



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**  
**INSTITUTO TECNOLÓGICO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE**  
**ALIMENTOS**

**ANDRÉA DA SILVA PINTO**

**Otimização de processos de obtenção de quitina e quitosana do exoesqueleto  
do camarão amazônico (*Macrobrachium amazonicum*, HELLER, 1863)**

Belém – Pará

2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**  
**INSTITUTO TECNOLÓGICO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE**  
**ALIMENTOS**

ANDRÉA DA SILVA PINTO

**Otimização de processos de obtenção de quitina e quitosana do exoesqueleto do camarão amazônico (*Macrobrachium amazonicum*, HELLER, 1863)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, como requisito final para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Evaldo Martins da Silva

Belém – Pará

2014

ANDRÉA DA SILVA PINTO

**Otimização de processos de obtenção de quitina e quitosana do exoesqueleto do camarão amazônico (*Macrobrachium amazonicum*, HELLER, 1863)**

Área de concentração: Ciência e tecnologia de matérias-primas alimentícias da Amazônia e resíduos agroindustriais

Avaliada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Conceito: \_\_\_\_\_ BANCA EXAMINADORA:

\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Evaldo Martins da Silva (PPGCTA/ITEC/UFPA – Orientador)**

\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Heronides Adonias Dantas Filho (GEAAP / PPGQ /UFPA - membro)**

\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Jesus Nazareno Silva de Souza (PPGCTA/ITEC/UFPA – membro)**

\_\_\_\_\_  
**Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>a</sup> Lúcia de Fátima Henrique Lourenço (PPGCTA/ITEC/UFPA – Suplente)**

Belém – Pará

2014

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Edilson (*in memoriam*) e  
Valdemira e meu sobrinho Gabriel.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, pelo simples fato de acreditar que tudo o que sou e tudo o que tenho fazer parte do amor infinito de Deus, agradeço a Ele. Obrigada meu Deus, por me fazer seguir em frente e ter ao meu lado pessoas de bem.

Meus pais Edilson (*in memorian*) e Valdemira, são a minha base! Hoje estou em busca de conhecimento, mas para está aqui, tive e tenho apoio dos dois. Obrigada pelo amor e por sempre acreditarem em mim.

Agradeço aos meus irmãos, Geselly, Edilson e Anderson, pois com muito amor e carinho sempre tive o apoio de todos vocês. Agradeço também pelos sobrinhos que me deram João Gabriel, Maria Clara e Yud, eles alegram os meus dias.

Agradeço também, este momento aos meus familiares, em especial meu tio Valdemir e minha vó Oscarina.

Meus amigos, Silvana, Marcelo e Maely, vocês fazem mais que parte deste momento maravilhoso. Sinto-me feliz em todos os momentos compartilhados com vocês. Cada um em sua particularidade contribuiu fundamentalmente para essa conquista.

Agradeço ao meu orientador Dr. Evaldo Martins, com certeza, não foi apenas um orientador, pois em muitos momentos pude contar com a sua humana compreensão, além da boa amizade construída. Agradeço as críticas construtivas, pois sempre objetivava algo melhor. Obrigada!

Agradeço o apoio que tive nos Laboratórios LAFAME, LAOS, LAPESCA e Lab. de química do pescado/Campus Bragança. Em especial aos colegas de trabalho, Jorge e Patrick.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade oferecida;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida;

**EPÍGRAFE**

*“Para nós os grandes homens não são aqueles que resolveram os problemas, mas aqueles que os descobriram”. (Albert Schweitzer)*

## RESUMO

Os exoesqueletos de crustáceos, como camarão *M. amazonicum* (Heller, 1863) são uma das principais fontes alternativas de obtenção de quitina, precursor da quitosana. Diante das inúmeras dificuldades de se trabalhar padronizadamente com biomaterias, este trabalho teve como principal objetivo a extração de quitina e quitosana através de uma metodologia de planejamento experimental por superfície de resposta, para otimizar as principais etapas de desmineralização, desproteínização e desacetilação,. Para o planejamento das três etapas, as variáveis de resposta foram respectivamente, porcentagem de cinzas remanescentes (%CR), porcentagem de Nitrogênio total (%Ntotais) e porcentagem do grau de desacetilação (%GD). As caracterizações das etapas de Desmineralização, Desproteínização. e Desacetilação, foram analisadas consecutivamente por análise de cinzas, análise elementar e titulação potenciométrica. Após as conclusões das análises de cinzas, tanto no material *in natura* quanto no desmineralizado, foi possível obter, respectivamente  $32,03 \pm 0,05\%$  de (%CR) e  $0,0\%$  de (%CR). Os parâmetros de regressão do modelo de superfície de resposta foram estatisticamente significativos, com valores ( $R^2$ ) igual a 0,89. A superfície de resposta construída para a variável % CR com regiões de iso-repostas indicaram HCl igual 1,2 M e razão 0,08g/ml, isto determina a região ótima no modelo adotado para a otimização da desmineralização. Para os ensaios de desproteínização ressalta-se que, mesmo não havendo significância quanto as variáveis em estudo, o resultado da análise elementar mostrou que em todos os ensaios do planejamento, a extração de proteínas foi realizada com eficiência, mostrando uma média de grau de desproteínização próximo a 100%. Na etapa de desactilação as variáveis também não se mostraram significantes, com % Grau de Desacetilação variando de 18,24 – 57,22. Neste trabalho, pode-se concluir que nem sempre a literatura poderá ser o apoio para eficiente extração de quitina e quitosana, dependendo neste caso, exclusivamente de testes preliminares e adaptações exclusivas para cada espécie em estudo.

**Palavras chave:** quitina, quitosana, *Macrobrachium amazonicum*, otimização.

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>9</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>1.1. OBJETIVOS</b> .....	<b>11</b>
1.1.1. <i>Objetivo geral</i> .....	11
1.1.1. <i>Objetivos Específicos</i> .....	11
<b>2. CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1. QUITINA E QUITOSANA</b> .....	<b>12</b>
<b>2.2. FONTES DE QUITINA E QUITOSANA</b> .....	<b>14</b>
2.2.1. <i>Macrobrachium amazonicum na Região Bragantina</i> .....	15
<b>2.3. ISOLAMENTO DE QUITINA E PREPARAÇÃO DE QUITOSANA</b> .....	<b>17</b>
<b>2.4. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA QUITINA E QUITOSANA</b> .....	<b>20</b>
<b>2.5. PRINCIPAIS APLICAÇÕES</b> .....	<b>22</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>31</b>
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>33</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>36</b>
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>38</b>
<b>2.1. OBTENÇÃO E PREPARO DA MATÉRIA-PRIMA</b> .....	<b>38</b>
<b>2.2. OBTENÇÃO DA QUITINA</b> .....	<b>38</b>
2.2.1. <i>Desmineralização</i> .....	38
2.2.2. <i>Desproteíntização</i> .....	40
2.2.2.1. <i>Análise elementar</i> .....	42
<b>2.3. PROCESSO DE DESACETILAÇÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>2.4. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA QUITOSANA</b> .....	<b>45</b>
2.4.1. <i>Titulação potenciométrica</i> .....	45
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>47</b>
<b>3.2. OTIMIZAÇÃO DA DESMINERALIZAÇÃO</b> .....	<b>47</b>
<b>3.3. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE DESPROTEÍNTIZAÇÃO</b> .....	<b>52</b>
3.3.1. <i>Análise elementar</i> .....	54
<b>3.4. DESACETILAÇÃO DA QUITINA</b> .....	<b>56</b>
<b>4. CONCLUSÃO</b> .....	<b>59</b>

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....66**

## LISTA DE FIGURAS

## CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL

<b>Figura 1:</b> Estrutura molecular da quitina.....	12
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática das estruturas polimórficas de quitina.....	13
<b>Figura 3:</b> Estrutura molecular da quitosana.....	14
<b>Figura 4:</b> Representação esquemática do dorsal do camarão.....	15
<b>Figura 5:</b> Camarão <i>M. amazonicum</i> em seu estágio adulto e juvenil.....	16
<b>Figura 6:</b> Isolamento de quitina e preparação de quitosana.....	19
<b>Figura 7:</b> Apresentação esquemática da reação de desacetilação da quitina por via alcalina.....	19
<b>Figura 8:</b> Ação conservante de quitosana em maçãs.....	23

**LISTA DE ABREVIATURAS**

%GDP – Grau de desproteïnização

%GD – Grau de desacetilação

%CR – Resíduo de cinzar

R – Razão

C – Concentração

T – Temperatura

t – Tempo

M – Molar

## CAPÍTULO 1

---

# INTRODUÇÃO GERAL

## 1. INTRODUÇÃO

Os cefalotórax dos crustáceos em sua maioria são constituídos aproximadamente de 25 - 40% de proteínas; 40 – 55% de carbonato de cálcio, e 15 a 20% de quitina (PACHECO et al., 2009; AGBOH et al., 1996). O importante a ser observado é que a quitina, um biopolímero de grande valor tecnológico, constitui em aproximadamente um terço do total desses rejeitos. A quitina é um polissacarídeo versátil e precursor da quitosana que tem sido indicada como um polímero de potencial aplicação (ASSIS; BRITO, 2008).

Na região bragantina, assim como em outras regiões brasileiras o camarão do gênero *Macrobrachium* são utilizados na aquicultura e também explorados pela pesca comercial, entretanto ressalta-se que o *M. amazonicum* é o único camarão explorado comercialmente nos estados do Pará e Amapá, pela pesca artesanal (MACIEL; VALENTI, 2009).

As cadeias produtivas das principais fontes utilizadas de quitina (camarão e caranguejo) geram resíduos que podem ser responsáveis por até 50% do volume total da matéria prima (ISLAM et al., 2004). Esses resíduos são gerados principalmente em estabelecimentos comerciais, praias e na manufatura das indústrias, em sua maioria, são enterrados ou jogados clandestinamente em rios ou no mar, ocasionando graves problemas de poluição além de odores desagradáveis (ARAUJO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2002).

Uma das formas de aproveitamento dos resíduos gerados no beneficiamento de camarões é a produção de quitina e consecutivamente a transformação da mesma em quitosana, por meio de reações químicas. Os autores Abdou et al. (2008); Minagawa et al. (2007); Yones et al. (2012); Weska et al. (2008) citam em seus trabalhos, condições de reações diferenciadas, mesmo em casos de mesma espécie, o que prever a necessidade de uma otimização no processo de obtenção tanto da quitina quanto da quitosana, pois o grau de pureza de cada uma determinará a sua aplicação tecnológica

## **1.1. Objetivos**

### **1.1.1. Objetivo geral**

Otimizar as etapas de desmineralização, desproteinização e desacetilação para a obtenção de quitina e quitosana a partir da espécie *Macrobrachium amazonicum*.

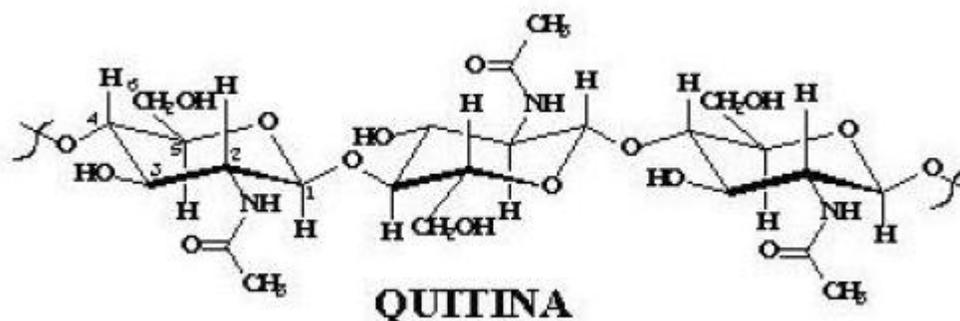
#### **1.1.1. Objetivos Específicos**

- Otimizar o processo de desmineralização, visando retirar o máximo de minerais;
- Otimizar o processo de desproteinização, visando a remoção total de proteínas;
- Otimizar o processo de desacetilação para a obtenção de quitosana;

## 2. CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 2.1. QUITINA E QUITOSANA

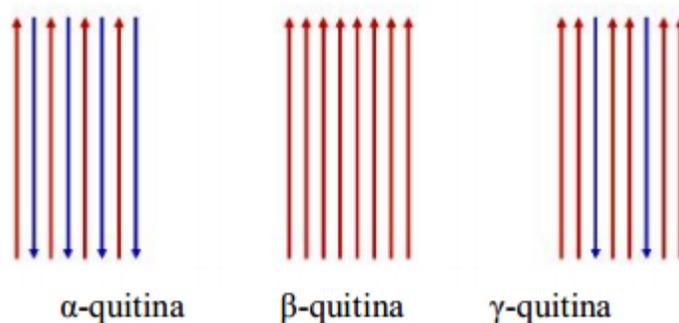
Quitina é um polímero linear com unidades repetitivas de 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose e 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose unidos por ligação glicosídica do tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), como mostra a Figura 1, definindo-se assim os terminais redutor e não-redutor das cadeias poliméricas, os quais correspondem às extremidades que contêm grupo hidroxila livre do anel de glicopiranosose (ABDOU et al., 2008; CAMPANA 2007; ARANAZ et al., 2009).



**Figura 1** Estrutura molecular da quitina.

Fonte: ARANAZ et al., 2009

Na natureza, a quitina pode ser encontrada em três diferentes formas de arranjo das cadeias poliméricas:  $\alpha$  (alfa),  $\beta$  (beta) e  $\gamma$  (gama), conforme mostra a Figura 2, sendo esta última de difícil ocorrência (ARANAZ et al., 2009; LAVALL et al., 2006). Na  $\alpha$ -quitina, as cadeias poliméricas estão dispostas de forma antiparalela, o que favorece o estabelecimento de numerosas ligações hidrogênio inter e intramoleculares e também inter e intrafolhas, resultando em um empacotamento denso. Todos os grupos hidroxilas, no estado cristalino, estabelecem ligações hidrogênio, e as formas entre cadeias de diferentes folhas são as responsáveis pela insolubilidade da  $\alpha$ -quitina na maioria dos solventes (CAMPANA, 2007).



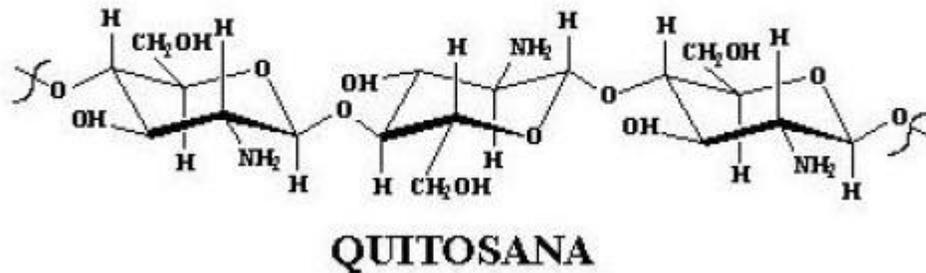
**Figura 2:** Representação esquemática das estruturas polimórficas de quitina, sendo que as setas representam as cadeias poliméricas no sentido do terminal não-redutor para o redutor.

Fonte: ARANAZ et al., 2009.

A estrutura da  $\alpha$ -quitina tem sido investigada de forma mais ampla do que as formas  $\beta$  e  $\gamma$ , por ser a forma polimórfica mais comum. Poucos estudos foram realizados em  $\gamma$ -quitina. Alguns pesquisadores já relataram a possibilidade de a  $\gamma$ -quitina ser uma versão distorcida da  $\alpha$ -quitina e  $\beta$ -quitina em vez de ser uma terceira forma (ARANAZ et al., 2009; LAVALL et al., 2006).

A quitina em pó com estrutura cristalina ou amorfa tem como característica ser insolúvel em água pura, solvente orgânico e em alguns ácidos e bases diluídas. Em ácidos minerais concentrados ocorre degradação da cadeia polimérica (CAMPANA et al., 2007; KUMAR, 2000).

A quitosana é um polissacarídeo linear de  $\beta$ -(1-4)-acetamido-2-desoxi- glicopiranoose, como mostra a Figura 3, obtido por meio enzimático ou por desacetilação parcial da quitina. Fatores como fontes naturais de matéria-prima e métodos de extração irão influenciar diretamente no grau de desacetilação, distribuição de massa molar e conteúdo de impurezas (ARANAZ et al., 2009; DAMIAN et al., 2005). A massa molar média da quitina nativa é geralmente maior do que  $10^6$  Daltons, enquanto a quitosana comercial tem uma massa molar média na faixa de  $1,0 \times 10^5$ – $1,2 \times 10^6$  Daltons (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009).



**Figura 3:** Estrutura molecular da quitosana.

Fonte: (ARANAZ et al., 2009).

A cristalinidade da quitina e quitosana, conforme avaliado através de estudos de difração de raios-X, depende do grau de acetilação e do processo pelo qual o polissacarídeo foi obtido. Já a estrutura espacial está relacionada à forma na qual a quitosana se encontra no estado sólido, ou seja, depende de a quitosana estar na forma hidratada, anidra, como complexos ou sais de quitosana (SANEL; McCLURE, 2004).

## 2.2. FONTES DE QUITINA E QUITOSANA

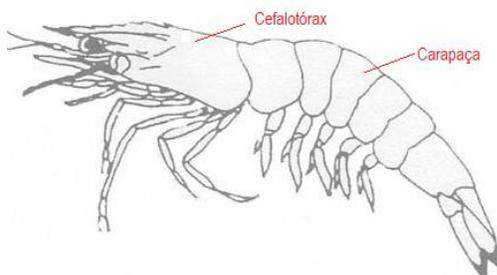
A quitina encontra-se na matriz da estrutura esquelética de invertebrados, como *Arthropoda*, *Annelida*, *Mollusca* e *Coelenterata*, em algas *Diatomáceas*, estando presente também nas paredes celulares de alguns fungos, como *Ascomycetos*, *Zigomycetes*, *Eusomycetes* e *Deuteromycetos* (CAMPANA et al., 2007). Sua extração em escala industrial geralmente se dá através do exoesqueleto de caranguejo e camarão (ADBOU et al., 2008). A Tabela 1 mostra alguns organismos e seus respectivos conteúdos em porcentagem de quitina em relação ao exoesqueleto.

**Tabela 1:** Principais fontes de quitina

Organismos	Quitina do exoesqueleto (%)
<b>Crustáceos</b>	
Caranguejo	14,00
Lagosta	69,80
Camarão ( <i>M. rosebergii</i> )	25,30
<b>Inseto</b>	
Borboleta	64,00
Mosca	54,80
<b>Fungos</b>	
<i>Mucos rouxil</i>	44,50
<i>Aspergillus Níger</i>	42,00

Fonte: CAMPANA et al., 2007

A figura 4 mostra a representação esquemática do cefalotórax e carapaça de camarão. (CAMPANA et al., 2007; LERTSUTTHIWONG et al., 2002).



**Figura 4:** Representação esquemática do cefalotórax e carapaça de camarão.

Fonte: ANTONITO, 2007

A quitosana existe naturalmente apenas em algumas espécies de fungos, embora em pequenas quantidades. Comercialmente, a quitosana é produzida a partir da desacetilação da quitina em soluções concentradas alcalinas, que é a principal via de obtenção. O grupo acetamida sofre hidrólise, formando a quitosana (GARCIA et al., 2008; AGBOH; QIN, 1996).

### **2.2.1. *Macrobrachium amazonicum* na Região Bragantina**

A Planície Costeira Bragantina, situada no nordeste paraense, abrange aproximadamente 40 km de linha de costa, possuindo ecossistemas de manguezal, estuário,

pântano salino, dunas costeiras, lagoa costeira e praias (FREIRE; SILVA, 2008). Entre estes ambientes, o manguezal é uma verdadeira floresta de mangue, com árvores que podem chegar a 30 metros de altura e um metro de diâmetro, são o refúgio de diversas espécies de crustáceos, peixes, moluscos e aves marinhas, mas ainda permanecem desconhecidas pela maioria dos brasileiros (SOUZA-FILHO et al., 2006).

Os camarões do gênero *Macrobrachium* são caracterizados por uma ampla distribuição mundial nas águas doces e salobras. Numerosas espécies apresentam um grande interesse comercial, tanto pela aquicultura quanto pela exploração de estoques naturais. Abundante nas águas brancas, ricas em sedimentos e sais dissolvidos, tendo pouca ocorrência nas águas pretas, ácidas e pobres em nutrientes. A (Figura 4) retrata a característica morfológica do camarão, visualizando seu tamanho médio alcançado na vida adulta (COLLART; MORREIRA, 1993)



**Figura 5:** Fotografia do camarão *Macrobrachium amazonicum* em seu estágio adulto e juvenil

**Fonte:** Evaldo Silva, 2012.

O *M. amazonicum*, palaemonidae, apresenta ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde o Amapá até o Paraná. Tem importância ecológica e econômica, sendo largamente explorado pela pesca artesanal na região Nordeste e nos estados do Pará e Amapá. Além disso, é a espécie nativa do Brasil com maior potencial para a aquicultura, sendo que cultivos em escala piloto vêm sendo realizado no Pará (MACIEL; VALENTI, 2009).

O *Macrobrachium amazonicum* é um camarão pequeno, que pode alcançar até 16 cm e 30 g (VALENTI et al., 2003), e sua carne apresenta textura mais firme e sabor mais acentuado em relação à carne de *Macrobrachium rosenbergii* e, por isso, é mais bem aceita nos mercados

consumidores. É amplamente consumido pelas populações de baixa, média e alta renda na região amazônica e população rural da região Nordeste.

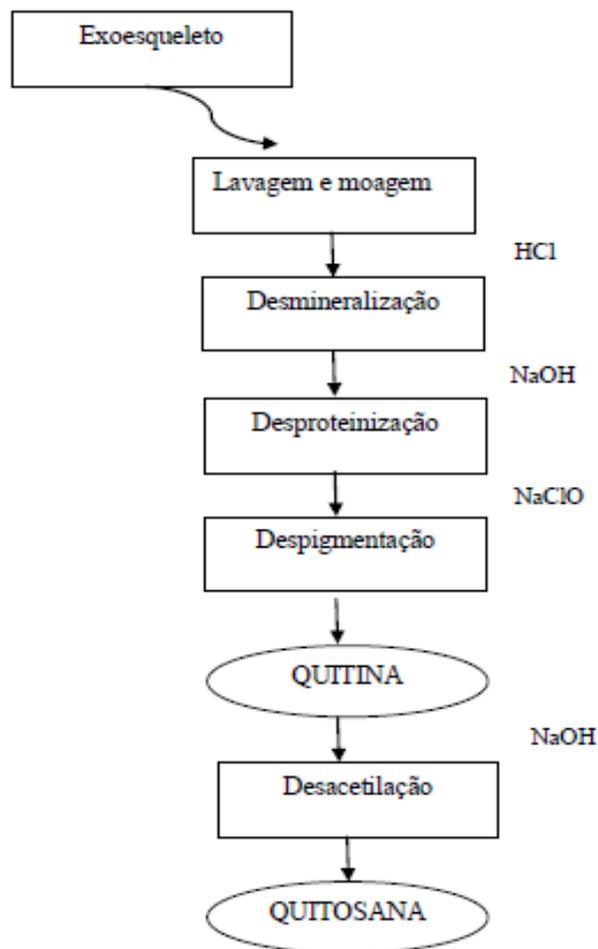
A produção mundial de camarões de água doce do gênero *Macrobrachium* é um dos setores da aqüicultura que mais cresce no mundo, tendo aumentado mais de 1300% na última década. No início deste milênio, a produção mundial superou 300.000 toneladas, movimentando mais de US\$ 1 bilhão. Há muitos dados informados como crustáceos de água doce e camarões em geral que não são computados na produção de *Macrobrachium* apresentada pela FAO (FREIRE; SILVA, 2008).

Dados estatísticos da Associação Brasileira de Criadores de Camarão demonstram que a produção brasileira de camarões cresceu entre os anos 1998 a 2005; e sua produtividade subiu, entre esses anos, de 7 mil para 65 mil toneladas por ano. Esta elevada produção de camarões tem gerado grandes quantidades de resíduos sólidos, tendo em vista que cabeça e casca do animal correspondem a aproximadamente 40% do seu peso total, culminando num forte impacto ambiental (ASSIS et al., 2008).

### 2.3. ISOLAMENTO DE QUITINA E PREPARAÇÃO DE QUITOSANA

As etapas do processo de obtenção da quitina através da carapaça e cefalotórax de crustáceos, como o camarão são: desmineralização, desproteínização, desodorização/despigmentação e secagem. A desmineralização consiste na extração dos resíduos minerais, principalmente o  $\text{CaCO}_3$  com HCl; a desproteínização consiste na extração de proteínas com álcali; e a desodorização/despigmentação consiste na agitação da matéria prima desproteínizada em presença de hipoclorito de sódio para a retirada da astaxantina. Entre cada uma das etapas de obtenção, são feitas sucessivas lavagens para a retirada dos reagentes (NO & MEYERS, 1997).

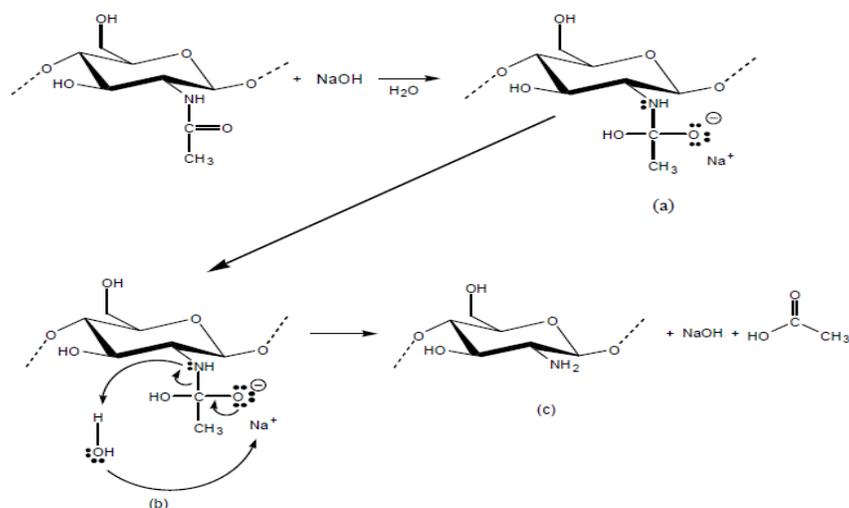
As matérias primas empregadas em processos de extração de quitina e quitosana, necessitam de prévio tratamento, para que assim os resíduos (ovas, carnes, sujidades...) não sejam mais um interferente na qualidade do produto final. A (Figura 6) abaixo, proposta por Sagheer et al. (2002), é um breve esquema do isolamento de quitina e preparação de quitosana.



**Figura 6:** Isolamento de quitina e preparação de quitosana

Fonte: Sagheer et al. (2002)

A quitosana é obtida por n-desacetilação de quitina, pré-purificada, como mostra a (Figura 7). Embora a hidrólise alcalina dos grupos acetoamido presentes na quitina, que leva a obtenção de quitosana, seja uma reação relativamente simples, esta não ocorre de maneira homogênea e completa ao longo de toda a cadeia, (CAMPANA-FILHO et al., 2007). O objetivo da desacetilação alcalina é romper as ligações de N-acetil do biopolímero para formar as unidades de D-glicosamina que contém os grupos amínicos livres, principal fator das aplicações tecnológicas (LERTSUTTHIWONG et al., 2002).



**Figura 7:** Mecanismo reacional para a produção de quitosana a partir de quitina por via alcalina.

Fonte: HENNING, 2009

A quitosana não apresenta uma entidade química uniforme, mas um grupo de biopolímeros parcialmente desacetilados, dos quais, os que apresentam grau de desacetilação superior a 50%, são considerados quitosana, sendo que as aplicações e características dependem do grau de desacetilação e do tamanho da cadeia do biopolímero (CRAVEIRO et al., 1999).

Durante a produção, condições severas como altas temperaturas, oxigênio dissolvido e pressão, podem conduzir à degradação da quitosana, desconfigurando a estrutura molecular e, por conseguinte, o peso molecular (DAMIAN et al., 2005). Geralmente a quitosana comercial contém aproximadamente (75-95)% de unidades D- glicosamina e (5-25)% e unidades de n-acetil-D- glicosaminas (HENNING, 2009).

A quitosana é insolúvel em água pura, em solventes orgânicos e em bases, mas é solúvel na maioria das soluções de ácidos orgânicos com pH inferior a 6 (seis). O ácido acético e o fórmico são os mais usados para a solubilização da quitosana. Alguns ácidos inorgânicos diluídos, tais como: ácido nítrico, clorídrico, perclórico e fosfórico, também podem ser usados para preparar uma dispersão da quitosana, mas somente após prolongada agitação e aquecimento (DAMIAN et al., 2005; SANTOS et al., 2005).

A solubilidade da quitosana está relacionada com a quantidade de grupos amino protonados ( $-\text{NH}_2^+$ ) na cadeia polimérica. Quanto maior a quantidade destes grupos, maior a repulsão eletrostática entre as cadeias e também maior a solvatação em água. O grau de protonação pode ser determinado pela variação da concentração de quitosana. Para uma dada concentração de ácido, o grau de protonação depende do  $pK_a$  do ácido usado para solubilizar a quitosana (SANTOS; CAMPANA, 2003; AZEVEDO et al., 2007).

As elevadas temperaturas podem ocasionar várias mudanças físico-químicas, como a formação de gases, líquidos e mudanças de coloração. A degradação térmica é uma reação que envolve a ruptura das ligações das cadeias principais e secundárias. A habilidade do polímero em resistir à decomposição química causada pelo aquecimento a altas temperaturas é chamada de estabilidade térmica. A estabilidade térmica é geralmente caracterizada pela temperatura na qual a decomposição do polímero se torna perceptível pela formação de produtos e cinética do processo. Um dos fatores determinantes da estabilidade térmica do polímero é a energia das ligações da cadeia principal (LIM; WAM, 1995).

A ligação C-C é uma das mais resistentes à degradação térmica. A presença de átomos de hidrogênio na molécula do polímero diminui a energia entre a ligação C-C, motivo pelo qual os hidrocarbonetos com elevada massa molecular e seus derivados possuem comparativamente baixa estabilidade sendo facilmente degradados com o aquecimento a temperaturas mais elevadas. Quitina e quitosana, quando aquecidas a temperaturas mais elevadas sofrem degradação. A estabilidade térmica da quitina aumenta com o grau de acetilação. Quando a forma acetilada prevalece, o efeito exotérmico aparece em  $320^\circ\text{C}$ , enquanto que, na forma desacetilada o efeito ocorre a  $280^\circ\text{C}$  (DAMIAN et al., 2005).

#### 2.4. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA QUITINA E QUITOSANA

O grau de desacetilação (GD) tem um grande efeito nas propriedades físico-químicas da quitosana e por tanto, em suas possíveis aplicações (ARANAZ, et al., 2009). Os principais fatores que afetam a eficiência da desacetilação e as características das quitosanas obtidas são: **a)** temperatura e tempo de reação; **b)** concentração da solução de álcali e adição de diluente (alcoóis de cadeia curta e cetonas são empregados); **c)** razão quitina/álcali; **d)** tamanho das partículas de

quitina; e) pressão atmosférica da reação e presença de agentes que evitem a despolimerização. A caracterização é de essencial importância, para a indicação de aplicações tecnológicas (DASH et al., 2011; AZEVEDO et al., 2007; CAMPANA et al., 2001).

As principais características do conjunto de polímeros constituídos por quitina e quitosana são o grau médio de acetilação, o grau médio de polimerização, também expresso em função das massas molares médias dos polímeros, a polidispersibilidade e a distribuição de unidades acetiladas e desacetiladas ao longo das cadeias poliméricas (ASSIS et al., 2008).

Análises como, pureza (teor de cinzas), umidade, conteúdo de metais pesados, endotoxinas e proteínas são obrigatórias em quitosana quando essa for aplicada a alimentos de consumo humano e/ou aplicações médicas. As análises de caracterizações respondem a qualidade da transformação de quitina em quitosana. A Tabela 2 descreve as principais características que uma quitosana poderá apresentar dependendo do seu grau de desacetilação (ARANAZ et al., 2009; TORRES et al., 2005).

As quitosanas comercializadas apresentam características diferentes do ponto de vista físico-químico, o que dificulta seu pleno uso na indústria alimentícia. As quitosanas disponíveis, principalmente no Brasil, são de procedências diversas e apresentam diferentes graus de pureza e densidade molar, além de não seguirem industrialmente um procedimento comum de desacetilação, o que torna os materiais comerciais consideravelmente diferentes entre si. Esse fato dificulta o estabelecimento de aplicações tecnológicas (ASSIS; LEONI, 2003).

**Tabela 2:** Relação entre os parâmetros estruturais e propriedades da quitosana.

Propriedade	Característica Estrutural *
Solubilidade	↑GD*
Cristalinidade	↓GD
Biodegradabilidade	↓GD ↓ Peso molecular

Viscosidade	↑GD
Biocompatibilidade	↑GD

---

\* ↑ - Diretamente proporcional a direção; ↓ - Inversamente proporcional a direção

\* GD: Grau de desacetilação

**Fonte:** DASH, 2011

## 2.5. PRINCIPAIS APLICAÇÕES

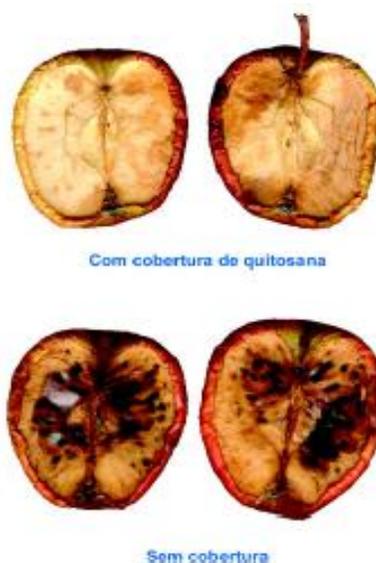
Atualmente, a quitosana tem recebido atenção considerável para suas aplicações comerciais nos alimentos, biomédica e indústria química. A quitosana contém três tipos de grupos funcionais reativos, um amino/acetamido e os grupos primário e secundário de hidroxila nos C-2, C-3 e C-6. Essas características físico-químicas estão relacionadas às suas propriedades, como a floculação, quelação e biológica. A variedade de aplicações é ainda maior quando são incluídos os vários derivados de quitosana obtidos por meio de reações químicas em que são inseridos diferentes grupos funcionais às suas moléculas, conferindo diferentes propriedades e aplicações (XIA et al., 2011; DAMIAN, 2005; ZINANOVIC et al., 2005).

As possibilidades de aplicações são ainda enriquecidas pelo fato de a quitosana poder ser preparada em diferentes formas, tais como soluções de viscosidade controlada, géis, filmes e membranas, microesferas e nanopartículas (DASH et al., 2011; FAI et al., 2008). Isso leva a aplicações importantes como a recuperação de íons de metais pesados no tratamento de efluentes; cosméticos; aplicações biotecnológicas e biomédicas (COCOLETZI, 2009; DOTTO, 2008).

Quando relacionado à aplicação em alimentos, a quitosana pode ser empregada na obtenção de coberturas ideais para frutos frescos em virtudes de suas excelentes propriedades bioquímicas de barreira aos gases e de formação de filmes, aliada à sua ação antimicrobiana (CAMILE et al., 2007). Devido à sua capacidade de formar revestimentos semipermeáveis, a quitosana pode modificar a atmosfera interna minimizando a senescência dos frutos e prolongando seu armazenamento (FAI et al., 2008).

A ação filmogenicidade, bactericida e fungicida deste polímero está relacionada à interação entre quitosana e importantes organelas das estruturas membranares, comprometendo

funções como a respiração destes microrganismos (OLIVEIRA; NUNES, 2011; ZINANOVIC et al., 2005; KIM et al., 2003). Essas características importantes dos géis de quitosana levam ao uso dos mesmos como conservante natural em alimentos como mostra a Figura 8.



**Figura 8:** Ação conservante de quitosana em maçãs

Fonte: ASSIS; LEONE, (2003).

A quitosana vem sendo utilizada na indústria de alimentos nos Estados Unidos, Alemanha e Japão, sendo reportado neste último, como agente conservante em macarrão, molho de soja, sardinha, entre outros; contudo, dados quanto às condições de processamento/formulação, todavia são escassas (FAI et al., 2008).

A indústria de alimentos vem cada vez mais se interessando por agentes coagulantes de origem natural e suas diversas aplicações, como na clarificação de bebidas. A quitosana apresenta afinidade por compostos fenólicos, como catequina, ácidos cinâmicos e seus derivados. Estes constituintes são responsáveis pela alteração de cor em vinhos brancos, devido, principalmente, a fenômenos oxidativos (SHAHIDI et al., 1999).

A preocupação com a segurança alimentar tem levantado questionamento sobre a agricultura moderna, aumentando a demanda pela produção orgânica, a qual preserva os agroecossistemas através do uso adequado dos recursos naturais, como o uso de polímeros naturais que apresentam várias vantagens como ser de fácil obtenção, ser biocompatível, biodegradável dando consequência a obtenção de alimentos de maior qualidade e isso têm sido de vital importância para os avanços das ciências (AZEVEDO et al., 2007; MAIA et al., 2010).

Atualmente utilizada como revestimento protetor e biofungicida para pulverização em frutas, vegetais e sementes contra a deterioração por microrganismos, para estimular o sistema imune da planta, proteger a planta contra o ataque de patógenos e favorecer o seu crescimento e consequentemente aumentar a produção vegetal Nos Estados Unidos, já se encontram registrados vários pesticidas à base de quitosana. (RAMOS, et al., 2011).

Duas das propriedades farmacológicas da quitosana que vêm sendo bastante explorada pela comunidade científica mundial são a sua capacidade de auxiliar na redução de peso corporal através da captura de gordura ingerida e a sua capacidade de redução dos níveis de colesterol LDL, sem que a mesma afete significativamente os teores de colesterol HDL e outros nutrientes essenciais (CHEREM; BRAMOSRKI, 2008).

Pela excelente capacidade de floculação, a quitosana com seus grupos  $\text{NH}_2^+$  podem interagir com colóides carregados negativamente. Esta é capaz de aderir facilmente a polímeros naturais como cabelo e pele, constituídos por proteínas e mucopolissacarídeos com cargas negativas. Assim, a capacidade bioadesiva da quitosana é uma das várias características que a torna atraente para a utilização em cosméticos, como cremes e loções (KUMAR, 2000).

Biomateriais baseados em quitosana constituem uma classe emergente com aplicação em vários campos biomédicos, tais como, regeneração tecidual, particularmente para cartilagem; dispositivos de liberação controlada de fármacos e sistemas de imobilização de células em gel (DASH et al., 2011; LARANJEIRA; FÁVERE, 2009). Tem sido tradicionalmente usada nos países orientais para o tratamento de queimaduras e cicatrização de feridas, incluem também inibição de células tumorais, efeito antifúngico, atividade antiácida e antiúlcera, ação hemostática e hipocolesterolêmica (DAMIAN et al., 2005).

De acordo com Assis et al., (2007), propriedades como a biocompatibilidade e biodegradabilidade da quitosana permitem a este polímero atuar como material substituto ósseo que, ao longo do tempo, vai sendo substituído por osso natural e como revestimento curativo ou como suporte para crescimento de células e recuperação de tecido animal. Polímeros de quitosana são constituídos por arranjos paralelos de pontes de hidrogênio que conferem melhores propriedades mecânicas, com alta resistência a cargas, bem como estabilidade ao enxerto (SPINNETO et al., 2008).

Devido a versatilidade, a quitosana tem também sido utilizada para imobilizar, não só enzimas, mas também células, principalmente pelo aprisionamento e confinamento de membranas (ARANAZ et al., 2009). A imobilização de enzimas em quitosana para preparação de biocatalisadores é de grande interesse, pois pode ser empregados na biotransformação de proteínas, modificação de óleos e gorduras e materiais lignocelulósicos, remoção de contaminantes em águas residuárias, síntese de compostos de alto valor agregado empregados nas indústrias farmacêutica e alimentícia e geração de energia, purificação de enzimas, preparação de sofisticados biossensores para medições *in situ* em águas residuárias e quantificação de metabólitos produzidos pelo organismo humano no controle de enfermidades (MENDES et al., 2011).

Estudos na área ambiental envolvendo quitina e quitosana tem mostrado que suas principais aplicações estão associadas aos sistemas de tratamento de água, efluentes de indústrias alimentícias e na recuperação de proteínas. Os resíduos secos resultantes da precipitação dos efluentes e da quitosana, por exemplo, podem conter 34-72% de proteína e 36-58% de gorduras (BARROS et al., 2006; SHAHIDI et al., 1999).

Outras aplicações da quitosana estão associadas a remoção de metais pesados, ácidos e corantes em sistema de tratamento de efluente de indústrias têxteis, remoção de  $Pb^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Al^{3+}$  e  $Fe^{3+}$  de águas naturais e efluentes industriais (PAULINO, 2008).

## Referências Bibliográficas

- ABDOU, E. S.; NAGY, K. S. A.; ELSABEE, M. Z.; Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. **Bioresource Technology**. v. 99, p. 1359–1367, 2008.
- AGBOH, O. C.; QIN, Y. Chitin and Chitosan Fibers. **Polymers for Advanced Technologies**. v 8, p. 355–365, 1996.
- AGULLÁ, E.; RODRIGUEZ, M. S.; RAMOS, V., ALBERTENGO, L.. Present and Future Role of Chitin and Chitosan in Food. **Macromolecular Bioscience**. v.3, p. 521–530, 2003.
- ANTONINO, N. A.; **Otimização do Processo de Obtenção de Quitina e Quitosana de Exoesqueletos de Camarões Oriundos da Indústria Pesqueira**. Paraibana. João Pessoa. Dissertação (Mestrado). Departamento de Química - Universidade Federal da Paraíba, 2007.
- ARANAZ, I.; MENGÍBAR, M.; HARRIS R.; PAÑOS, I.; MIRALLES, B.; ACOSTA, N.; GALED, G. and HERAS, Á. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. **Current Chemical Biology**, v. 3, n. 2, 2009.
- ARAÚJO F. J. F. de; AQUINO, M. D. de; AQUINO, B. F. de; BEZERRA F. M. L.; CHAGAS NETO, F.; **Aplicação do Composto Orgânico Produzido a partir de Caranguejo Uçá *Ucides Cordatus Cordatus* no Cultivo de Feijão Caupi *Vigna unguiculata* (L.) walp.** Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal, v. 6, n. 3, p. 015-035, 2009.
- ASSIS, O. B. G.; BRITTO, D. Processo básico de extração de quitinas e produção de quitosana a partir de resíduos da carcinicultura **Embrapa Instrumentação Agropecuária** Pelotas, v.14, n.1, p.91-100, 2008.
- ASSIS, O. B. G.; LEONI, A. M.; NOVAES, A P. Avaliação do efeito cicatrizante da quitosana por aplicação tópica em ratos. **Embrapa Instrumentação Agropecuária**, documentos p. 1518-7179, 29, 2007.

- ASSIS, O. B. G. Filmes comestíveis de quitosana. **Revista Biotecnologia e Desenvolvimento** edição nº 30, 2003.
- AZEVEDO V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; FOOK, M. V. L.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campinas- SP. v. 2, n.3, p.27-34, 2007.
- BARROS, F. C. F.; CAVALCANTE, R. M.; CARVALHO, T. V.; DIAS, F. S.; QUEIROZ, D. C.; VASCONCELLOS L. C. G. e NASCIMENTO, R. F. Produção e Caracterização de Esfera de Quitosana Modificada Quimicamente. **Revista Iberoamericana de Polímero**. v. 7, n. 4, 2006.
- CAMILI E. C.; BENATO, E. A.; PASCHOLATI, S. F.; CIA, P. Avaliação de quitosana, aplicada em pós-colheita, na proteção de uva 'Itália' contra *Botrytis cinérea*. **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v. 33, n. 3, p. 215-221, 2007.
- CAMPANA-FILHO S. P.; BRITTO, D. de, CURTI E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R. e LAVALL, R. L. Extração, Estruturas e Propriedades de  $\alpha$ - e  $\beta$ -Quitina. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 644-650, 2007.
- CAMPANA-FILHO, S. P.; SIGNINI, R. Efeito de Aditivos na Desacetilação de Quitina. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, n 4, p. 169-173, 2001.
- COCOLETZI, H. H.; ALMANZA E. Á.; AGUSTIN, O. F.; NAVA, E.L.V.; CASSELLIS, E. R., Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón **Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales**. v. 22, n. 3, p. 57-60, 2009.
- CHEREM, A. R.; BRAMOSRKI, A. Excreção de gordura fecal de ratos (*Rattus norvegicus*, *Wistar*), submetidos a dietas hiperlipídicas e hipercolesterolêmicas suplementadas com quitosana. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 44, n. 4, 2008.

- CRAVEIRO, A. A.; CRAVEIRO, A. C.; QUEIROZ, D. C. Quitosana: a fibra do futuro. **Parque de desenvolvimento Tecnológico – PADETEC**, p. 124, 1999.
- DASHA, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITEB, A. R. M.; CHIELLINI E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical Applications. **Progress in Polymer Science** v. 36, p. 981–1014, 2011.
- DAMIAN, C.; BEIRÃO L. H.; FRANCISCO, SANTO, A.; M. L. P. E.; TEIXEIRA, E.; Quitosana: Um Amino Polissacarídeo com Características Funcionais. **Alimento e Nutrição**. v. 16, n. 2, p. 195-205, 2005.
- DOTTO, G. L.; GREVINELI, A. C.; OLIVEIRA, A.; PONS, G.; PINTO, L. A. A. Uso de Quitosana como Filme Microbiológico para o Aumento da Vida Útil de Mamão Papaia. **XVII Congresso de Iniciação Científica**. X Encontro de Pós – Graduação 2008.
- FAI, A. E. C; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. **Revista iberoamericana de polímeros**. v 9, n. 5, 2008.
- FERNANDES, S. C. M.; FREIRE, C S. R; SILVESTRE, A. J. D.; PASCOAL NETO, C; GANDINI, A.; Novel materials based on chitosan and cellulose. **Society of Chemical Industry**. v. 60, p. 875–882, 2010.
- FREIRE, J. L.; SILVA, B. B. da; ASPECTOS SÓCIO-AMBIENTAIS DAS PESCARIAS DE CAMARÕES DULCÍOLAS (*Macrobrachium amazonicum* HELLER, 1862 E *Macrobrachium rosenbergii* DE MAN, 1879) (*decapoda, palaemonidae*) na região bragantina - PARÁ – BRASIL. **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**, v. 21, p. 51-62, 2008.
- GARCIA R. B.; SILVA, D. L. P da; COSTA, M.; RAFFIN, F. N.; RUIZ, N. M. da S. Avaliação de Géis Obtidos a partir da Acetilação da Quitosana em meio Heterogêneo. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 486-492, 2008.

- HENNIG, E. L. Utilização de quitosana obtida de resíduos de camarão para avaliar a capacidade de adsorção de íons  $\text{Fe}^{+3}$ . **Dissertação de Mestrado**. Rio Grande-RS, 2009.
- ISLAM Md. S., SALEHA, K, MASARU, T. Waste loading in shrimp and fish processing effluents: potential. Source of hazards to the coastal and nearshore environments. **Marine Pollution Bulletin**. v. 49, p. 103–110, 2004.
- KHOR, E. Chitin: a biomaterial in waiting **Current Opinion in Solid State and Materials Science**. v. 6, p. 313–317, 2002.
- KIML M.; SON IN-SOOK. Evaluation of microbiological, physicochemical and sensory qualities of Chitosan tofu during storage. **Journal of Food Quality**. v. 27, p. 27-40, 2004.
- KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers**. v. 46, p.1 –27, 2000.
- LARANJEIRA, M. C. M. e FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**. v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.
- LAVALL, R. L; ASSIS, O. B.G; CAMPANA-FILHO, S. P..  $\beta$ -Chitin from the pens of *Loligo* sp.: Extraction and characterization. **Bioresource Technology**. v. 8, p. 2465–2472, 2007.
- LERTSUTTHIWONG, P; HOW, N C.; CHANDRKRACHANG, S.; STEVENS, W. F. Effect of Chemical Treatment on the Characteristics of Shrimp Chitosan. **Journal of Metals, Materials and Minerals**. v. 12 n. 1 p. 11-18, 2002.
- MACIEL, C. R; VATENTI, W. C. Biology, Fisheries, and Aquaculture of the Amazon River Prawn *Macrobrachium amazonicum*: **A Review**. *Nauplius*. v. 17, n. 2, p. 61-79, 2009
- MAIA, A. J.; BOTELHO, R. V.; FARIA, C. M. D. R.; LEITE, C. D. Ação de quitosana sobre o desenvolvimento de *Plasmopara viticola* e *Elsinoe ampelina*, in vitro e em videiras cv. Isabel. **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v. 36, n. 3, p. 203-209, 2010.

- MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C. de; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. de L. C.. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.
- MINAGAWA, T., OKAMURA, Y.; SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S.; OKAMOTO, Y. Effects of molecular weight and deacetylation degree of chitin/chitosan on wound healing. **Carbohydrate Polymers**. v 67, p. 640–644, (2007)
- NO, H. K.; LEE, K. S.; MEYERS, S. P. Correlation Between Physicochemical Characteristics and Binding Capacities of Chitosan Products. **Journal of food Science**. v. 65, n. 7, 2000.
- OLIVEIRA B. S. de, Nunes M. L. Avaliação de quitosana de caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*) como biofilme protetor em caju. **Scientia Plena**. v. 7, p. 4, 2011.
- OLIVEIRA, V. G.; JERÔNIMO, C. E. de M., CEZAR, G. M., SANTIAGO, A. F.; MELO, H. N. de S.. Proposta para Minimização do Impacto Causado pela Carcinicultura nos Manguezais do RN. **Congresso Internacional de Engenharia Sanitária e Ambiental**. México – 2002.
- PAULINO, A. T. Produção de Adsorventes não-Convencionais e Aplicação na Remediação de Água e Efluentes Industriais. **Tese**. Maringá-Brasil, 2008.
- PACHECO, N.; M. GARNICA-GONZÁLEZ; RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, J. Y.; FLORES-ALBINO, B.; GIMENO, M.; BÁRZANA, E.; SHIRAI, K. Effect of temperature on chitin and astaxanthin recoveries from shrimp waste using lactic acid bacteria. **Bioresource Technology**, v. 100, p 2849–2854, (2009).
- RAMOS, L. R B; STAMFORD, T. C.. MONTENEGRO. STAMFORD, N. P. Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura. **Revista Iberoamericana de Polímeros**. v. 12, p.4, 2011.

- SAGHEER, F.A. A; SUGHAYER, M.A.; MUSLIM, S.; ELSABEE, M.Z., Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. **Carbohydrate Polymers**. v. 77, p. 410–419, 2009.
- SANEL, S.; MCCLURE S. J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 1467–1480, (2004).
- SANTOS, J. E.; DOCKAL, E. R.; CAVALHEIRO, E. T. G. Synthesis and characterization of Schiff bases from chitosan and salicylaldehyde derivatives. **Carbohydrate Polymers**. v. 60, p. 277–282 2005.
- SANTOS, J E.; SOARES, J. P.; DOCKAL, E. R.; CAMPANA FILHO, S. P.; CAVALHEIRO, E. T. G. Caracterização de Quitosanas Comerciais de Diferentes Origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, nº 4, p. 242-249, 2003.
- SHAHIDI F.; ARACHCHI, J. K. V. ; JEON, You-Jin. Food applications of chitin and chitosans. **Trends in Food Science & Technology**. v. 10, p 37±51, (1999).
- SILVA, I. R; PEREIRA, L. C. C., **Estudo socioambiental da comunidade de Bacuriteua (Pará, Litoral Amazônico, Brasil)**. Revista da Gestão Costeira Integrada, 2010.
- SPIN-NETO, Rubens, Chaíne PAVONEb, Rubens Moreno de FREITAS, Rosemary Adriana Chiérici MARCANTONIOd, Elcio MARCANTONIO-JÚNIOR. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. **Revista de Odontologia da UNESP**. v. 37(2), p. 155-161, 2008.
- TORRES, M. A.; VIEIRA, R. S.; BEPPU, M. M.; SANTANA, C. C., Produção e Caracterização de Microesferas de Quitosana Modificadas Quimicamente. **Polímero: Ciencia e Tecnologia**. Associação Brasileira de Polímeros. v. 15, p. 306-312, 2005.
- WESKA R.F., J.M. Moura, L.M. Batista, J. Rizzi, L.A.A. Pinto \*. Optimization of deacetylation in the production of chitosan from shrimp wastes: Use of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 749–753, (2007).

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

YOUNES, I.; GHORBEL-BELLAAJ, O.; NASRI, R.; CHAABOUNI, M.; MARGUERITE NASRI, R. M. Chitin and chitosan preparation from shrimp shells using optimized enzymatic Deproteinization. *Process Biochemistry*, v. 47, p. 2032–2039, 2012.

ZIVANOVIC, S; CHI, S.; DRAUGHON, A. F. Antimicrobial Activity of Chitosan Films Enriched with Essential Oils. *Journal of food Science*. v. 70, n. 1, 2005.

# **ARTIGO CIENTÍFICO**

1 **Folha de rosto**

2 **Otimização de processos de obtenção de quitina e quitosana do**  
3 **exoesqueleto do camarão amazônico (*Macrobrachium amazonicum*,**  
4 **HELLER, 1863)**

5

6 **Autores: Andréa Pinto<sup>1</sup>, Evaldo Silva<sup>2</sup>**

7 <sup>1</sup>UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ. Instituto Tecnológico (ITEC);

8 Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Laboratório de Química  
9 do Pescado. Alameda Leandro Ribeiro, S/N – Aldeia – Bragança – PA.

10 <sup>2</sup> UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ. Instituto de Estudos Costeiros (IECOS),

11 Faculdade de Engenharia de Pesca, Laboratório de Química do Pescado. Alameda Leandro  
12 Ribeiro, S/N – Aldeia – Bragança – PA.

13 **Palavras chaves:** otimização, caracterização, quitina, quitosana, *Macrobrachium*  
14 *amazonicum*

15 **Nome do autor para correspondência:** Evaldo Martins da Silva

16 Endereço: Alameda Leandro Ribeiro, S/N – Aldeia – 68.600-000 – Bragança/PA

17 Telefone: (091)3425 1209 - Ramal 208 - Fax: (091) 3425 1593

18 Endereço eletrônico: [evaldms@ufpa.br](mailto:evaldms@ufpa.br)

19

## ABSTRACT

20 The exoskeletons of crustaceans, such as shrimp *M. amazonicum* (Heller, 1863) are a  
21 major alternative sources of obtaining chitin, chitosan precursor. Given the many difficulties  
22 of working with biomaterials standardly, this work was aimed at the extraction of chitin and  
23 chitosan through a methodology of experimental design for response surface to optimize the  
24 main stages of demineralization, deproteinization and deacetylation. For planning of the three  
25 stages, the response variables were, respectively, the percentage of remaining ash (% CR),  
26 percentage of the total nitrogen (N<sub>total</sub>%) and percentage of degree of deacetylation (% DD).  
27 The characterizations of the stages of demineralization, deproteinization. Deacetylation and  
28 were analyzed consecutively by ash analysis, elemental analysis and potentiometric titration.  
29 After the findings of analyzes of ash in both the material in nature as the demineralized, it was  
30 possible to obtain, respectively  $32.03 \pm 0.05\%$  (CR%) and 0.0% of (% CR). Regression  
31 parameters of the response surface model were statistically significant, with values (R<sup>2</sup>) equal  
32 to 0.89. The response surface constructed for the variable% CR with regions of iso-responses  
33 indicated equal 1.2 M HCl and reason 0.08g / ml, that determines the optimal region in the  
34 model adopted for the optimization of demineralization. For tests deproteinization is  
35 noteworthy that, even with no significance as the study variables, the result of elemental  
36 analysis showed that in all trials of planning, protein extraction was performed efficiently,  
37 showing an average degree of deproteinization close to 100%. In desactilação step variables  
38 are generally not significant, with Grade% deacetylation ranging from 18.24 to 57.22. In this  
39 paper, we can conclude that the literature can not always be supported for efficient extraction  
40 chitin and chitosan, depending in this case, only preliminary tests and adjustments unique for  
41 each species under study.

42

43 Keywords : chitin, chitosan, *Macrobrachium amazonicum* and optimization.

44

45

## 46 1. Introdução

47 A quitina, um polissacarídeo constituído de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glicose,  
48 é o segundo biopolímero mais abundante na natureza, sua estrutura é muito semelhante à  
49 celulose, diferindo apenas na ligação do C-2 (Agullar, et al., 2003; Kumar, 2000). A  
50 quitina é encontrada principalmente no exoesqueleto de crustáceos e insetos, sendo  
51 classificada como um polímero atóxico, biodegradável, biocompatíveis e produzidos por  
52 fontes naturais renováveis (AZEVEDO et al., 2007).

53 Os cefalotórax dos crustáceos em sua maioria são constituídos aproximadamente de 25  
54 - 40% de proteínas; 40 – 55% de carbonato de cálcio, e 15 a 20% de quitina (Pacheco et  
55 al., 2009). O importante a ser observado é que a quitina, um biopolímero de grande valor  
56 tecnológico, constitui em aproximadamente um terço do total desses rejeitos. A quitina é  
57 um polissacarídeo versátil e precursor da quitosana que tem sido indicada como um  
58 polímero de potencial aplicação (ASSIS; BRITO, 2008).

59 Na região bragantina, assim como em outras regiões brasileiras o camarão do gênero  
60 *Macrobrachium* são utilizados na aqüicultura e também explorados pela pesca comercial,  
61 entretanto ressalta-se que o *M. amazonicum* é o único camarão explorado comercialmente  
62 nos estados do Pará e Amapá, pela pesca artesanal.

63 O *M. amazonicum* habita à água doce, é um decápodes de maior importância  
64 econômica no leste do subcontinente sul-americano. Explorado artesanalmente no norte e  
65 nordeste brasileiro, amplamente consumido pelos povos indígenas e brasileiros de todos  
66 os grupos econômicos. Além disso, este camarão mostra um elevado potencial para a  
67 aqüicultura. Atualmente foram intensificados os esforços nas pesquisas direcionadas aos  
68 desenvolvimentos de tecnologias para a cultura comercial desta espécie (MACIEL;  
69 VALENTI, 2009).

70 Os estudos para a implantação de cultivo de camarões foram direcionados para a  
71 biologia da espécie, cultivo, estoques naturais, legislação e normalização, manejo,  
72 comercialização, entre outros, mas percebe-se que poucos trabalhos apreciam a utilização  
73 dos resíduos gerados pelo seu processamento. O Brasil necessita de trabalhos específicos  
74 voltados ao aproveitamento desses resíduos, que acumulados em determinados efluentes  
75 causam mudanças botânicas, devido principalmente ao esgotamento de oxigênio e

76 formação do gás sulfídrico (H<sub>2</sub>S), considerado indicador de ambientes altamente poluídos  
77 por materiais orgânicos (SILVA; PEREIRA, 2010).

78 As cadeias produtivas das principais fontes utilizadas de quitina (camarão e  
79 caranguejo) geram resíduos que podem ser responsáveis por até 50% do volume total da  
80 matéria prima (ISLAM et al., 2004). Esses resíduos são gerados principalmente em  
81 estabelecimentos comerciais, praias e na manufatura das indústrias, em sua maioria, são  
82 enterrados ou jogados clandestinamente em rios ou no mar, ocasionando graves problemas  
83 de poluição além de odores desagradáveis (ARAUJO et al., 2009; OLIVEIRA et al.,  
84 2002).

85 Uma das formas de aproveitamento dos resíduos gerados no beneficiamento de  
86 camarões é a produção de quitina e consecutivamente a transformação da mesma em  
87 quitosana, por meio de reações químicas. Os autores Abdou et al. (2008); Minagawa et al.  
88 (2007); Yones et al. (2012); Weska et al. (2008) citam em seus trabalhos, condições de  
89 reações diferenciadas, mesmo em casos de mesma espécie, o que prever a necessidade de  
90 uma otimização no processo de obtenção tanto da quitina quanto da quitosana, pois o grau  
91 de pureza de cada uma determinará a sua aplicação tecnológica

92 As quitosanas, por apresentarem características particulares, como a presença de  
93 alguns grupos funcionais reativos, têm despertado diversos interesses científicos e  
94 industriais em áreas como biotecnologia, farmacêutica, biomedicina, embalagens,  
95 tratamento de águas residuais, cosméticos, ciência dos alimentos, entre outros  
96 (FERNANDES et al., 2010). Porém sua qualidade está diretamente ligada não só ao tipo  
97 de fonte utilizada como à eficiência do processo de desacetilação (CAMPANA-FILHO,  
98 2007).

99 Nesse contexto, o objetivo deste trabalho é otimizar os processos químicos de  
100 obtenção da quitina e quitosana a partir da espécie *Macrobrachium amazonicum*,  
101 enfatizando as etapas de desmineralização, desproteinização e desacetilação.

102

## 103 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 104 2.1. OBTENÇÃO E PREPARO DA MATÉRIA-PRIMA

105 O *Macrobrachium amazonicum* foi obtido diretamente dos pescadores artesanais da  
106 região bragantina, estando o crustáceo recém capturado e congelado. Para a extração da  
107 quitina as reações iniciaram com o pó do exoesqueleto do *M. amazonicum*, este material foi  
108 obtido através das seguintes etapas: lavagem dos camarões em água corrente; descascamento  
109 manual (ressalta-se neste item, que os rendimentos melhoraram com o descascamento  
110 realizado com o camarão ainda congelado); lavagem dos exoesqueletos para a remoção de  
111 possíveis resíduos de carnes; aquecimento dos exoesqueletos em água fervente por um tempo  
112 de 15 minutos; nova lavagem em água corrente; secagem em estufa com temperatura de 40°C  
113 por 24 horas; trituração em liquidificador doméstico; peneiramento em peneira  
114 granulométrica (latão) de abertura de 0,250 mm (60 mesh) e armazenamento sob refrigeração  
115 (AZEVEDO, et al., 2007; FAI, et al., 2008; WESKA et al., 2007).

116

### 117 2.2. OBTENÇÃO DA QUITINA

118 A obtenção da quitina se deu em 3 principais etapas: desmineralização,  
119 desproteínização e despigmentação. Com exceção da despigmentação, pelo fato de boa parte  
120 dos pigmentos já serem removidos nas etapas anteriores, as outras duas etapas, foram  
121 executadas de acordo com planejamentos experimentais.

122

#### 123 2.2.1. Desmineralização

124 Para uma maior eficiência no processo de extração da quitina, os ensaios foram  
125 realizados de acordo com um planejamento amostral, conforme Tabela 3, do tipo composto  
126 central rotacional, com 6 replicatas no centro e modelo de 2ª ordem. O planejamento  
127 experimental foi elaborado no programa STATISTICA 7.0. Nesta etapa de desmineralização,  
128 a porcentagem de Cinzas Remanescente (%CR) foi a variável dependente a ser otimizada e as  
129 independentes foram: *tempo* (horas), *concentração de HCl*(M) e *razão*(g/ml) massa de

130 crustáceo por volume de solução. O intuito deste planejamento é avaliar a reprodutibilidade e  
 131 atender a critérios estatísticos de rotabilidade e ortogonalidade.

132 **Tabela 3:** Planejamento experimental para o processo de desmineralização.

Ensaio	Valores codificados			Valores Reais		
	R	C	t	R (g/mL)	[NaOH]	t' (min.)
1	0,0	1,68	0,0	0,16	1,47	5
2	1,0	1,0	1,0	0,24	1,2	7
3	0,0	0,0	-1,68	0,16	0,8	1,63
4	1,0	-1,0	-1,0	0,24	0,4	3
5	-1,68	0,0	0,0	0,02	0,8	5
6	0,0	0,0	0,0	0,16	0,8	5
7	-1,0	-1,0	1,0	0,08	0,4	7
8	0,0	0,0	0,0	0,16	0,8	5
9	-1,0	1,0	-1,0	0,08	1,2	3
10	1,68	0,0	0,0	0,29	0,8	5
11	0,0	-1,68	0,0	0,16	0,12	5
12	1,0	1,0	-1,0	0,24	1,2	3
13	0,0	0,0	0,0	0,16	0,8	5
14	0,0	0,0	1,68	0,16	0,8	8,36
15	1,0	-1,0	1,0	0,24	0,4	7
16	0,0	0,0	0,0	0,16	0,8	5
17	-1,0	1,0	1,0	0,08	1,2	7
18	0,0	0,0	0,0	0,16	0,8	5
19	0,0	0,0	0,0	0,16	0,8	5
20	-1	-1,0	-1,0	0,08	0,4	3

133 \*onde: R= Razão quantidade de exoesqueleto/ Volume da solução (g/mL), C=Concentração HCl (M) e t' =  
 134 Tempo em minutos

135 A massa de exoesqueleto em pó e a solução de HCl com concentrações delineadas no  
 136 planejamento experimental foram misturados em erlenmeyer de 125 mL e mantidos em  
 137 banho-maria a temperatura de 40°C por tempos determinados no planejamento. Ressalta-se  
 138 que ocorreram agitações manuais a cada 30 minutos de reação. O produto obtido da reação foi  
 139 lavado com água destilada e filtrado a vácuo até atingir o pH próximo da neutralidade,  
 140 seguido de uma nova secagem em estufa durante 12 horas a 40°C. Posteriormente, o material  
 141 seco foi pesado para o cálculo de rendimento com relação ao peso inicial do material *in*  
 142 *natura*.

143 Para avaliar a efetividade da desmineralização, foram realizadas análises de cinzas em  
144 todos os ensaios, e as mesmas seguiram a metodologia proposta pela AOAC, (1997).

145 Após o término de todos os ensaios de desmineralização e a aplicação da análise de  
146 cinzas, os ensaios passaram por análise estatística, a predição dos pontos de melhores  
147 respostas quanto à redução do resíduo de cinzas. Ao fim, realizou-se a validação do ponto  
148 ótimo. Com a confirmação, procedeu-se então a uma desmineralização de um grande volume  
149 de massa de exoesqueleto para a extração de proteínas no processo posterior.

### 150 **2.2.2. Desproteíntização**

151 Após a obtenção do material desmineralizado nas condições otimizadas da etapa  
152 anterior, os mesmos passaram pelo processo de desproteíntização, de acordo com o  
153 planejamento experimental proposto.

154 As condições experimentais foram definidas através de um planejamento compósito  
155 central rotacional, contendo 6 ensaios no ponto central. Todos os 20 ensaios, descritos na  
156 Tabela 4, tiveram como variáveis independentes a *temperatura (°C)*, *concentração de NaOH*  
157 *(Molar)* e *tempo (minutos)* e variável dependente o percentual de Nitrogênio. Os domínios  
158 experimentais foram estabelecidos de acordo com a literatura (CAMPANA 2008: YONES, et  
159 al., 2012 ).

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

**Tabela 4:** Planejamento experimental do processo de desproteínização.

Ensaio	Valores Codificados			Valores Reais		
	C	T(°C)	t	[NaOH] (M)	T (°C)	Tempo (min)
1	1,0	1,0	-1,0	<b>2,25</b>	<b>88</b>	<b>120</b>
2	0,0	-1,68	0,0	<b>1,50</b>	<b>50,45</b>	<b>210</b>
3	0,0	0,0	0,0	<b>1,50</b>	<b>74</b>	<b>210</b>
4	-1,0	-1,0	1,0	<b>0,75</b>	<b>60</b>	<b>300</b>
5	0,0	0,0	0,0	<b>1,50</b>	<b>74</b>	<b>210</b>
6	0,0	0,0	0,0	<b>1,50</b>	<b>74</b>	<b>210</b>
7	0,0	1,68	0,0	<b>1,50</b>	<b>97,55</b>	<b>210</b>
8	0,0	0,0	-1,68	<b>1,50</b>	<b>74</b>	<b>59</b>
9	1,0	-1,0	1,0	<b>2,25</b>	<b>60</b>	<b>300</b>
10	0,0	0,0	0,0	<b>1,50</b>	<b>74</b>	<b>210</b>
11	-1,68	0,0	0,0	<b>0,239</b>	<b>74</b>	<b>210</b>
12	1,68	0,0	0,0	<b>2,762</b>	<b>74</b>	<b>210</b>
13	1,0	-1,0	-1,0	<b>2,25</b>	<b>60</b>	<b>120</b>
14	0,0	0,0	0,0	<b>1,50</b>	<b>74</b>	<b>210</b>
15	-1,0	1,0	1,0	<b>0,75</b>	<b>88</b>	<b>300</b>
16	0,0	0,0	0,0	<b>1,50</b>	<b>74</b>	<b>210</b>
17	1,0	1,0	1,0	<b>2,25</b>	<b>88</b>	<b>300</b>
18	-1,0	1,0	-1,0	<b>0,75</b>	<b>88</b>	<b>120</b>
19	-1,0	-1,0	-1,0	<b>0,75</b>	<b>60</b>	<b>120</b>
20	0,0	0,0	1,68	<b>1,50</b>	<b>74</b>	<b>361</b>

171

\*onde: C=Concentração NaOH (M), T= Temperatura em °C na forma codificada e t= tempo em minutos.

172

173

174

175

176

177

Para esta etapa a razão g/ml ficou estabelecida em um valor fixo de 0,8g de material desmineralizado para cada 8ml de solução básica de NaOH (*Razão 1:10*). Após os tempos de reação estabelecidos no planejamento, as amostras foram filtradas e lavadas em água destilada até a neutralidade do filtrado. Seguiu-se nova secagem nas mesmas condições da desmineralização. A variável de resposta para esta etapa é o porcentagem de nitrogênio (%N) do material tratado.

178

179

180

181

Ao fim de todos os ensaios do planejamento de desproteínização, foi realizada a análise elementar, para avaliar a porcentagem dos resíduos de Nitrogênio presente e, assim, determinar o ponto ótimo de desproteínização. Por fim realizou-se uma desproteínização em grande volume de massa para dar continuidade à etapa seguinte, despigmentação.

### 182 2.2.2.1. Análise elementar

183

184 A análise elementar de Nitrogênio, Hidrogênio e Carbono, foram conduzidas em  
185 analisador elementar. O objetivo principal desta técnica utilizada foi a determinação dos  
186 teores de Nitrogênio total. Para as análises de CHN (Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio), as  
187 amostras foram pesadas (5-10 mg) em cápsula de estanho logo após foram queimadas em um  
188 reator à 1000°C. A queima do estanho promove uma reação violenta em atmosfera de  
189 oxigênio temporariamente enriquecida. A combustão dos produtos CO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O são  
190 levadas por um fluxo constante de gás carreador (Helio), atravessando uma coluna de vidro  
191 empacotada. A esta temperatura, o óxido de nitrogênio se reduz a N<sub>2</sub>. Os gases N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e SO<sub>2</sub>  
192 são transportados pelo gás Helio e quantificada em detector (TCD). Por esta técnica analítica  
193 foram determinados os teores de carbono (C), Hidrogênio (H) e Nitrogênio (N) nas amostras.

194 Após a obtenção dos valores de N, C, e H, pode-se utilizar os resultados para o cálculo  
195 da porcentagem do grau de desproteínização (GDP%), utilizando a seguinte equação 01  
196 (YONES, et al., 2012).

$$197 \quad \%GDP = \frac{[(P_O \times O) - (P_R \times R)] \times 100}{P_O \times O} \quad (\text{Equação 01})$$

198 Onde P<sub>O</sub> e P<sub>R</sub> são, respectivamente, as concentrações de proteínas antes e depois da  
199 desproteínização; e O e R representam a massa (g) da amostra antes e após a remoção de  
200 proteínas.

201

### 202 2.3. PROCESSO DE DESACETILAÇÃO

203 Após a etapa de desproteínização, as amostras passaram pelo processo de  
204 despigmentação, realizada de acordo com testes baseados nas metodologias propostas por  
205 Antonino, (2007) e Hennig, (2009), onde a concentração de hipoclorito é fixada a 5% e a  
206 razão sólido/volume de solução foi de 1:10, durante 12 horas, posteriormente ocorreu a  
207 lavagem das amostras com água destilada até a remoção do reagente.

208

209           Todas as reações de transformação de quitina em quitosana ocorreram em reatores,  
210 (Figura 1), previamente planejados de acordo com descrições, por meio de empresa  
211 especializada em trabalhos com materiais inoxidáveis. Para maior interação entre a quitina e  
212 solução forte de NaOH, as amostras passaram por processo de maceração durante 24hs. Em  
213 seguida as amostras, ainda em reatores, foram aquecidas em autoclaves conforme as  
214 temperaturas em planejamento. Após o período de reação o produto obtido passou por várias  
215 lavagens e filtrações até pH próximo da neutralidade, em seguida realizou-se secagem em  
216 estufa por 12horas (HENNIG, 2009).

217



218

219           **Figura 1:** Reatores em materiais inoxidáveis

220           Fonte: Pinto, 2013.

221           As condições experimentais foram definidas através de um plano central compósito  
222 contendo 6 ensaios no ponto central. Todos os 20 ensaios tiveram como variáveis  
223 independentes a *temperatura* (°C), *concentração de NaOH* (Molar) e *tempo* (minutos). Para a  
224 variável dependente, fixou-se o *grau de desacetilação* da quitosana, a qual pode ser medida  
225 por vários métodos indiretos, tanto físicos quanto químicos, indicando pontos ótimos de  
226 transformação de quitina em quitosana, onde determinada condição de transformação poderá  
227 ser direcionado para várias aplicações tecnológicas desse biopolímero. As faixas de domínios  
228 experimentais foram estabelecidas de acordo com a literatura e de ensaios preliminares em

229 laboratório. A Tabela 5 abaixo descreve os valores das condições de variação de cada um dos  
230 20 ensaios.

231 **Tabela 5:** Planejamento experimental para a etapa de desacetilação.

Ensaio	Valores Codificados			Valores Reais		
	C	T	t	[NaOH]	Temperatura	Tempo
1	1	1	-1	54	115	125
2	0	-1,68	0	48	74,77	95
3	0	0	0	48	100	95
4	-1	-1	1	37,9	85	125
5	0	0	0	48	100	95
6	0	0	0	48	100	95
7	0	1,68	0	48	125,22	95
8	0	0	-1,68	48	100	44,54
9	1	-1	1	54	85	125
10	0	0	0	48	100	95
11	-1,68	0	0	37,9	100	95
12	1,68	0	0	58,09	100	95
13	1	-1	-1	54	85	65
14	0	0	0	48	100	95
15	-1	1	1	37,9	115	125
16	0	0	0	48	100	95
17	1	1	1	54	115	125
18	-1	1	-1	37,9	115	65
19	-1	-1	-1	37,9	85	65
20	0	0	1,68	48	100	145,45

232 \*onde: C=Concentração NaOH (Molar), T= Temperatura e t= tempo.

233 Após o término das reações, as mesmas passaram por repetidas lavagens com água  
234 destilada e filtragem a vácuo até pH neutro. Finalizou-se o processo com a secagem do  
235 material em estufa a 40°C por 12 horas.

236

237

238

239

240 2.4. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA QUITOSANA

241

242 **2.4.1. Titulação potenciométrica**

243 Para a caracterização das quitosanas obtidas, realizou-se a titulação potenciométrica  
244 como forma de determinação do grau de desacetilação. De acordo com a metodologia  
245 proposta por Hennig, 2009, 0,25g de quitosana foram pesados e dissolvidos em 20 ml de  
246 solução de HCl. Para uma dissolução mais rápida e eficiente, as amostras passaram por  
247 agitações magnéticas seguida de repouso e este processo se estendeu até a percepção de uma  
248 solução viscosa livre da presença de partículas sólidas de quitosana e, então foi finalizado  
249 com a adição de 100 ml de água em cada amostra seguida de agitação.

250 Em seguida, procedeu-se a titulação até o titulado alcançar pH próximo de 6,0. Os  
251 valores de volume de solução de NaOH gasto foram identificados e utilizados na equação 02  
252 para a determinação do  $f(x)$ .

253 
$$f(x) = \left( \frac{V_0 + V}{NB} \right) ([H^+] - [OH^-]) \quad \text{(Equação 02)}$$

254 Onde:

255  $V_0$ : Volume de solução de quitosana (ml);

256  $V$ : Volume de NaOH utilizado na titulação (ml);

257  $N_B$ : Concentração molar do NaOH.

258 Com o objetivo de calcular  $V_e$  (volume de NaOH ao fim da titulação), foi feita a  
259 extrapolação da curva de titulação linear. Este valor de  $V_e$  é necessário para o cálculo de  $\phi$  na  
260 Equação 03 abaixo.

261 O grau de desacetilação da amostra de quitosana é calculado utilizando a seguinte  
262 equação.

263 
$$GD(\%) = \phi / [(W - 161\phi) / 204 + \phi] * 100 \quad \text{(Equação 03)}$$

264 Sendo:

$$265 \quad \phi = NA \cdot VA - NB \cdot Ve / 1000 \quad (\text{Equação 04})$$

266 Onde:

267  $N_A$ : Concentração normal de HCl;

268  $V_A$ : Volume de HCl (ml);

269  $N_B$ : Concentração normal de NaOH;

270  $V_e$ : Volume de NaOH ao fim da titulação;

271 **161**: Massa molecular da unidade monomérica da quitosana;

272 **204**: Massa molar da unidade de quitina em  $\text{mg mol}^{-1}$ .

273

274

275

276

277

278

279

280

281

282

283

### 284 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

285

#### 286 3.2. OTIMIZAÇÃO DA DESMINERALIZAÇÃO

287

288 Para autores como Lertsutthiwong *et al.*, (2002); Azevedo *et al.*, (2007) a  
289 desmineralização deve ser a primeira etapa do processo de obtenção da quitina, pois está  
290 diretamente relacionada a um rendimento mais alto, isto ocorre devido a proteção que a  
291 proteína ainda aderida a cadeia promove, impedindo a despolimerização e hidrólise da  
292 quitina.

293 Inicialmente, como forma de referência comparativa para os ensaios do planejamento,  
294 foi realizada a análise de cinzas na amostra *in natura*, obtendo-se o valor de  $32,03 \pm 0,05\%$  em  
295 relação à matéria seca. Em estudos análogo a este foi observado pelos seguintes autores  
296 Chorit *et al.*, (2008); Ghorbel-Bellaje *et al.*, (2009); Lertsutthiwong, *et al.*, (2002), os  
297 respectivos valores 42,7%,  $46,1 \pm 0,06\%$  e 34,8%. Segundo Assis; Brito, (2008), as diferenças  
298 entre o conteúdo de minerais está diretamente relacionada a espécie, gêneros e a sazonalidade  
299 de cada um, o que pode justificar as distintas porcentagens mencionadas anteriormente.

300 Assim como Agboh *et al.* (2008); Qin (2006), neste trabalho, destacou-se como  
301 desmineralização eficiente, o ensaio com maior remoção dos minerais presentes na  
302 constituição do exoesqueleto dos crustáceos. Além desse, outros fatores são as condições  
303 experimentais ótimas de extração dos minerais, ou seja, as condições mais brandas possíveis,  
304 que não acarretem eventual destruição da constituição da quitina e também desperdício de  
305 reagentes.

306 Após todos os ensaios de desmineralização do exoesqueleto de *M. amazonicum*,  
307 realizou-se a determinação do percentual de cinzas remanescente (% CR) de cada amostra  
308 obtida ao fim do processo de remoção dos minerais. O resultado alcançaram amplitude de  
309 variação de 0 a 25,33% de %CR (Tabela 6), o que nos permite dizer que há uma relação  
310 consequente entre as condições de reação (concentração, tempo e razão) na extração de  
311 quitina e seus resultados obtidos (%CR).

312

313

314 **Tabela 6:** Rendimento das cinzas residuais

Ensaio	Valores Reais			Valor			
	R	C	t	Razão	[HCl]	Tempo	% CR
<i>In natura</i>	-	-	-	-	-	-	<b>32,03</b>
1	1,0	1,0	1,0	<b>0,16</b>	<b>1,473</b>	<b>5</b>	<b>0,67</b>
2	0,0	0,0	-1,68	<b>0,24</b>	<b>1,2</b>	<b>7</b>	<b>4,67</b>
3	1,0	-1,0	-1,0	<b>0,16</b>	<b>0,8</b>	<b>1,636</b>	<b>14,33</b>
4	-1,68	0,0	0,0	<b>0,24</b>	<b>0,4</b>	<b>3</b>	<b>25,33</b>
5	0,0	0,0	0,0	<b>0,025</b>	<b>0,8</b>	<b>5</b>	<b>2,00</b>
6	-1,0	-1,0	1,0	<b>0,16</b>	<b>0,8</b>	<b>5</b>	<b>4,33</b>
7	0,0	0,0	0,0	<b>0,08</b>	<b>0,4</b>	<b>7</b>	<b>3,33</b>
8	-1,0	1,0	-1,0	<b>0,16</b>	<b>0,8</b>	<b>5</b>	<b>4,00</b>
9	1,68	0,0	0,0	<b>0,08</b>	<b>1,2</b>	<b>3</b>	<b>0,00</b>
10	0,0	-1,68	0,0	<b>0,295</b>	<b>0,8</b>	<b>5</b>	<b>17,33</b>
11	1,0	1,0	-1,0	<b>0,16</b>	<b>0,127</b>	<b>5</b>	<b>25,33</b>
12	0,0	0,0	0,0	<b>0,24</b>	<b>1,2</b>	<b>3</b>	<b>4,67</b>
13	0,0	0,0	1,68	<b>0,16</b>	<b>0,8</b>	<b>5</b>	<b>4,33</b>
14	1,0	-1,0	1,0	<b>0,16</b>	<b>0,8</b>	<b>8,364</b>	<b>5,33</b>
15	0,0	0,0	0,0	<b>0,24</b>	<b>0,4</b>	<b>7</b>	<b>23,33</b>
16	-1,0	1,0	1,0	<b>0,16</b>	<b>0,8</b>	<b>5</b>	<b>4,33</b>
17	0,0	0,0	0,0	<b>0,08</b>	<b>1,2</b>	<b>7</b>	<b>0,33</b>
18	0,0	0,0	0,0	<b>0,16</b>	<b>0,8</b>	<b>5</b>	<b>5,33</b>
19	-1	-1,0	-1,0	<b>0,16</b>	<b>0,8</b>	<b>5</b>	<b>5,67</b>
20	0,0	1,68	0,0	<b>0,08</b>	<b>0,4</b>	<b>3</b>	<b>3,33</b>

315 \* R= Razão quantidade de exoesqueleto/ Volume da solução, C=Concentração, T= Temperatura (°C).

316 Através de regressão múltipla e ANOVA do modelo, pode-se observar que o  
317 coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,89$ ) apresentou um valor elevado, o que indica que 89%  
318 da variabilidade da resposta é explicada pelo modelo de 2ª ordem, e que nem todos os fatores  
319 do modelo são significativos para os valores de  $p$  igual a 0,05. De acordo com a Tabela 7,  
320 todos os parâmetros lineares e quadráticos das variáveis foram significativos, porém, não se  
321 observou interações significativas da variável *tempo* com as variáveis *razão* e *concentração*  
322 *de HCl*.

323 As variáveis que atestaram significâncias, foram baseadas em trabalhos literários,  
324 como os de Hossain *et al.*, (2007); Leitão *et al.*, (2008), que as descreveram como principal  
325 responsáveis pela eficiência do processo de remoção dos minerais nas carapaças de  
326 crustáceos, desta forma o resultado obtido reforçou ainda mais a importância de se manter o  
327 controle das variáveis em questão.

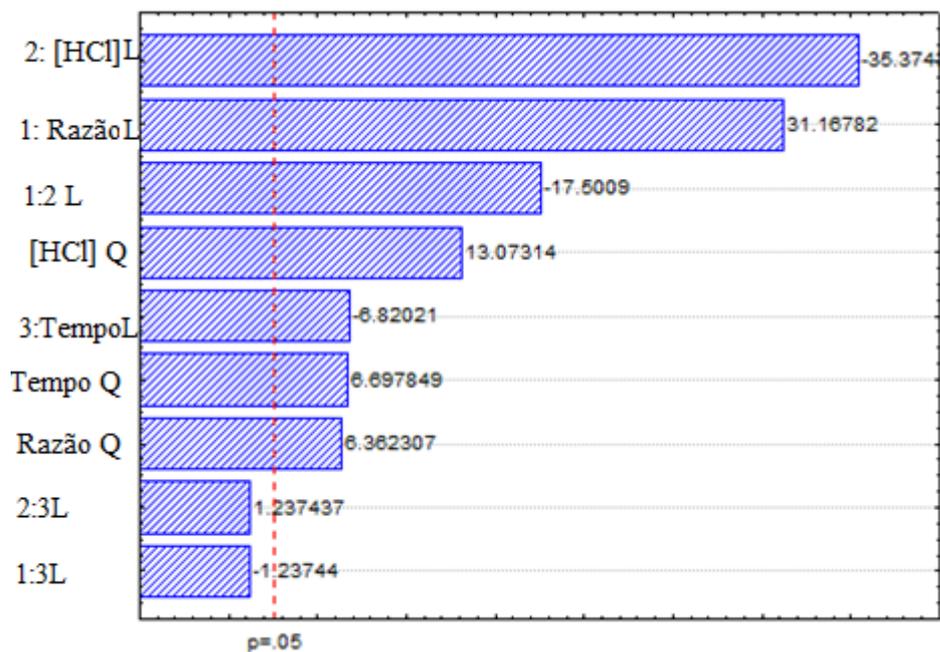
328 **Tabela 7:** Coeficiente de determinação e ANOVA para os fatores utilizados na  
 329 desmineralização do exoesqueleto de *Macrobrachium amazonicum*.

Fator	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F	p
(1) Razão (L)	431,748	1	431,748	971,43	0,000001
Razão (Q)	17,991	1	17,991	40,47	0,001418
(2) [HCl] (L)	556,151	1	556,151	1251,34	0,000000
[HCl] (Q)	75,959	1	75,959	170,90	0,000047
(3) Tempo (L)	20,673	1	20,673	46,51	0,001033
Tempo (Q)	19,938	1	19,938	44,86	0,001122
1 L:2 L	136,125	1	136,125	306,28	0,000011
1 L:3 L	0,681	1	0,681	1,531	0,270865
2 L:3 L	0,681	1	0,681	1,531	0,270865
Falta de ajuste	70,549	5	14,1099	31,74	0,000856
Erro Puro	2,222	5	0,444		
Total SQ	1317,356	19			
R <sup>2</sup>	0,94476				
R <sup>2</sup> Ajustado	0,89504				

330

331 O gráfico de pareto (Figura 2) é uma das formas de se avaliar visualmente a influencia  
 332 dos fatores estudados na resposta. A hierarquia dos efeitos é representada pelas colunas  
 333 enquanto que a linha transversal às colunas representa a magnitude dos efeitos com  
 334 significado estatístico para  $p < 0,05$ , ou seja, os fatores que são estatisticamente significativos  
 335 ao nível de 95% de confiança.

336



337

338 **Figura 2:** Gráfico de Pareto do planejamento experimental 2ª mostrando a influência  
 339 dos fatores estudados.

340

341 A análise do gráfico de Pareto indicou que o fator concentração [HCl] foi o que  
 342 influenciou de forma mais significativa na extração de minerais do cefalotórax. Na  
 343 desmineralização, utilizando soluções ácidas, ocorre como principal reação a eliminação  
 344 carbonato de cálcio e magnésio, através da geração de cloretos hidrossolúveis e liberação de  
 345 dióxido de carbono (CARDOSO, 2008).

346 A concentração de [HCl] atingiu um efeito estimado de -35,37, o sinal negativo  
 347 indicando que o aumento da concentração de HCl da solução utilizada no processo de  
 348 desmineralização reduz proporcionalmente a quantidade de minerais presentes. Porém, de  
 349 acordo com Kamil *et al.*, (2008); Talaimate *et al.*, (2003); Chen *et al.*, (2006), as condições  
 350 deste processo devem ser preferencialmente o mais branda possível, evitando principalmente  
 351 uma degradação da quitina obtida.

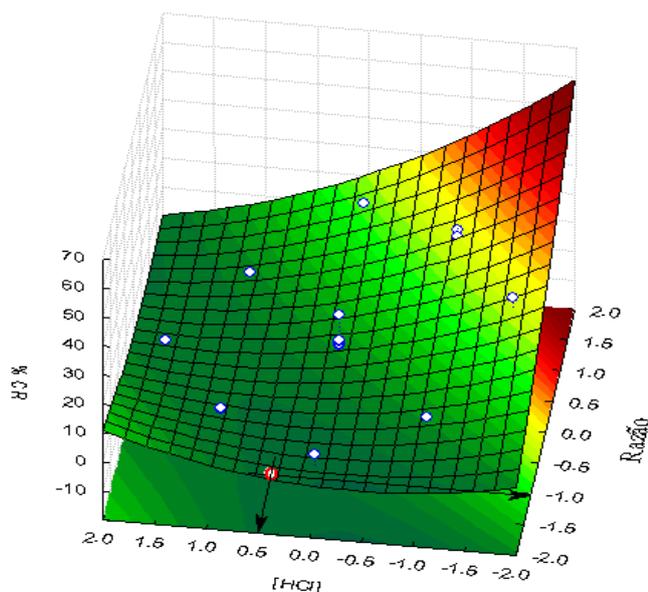
352 Quanto à variável razão g/ml (massa/solução), um efeito igual a 31,16 também  
 353 influenciou de forma positiva essa resposta, enfatizando mais ainda a boa relação ácido-  
 354 exoesqueleto na remoção de minerais, pois há um limite máximo e mínimo entre massa e  
 355 volume da solução para que ocorram interações moleculares necessárias, evitando o  
 356 desperdício de reagentes e conseqüentemente a minimização de contaminação do ambiente.

357 Quando analisado o tempo e a interação entre as variáveis [HCl] e razão g/ml, verifica-  
 358 se que as mesmas também foram estatisticamente significativas, porém em menor relevância,

359 já que os valores dos efeitos foram 17,50 e -6,82 respectivamente. Devido à resposta da  
360 variável tempo ter alcançado um efeito -6,82, realizou-se a predição para que assim fosse  
361 estabelecido um tempo limite para a extração e a não degradação do material. Após esta  
362 análise, determinou-se que possivelmente o melhor tempo de reação para a matriz  
363 exoesqueleto de camarão *M amazonicum* seria 5 horas.

364 A concentração quadrática de HCl também teve efeito significativo ( $p < 0,05$ ), assim  
365 como o efeito linear e quadrático do tempo e efeito quadrático da razão, mas estes tendo  
366 menores impactos para o processo de desmineralização.

367 A análise do gráfico de superfícies de resposta (Figura 3), indicou que regiões  
368 experimentais com maiores concentrações de HCl e menores valores de razão *sólido:líquido*  
369 foram as melhores para otimizar a desmineralização. Com a análise da predição dos  
370 resultados, percebeu-se que os melhores resultados foram encontrados a uma concentração de  
371 HCl de 1,2M e razão igual a 0,08.



384 **Figura 3:** Superfície de resposta para o percentual de cinzas remanescente em função das  
385 variáveis *[HCL]*, *Razão sólido-líquido (g/mL)* e, usando modelo de superfície de resposta para  
386 desmineralizar exoesqueleto de *M. Amazonicum* (o tempo foi fixado no ponto central).

387 Em seguida, procedeu-se à etapa de validação do processo. A validação de um ponto  
388 ótimo experimental é uma etapa necessária e de fundamental importância em otimização de  
389 processo por MSR, pois é preciso confrontar as respostas previstas com os valores  
390 experimentais. Na Tabela 8 estão descritas condições para a validação do ponto ótimo, bem  
391 como, as resposta que confirmam a significância das variáveis.

392 **Tabela 8:** Resultados da validação do ponto ótimo e de maior eficiência do processo de  
393 desmineralização do exoesqueleto de *M. amazonicum*.

Ensaio	Razão	[HCl]	Tempo	Resposta (% CR)	
				Valor Predito	Valor Experimental
E1	0,08	0,9	5 h	0,00	0,00
E1	0,08	0,9	5 h	0,00	0,00
E1	0,08	0,9	5 h	0,00	0,33
E1	0,08	0,9	5 h	0,00	0,00

394 % CR: Percentual de cinzas residuais

395

396 Os resultados mostram que houve boa concordância entre os valores preditos e os  
397 valores experimentais, o que significa que a metodologia aplicada por MSR e o modelo  
398 matemático de segunda ordem foram eficientes em otimizar o processo de desmineralização,  
399 ou seja, reduzir o teor de cinzas a um valor mínimo.

400

### 401 3.3. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE DESPROTEINIZAÇÃO

402 Foram realizados todos os ensaios de desproteínização seguindo as condições  
403 estabelecidas no planejamento proposto. Os resultados obtidos estão expostos em  
404 porcentagem de rendimento na Tabela 9, apresentando uma variação de 39 – 43%, tal faixa se  
405 encaixa nos valores descritos por Campana *et al.*, (2008), que destacou o rendimento de  
406 quitina sem despigmentação entre 30 a 40%.

407

408

409

410

411

**Tabela 9:** Porcentagem do rendimento em massa após o processo de desproteínização

Ensaio				[NaOH]	T (°C)	t' (min.)	R%
1	1,0	1,0	-1,0	<b>2,25</b>	<b>88</b>	<b>120</b>	<b>41</b>
2	0,0	-1,7	0,0	<b>1,50</b>	<b>50,45</b>	<b>210</b>	<b>43</b>
3	0,0	0,0	0,0	<b>1,50</b>	<b>74</b>	<b>210</b>	<b>40</b>
4	-1,0	-1,0	1,0	<b>0,75</b>	<b>60</b>	<b>300</b>	<b>42</b>
5	0,0	0,0	0,0	<b>1,50</b>	<b>74</b>	<b>210</b>	<b>41</b>
6	0,0	0,0	0,0	<b>1,50</b>	<b>74</b>	<b>210</b>	<b>39</b>
7	0,0	1,7	0,0	<b>1,50</b>	<b>97,54</b>	<b>210</b>	<b>41</b>
8	0,0	0,0	-1,7	<b>1,50</b>	<b>74</b>	<b>59</b>	<b>40</b>
9	1,0	-1,0	1,0	<b>2,25</b>	<b>60</b>	<b>300</b>	<b>41</b>
10	0,0	0,0	0,0	<b>1,50</b>	<b>74</b>	<b>210</b>	<b>41</b>
11	-1,7	0,0	0,0	<b>0,239</b>	<b>74</b>	<b>210</b>	<b>43</b>
12	1,7	0,0	0,0	<b>2,762</b>	<b>74</b>	<b>210</b>	<b>40</b>
13	1,0	-1,0	-1,0	<b>2,25</b>	<b>60</b>	<b>120</b>	<b>42</b>
14	0,0	0,0	0,0	<b>1,50</b>	<b>74</b>	<b>210</b>	<b>40</b>
15	-1,0	1,0	1,0	<b>0,75</b>	<b>88</b>	<b>300</b>	<b>42</b>
16	0,0	0,0	0,0	<b>1,50</b>	<b>74</b>	<b>210</b>	<b>42</b>
17	1,0	1,0	1,0	<b>2,25</b>	<b>88</b>	<b>300</b>	<b>39</b>
18	-1,0	1,0	-1,0	<b>0,75</b>	<b>88</b>	<b>120</b>	<b>41</b>
19	-1,0	-1,0	-1,0	<b>0,75</b>	<b>60</b>	<b>120</b>	<b>41</b>
20	0,0	0,0	1,7	<b>1,50</b>	<b>74</b>	<b>361</b>	<b>40</b>

413

\*C: Concentração de NaOH; T: temperatura em °C, t: tempo em minutos

414

De acordo com a análise dos dados da Tabela 9 acima (última coluna), fica evidente a baixa variabilidade dos valores no que se refere à diferença de porcentagem relacionada aos rendimentos dos materiais tratados. Após a ANOVA, os valores de  $p$  ficaram muito acima de 0,05, e  $R^2$  foi igual a 0,44, é possível determinar que para este estudo nem um das variáveis foram consideradas estatisticamente significativas. Isto é um indício de que não podemos estender a otimização de uma espécie baseado em outros estudos usando carapaça de camarão.

421

De fato, o processo de desproteínização para a obtenção de quitina, apresenta-se pouco estudado na literatura, talvez um dos fatores seja a baixa variabilidade nos resultados quanto a esta etapa. Porém, para autores como Campana *et al.*, (2007), as condições reacionais no processo de desproteínização devem ser brandas para evitar, ou minimizar, a ocorrência de hidrólise dos grupos acetamida presentes na quitina e também sua despolimerização.

426 De acordo com Yones *et al.*, (2012), a desmineralização é um processo que também  
427 reduz de forma significativa a porcentagem de proteínas presente na carapaça dos crustáceos,  
428 isto deve-se a possível hidrólise que algumas moléculas de proteínas sofrem em meio ácido.  
429 Na Tabela 10 abaixo é possível visualizar que há uma redução do conteúdo de proteínas do  
430 material *in natura*, com 56,61% para o desmineralizado, 26,79%.

431 **Tabela 10:** Determinação da porcentagem de proteínas nos materiais *in natura* e  
432 desmineralizado pelo método Kjeldhal.

Material	% Proteínas
<i>in natura</i>	56,61±0,04
Desmineralizado	26,79±0,04

433 Os dados da Tabela 10, assim como as descrições redigidas por Assis et al, 2008;  
434 Yones et al., 2012, enfatizam que as etapas para isolamento da quitina, principalmente  
435 desmineralização e desproteínização não eliminam exclusivamente os nutrientes aos quais  
436 cada etapa de reação se propõe, pois é perceptível na etapa de desmineralização, por exemplo,  
437 a perdas significante de proteínas, enquanto que o objetivo da mesma é a remoção de  
438 minerais. Tais dados, apenas afirmam as dificuldades em se manter um padrão de extração  
439 para cada etapa, pois não se tem um controle da interferência de uma etapa a outra.

440

### 441 3.3.1. Análise elementar

442 A análise elementar é particularmente útil para determinar a fórmula empírica do  
443 composto, correspondendo a proporção, em termos de quantidade de elementos de uma  
444 molécula. A Tabela 11 exhibe os valores em porcentagem dos elementos N, C e H presentes na  
445 estrutura molecular dos materiais desproteínizados. Para esta análise foram selecionados os  
446 ensaios 1, 4, 6, 11 e 12, por estar em condições mais diferenciadas e assim ampliar a  
447 significância de cada ponto.

448

449

450 **Tabela 11:** Determinação do percentual de N, C e H por análise elementar.

<b>Ensaio</b>	<b>Massa(g)</b>	<b>N%</b>	<b>C%</b>	<b>H%</b>	<b>C/N</b>	<b>%GDP</b>
1	0,1007	6,665	45,814	5,686	6,86	101,36
4	0,1007	6,612	45,633	5,744	6,89	102,7
6	0,1003	6,415	45,553	5,718	7,1	115,37
11	0,101	6,458	46,018	5,703	7,13	116,74
12	0,1001	6,459	46,055	5,785	7,11	115,5
<b>Σ</b>	<b>0,1±0,00</b>	<b>6,52± 0,11</b>	<b>45,81±0,22</b>	<b>5,72±0,03</b>	<b>7,01±0,13</b>	<b>110,33±7,61</b>

451 \*%N: Percentual de Nitrogênio; %C: Percentual de Carbono; %H: Percentual de Hidrogênio e %GDP: Grau de  
 452 desproteinização.

453 Teoricamente a quitina é constituída N, O, H e C, do total de seu peso molecular cada  
 454 elemento representa em porcentagem os respectivos valores 6,9%, 39,4%, 6,4% e 47,3%  
 455 (Aranaz, et al., 2009). Para análise do teor de N, que é a variável dependente deste  
 456 planejamento, pode-se observar que ao compararmos o valor teórico 6,9% com o valor médio  
 457 descrito na Tabela 11,  $6,52 \pm 0,11$  e, além disso, confrontar com o valor 6,27%, descrito por  
 458 Antonino, (2007), permite-nos concluir que se houvessem resquícios de proteínas, os valores não  
 459 estariam tão próximos.

460 Cardoso (2008) em seu estudo com moluscos e crustáceos, obteve %GDP próximos a  
 461 89% já o autor Lavall, *et al.*, (2007) em seus estudos sobre a extração de quitina, obteve  
 462 valores variando de 90,7 a 101,2%, tais dados estão próximos aos descritos na Tabela 11,  
 463  $110,33 \pm 7,61$ . De fato, o %GDP está relacionado ao grau de pureza da quitina, livre de minerais  
 464 e proteínas, por consequência quanto maior %GDP, mais eficiente o processo, porém ressalta-  
 465 se a importância de manter o mais próximo possível a condições brandas para não ocorrer a  
 466 descaracterização da quitina obtida.

467 Ao observarmos os %GDP,  $110,33 \pm 7,61$ , na Tabela 11 e os rendimentos descritos na  
 468 Tabela 10, em especial o ensaio 11, pode-se dizer que em condições otimizadas, ou seja, 0%  
 469 de proteínas, as concentrações podem ficar até mesmo, abaixo de 0,239 M.

470 3.4. DESACETILAÇÃO DA QUITINA

471 Antes da desacetilação realizou-se a despigmentação que para Assis *et al.*, (2008) é um  
 472 processo que inicia-se desde a etapa de desproteção, onde é possível visualizar de forma  
 473 significativa a mudança de cor do material. A despigmentação foi caracterizada como  
 474 eficiente apenas por análise visual, porém ressalta-se que a concentração estabelecida de  
 475 hipoclorito, bem como o tempo de reação, foram realizadas de acordo com a literatura  
 476 pesquisada e após testes laboratoriais preliminares.

477 Após a realização das titulações potenciométricas, pode-se determinar o grau de  
 478 desacetilação das amostras em estudo. A Tabela 13 abaixo descreve os resultados obtidos para  
 479 cada ensaio no processo de desacetilação para a transformação de quitina em quitosana.

480 **Tabela 13:** Desacetilação da quitina com a porcentagem do grau de desacetilação.

Ensaio	C	T	t	C	T°	t	Vfinal	% GD
1	1	1	-1	54	115	125	15,14	44,88
2	0	-1,68	0	48	74,77	95	16,7	31,43
3	0	0	0	48	100	95	17,19	24,1
4	-1	-1	1	37,9	85	125	18,3	18,24
5	0	0	0	48	100	95	15,94	20,4
6	0	0	0	48	100	95	15,26	27,02
7	0	1,68	0	48	125,22	95	12,15	54,12
8	0	0	-1,68	48	100	44,54	16,83	22,53
9	1	-1	1	54	85	125	13,63	42,18
10	0	0	0	48	100	95	15,23	30,27
11	-1,68	0	0	37,9	100	95	15,72	36,18
12	1,68	0	0	58,09	100	95	13,57	49,43
13	1	-1	-1	54	85	65	14,53	37,39
14	0	0	0	48	100	95	13,53	43,03
15	-1	1	1	37,9	115	125	13,84	47,78
16	0	0	0	48	100	95	13,02	52,84
17	1	1	1	54	115	125	11,83	57,22
18	-1	1	-1	37,9	115	65	15,43	37,82
19	-1	-1	-1	37,9	85	65	15,56	33,46
20	0	0	1,68	48	100	145,45	12,51	51,46
<b>Média</b>								<b>38,08±11,98</b>

481 \*onde: C=Concentração, T= Temperatura, t= tempo em minutos, Vfinal= Volume final e GD = Grau de  
 482 Desacetilação.

483 O valor médio  $38,08 \pm 11,98$ , encontrados de grau de desacetilação ficou abaixo de 50%, o  
484 que não pode ser considerado como quitosana (Minagawa et al., 2007). Apenas 3 ensaios  
485 ficaram acima desse valor (07, 16, 17 e 20), mas que ainda não caem na faixa de aplicação  
486 industrial, ou seja, entre 75 e 95%.

487 Através de regressão múltipla e da ANOVA, foram encontrados valores de  $p$  maiores que  
488 0,05 o que significa que todas as variáveis em estudo não foram estatisticamente significativas  
489 para explicar a variabilidade ocorrida no grau de desacetilação medido. Dessa forma, estes  
490 resultados não corroboraram a literatura empregada neste estudo, principalmente, em trabalho  
491 em que se utilizou o mesmo tipo de reator e condições reacionais a tipo de crustáceo (Weska  
492 et al, 2008). Uma possível explicação pode ter sido a não agitação do reator durante o  
493 processo. Nosso reator não disponha de um sistema de agitação.

494 Na realidade, nos estudos feitos por vários autores, até mesmo com as mesmas espécies,  
495 encontrou-se uma variação muito grande de condições reacionais, a exemplo no quadro  
496 abaixo temos os seguintes autores.

497 **Quadro1:** Autores e as condições de reação na transformação de quitina em quitosana

<b>Autores</b>	<b>Condições</b>
Weska et al, (2007)	Concentração – 45% de NaOH, temperatura – 125°C e tempo – 2 horas
Antonino, (2007)	Concentração – 30% de NaOH, temperatura - 100±5°C e tempo – 5 horas
Gupta et al., (2006)	Concentração – 40%, temperatura 80°C e tempo 4 horas
Cardoso, (2008)	Concentração - 5% de NaOH, temperatura – 150°C e tempo – 24 horas

498

499 Campana-Filho et al., (2007); Chaves, (2009); Lima, (2005) destacaram que, em se  
500 tratando de produto natural cuja biossíntese não está sob estrito controle genético, ocorrem

501 variações de composição e, além disso, a quitina raramente ocorre em forma pura,  
502 influenciando diretamente na produção de quitosana. Assim, a completa eliminação das  
503 substâncias com as quais a quitina ocorre naturalmente associada não é uma tarefa simples e é  
504 por vezes muito difícil atingir um padrão de pureza condizente com determinadas aplicações.

505 Além disso, a maioria dos processos de produção de quitosana está protegida por  
506 patentes. Quanto à literatura científica disponível, há muitas diferenças quanto às condições  
507 reacionais e outro fator muito debatido é o equipamento utilizado na desacetilação. Autores  
508 como Abdou et al., 2008; Antonino, 2007; Lertsutthiwong, et al., 2002; Sagheer et al., (2009)  
509 utilizaram, respectivamente, os seguintes meios reacionais: autoclave, agitador magnético  
510 com aquecimento, estufa e micro-ondas. Essa diversidade é mais um indício de que o  
511 processo de desacetilação deve passar por testes preliminares, para então, haver uma definição  
512 de um protocolo confiável de transformação de quitina em quitosana.

513

514

515

516

517

518

519

520

521

522

523

524

525

#### 526 4. CONCLUSÃO

527 Diante dos planejamentos experimentais realizados na obtenção de quitina foi  
528 possível visualizar o quão eficiente foi a primeira etapa, a desmineralização, a mesma  
529 apresentou-se como o melhor momento de controle do processo, pois foi possível visualizar  
530 através de análise estatística pontos ótimos com variáveis significativas e principalmente,  
531 materiais com quase 100% de extração de minerais não despolimerizados, alcançando desta  
532 forma o principal objetivo desta etapa.

533 A etapa de desproteínização apresentou-se com um grau mais elevado de dificuldade  
534 no controle de extração das proteínas, porém é possível destacar de forma muito positiva a  
535 extração eficiente das proteínas na maioria das amostras. Esta etapa não apresentou variáveis  
536 de influencia, visto que todas as respostas apresentaram-se muito próximas entre si. Nesses  
537 processos foi possível perceber que não existe protocolo definido, mesmo em se tratando da  
538 mesma espécie, ressaltamos a necessidade de sempre haver testes preliminares para direcionar  
539 fielmente as extrações em questão.

540 A desacetilação da quitina mostrou-se como um processo de alta dificuldade no  
541 controle da reação de transformação, visto que para esta etapa não se pôde determinar até que  
542 ponto um fator, como agitação, tamanho de partícula, tempo de maceração, etc. pode ser  
543 determinante na obtenção da quitosana. O que nos leva a concluir que para cada processo de  
544 desacetilação, poderá ser necessário ajustes como métodos, equipamentos e condições de  
545 transformação, que possam influenciar diretamente na obtenção do polímero.

546 Sugerimos para próximos estudos, se utilizar concentrações mais baixas de hidróxido de  
547 sódio na desproteínização da carapaça do camarão amazônico. Quanto a desacetilação,  
548 recomendamos a aplicação de novos processos, como a desacetilação por micro-ondas, ou o  
549 uso de sistema de refluxo.

550

551

552

553

554 **Referências Bibliográficas**

555

556 ABDON, E. S.; NAGY, K. S. A.; ELSABEE, M. Z.; Extraction and characterization of chitin  
557 and chitosan from local sources. **Bioresource Technology**. v. 99, p. 1359–1367, 2008.

558 AGBOH, O. C.; QIN, Y. Chitin and Chitosan Fibers. **Polymers for Advanced Technologies**.  
559 v 8, p. 355–365, 1996

560 ANTONINO, N. A.; **Otimização do Processo de Obtenção de Quitina e Quitosana de**  
561 **Exoesqueletos de Camarões Oriundos da Indústria Pesqueira**. Paraibana. João  
562 Pessoa. Dissertação (Mestrado). Departamento de Química - Universidade Federal da  
563 Paraíba, 2007.

564 ARANAZ, I.; MENGÍBAR, M.; HARRIS R.; PAÑOS, I.; MIRALLES, B.; ACOSTA, N.;  
565 GALED, G. and HERAS, Á. Functional Characterization of Chitin and Chitosan.  
566 **Current Chemical Biology**, v. 3, n. 2, 2009.

567 ARAÚJO F. J. F. de; AQUINO, M. D. de; AQUINO, B. F. de; BEZERRA F. M. L.;  
568 CHAGAS NETO, F.; **Aplicação do Composto Orgânico Produzido a partir de**  
569 **Caranguejo Uçá *Ucides Cordatus Cordatus* no Cultivo de Feijão Caupi *Vigna***  
570 ***unguiculata* (L.) walp.** Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal, v. 6, n. 3, p.  
571 015-035, 2009.

572 ASSIS, O. B. G.; BRITTO, D. Processo básico de extração de quitinas e produção de  
573 quitosana a partir de resíduos da carcinicultura **Embrapa Instrumentação**  
574 **Agropecuária** Pelotas, v.14, n.1, p.91-100, 2008.

575

576 AZEVEDO V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; FOOK, M. V. L.; COSTA, A. C.  
577 F. M. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de**  
578 **Materiais e Processos**, Campinas- SP. v. 2, n.3, p.27-34, 2007.

579 CAMPANA-FILHO S. P.; BRITTO, D. de, CURTI E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.;  
580 BATTISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R. e LAVALL, R. L.. Extração,

- 581 Estruturas e Propriedades de  $\alpha$ - e  $\beta$ -Quitina. *Química Nova*, v. 30, n. 3, p. 644-650,  
582 2007.
- 583 COCOLETZI, H. H.; ALMANZA E. Á.; AGUSTIN, O. F.; NAVA, E.L.V.; CASSELLIS, E.  
584 R., Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón  
585 **Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales**. v. 22, n.  
586 3, p. 57-60, 2009.
- 587 HENNIG, E. L. Utilização de quitosana obtida de resíduos de camarão para avaliar a  
588 capacidade de adsorção de íons  $\text{Fe}^{+3}$ . **Dissertação de Mestrado**. Rio Grande-RS,  
589 2009.
- 590 ISLAM Md. S., SALEHA, K, MASARU, T. Waste loading in shrimp and fish processing  
591 effluents: potential. Source of hazards to the coastal and nearshore environments.  
592 **Marine Pollution Bulletin**. v. 49, p. 103–110, 2004.
- 593 LAVALL, R. L; ASSIS, O. B.G; CAMPANA-FILHO, S. P..  $\beta$ -Chitin from the pens of *Loligo*  
594 sp.: Extraction and characterization. **Bioresource Technology**. v. 8, p. 2465–2472,  
595 2007.
- 596 LERTSUTTHIWONG, P; HOW, N C.; CHANDRKRACHANG, S.; STEVENS, W. F. Effect  
597 of Chemical Treatment on the Characteristics of Shrimp Chitosan. **Journal of Metals,**  
598 **Materials and Minerals**. v. 12 n. 1 p. 11-18, 2002.
- 599 MACIEL, C. R; VATENTI, W. C. **Biology, Fisheries, and Aquaculture of the Amazon**  
600 **River Prawn *Macrobrachium amazonicum*: A Review**. *Nauplius*. v. 17, n. 2, p. 61-  
601 79, 2009
- 602 MINAGAWA, T., OKAMURA, Y.; SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S.; OKAMOTO, Y.  
603 Effects of molecular weight and deacetylation degree of chitin/chitosan on wound  
604 healing. **Carbohydrate Polymers**. v 67, p. 640–644, (2007)  
605
- 606 OLIVEIRA, V. G.; JERÔNIMO, C. E. de M., CEZAR, G. M., SANTIAGO, A. F.; MELO, H.  
607 N. de S.. Proposta para Minimização do Impacto Causado pela Carcinicultura nos  
608 Manguezais do RN. **Congresso Internacional de Engenharia Sanitária e**  
609 **Ambiental**. México – 2002.

- 610   PACHECO, N.; M. GARNICA-GONZÁLEZ; RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, J. Y.; FLORES-  
611       ALBINO, B.; GIMENO, M.; BÁRZANA, E.; SHIRAI, K. Effect of temperature on  
612       chitin and astaxanthin recoveries from shrimp waste using lactic acid bacteria.  
613       *Bioresource Technology*, v. 100, p 2849–2854, (2009).
- 614   SAGHEER, F.A. A; SUGHAYER, M.A.; MUSLIM, S.; ELSABEE, M.Z., Extraction and  
615       characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf.  
616       **Carbohydrate Polymers**. v. 77, p. 410–419, 2009.
- 617   WESKA R.F., J.M. Moura, L.M. Batista, J. Rizzi, L.A.A. Pinto \*. Optimization of  
618       deacetylation in the production of chitosan from shrimp wastes: Use of response  
619       surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 749–753, (2007).
- 620   YOUNES, I.; GHORBEL-BELLAJ, O.; NASRI, R.; CHAABOUNI, M.; MARGUERITE  
621       NASRI, R. M. Chitin and chitosan preparation from shrimp shells using optimized  
622       enzymatic Deproteinization. *Process Biochemistry*, v. 47, p. 2032–2039, 2012.