ou Aparente**

Os ensaios de viscosimetria dinâmica foram realizados com um viscosímetro de Brookfield, modelo DV-II+ PRO, com dispositivo para amostras pequenas e com spindle 21. O ensaio foi realizado e repetido três vezes a 20°C, numa solução de quitosana a 1% (p/v) dissolvida em uma solução aquosa de ácido acético a 1%(v/v), tal como é indicado pela norma 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”.

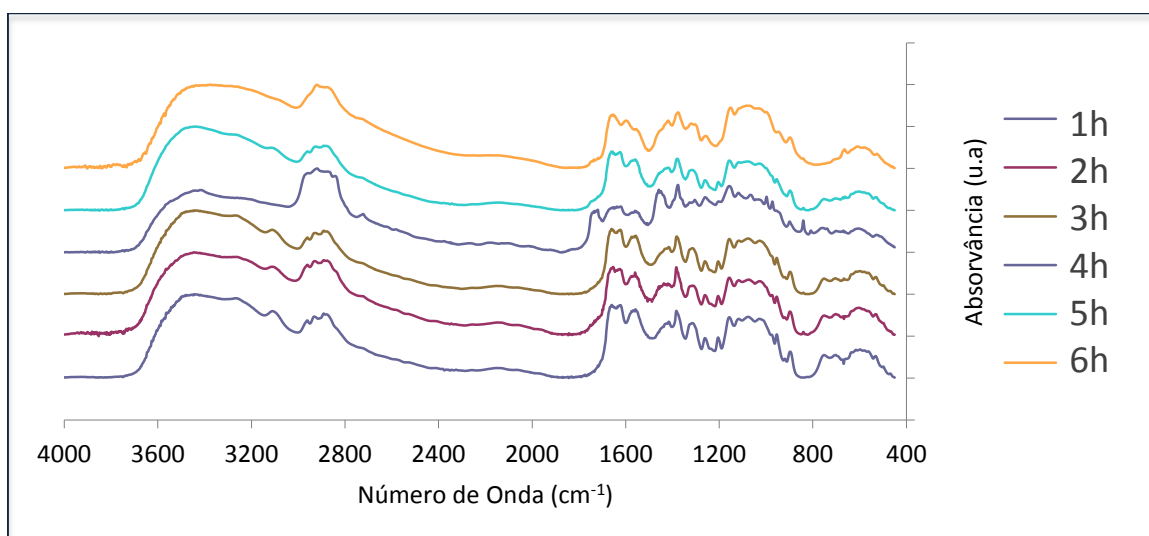
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.4.1 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier- FTIR

- **FTIR em etapa singular**

Foi realizado um estudo da conversão da quitina em quitosana utilizando-se seis (6) tempos diferentes no processo de desacetilação, como exposto na Figura 33.

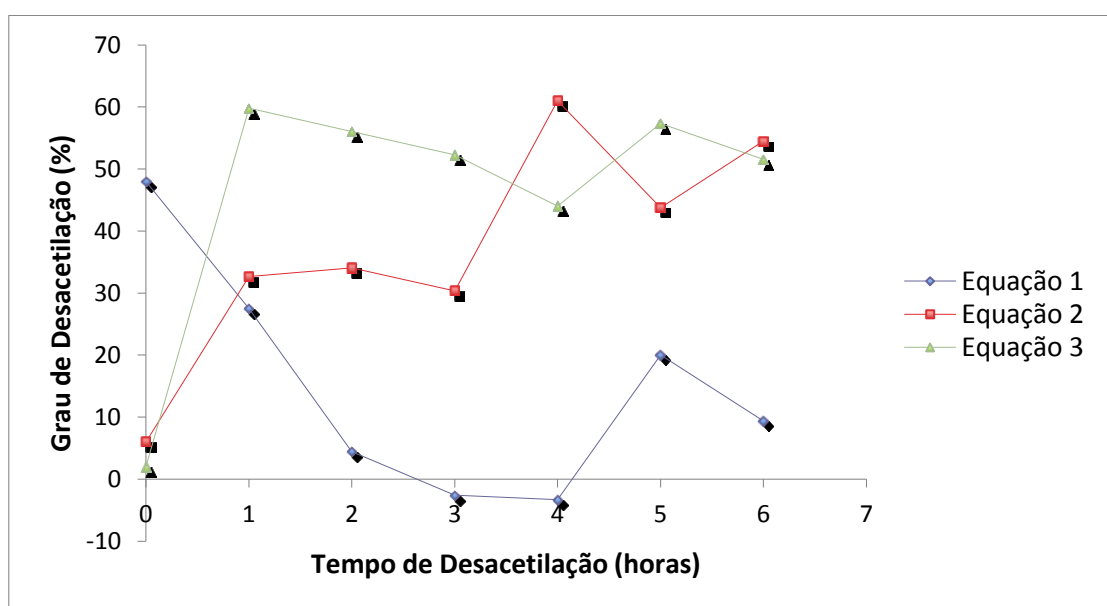
Figura 33 - Espectros de infravermelho de cada amostra desacetilada



Os resultados obtidos pela espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (apresentados na Figura 33) confirmaram a presença de bandas dos grupos presente na quitina/quitosana, que são: 1655 cm^{-1} amida I; 1630 cm^{-1} amida I; 1560 cm^{-1} amida II; 3450 cm^{-1} grupo hidroxilo; 2878 cm^{-1} ligação C-H; 1160 cm^{-1} banda de oxigênio; 1070 cm^{-1} ligação C-O; 1030 cm^{-1} ligação C-O; 897 cm^{-1} ligação C-O. Pela Figura 33, pôde-se observar uma diferença relevante na quitina submetida à desacetilação em 6 horas, com aparecimento de um pico agudo em 1665 cm^{-1} , que é atribuído aos grupos acetamida. Outras mudanças também foram observadas, como na banda em

3450 cm^{-1} do grupo hidroxilo, que se torna bastante definida, ligação C-O. Apesar de existirem outros métodos, o único método disponível para determinar o grau de desacetilação da quitina, ou seja, sem dissolução é a partir da determinação da percentagem de N-acetilação a partir de diferentes bandas de absorção do grupo amina e da banda de absorção do grupo hidroxilo. Aqui foram utilizadas as mesmas três equações (Eq 1 – 3) do Capítulo 3.

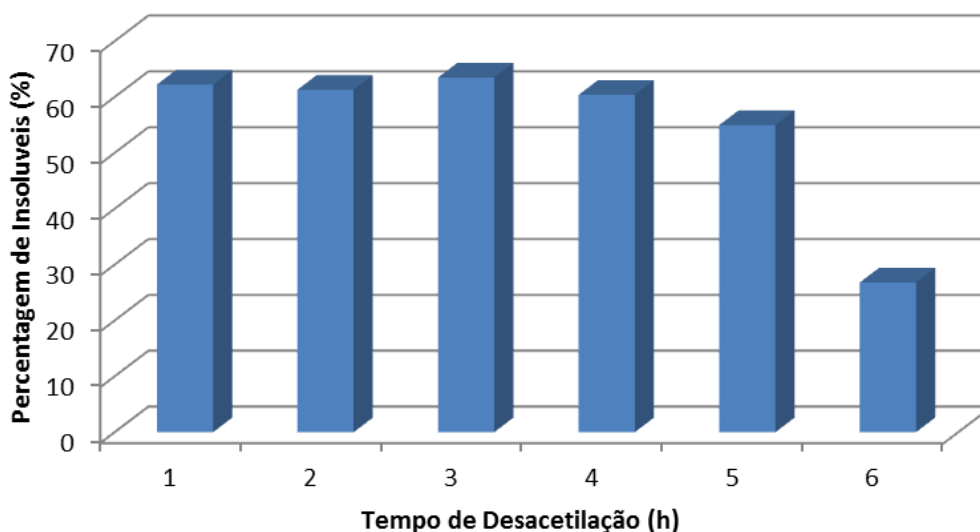
Figura 34 - Grau de desacetilação em função do tempo de reação



Analisando-se os resultados da Figura 34, verifica-se que a equação 1 não fornece resultados confiáveis de grau de desacetilação. No entanto, nas equações II e III, tal como no Capítulo 3, os resultados apresentados são valores mais confiáveis no que se refere ao grau de desacetilação. Verifica-se que o aumento do grau de desacetilação na primeira hora é significativo, evoluindo de uma forma discreta após a primeira hora de desacetilação, como pode ser visto pela equação 3. Já analisando a equação 2, verifica-se o mesmo salto na primeira hora, embora menos significativo, evoluindo somente depois da 3h de desacetilação para valores perto de 50% de desacetilação.

Para fundamentar os resultados de desacetilação, foi também realizado um estudo sobre a quantidade de insolúveis para as 6 amostras, apresentado na figura 35.

Figura 35 - Quantidade de insolúveis presentes nas amostras



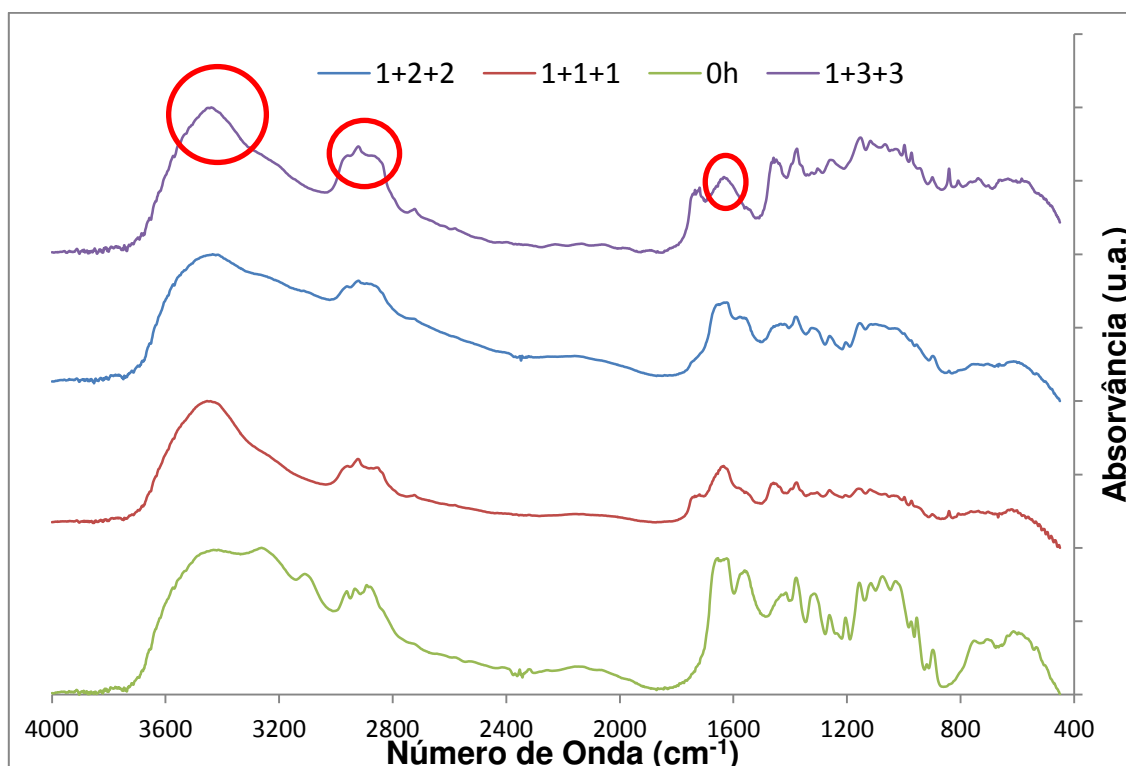
Com esse estudo, foi possível observar que se utilizando apenas uma etapa de desacetilação, o efeito no processo torna-se limitado e o grau de desacetilação aumenta lentamente. Uma provável explicação para esse fenômeno vem a partir da morfologia da quitina, em que alguns grupos amidas ficam inacessíveis à molécula de NaOH. Sendo a quitina um polímero semicristalino, nas regiões amorfas, a acessibilidade aos sítios reativos é maior, enquanto que, nas regiões cristalinas, não são completamente acessíveis. Segundo estudos realizados por Yaghoobi (2010), os processos de desacetilação, realizados com mais de uma etapa, permitem que os grupos acetamida se tornem mais acessíveis, pois, a cada nova etapa, a lavagem é o principal fator da eficácia desse método, pois provoca ainda mais o inchaço da quitina e mais cadeias ficam expostas ao processo de desacetilação.

Verifica-se que, apesar de o grau de desacetilação ser baixo e inferior a 60%, acima de 5h a fração solúvel torna-se significativa. Tal fato pode estar relacionado com o mecanismo de desacetilação das cadeias, ocorrendo primeiramente nas frações amorfas das cadeias, que ficam solúveis. No entanto, grande parte das cadeias restantes encontra-se ainda pouco desacetilada.

- **FTIR Multietapas**

Após analisar os resultados da conversão da quitina em quitosana, utilizando seis (6) tempos diferentes, em que se observou que grau de desacetilação aumentou lentamente, foi realizado um novo ensaio, baseado na literatura, em que a quitosana foi submetida, em três (3) etapas, ao contato de uma nova solução de NaOH. Os resultados obtidos estão representados na Figura 36 a seguir (YAGHOBI & HORMOZI 2010).

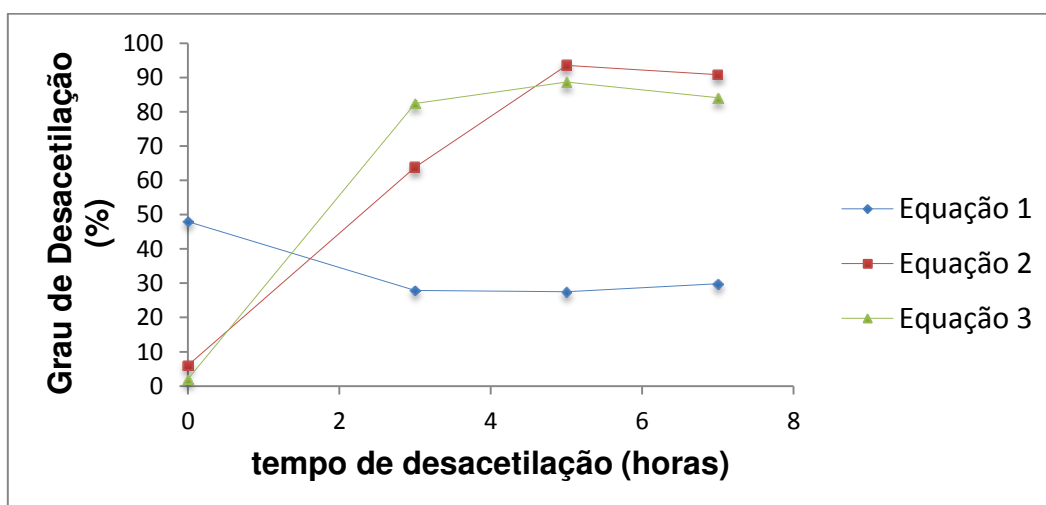
Figura 36 - Espectros de infravermelho da quitosana pelo processo multietapas



O que pode ser observado na Figura 36 é que os resultados continuam confirmando a presença de bandas dos grupos presentes na quitina/quitosana. Nota-se que o pico 3450 cm^{-1} , conforme o aumento das horas, em relação às etapas foi se tornando mais agudo. Esse comportamento é típico do processo de conversão da quitina em quitosana (ROBERTS et al., 1997).

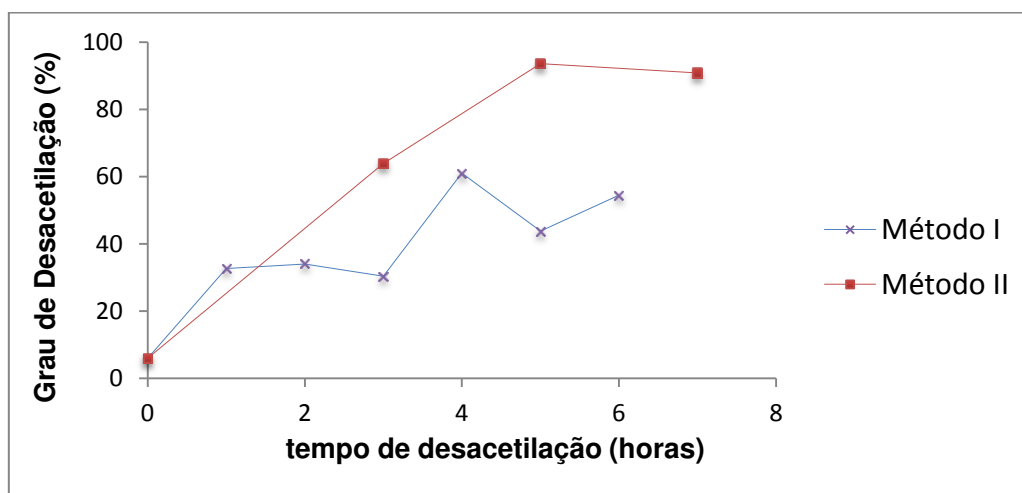
Também foi observado o aumento da banda de absorção em 2878 cm^{-1} que influencia diretamente no grau de desacetilação. Outras mudanças também foram observadas, o pico tornou-se mais agudo em 1665 cm^{-1} , o que é atribuído aos grupos acetamida. Os resultados para o grau de desacetilação, descrita na equação 1, no tópico anterior está apresentado na Figura 37.

Figura 37 - Grau de desacetilação em função do tempo de reação com as 3 equações



As mesmas equações utilizadas para determinação do grau de desacetilação do método I foram adotadas para análise do grau de desacetilação das amostras desacetiladas pelo método II. Verifica-se, mais uma vez, a incapacidade da equação I para fornecer valores concordantes com as equações. Já as equações II e III apresentam valores mais aproximados, apesar de diferentes. Verifica-se que, logo na amostra 1+1+1, é possível obter um valor de desacetilação elevado, com valores entre 60-80%, subindo este valor para perto de 90% com as amostras 1+2+2 e 1+3+3. Desta forma, é fácil perceber a diferença entre os dois métodos quanto ao grau de desacetilação, e evidenciada pela Figura 38. Pode-se afirmar que o método por multietapas é mais eficaz na desacetilação da quitina.

Figura 38 - Grau de desacetilação em função do tempo de reação pelo método 1 e 2



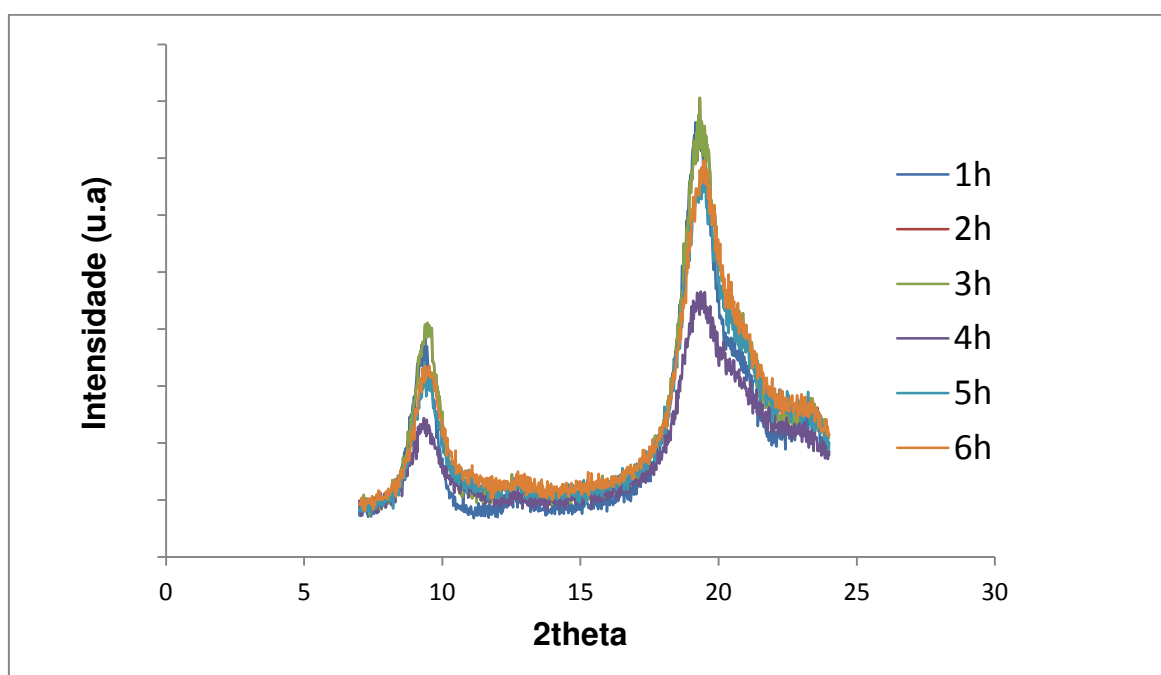
Estes resultados estão de acordo com o trabalho de Chebotok & colaboradores (2007), quando afirmam que a lavagem da quitina parcialmente desacetilada com água reduz parte da cristalinidade devido ao inchamento. Tal inchamento permite a penetração das moléculas de NaOH mais facilmente, conseguindo-se melhores resultados em termos de grau de desacetilação. No entanto, apesar dos valores de grau de desacetilação para as duas primeiras amostras ser acima de 50%, continua-se a observar valores de insolúveis relativamente altos. O mesmo resultado foi obtido por Percot e colaboradores (2003). A explicação para tal fenômeno é a fração cristalina encontrar-se ainda por desacetilar e permanecer insolúvel em ácido acético.

5.4.2 Difração de Raios X

- **DRX em etapa única**

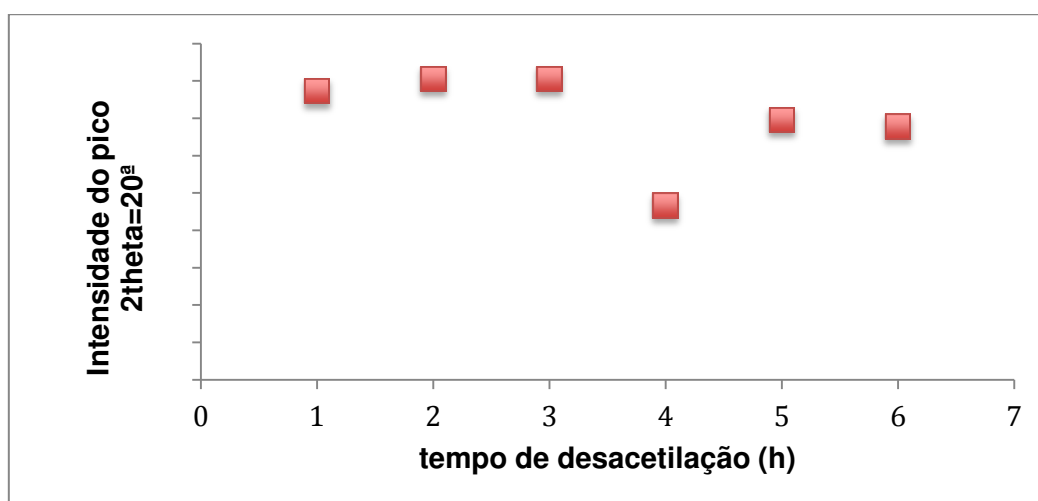
Para este ensaio, foram caracterizadas, primeiramente, amostras de quitosana exposta à desacetilação por períodos de 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, cujos resultados obtidos por difração de raios-x (DRX) estão representados na Figura 39.

Figura 39 - amostra do DRX da quitosana



Pelos difratograma, mostrados na Figura 39, observam-se dois picos característicos, igualmente verificados no difratograma obtido da quitina. Esses picos têm maior ou menor intensidade de acordo com a exposição de tempo de desacetilação, mas continuam aparecendo em 10° e 20° . De acordo com a Figura 40, pode-se observar as amostras que contêm maior intensidade em 20° .

Figura 40 - Grau de intensidade em 20°

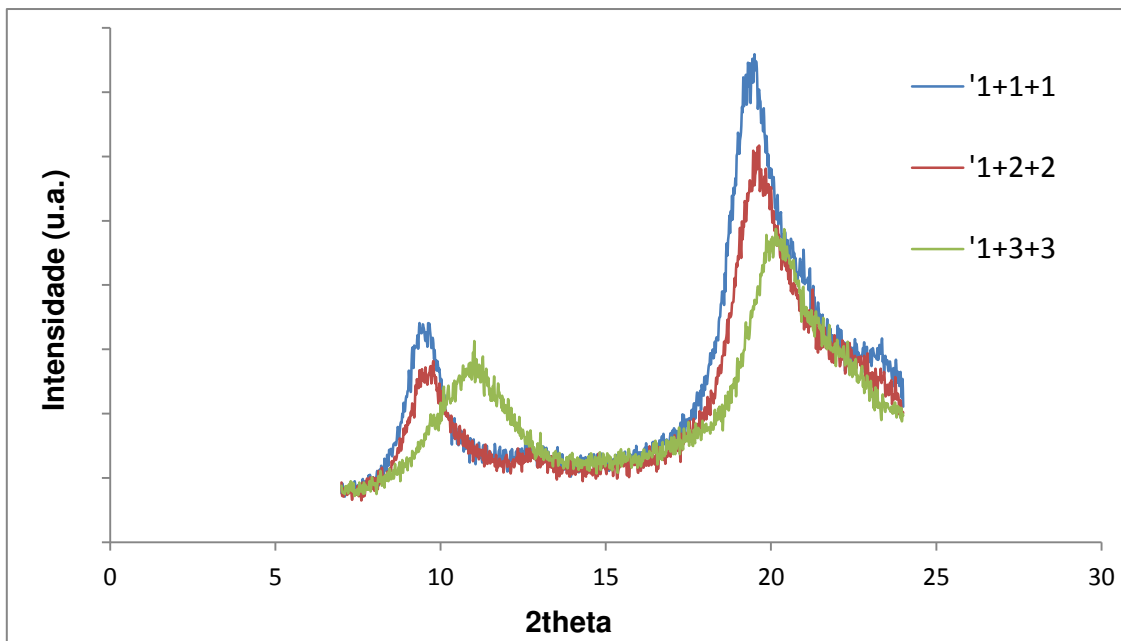


Analisando-se a Figura 40, verifica-se que a intensidade do pico cristalino da quitina se mantém praticamente constante até 4h de desacetilação, começando a partir deste ponto a diminuir de intensidade. Verifica-se, no entanto, que essa diminuição não é muito significativa, pelo que se pode determinar com a metodologia I, onde a diminuição cristalinidade não foi efetiva, confirmando-se, assim, o motivo pelo qual o grau de desacetilação não aumenta.

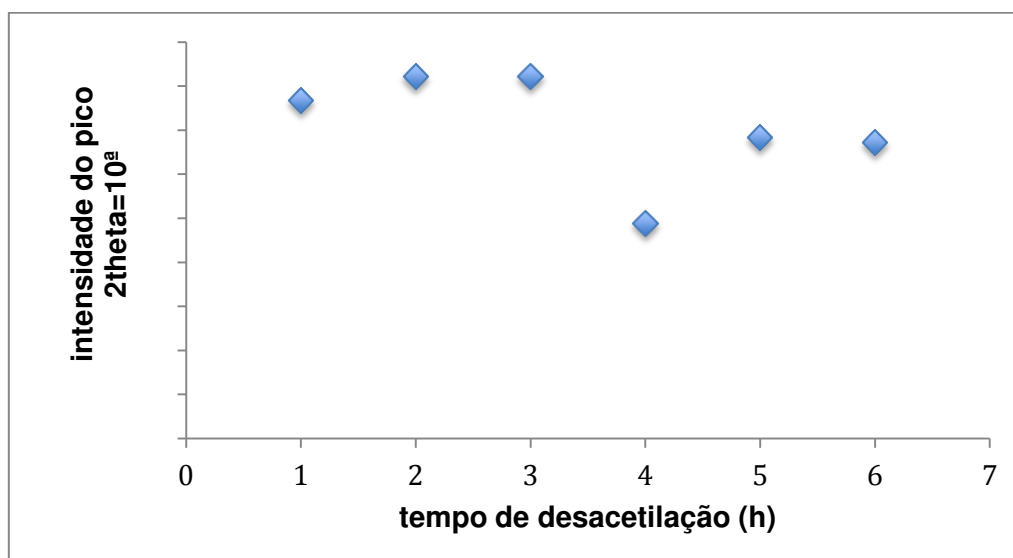
- **DRX multietapas**

Os resultados das amostras multietapas estão representados na figura 41.

Figura 41 - DRX multietapas (A) 1+1+1, (B) 1+2+2 e (C) 1+3+3



No difratograma da quitosana, as primeiras amostras A e B permanecem com os picos 10° e 20° . Porém, para amostra C, houve um deslocamento perdendo a sua característica de pico mais agudo, e, conseqüentemente, observando a presença de um pico mais largo, indicou a predominância de uma forma amorfa do material. Na figura 42, verifica-se o grau de intensidade dos picos para essas três amostras:

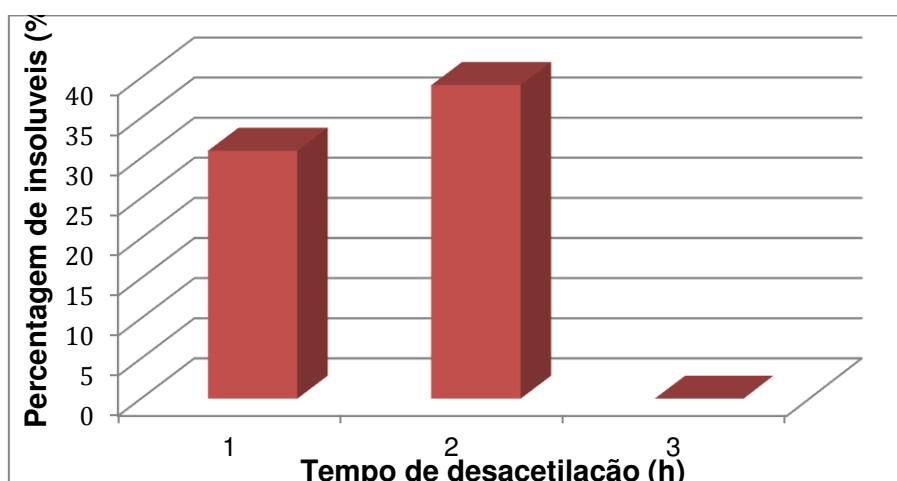
Figura 42 - Grau de intensidade em 10° 

Analisando-se a Figura 42, visualiza-se, então, uma diminuição na intensidade dos picos de cristalinidade, indicando uma mudança morfológica, tornando um material cada vez mais amorfo. Esses resultados, de acordo com os resultados obtidos com FTIR e o ensaio de insolúveis, mostram a efetividade na desacetilação da amostra C, corroborado em uma diminuição acentuada na intensidade do pico na região cristalina, confirmando a eficiência do método II (multietapas).

5.4.3 Insolúveis

Na figura 43, apresentam-se os resultados do ensaio realizado para determinar a quantidade de insolúveis, onde foi verificado que um percentual de 30% para amostra A (1+1+1) e 39% para amostra B (1+2+2) e a amostra C(1+3+3) tornou-se solúvel.

Figura 43 - Quantidade de insolúveis presentes nas amostras de quitosana multietapas



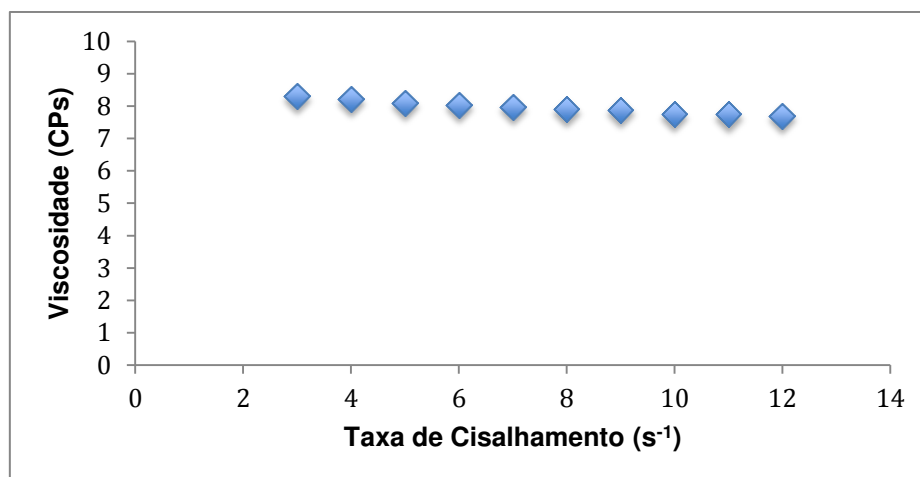
Verifica-se que a metodologia II proporcionou a obtenção de valores significativamente melhores no que concerne ao grau de insolúveis, sendo possível transformar totalmente o produto em quitosana com a metodologia 1+3+3.

No que toca à produção de quitosana, o resultado obtido com a amostra C é o ideal, dispensando-se, assim, etapas de purificação para a separação das moléculas de quitina ainda insolúveis.

5.4.4 Viscosidade dinâmica ou aparente

A viscosidade dinâmica determinada em função da taxa de deformação variável está representada na figura seguinte.

Figura 44 - Taxa de deformação da quitosana 1+3+3



As soluções de quitosana apresentam um comportamento não-newtoniano, exceto uma vez em que a viscosidade se mantém praticamente constante com o aumento da taxa de deformação (DESBRIERE, 2002). Segundo o mesmo autor, para soluções muito diluídas de quitosana, existe uma taxa de deformação crítica, a partir da qual ocorre a passagem do comportamento newtoniano para um comportamento pseudoplástico. Nos resultados obtidos, a taxa referenciada não pode ser observada.

O objetivo inicial para esta caracterização seria determinar o peso molecular das quitosanas obtidas. Contudo, conforme os dados descritos pela literatura, não foi possível estabelecer uma relação direta entre os valores de viscosidade dinâmica com valores de peso molecular. Os valores de viscosidade obtidos para a quitosana enquadram-se dentro de valores associados à quitosana de baixo peso molecular, sendo esta uma denominação comercial que costuma corresponder a valores entre os 20. 000 g/mol e os 100. 000 g/mol.

Tipicamente, a quitosana de baixo peso molecular é obtida por vias de despolimerização da quitosana de alto peso molecular, adicionando-se mais uma etapa ao processo produtivo (HUANG, 2007). No presente trabalho,

considera-se que se introduziu uma melhoria na produção de quitosana de baixo peso molecular, uma vez que ela é obtida naturalmente a partir da desacetilação da quitina, sem ser necessária nova etapa.

O número de possibilidades de aplicação da quitosana de baixo peso molecular não é menor que aquele considerado para a quitosana de alto peso molecular (>400 000 g/mol) ou médio peso molecular (>100 000 g/mol). Dentre as propriedades principais da quitosana com baixo peso molecular, estão as suas propriedades biológicas, como antimicrobianas, antifúngicas (JEON, 2001) e antitumorais (QIN, DU, & XIAO, 2002), rápida biodegradação, baixa viscosidade e melhor solubilidade.

5.5 CONCLUSÃO

Foi possível obter quitosana totalmente solúvel com grau de desacetilação acima dos 90% por meio do método de multietapas. Para tal, foram necessárias 7h de desacetilação em 3 etapas. A total solubilidade das amostras é importante por questões de economia, já que, desta forma, não é necessária uma nova etapa de purificação para a remoção da quitina insolúvel. Conclui-se ainda que a cristalinidade da quitina é um fator importante no processo de desacetilação, verificando-se que, quanto menor for a sua cristalinidade, maior a cinética de desacetilação. Finalmente, determinaram-se ainda duas equações, que relacionam picos de absorção de infravermelhos distintos, para a determinação do grau de desacetilação de quitosanas diferentes.

Em relação ao ensaio de viscosidade, os valores obtidos estão associados à quitosana de baixo peso molecular.

5.6 REFERÊNCIA DA LITERATURA

BAXTER, A.; DILLON, M.; ANTHONY TAYLOR, K. D.; ROBERTS, G. A. Improved method for ir determination of the degree of N-acetylation of chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.14, n.3, p.166-169, 1992.

BLACKWELL, J.; WEIH, M. A. Structure of chitin-protein complexes: Ovipositor of the ichneumon fly *Megarhyssa*. **Journal of molecular biology**, v. 137, n. 1, p. 49-60, 1980.

CARDOSO, M. B.; **Contribuição ao estudo da reação de desacetilação de quitina: Estudos da desacetilação assistida por ultrassom de alta potência**. 2008. 95f. Tese (Doutorado em Físico-Química) Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos.

CAMPANA-FILHO, S.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F.; CARDOSO, M.; BATTISTI, M.; SIM, P.; GOY, R.; SIGNINI, R.; LAVALL, R. Extração, estruturas e propriedades de α - e β -quitina. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p.644-650, 2007.

CHEBOTOK, E. N.; NOVIKOV, V. Y.; & KONOVALOVA, I. N. Kinetics of base deacetylation of chitin and chitosan as influenced by their crystallinity. **Russian Journal of Applied Chemistry**, v.80, n.10, p. 1753-1758, 2007.

DESBRIERES, J. Viscosity of semiflexible chitosan solutions: Influence of concentration, temperature, and role of intermolecular interactions. **Biomacromolecules**, v.3, p. 342-349, 2002.

GOY, R.C.; ASSIS, O.B.G.; CAMPANHA-FILHO, S.P. Produção de Esferas de quitosana. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. v. 33, julho/dezembro, 2004.

HUANG, Y.; LAM, U. Chitosan/Fucoidan pH Sensitive Nanoparticles for Oral Delivery System. **Journal of the Chinese Chemical Society** v.58 p. 779–785, 2011.

JEON Y.J.; PARK P.J.; KIM S.K. Antimicrobial effect of hitooligosaccharides produced by bioreactor. **Carbohydr. Polym.**, v. 44 p. 71–76, 2001.

LARANJEIRA, M.; FÁVERE, V. Quitosana: Biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.

KHOR, E. Chitin: fulfilling a biomaterials promise. **Book reviews / Biomaterials**, Elsevier. v.23, p. 3913–3915, 2002.

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

MOTHÉ, C. G.; AZEVEDO, A. D., **Análise térmica de materiais**. São Paulo: Editora, 2002.

PERCOT, A.; VITON, C. & DOMARD, A. Optimization of chitin extraction from shrimp shells. **Biomacromolecules**, v.4, p.12–18, 2003. ISSN 1525-7797.

PETER, M. G. Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. **Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure And Applied Chemistry**, New York, v. 32, p. 629-640, 1995.

QIN, C.; DU, Y.; XIAO, L.; LI, Z.; GAO, X. Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.31, p.111–117, 2002.

ROBERTS, G. A. F. **Chitin chemistry**, Mc Millan Press Ltd: London, 1992.

SANTOS, J. E.; SOARES, J.; DOCKAL, E.; CAMPANA-FILHO, S. P.; CAVALHEIRO, É. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.13, n.4, p. 242-249. 2003.

TOKORO, A.; TATEWAKI, N.; SUZUKI, K.; MIKAMI, T.; SUZUKI, S. Growth-inhibitory effect of hexa-*N*-acetylchitohexaose and chitohexaose **Chem. Pharm. B**, v.36 p. 784–790, 1988.

YAGHOBI, N.; HORMOZI, F. Multistage deacetylation of chitin: Kinetics study. **Carbohydrate Polymers**, v.81, n.4, p. 892-896, 2010.

YAGHOBI, N.; MIRZADEH, H. Enhancement of Chitin's Degree of Deacetylation by Multistage Alkali Treatments. **Iranian Polymer Journal**, p.131-136,2004.

YANG X.; YUAN, X.; CAI, D.; WANG, S.; ZONG, L. Low molecular weight chitosan in DNA vaccine delivery via mucosa. **International Journal of Pharmaceutics** v. 375, p.123–132, 2009.

YANG, H.; HON M. The effect of the molecular weight of chitosan nanoparticles and its application on drug delivery. **Microchemical Journal** v.92 p. 87–91, 2009.

Capítulo VI

APLICAÇÃO EM BIOMATERIAIS

6 APLICAÇÃO DA QUITOSANA EM BIOMATERIAIS

6.1 INTRODUÇÃO

Existem muitos tipos de materiais com diferentes aplicações, e esta multiplicidade sempre inspirou a humanidade. Os materiais naturais ou elaborados pelo homem têm simplificado de forma significativa as funções do nosso dia a dia (PASSOS, 2006).

Entretanto, os primeiros seres humanos tiveram acesso apenas a um número limitado de materiais, os naturais, que, a princípio, foram usados para aumentar ou reparar o corpo, tais como a madeira, utilizada na tentativa de substituir tecidos perdidos por doença ou trauma. Neste contexto, a partir da ideia de reconstrução de membros quebrados, começou a surgir um interesse relevante pelos Biomateriais há mais de um século.

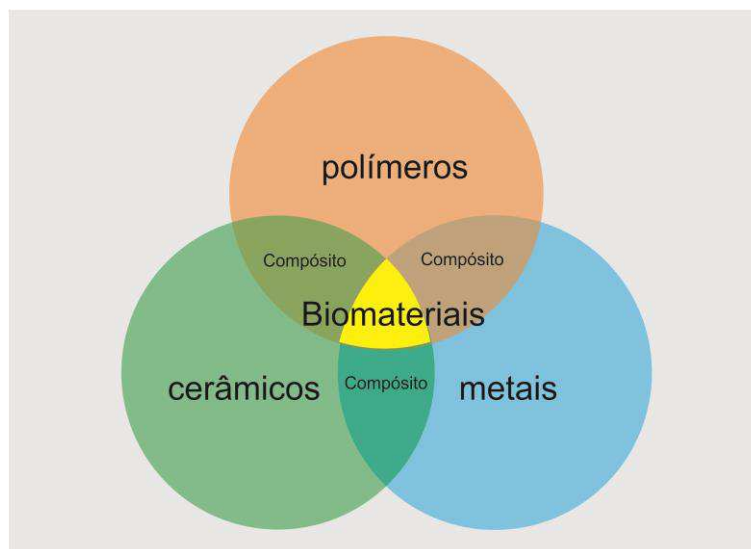
Através da percepção de que o produto “implantado” tinha de ser forte o suficiente para sustentar tensões funcionais do corpo por um período de tempo adequado, sem que este sofresse fratura ou que houvesse efeito adverso sobre o paciente, ficou estabelecido o princípio da seleção dos materiais para aplicações médicas para as próximas décadas (HUEBSCH e MOONEY 2009; ANDERSON, 2006).

6.2 REVISÃO DA LITERATURA

6.2.1 Biomateriais

Biomateriais podem ser definidos como substâncias de origem natural, sintética ou artificial que são toleradas de forma transitória ou permanente pelos diversos tecidos que constituem os órgãos dos seres vivos. Eles são utilizados como um todo ou parte de um sistema que trata, restaura ou substitui algum tecido, órgão ou função do corpo, ou ainda como um material não biológico utilizado em um dispositivo médico, com intenção de interagir com sistemas biológicos (WILLIAMS, 1987). Conseqüentemente, uma grande variedade de materiais, que engloba todos os materiais clássicos, como metais, cerâmicos e os polímeros, foram investigados como Biomateriais (NAIR e LAURENCIN 2007), representados na Figura 45.

Figura 45 - Materiais investigados como Biomateriais



Manufaturados ou processados, os materiais devem se adequar à utilização em dispositivos médicos que entram em contato íntimo, desde o nível microscópico, como proteínas e células, até o nível macro, como tecidos, órgãos e sistemas orgânicos. Todos provocam, em maior ou menor grau, uma resposta imunológica do receptor. Com a pesquisa e o desenvolvimento de novos materiais biomédicos, o material, antes considerado "passivo", passa a interagir ativamente e se integrar com o seu ambiente biológico (DALAPÍCULA et al 2006 ; ANDERSON, 2006).

O critério de seleção de Biomateriais é baseado principalmente na aplicação a que se destinam. É, a partir do cumprimento de cada uma das exigências primárias, que se têm os conceitos de biocompatibilidade e de biofuncionalidade. A biocompatibilidade dos materiais é estudada pelo emprego de testes de natureza hematológica, biológica e física. Os métodos hematológicos visam estabelecer a extensão de alterações do sangue causadas pelo contato com o material. Os métodos biológicos avaliam o grau de toxicidade dos materiais para os tecidos. E os métodos físicos correlacionam as propriedades físicas das superfícies e seus eventuais efeitos no sangue (SOUZA e ELIAS 2006).

O outro requisito é a biofuncionalidade, que se refere a um conjunto de propriedades (propriedades físicas, mecânicas, químicas e biológicas) que

habilitam um determinado dispositivo a realizar uma função semelhante àquela do material que está sendo substituído (SCHNEIDER, 2001).

Quanto às propriedades físico-químicas, estas são responsáveis pela sua integração ao tecido vivo e devem ser avaliadas antes da sua aplicação. As propriedades físicas são específicas à área de superfície como, por exemplo, formato e cristalinidade do produto. Estas não deverão ser afetadas durante a sua utilização *in vivo*, ou seja, devem desempenhar a função determinada durante o período de tempo necessário. As propriedades químicas estão ligadas à composição química, ao grau de impureza elementar e à substituição iônica na estrutura atômica. Estas propriedades somadas ao ambiente mecânico influenciam o índice de dissolução do material, assim como a indicação ou restrição da sua aplicação clínica (DALAPÍCULA et al., 2006).

Do ponto de vista mecânico, a resistência à corrosão e degradação está intimamente relacionada com a qualidade e o comportamento do implante no hospedeiro, tornando-se necessário um bom conhecimento das suas características e consequências do uso em longo prazo, assim como da resposta do hospedeiro ao mesmo, dependendo da avaliação do desempenho desse material destas duas vertentes (CORDAS, 2006).

Os biomateriais podem ser classificados em conformidade com a sua origem, mecanismo de ação e comportamento fisiológico. Em relação ao seu comportamento fisiológico, podem ser classificados pela forma como interagem com os tecidos adjacentes. Bioinertes ou Biotoleráveis são materiais que não interagem com os sistemas biológicos, conseqüentemente, não provocam rejeição. Bioativos são materiais duráveis que interagem superficialmente com tecidos próximos em função da similaridade química. Reabsorvíveis são materiais que, após certo período de tempo em contato com os tecidos, acabam sendo degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo (eventualmente substituem ou se incorporam ao tecido com o qual estão em contato) (SCHNEIDER, 2001).

Logo, a seleção do material é apenas uma das etapas que garantirão, ou não, o sucesso. Desde a identificação das necessidades de um paciente até a produção e comercialização de componentes biomédicos, passando pelo projeto, fabricação e testes, um longo caminho deve ser percorrido, dele participando engenheiros (projetistas e de materiais), médicos, dentistas,

biólogos, bioquímicos e até profissionais com formação em desenho industrial (SOARES, 2005).

Os polímeros naturais ou biopolímeros interagem melhor com as células e fluidos do organismo, justamente por serem de origem orgânica e, por isso, facilitarem os mecanismos regenerativos. Derivados de fontes renováveis, tais como plantas, animais, e microorganismos, os polímeros naturais têm sido utilizados, por exemplo, como arcabouços. Além disso, apresentam componentes similares aos das matrizes extracelular (MEC) nativas, que podem também evitar o estímulo de inflamação crônica ou reações imunológicas e toxicidade, geralmente detectada com polímeros sintéticos (NAIR e LAURENCIN 2007).

Atualmente, existem estudos e discussões sobre os tratamentos que fazem uso de processos biológicos e funções celulares para interagir com os materiais. Novos materiais têm sido projetados para mimetizar estruturas biológicas ou funções, com objetivos que abrangem também aspectos ambientais, através da utilização de materiais de origem biológica, tais como quitosana, colágenos, celulose e polímeros de ácido hialurônico.

Biomateriais, baseados em quitosana, constituem uma classe emergente com aplicação em vários campos biomédicos. O aumento desse interesse tem sido corroborado pelo grande número de publicações científicas e patentes, principalmente com novas modificações químicas e físicas, as quais têm promovido novas atividades biológicas para fins específicos como, por exemplo, na engenharia de tecidos, liberação de fármacos e biossensores para diagnósticos clínicos (LARANJEIRA e FÁVERE, 2009).

No Quadro 1, estão exemplificados alguns tipos de biomateriais utilizados para diferentes aplicações.

Quadro 1 - Aplicação clínicas dos Biomateriais

BIOMATERIAIS	VANTAGENS	DESVANTAGENS	APLICAÇÕES
POLÍMEROS POLIETILENO PTFE POLIÉSTER POLIURETANO PMMA SILICONA	Elasticidade; Fácil fabricação; Baixa densidade	Baixa resistência mecânica; Degradação depende do tempo	Suturas, artérias, veias; maxilofacial, (nariz, orelha, maxilar, mandíbula, dente); cimento, tendão artificial; oftalmologia.
METAIS E LIGAS AÇO INOXIDÁVEL LIGA DE TITÂNIO LIGA DE COBALTO - CROMO	Alta força de tensão; Alta resistência a desgaste; Energia de deformação alta	Baixa biocompatibilidade; Corrosão em meio fisiológico; Perda das propriedades mecânicas com tecidos conectivos moles; Alta densidade	Fixação ortopédica (parafusos, pinos, placas, fios, hastes); implantes dentários
CERÂMICAS E VIDROS ALUMINA ZIRCÔNIA CARBONO FOSFATOS DE CÁLCIO PORCELANA VIDROS BIOATIVOS	Boa biocompatibilidade; Resistência à corrosão; Inércia; Alta resistência à compressão	Baixa força de tensão; Baixa resistência mecânica; Baixa elasticidade; Alta densidade	Ossos, juntas, dentes, válvulas, tendões, vasos sanguíneos e traquéias artificiais
COMPOSITOS FIBRA DE CARBONO RESINA TERMOFIXA FIBRA DE CARBONO TERMOPLÁSTICO CARBONO- CARBONO FOSFATO DE CÁLCIO - COLÁGENO	Boa biocompatibilidade; Resistência à corrosão; Inércia; Alta força de tensão	Material de fabricação incompatível	Válvula cardíaca artificial (carbono ou grafite pirolítico), implantes de juntas de joelho (fibra de carbono reforçada com polietileno de alta densidade)

Fonte: adaptado de KAWACHI et al (2008)

6.2.2 Aplicações com quitosana de baixo peso molecular para biomateriais

A partir dos resultados obtidos no capítulo 5, no âmbito das aplicações em Biomateriais, procurou-se indicar as áreas pelas quais essa quitosana,

caracterizada com alto grau de desacetilação e baixo peso molecular, poderá ser utilizada. Dentre as aplicações disponíveis para a área médica deste tipo de quitosana, encontram-se as atividades antimicrobiana e antitumoral, sistema de cicatrização, liberação de gene, entre outras.

- **Atividade antimicrobiana e aceleração da cicatrização**

No que se refere às aplicações biomédicas, a quitosana pode conjugar propriedades, atuando, por exemplo, como agente cicatrizador à medida que age como agente antimicrobiano. Os sistemas de cicatrização compreendem desde o uso de bandagem ou membranas para regeneração da pele, ferimentos, lesões e queimaduras, até a sua utilização para fios de sutura em sistema de multifios. Estes dispositivos são aplicados como proteção contra agentes exteriores ao corpo, utilizando assim as propriedades antimicrobianas e antifúngicas deste peso molecular (ARANAZ et al., 2009).

Esta associação da quitosana como potencial para propriedades reparadoras acontece por esta apresentar na sua formulação básica grupos aminos estruturalmente semelhantes aos aminoácidos que constituem a pele. Esta característica é um aspecto favorável na redução de irritações ou rejeições localizadas, além de atuar na redução do sangramento. Somada à capacidade de estimular a regeneração da derme, outra característica que reforça o potencial médico da quitosana é sua natureza hidrofílica (ASSIS, 2007).

Em relação à utilização da quitosana de baixo peso molecular, pode ser efetiva não apenas sua capacidade de ativar o macrófago, mas também pela facilidade de biodegradação desse polímero no organismo. O macrófago, por sua vez, libera interleucina-1, que estimula a proliferação de fibroblastos e influencia na estrutura do colágeno. Também promovem a migração de neutrófilos, facilitando a resposta inflamatória. Pesquisas indicam que feridas ou lesões tratadas com quitosana mostraram menor grau de fibroplasia, o que favorece a reepitelização com formação de cicatriz lisa (SILVA, 2006).

No que diz respeito às atividades antimicrobianas e antifúngicas, ZHENG e ZHU(2003) indicam que, quanto menor for a massa molecular do polímero, maior será sua atividade antimicrobiana. Isto ocorre, principalmente,

porque a quitosana de baixo peso molecular pode penetrar a parede celular das bactérias e, ao se combinar com o DNA, conduzir a inibição de algumas enzimas e provocar uma interferência na síntese de RNA e, conseqüentemente, de proteínas.

- **Vetor de DNA**

Na indústria farmacêutica, pesquisas mais recentes visam à utilização da quitosana de baixo peso molecular na terapia genética, no tratamento de reações imunológicas ou alérgicas, através da absorção de partículas de quitosana carregando fragmentos de genes através da parede intestinal, inativando alérgenos de origem alimentar.

Entre outras pesquisas, destaca-se um estudo comparativo entre a quitosana de alto peso molecular e baixo molecular, indicando que a quitosana de baixo peso molecular tem maior potencial como vetor de DNA e liberação do mesmo na mucosa oral, aliado á vantagem da biodegradação ocorrer de forma mais rápida (YANG, 2009). A biodegradabilidade é um atributo explorado, uma vez que é desejável que um material introduzido no organismo desapareça depois de cumprida sua função, sem a necessidade de intervenções para sua retirada.

- **Liberação de fármacos**

O sistema de liberação controlada define a quitosana como um agente ativo liberado independentemente de fatores externos e com uma cinética bem estabelecida (BAKER,1987). Novos sistemas de liberação de fármacos têm interagido com a quitosana, permitindo o uso de várias técnicas para encapsulamento de muitos compostos em sistemas de multipartículas, como microesferas e microcápsulas, no intuito de proteger, estabilizar, mascarar os sabores indesejáveis ou modificar as propriedades de liberação. Além da fácil degradação, esse biopolímero pode ajudar na eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada, assim como diminuir a toxicidade e ter maior tempo de permanência na circulação (LEE et al., 2009).

Dentre as aplicações de liberação de droga, encontram-se, ainda, pesquisas que indicam as nanopartículas, feitas com quitosana de baixo peso molecular, como portadoras de perfis rápidos de liberação e completa biodegradação em 3h (YANG, 2009).

6.2.3 Dispositivos produzidos com quitosana de baixo peso molecular

Para comprovar a eficácia da quitosana produzida, esta foi aplicada em duas metodologias utilizadas pelo grupo. Primeiramente, utilizou-se a metodologia de Fideles (2010) e Holanda (2011), para produção de membranas, como é mostrado na Figura 46.

Figura 46 - Membrana produzida com quitosana de baixo peso molecular



Para produção de scaffold, Figura 47, utilizou-se a metodologia aplicada nos trabalhos de Sampaio (2012) e Cavalcanti (2013).

Figura 47 -. Scaffold produzido com quitosana de baixo peso molecular



6.3 CONCLUSÃO

O objetivo principal deste capítulo foi apontar, no âmbito das aplicações em Biomateriais, as áreas em que a quitosana produzida pode vir a ser utilizada. Logo, optou-se por não se descreverem os materiais e métodos, visto que não foi realizado qualquer tipo de caracterização. Apenas foi explicada a viabilidade de aplicação da quitosana, com base na metodologia já utilizada pelo grupo do CERTBIO.

6.4 REFERÊNCIA DA LITERATURA

ARANAZ, I.; MENGÍBAR, M.; HARRIS, R.; PAÑOS, I.; MIRALLES, B.; ACOSTA, N.; GALED, G. & HERAS Á. Characterization of Chitin and Chitosan. **Chem. Biol.** v. 3, p. 203–230, 2009.

ASSIS, O. B. G. **Avaliação do efeito cicatrizante da quitosana por aplicação tópica em ratos.** São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2007. 16 p. - (Embrapa Instrumentação Agropecuária. Documentos, ISSN 1518-7179; 29).

BAKER, R. **Controlled release of biologically active agents.** New York: **Wiley-Interscience**, 1987, 279p.

BARBANTI, S.H.; ZAVAGLIA, C.A.C.; DUEK, E.A.R. Polímeros bioabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 1, p. 13-21, 2005.

CAVALCANTI, M. **Desenvolvimento e Avaliação de Arcabouços Tridimensionais de Quitosana-Gelatina para Regeneração Tecidual da Pele**, 2013. Dissertação, Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.

CORDAS, Cristina Maria. Biomateriais: utilização e controlo em meios fisiológicos. **Revista Proformar online**, ed.13, p.11, 2006.

DALAPÍCULA S. S.; VIDIGAL JÚNIOR, G. M.; CONZ, M. B. Características físico-químicas dos biomateriais utilizados em enxertias ósseas. Uma revisão crítica. **Implantnews**, v.3, n.5, p. 487-91, 2006.

FIDELES, T. **Filmes reticulados de quitosana para aplicação como Biomaterial**, 2010. Dissertação, Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.

GOY, R. C.; ASSIS, O. B. G.; CAMPANHA-FILHO, S. P. Produção de esferas de quitosana. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. v.33, julho/dezembro, 2004.

HOLANDA, A. **Membranas de quitosana para uso em sistema de liberação controlada de insulina: síntese e caracterização**, 2011. 113f. Tese, Engenharia de Processos, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.

HUEBSCH, N, MOONEY, D, J. Inspiration and application in the evolution of biomaterials. **Nature**, v. 462, n. 72, p. 426–32, 2009.

KAWACHI, E. Y., et al. Biocerâmicas: Tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**. v. 23, n. 4, p. 518-522, 2000.

LARANJEIRA, M.; FÁVERE, V. Quitosana: Biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.

LEE, D.; LIM, H.; CHONG, H.; SHIM, W. Advances in chitosan material and its hybrid derivatives: A Review. **The Open Biomaterials Journal**, v. 1, p.10-20, 2009.

NAIR, L.S.; LAURENCIN, C.T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Prog. Polym. Sci.**, v.32, p. 762–98, 2007,

NAGEM FILHO, H.; CAMPI JÚNIOR, L.; NAGEM, H. D.; FRANCISCONI, P. A. S. Engenharia tecidual dos biomateriais. **Innovations implant journal. Biomaterials and Esthetics**, São Paulo, v.1, n.1, mai., 2006.

PASSOS, L. **Ciência e tecnologia dos materiais**, Faculdades Integradas Einstein de Limeira, São Paulo, 2006 (**Apostila**).

SAMPAIO, G. **Desenvolvimento de arcabouços biodegradáveis para regeneração de tecidos cartilagosos**, 2012. Dissertação, Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.

SCHNEIDER, S.G. **Obtenção e caracterização da liga Ti-13Nb-13Zr para aplicação como biomaterial**, 2001. Tese. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), São Paulo.

SOARES, G. A. Biomateriais. **Fórum de Biotecnologia Biomateriais**. 2005, Rio de Janeiro, Brasil.

SOUZA, M.; ELIAS, D. Fundamentos da circulação extracorpórea. In: **Materiais e Biocompatibilidade**. Rio de Janeiro: Centro Editorial Alfa Rio, capítulo 8, 2006.

YANG X.; YUAN, X.; CAI, D.; WANG, S.; ZONG, L. Low molecular weight chitosan in DNA vaccine delivery via mucosa. **International Journal of Pharmaceutics** v. 375, p.123–132, 2009.

WILLIAMS, D. F. Definition in biomaterials. In: **Progress in biomedical engineering**, Amsterdam Elsevier. cap 4, 1987.

ZHENG, L.; ZHU J. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. **Carbohydr. Polym.** v. 54 p. 527-530, 2003

Capítulo VII

PERSPECTIVAS FUTURAS

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho teve como principal objetivo o aproveitamento de resíduos alimentares da casca de camarão, visando à produção de duas matérias-primas destinadas ao desenvolvimento de materiais: a quitina e a quitosana. Ambas, devido ao seu grau de pureza, permitem sua aplicação em dispositivos médicos.

Com o objetivo concretizado, considera-se que o trabalho acadêmico realizado estabeleceu metodologias processuais que visam ao aproveitamento efetivo dos resíduos de casca de camarão. Portanto, o estudo justifica-se e se faz relevante, tendo em vista a escassez de trabalhos e resultados realizados sobre essa espécie de camarão, a *Litopenaeus vannamei*. O que, por si só, traduz o seu valor, tanto do ponto de vista acadêmico quanto para a área geográfica em questão – o nordeste brasileiro –, que produz este resíduo em grande escala.

Sob essa perspectiva, surgiram ainda diversas ideias que poderão ter continuidade a partir do trabalho já realizado. Assim, considerando a totalidade do resíduo alimentar, somente uma pequena parte é aproveitada, tendo ainda como possibilidades a utilização do componente mineral, componente proteico e os pigmentos como alternativas de aproveitamento e com aplicações comerciais. Para viabilizar seu aproveitamento, pode-se usar o carbonato de cálcio, extraído do componente mineral da casca pós-processo de desmineralização, como cloreto de cálcio, que já é um sal com aplicação comercial, necessitando apenas realizar estudos para a precipitação do mesmo, uma vez que este fica dissolvido no meio ácido.

Partindo desses pressupostos, deverão ainda ser realizados estudos que otimizem o processo de extração das proteínas e pigmentos para que estas moléculas não sejam degradadas, tornando seu aproveitamento ainda mais efetivo do que o realizado no processo atual.

Dentre outras possibilidades, esse estudo visa ao *scale-up* do processo produtivo, e, por consequência, tornar viável a instalação de uma unidade piloto para a produção de quitina e quitosana de grau médico.

Durante o presente trabalho, procuraram-se ainda – embora sem sucesso devido à indisponibilidade dos equipamentos em tempo útil – alternativas para a determinação do grau de desacetilação, nomeadamente através de ensaios termogravimétricos. Considera-se que seria interessante realizar um estudo termogravimétrico comparativo com os resultados de FTIR obtidos.

Dentre os estudos sobre a conformação da quitina, outro fator importante diz respeito à conformação α como a mais difícil no processo de desacetilação. Portanto, considera-se adequada a busca por novas metodologias que visem alterar a conformação α para β , tornando esta alteração como meio facilitador do processo de desacetilação e, conseqüentemente, otimizando um aspecto relevante na globalidade do processo de produção da quitosana.

Finalizando, reconhece-se a grande importância tanto da quitina como da quitosana na obtenção dos valores do peso molecular, assim como o desenvolvimento de metodologias que visem à produção da quitosana com elevado grau de desacetilação em diferentes pesos moleculares, com o objetivo de se obter uma matéria-prima mais aplicável em diversos dispositivos médicos.