



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MINAS, METALÚRGICA E DE  
MATERIAIS

LUAN RIOS PAZ

EFEITOS DOS PARÂMETROS DE PROCESSAMENTO NA OBTENÇÃO DE QUITINA E  
QUITOSANA DE CARAPAÇAS DO CAMARÃO DO PACÍFICO *Litopenaeus vannamei*

PORTO ALEGRE

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MINAS, METALÚRGICA E DE  
MATERIAIS

LUAN RIOS PAZ

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais - PPGE3M, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Engenharia. Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Luís Alberto Loureiro dos Santos.

PORTO ALEGRE  
2024

**DEDICATÓRIA**

*À minha família.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me proporcionar a vivência desta experiência enriquecedora e por me capacitar para alcançar esta conquista. A meu pai, Luis Valdenes, minha mãe, Serlei, e meu irmão, Kauan, pelo apoio e suporte constante, sempre buscando me fortalecer ao longo desta jornada. Esta conquista é de todos nós.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luís Alberto Loureiro dos Santos, pelo suporte, atenção e paciência na orientação ao longo desta jornada, bem como pelo acesso à toda estrutura do Laboratório de Biomateriais e Cerâmicas Avançadas (Labiomat). Agradeço também pelo incentivo ao empreendedorismo, que tem sido uma experiência transformadora em minha vida.

Aos meus colegas de laboratório, que não só me auxiliaram na realização deste trabalho, mas também se tornaram grandes amigos. Estendo meus agradecimentos aos outros laboratórios e aos colegas que contribuíram para a realização das análises, ensaios e com suporte ao trabalho, como Igor, do TECNOCAT, Yásmin, do LACER, Júlia, do Labiomat, a equipe do LAMAT e CMM, e meus colegas da startup Bioplíx P D & I - Soluções em Transformação, Paulo e Dionata.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais (PPGE3M), às responsáveis pela secretaria, Ana Beatriz e Paola, pela disponibilidade e esclarecimento, e ao auxílio necessário. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro por meio da bolsa de mestrado recebida.

## RESUMO

A quitina é um polissacarídeo acetilado predominante em carapaças de crustáceos. A sua forma desacetilada, a quitosana, apresenta propriedades como biocompatibilidade, biodegradabilidade e atividade antimicrobiana, o que possibilita o seu uso em diferentes aplicações. Neste trabalho, realizou-se o processo de beneficiamento das carapaças de crustáceos e, em seguida, foram realizadas as extrações de cinco amostras de quitina provenientes dessas carapaças em diferentes tempos de desmineralização e desproteínização, sendo avaliada a influência desses tempos nas propriedades físico-químicas destes materiais. Posteriormente, foram obtidas duas amostras de quitosana, com e sem congelamento antes da desacetilação química, o que possibilitou investigar a influência desta etapa nas suas propriedades físico-químicas. O rendimento de obtenção da quitina foi de 14,6% para a obtenção de quitina e de 6,75% para a obtenção da quitosana, ambos em base seca. Os resultados de FTIR-ATR confirmaram a presença dos grupos funcionais da quitina obtidos sob diferentes tempos de desmineralização e desproteínização. O TGA/DTA indicou três estágios de decomposição do material e sugeriu que a desmineralização prolongada reduz o teor de cinzas. O DSC identificou picos endotérmicos típicos da quitina, e o MEV revelou que o processo químico alterou a morfologia da quitina em relação às cascas beneficiadas, resultando em estruturas menos irregulares. O DRX confirmou a obtenção de cinco amostras de  $\alpha$ -quitina com um alto índice de cristalinidade (superior a 96%). A determinação do nitrogênio total pelo método de Kjeldahl nas cascas beneficiadas e nas cinco amostras de quitina demonstrou a obtenção de materiais com teor de nitrogênio abaixo de 6%, evidenciando a eficácia do processo de beneficiamento. A obtenção da quitosana foi eficaz e observou-se que o congelamento antes da desacetilação favorece a obtenção de um material com maior grau de desacetilação, alcançando 85% em comparação com 77,6% da quitosana não congelada, conforme evidenciado pelos resultados de FTIR. Este processo também reduziu a estabilidade térmica do material, como indicado pelos resultados de TGA/DTA. Além disso, os resultados de DSC e DRX evidenciaram que o congelamento permite a obtenção de uma estrutura mais amorfa. A análise de viscosimetria intrínseca mostrou que o congelamento favorece a obtenção de quitosana de baixo peso molecular, com 26,31kDa.

**Palavras-chave:** Quitina, Quitosana, Desmineralização, Desproteínização, Congelamento.

## ABSTRACT

Chitin is a predominant acetylated polysaccharide in crustacean shells. Its deacetylated form, chitosan, has properties such as biocompatibility, biodegradability, and antimicrobial activity, which allows its use in different applications. In this work, the beneficiation process of crustacean shells was carried out, followed by the extraction of five chitin samples from these shells at different demineralization and deproteinization times, evaluating the influence of these times on the physicochemical properties of these materials. Subsequently, two chitosan samples were obtained, with and without freezing before chemical deacetylation, which allowed the investigation of the influence of this step on their physicochemical properties. The yield of chitin was 14.6% for the obtaining of chitin and 6.75% for the obtaining of chitosan, both on a dry basis. The FTIR-ATR results confirmed the presence of the functional groups of chitin obtained under different demineralization and deproteinization times. The TGA/DTA indicated three stages of material decomposition and suggested that prolonged demineralization reduces the ash content. The DSC identified typical endothermic peaks of chitin, and the SEM revealed that the chemical process altered the morphology of chitin in relation to the beneficiated shells, resulting in less irregular structures. The XRD confirmed the obtaining of five samples of  $\alpha$ -chitin with a high crystallinity index (greater than 96%). The determination of total nitrogen by the Kjeldahl method in the beneficiated shells and in the five chitin samples demonstrated the obtaining of materials with a nitrogen content below 6%, evidencing the effectiveness of the beneficiation process. The obtaining of chitosan was effective and it was observed that freezing before deacetylation favors the obtaining of a material with a higher degree of deacetylation, reaching 85% compared to 77.6% of the non-frozen chitosan, as evidenced by the FTIR results. This process also reduced the thermal stability of the material, as indicated by the TGA/DTA results. In addition, the DSC and XRD results showed that freezing allows the obtaining of a more amorphous structure. The intrinsic viscosity analysis showed that freezing favors the obtaining of low molecular weight chitosan, with 26.31kDa.

**Keywords:** Chitin, Chitosan, Demineralization, Deproteinization, Freezing.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1-</b> Fontes biológicas de quitina.....  | 17 |
| <b>Figura 2-</b> Etapas de obtenção de quitina oriunda de carapaças de crustáceos com extração pelo método químico e biológico.....   | 18 |
| <b>Figura 3-</b> Etapas do processo de extração da quitina a partir carapaças de crustáceos.....  | 19 |
| <b>Figura 4-</b> Cadeia molecular da quitina.....   | 23 |
| <b>Figura 5-</b> Estrutura de diferentes conformações das cadeias de quitina (alfa, beta e gama). ....  | 24 |
| <b>Figura 6-</b> Estrutura polimórfica da $\alpha$ -quitina. ....   | 25 |
| <b>Figura 7-</b> Estrutura polimórfica da $\beta$ -quitina. ....  | 26 |
| <b>Figura 8-</b> Representação das moléculas da quitina e quitosana. ....   | 28 |
| <b>Figura 9-</b> Possíveis modificações da quitosana. ....  | 30 |
| <b>Figura 10-</b> Representação das frações acetiladas e desacetiladas da molécula da quitosana.....  | 32 |
| <b>Figura 11-</b> Propriedades biológicas da quitina, quitosana e derivados. ....   | 37 |
| <b>Figura 12-</b> Principais propriedades dos revestimentos comestíveis aplicados em frutas e vegetais, afetando a permeabilidade ao etileno ( $C_2H_4$ ), água ( $H_2O$ ), oxigénio ( $O_2$ ), e dióxido de carbono ( $CO_2$ ). .... | 44 |
| <b>Figura 13-</b> Etapas para extração da quitina e respectivas análises de caracterização realizadas.  | 45 |
| <b>Figura 14-</b> Etapas para obtenção das amostras de quitosanas e respectivas análises de caracterização realizadas. ....   | 45 |
| <b>Figura 15-</b> Processo de beneficiamento da matéria-prima.....  | 46 |
| <b>Figura 16-</b> Cascas de camarão após processo de lavagem com remoção de sujidades grosseiras. ....  | 47 |
| <b>Figura 17-</b> Cascas de camarão beneficiadas. ....  | 48 |
| <b>Figura 18-</b> Etapas do processo químico de extração de quitina. ....   | 49 |
| <b>Figura 19-</b> Equipamentos utilizados nas etapas de obtenção das amostras de quitina. A Figura 19 A demonstra a realização da etapa de desmineralização e a Figura 19 B demonstra a etapa de desproteínização. ....               | 51 |
| <b>Figura 20-</b> Processo de despigmentação em solução de hipoclorito de sódio representada na Figura 20 A. Na Figura 20 B é possível verificar a quitina após o processo de lavagem e secagem. ....                                 | 52 |
| <b>Figura 21-</b> Sistema para realização da desacetilação química da quitina. ....   | 54 |
| <b>Figura 22-</b> Chiller empregado para recirculação de água no condensador de refluxo. ....   | 55 |
| <b>Figura 23-</b> Demonstração das amostras de quitosana QM6P6F (A) e QM6P6 (B), respectivamente. ....  | 55 |
| <b>Figura 24-</b> Sistema empregado para determinação da viscosidade intrínseca. ....   | 61 |
| <b>Figura 25-</b> Espectro de FTIR-ATR da amostra M1P3. ....  | 64 |
| <b>Figura 26-</b> Espectro de FTIR-ATR da amostra M3P3. ....  | 65 |
| <b>Figura 27-</b> Espectro de FTIR-ATR da amostra M6P3. ....  | 65 |
| <b>Figura 28-</b> Espectro de FTIR-ATR da amostra M6P1. ....  | 66 |
| <b>Figura 29-</b> Espectro de FTIR-ATR da amostra M6P6. ....  | 66 |
| <b>Figura 30-</b> Curvas TGA / DTA de casca de camarão beneficiada.....   | 68 |
| <b>Figura 31-</b> Curvas TGA / DTA das amostras de quitina M1P3, M3P3, M6P3, M6P1 e M6P6. ....  | 70 |
| <b>Figura 32-</b> Curvas de DSC das amostras de quitina. ....   | 73 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 33</b> -Imagens de MEV (magnificação de 500x) da casca de camarão beneficiada “A” (superfície rugosa e com irregularidades) e amostras de quitina: M1P3 “B”, M3P3 “C”, M6P3 “D”, M6P1 “E” e M6P6 “F” (presença de multicamadas, ásperas e compactas). .....         | 76 |
| <b>Figura 34</b> -Imagens de MEV (magnificação de 5.000x) da casca de camarão beneficiada “A” (superfície rugosa e com irregularidades) e amostras de quitina: M1P3 “B”, M3P3 “C”, M6P3 “D”, M6P1 “E” e M6P6 “F” (presença de poros, multicamadas, ásperas e compactas).....  | 77 |
| <b>Figura 35</b> -Imagens de MEV (magnificação de 10.000x) da casca de camarão beneficiada “A” (superfície rugosa e com irregularidades) e amostras de quitina: M1P3 “B”, M3P3 “C”, M6P3 “D”, M6P1 “E” e M6P6 “F” (presença de poros, multicamadas, ásperas e compactas)..... | 77 |
| <b>Figura 36</b> -Padrão de DRX das 5 amostras de quitina confirmando a estrutura cristalina da $\alpha$ -quitina. ....   | 79 |
| <b>Figura 37</b> -Espectros de FTIR das amostras de quitosana QM6P6 e QM6P6F. ....  | 84 |
| <b>Figura 38</b> -Espectro FTIR da amostra QM6P6 obtido com a utilização de pastilha de KBr, exibindo a representação das linhas de base selecionadas. ....   | 86 |
| <b>Figura 39</b> -Espectro FTIR da amostra QM6P6F obtido com a utilização de pastilha de KBr, exibindo a representação das linhas de base selecionadas. ....  | 86 |
| <b>Figura 40</b> -Curvas TGA / DTA da amostra QM6P6 de quitosana. ....  | 89 |
| <b>Figura 41</b> -Curvas TGA / DTA da amostra QM6P6F de quitosana. ....   | 89 |
| <b>Figura 42</b> -Curvas de DSC das amostras de quitosana. ....   | 92 |
| <b>Figura 43</b> -Padrão de DRX das amostras QM6P6 e QM6P6F de quitosana. ....  | 94 |
| <b>Figura 44</b> -Diferença visual da solubilidade das soluções concentradas das amostras de quitosana QM6P6F (A) e QM6P6 (B). ....   | 96 |
| <b>Figura 45</b> -Amostra QM6P6 decantada durante o preparo das soluções diluídas devido à baixa solubilidade no meio. ....   | 96 |
| <b>Figura 46</b> -Viscosidade reduzida ( $n_{sp}/C$ ) em função da concentração (g/mL). ....  | 97 |



## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1-</b> Comparação da produção de quitina de diferentes fontes. ....  | 23 |
| <b>Tabela 2-</b> Condições e respectivos tempos adotados em cada etapa para obtenção de quitina. ....  | 50 |
| <b>Tabela 3-</b> Parâmetros do processo de obtenção de quitosana. ....   | 53 |
| <b>Tabela 4-</b> Rendimento de extração de quitina (amostra M1P3) e de obtenção de quitosana (QM6P6).....  | 63 |
| <b>Tabela 5-</b> Picos de temperatura para cada etapa de decomposição e respectivos % de perda de massa correspondentes às curvas TGA / DTA obtidas. ....                          | 71 |
| <b>Tabela 6-</b> Determinação do índice de cristalinidade das amostras de quitina. ....  | 80 |
| <b>Tabela 7-</b> Teores de nitrogênio total pelo método de Kjeldahl. ....  | 81 |
| <b>Tabela 8-</b> Resultados do %GD para as amostras de quitosana. ....   | 87 |
| <b>Tabela 9-</b> Picos de temperatura para cada etapa de decomposição das amostras de quitosana e respectivos % de perda de massa correspondentes às curvas TGA / DTA obtidas..... | 90 |
| <b>Tabela 10-</b> Transições endo/exotérmicas e temperaturas de pico das amostras de quitosana. ...  | 92 |
| <b>Tabela 12-</b> Resultados de viscosidade intrínseca média e massa molecular viscosimétrica média. ....  | 98 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                              |   |
|------------------------------|---|
| $^{13}\text{C}$ -RMN         | Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13   |
| $\alpha$                     | Constante Viscosimétrica da Equação de Mark-Houwink   |
| $A_{3450}; 1655; 1420; 1320$ | Áreas de absorção do espectro de FTIR em $3450\text{cm}^{-1}$ , $1655\text{cm}^{-1}$ , $1420\text{cm}^{-1}$ e $1320\text{cm}^{-1}$                        |
| Ch <sub>70; 90; 100</sub>    | Quitosana com grau de desacetilação de 71,8%, 89,3% e 98,5%, respectivamente  |
| CCht                         | Quitina como recebida   |
| Cht <sub>25; 50</sub>        | Quitina com grau de desacetilação de 26,9% e 47,5%, respectivamente   |
| DRX                          | Difração de raios X   |
| DSC                          | Do inglês, Differential Scanning Calorimetry (Calorimetria Diferencial de Varredura)  |
| F <sub>C</sub>               | Fator de correção do Ácido Sulfúrico 0,1N   |
| FTIR-ATR                     | Do inglês, Fourier Transform Infrared Spectroscopy - Attenuated Total Reflectance (Espectroscopia de Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada) |
| GlcNAc                       | Unidades de 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose   |
| GlcN                         | Unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose  |
| I <sub>A</sub>               | Intensidades dos Sinais de DRX nas Regiões Amorfas  |
| I <sub>C</sub>               | Intensidades dos Sinais de DRX nas Regiões Cristalinas  |
| I <sub>CR</sub>              | Índice de Cristalinidade  |
| K                            | Constante Viscosimétrica da Equação de Mark-Houwink   |
| kDa                          | Unidade de massa molecular média (quilodalton)  |
| KBr                          | Brometo de potássio   |
| M(1-6)P(1-6)                 | Tempos do processo de desmineralização e desproteíntização variando de 1 a 6 horas para as amostras de quitina  |
| m <sub>amostra</sub>         | Massa de amostra digerida, em gramas  |
| MEV                          | Microscopia Eletrônica de Varredura   |
| M <sub>V</sub>               | Massa Molecular Viscosimétrica Média  |
| M <sub>w</sub>               | Massa Molecular Média   |
| n                            | Viscosidade Intrínseca  |
| n <sub>0</sub>               | Viscosidade do Sistema de Solvente Ácido Acético e Acetato de Sódio (0,3 mol/L e 0,2 mol/L)   |

|                     |   |
|---------------------|---|
| $n_{rel}$           | Viscosidade Relativa  |
| $n_{Red}$           | Viscosidade Reduzida  |
| $n_{Sp}$            | Viscosidade Específica  |
| PPM                 | Partes por milhão   |
| QM6P6               | Quitosana obtida a partir da desacetilação da amostra de quitina que passou por 6 horas de desmineralização e 6 horas de desproteinização                                       |
| QM6P6F              | Quitosana obtida a partir da desacetilação da amostra de quitina previamente congelada em ultrafreezer que passou por 6 horas de desmineralização e 6 horas de desproteinização |
| RPM                 | Rotações por Minuto   |
| $T_G$               | Temperatura de transição vítrea   |
| TGA/DTA             | Do inglês, Thermogravimetric and Differential Thermal Analysis (Análise Termogravimétrica e Diferencial Térmica)  |
| $T_m$               | Temperatura de fusão  |
| $V_{H_2SO_4}$       | Volume, em mL, de Ácido Sulfúrico 0,1N gasto na titulação   |
| %GD                 | Grau de Desacetilação   |
| %GA                 | Grau de Acetilação  |
| %N <sub>TOTAL</sub> | Teor de Nitrogênio Total  |

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 16 |
| 2. OBJETIVOS .....   | 17 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....   | 17 |
| 3.1 QUITINA .....  | 17 |
| 3.1.1 FONTES DE OBTENÇÃO E MÉTODOS DE EXTRAÇÃO .....   | 17 |
| 3.1.2 DESPROTEINIZAÇÃO QUÍMICA .....   | 19 |
| 3.1.3 DESMINERALIZAÇÃO QUÍMICA .....   | 20 |
| 3.1.4 DESPIGMENTAÇÃO .....   | 22 |
| 3.1.5 PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO .....   | 22 |
| 3.1.6 ESTRUTURAS POLIMÓRFICAS .....  | 23 |
| 3.2 QUITOSANA .....  | 27 |
| 3.2.1 OBTENÇÃO DA QUITOSANA POR DESACETILAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA ...  | 31 |
| 3.2.2 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS .....   | 31 |
| 3.2.3 GRAU DE DESACETILAÇÃO .....  | 32 |
| 3.2.4 MASSA MOLECULAR .....  | 33 |
| 3.2.5 VISCOSIDADE .....  | 35 |
| 3.2.6 SOLUBILIDADE .....   | 35 |
| 3.3 APLICAÇÕES DA QUITINA E QUITOSANA .....  | 36 |
| 3.3.1 APLICAÇÕES BIOMÉDICAS .....  | 36 |
| 3.3.2 APLICAÇÕES NA AGRICULTURA .....  | 39 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS .....   | 45 |
| 4.1 BENEFICIAMENTO DA MATÉRIA-PRIMA .....  | 46 |
| 4.2 PROCESSO QUÍMICO DE EXTRAÇÃO DA QUITINA .....  | 48 |
| 4.2.1 DESMINERALIZAÇÃO .....   | 51 |
| 4.2.2 DESPROTEINIZAÇÃO .....   |    |
| 4.2.3 DESPIGMENTAÇÃO .....   | 52 |
| 4.3 DESACETILAÇÃO QUÍMICA DA QUITINA PARA OBTENÇÃO DA QUITOSANA .....  | 53 |
| 4.4 RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO DA QUITINA E OBTENÇÃO DA QUITOSANA .....  | 56 |
| 4.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS MATERIAIS OBTIDOS .....  | 56 |
| 4.5.1 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER<br>COM REFLEXÃO TOTAL ATENUADA (FTIR-ATR) E FTIR POR TRANSMISSÃO ..... | 56 |
| 4.5.2 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA E DIFERENCIAL TÉRMICA (TGA/DTA) .....  | 58 |
| 4.5.3 ANÁLISE DE CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) .....   | 58 |
| 4.5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) .....  | 58 |
| 4.5.5 DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX) E DETERMINAÇÃO DE CRISTALINIDADE .....   | 58 |
| 4.5.6 DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO TOTAL PELO MÉTODO DE KJELDAHL .....   | 59 |
| 4.5.7 VISCOSIDADE INTRÍNSECA .....   | 60 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....  | 63 |
| 5.1 RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO DA QUITINA E OBTENÇÃO DE QUITOSANA .....  | 63 |
| 5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE QUITINA .....   | 64 |

|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 5.2.1 | ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER COM REFLEXÃO TOTAL ATENUADA (FTIR-ATR)..... | 64  |
| 5.2.2 | ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA E DIFERENCIAL TÉRMICA (TGA/DTA) .....   | 67  |
| 5.2.3 | ANÁLISE DE CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC).....   | 72  |
| 5.2.4 | MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....  | 75  |
| 5.2.5 | ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX) E DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE CRISTALINIDADE.....                    | 78  |
| 5.2.6 | DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO TOTAL PELO MÉTODO DE KJELDAHL .....  | 81  |
| 5.3   | CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE QUITOSANA .....  | 83  |
| 5.3.1 | ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) POR TRANSMISSÃO .....                | 83  |
| 5.3.2 | ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA E DIFERENCIAL TÉRMICA (TGA/DTA) .....   | 88  |
| 5.3.3 | ANÁLISE DE CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC).....   | 91  |
| 5.3.4 | ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX) E DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE CRISTALINIDADE.....                    | 93  |
| 5.3.5 | VISCOSIDADE INTRÍNSECA .....  | 95  |
| 6.    | CONCLUSÃO.....  | 99  |
| 7.    | SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....   | 102 |
| 8.    | REFERÊNCIAS .....   | 103 |

# 1. INTRODUÇÃO

A quitina, um polissacarídeo acetilado composto por unidades de N-acetil-d-glucosamina ligadas por ligações  $\beta(1 \rightarrow 4)$ , é o segundo polímero natural mais abundante, superado apenas pela celulose (RINAUDO, 2006). Este composto é extraído principalmente das carapaças de crustáceos, como camarões, caranguejos e siris, além de exoesqueletos de insetos e paredes celulares de fungos. A quitosana, derivada da quitina, se destaca pela sua solubilidade superior comparada à quitina, ampliando seu uso em áreas como a produção de fertilizantes, a indústria química, o setor alimentício e a medicina (PELLIS; GUEBITZ; NYANHONGO, 2022; SANTOS, *et al.*, 2019).

Caracterizada por sua biodegradabilidade, compatibilidade com organismos vivos, baixa toxicidade e eficácia na coagulação sanguínea, além de atividade antimicrobiana, a quitosana tem aplicações promissoras em diversos setores (ESSAWY; HEFNI; EL-NGGAR, 2019). Sua utilidade se estende à indústria têxtil e de papel, no tratamento de águas residuais e na agricultura, onde atua como biopesticida possibilitando o controle sobre fungos e bactérias. Também é utilizada como elicitador e bioestimulante de plantas, contribuindo para um desenvolvimento agrícola mais produtivo e sustentável. As aplicações da quitosana como biomaterial são valorizadas devido à sua biocompatibilidade, baixa toxicidade e capacidade de biodegradação (MALIKI, *et al.*, 2022; LI, K., *et al.*, 2020).

Em termos de economia circular, o processo de produção de quitina e quitosana é um excelente exemplo de sua aplicabilidade. Uma vez que os resíduos de carapaças de crustáceos, um potencial agente poluidor do meio ambiente, são reutilizados como matéria-prima para o desenvolvimento de bens de consumo. (TRIUNFO, *et al.*, 2022). Encontrar bons fornecedores de quitina e quitosana a um bom custo é muitas vezes desafiador, haja vista que muitos produtos comerciais encontrados contêm principalmente carbonato de cálcio e outras impurezas. Contudo, técnicas adequadas de processamento químico, como desmineralização e desproteínização, garantem a obtenção de materiais com elevada pureza e sem a presença de minerais indesejados (JUNCEDA-MENA; GARCÍA-JUNCEDA; REVUELTA, 2023).

Apesar do Nordeste brasileiro ser fundamental na produção de crustáceos, na região Sul, especialmente em Santa Catarina, também se observa um avanço significativo. O camarão criado em viveiros, da espécie *Litopenaeus vannamei*, é uma espécie marinha exótica que foi introduzida no Brasil na década de 1980 e se adaptou muito bem às nossas condições (AHIM; DAMACENO; ARAÚJO, 2019). A crescente produção de camarão em viveiros nesta região proporciona uma fonte de matéria-prima mais controlada e acessível, otimizando a extração e processamento desses materiais (VALENTI, *et al.*, 2021).

Os processos de extração de quitina e obtenção de quitosana de carapaças do camarão do Pacífico *Litopenaeus vannamei* não são totalmente conhecidos, especialmente quando aplicadas diferentes condições de processamento (PHILIBERT; LEE; FABIEN, 2017; PELLIS; GUEBITZ; NYANHONGO, 2022). Por isso, o objetivo deste trabalho foi aprofundar o entendimento de como cada etapa do processo influencia as características finais dos produtos e seu impacto nas potenciais aplicações, incluindo a utilização de diferentes tempos para desmineralização e desproteínização na extração da quitina, além do emprego de congelamento prévio à desacetilação para a produção de quitosana.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência dos parâmetros de processamento na obtenção de quitina e quitosana provenientes das carapaças do camarão do Pacífico *Litopenaeus vannamei*, tendo como objetivos específicos:

- Determinar o rendimento de extração da quitina e obtenção de quitosana;
- Realizar as extrações de quitina aplicando diferentes tempos de desmineralização e desproteínização e avaliar a influência deste parâmetro nas propriedades tecnológicas deste material, como teor de cinzas, teor de nitrogênio total, morfologia e cristalinidade;
- Obter a quitosana e avaliar a influência do congelamento da quitina em solução de hidróxido de sódio concentrado antes da etapa de desacetilação química em propriedades tecnológicas como o grau de desacetilação (%GD), o índice de cristalinidade ( $I_{CR}$ ) e a massa molecular viscosimétrica média ( $M_V$ ).



### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 QUITINA

##### 3.1.1 FONTES DE OBTENÇÃO E MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

A quitina foi identificada pela primeira vez no ano de 1811 por Henri Braconnot. É um carboidrato complexo formado por cadeias de N-acetilglucosamina e normalmente está presente nas carapaças de lagostas, caranguejos, camarões, nos exoesqueletos de insetos e paredes celulares de fungos, como mostrado na Figura 1. Este biopolímero está presente na natureza em grande quantidade e apenas a celulose o supera em termos de disponibilidade (RINAUDO, 2006). Geralmente, este biopolímero acetilado é formado por cadeias de N-acetil-D-glucosamina ligadas por uma ligação  $\beta(1 \rightarrow 4)$  (VERMA; FORTUNATI, 2019). Comercialmente, a quitina pode ser obtida por meio de uma série de processos de desproteínização e desmineralização para remover proteínas e minerais que, junto com a quitina, formam a estrutura das carapaças desses animais. A massa seca desses resíduos de carapaças contém tipicamente cerca de 15-25% de quitina (QIN, 2016).

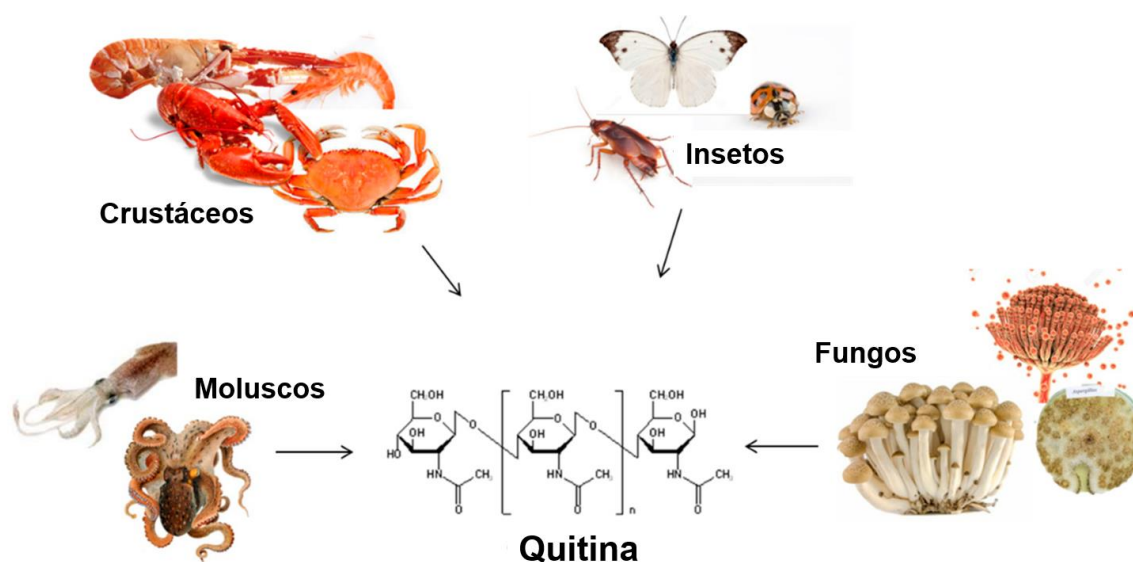
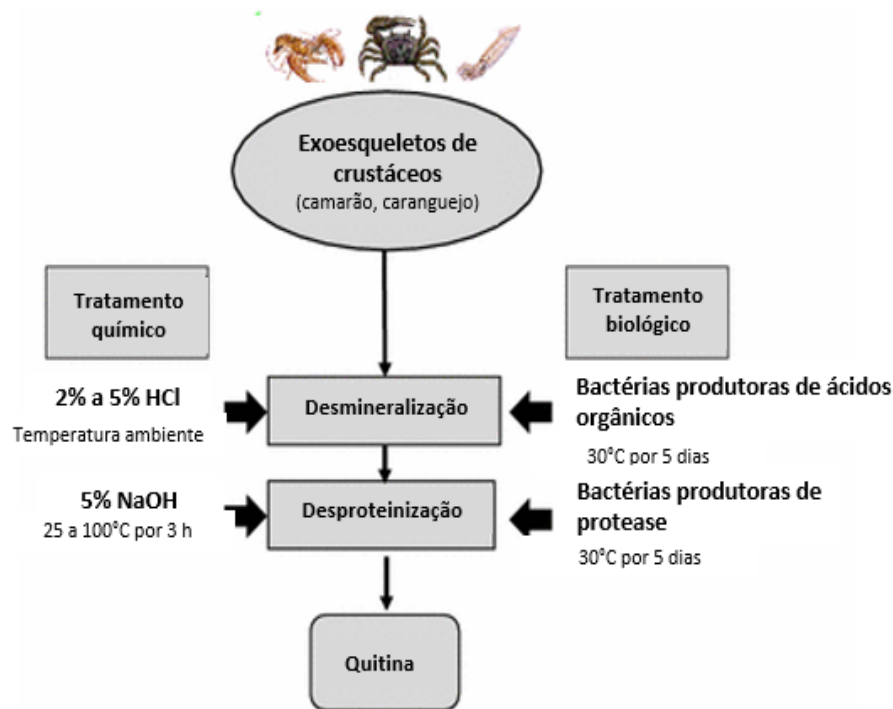


Figura 1- Fontes biológicas de quitina.

Adaptado de MADDALONI; VASSALINI; ALESSANDRI, 2020.

A remoção de minerais presentes nas carapaças de crustáceos é realizada comumente com ácido clorídrico diluído, e o cálcio é convertido em sais que são removidos por filtração. A desproteínização é feita utilizando bases como hidróxido de sódio. A despigmentação pode ser realizada com solução diluída de hipoclorito de sódio. Além disso, a extração da quitina pode ser feita por meio de um processo biológico, que consiste em etapas de desmineralização e desproteínização, realizadas por bactérias produtoras de ácidos orgânicos e protease, respectivamente em cada uma dessas etapas. Este método resulta em uma produção segura e controlada (GIRI *et al.*, 2021). Os processos químico e biológico típicos de obtenção da quitina oriunda das carapaças de crustáceos estão ilustrados na Figura 2.

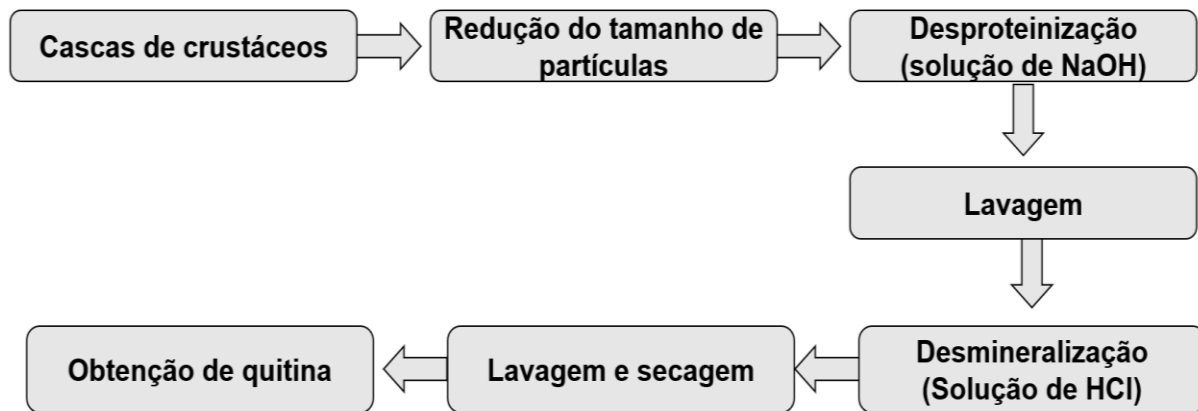


**Figura 2-** Etapas de obtenção de quitina oriunda de carapaças de crustáceos com extração pelo método químico e biológico.

Adaptado de KIM; PARK, 2015.

As etapas de desmineralização e desproteínização também podem ser realizadas em ordem inversa, no entanto, se a recuperação de proteínas for um objetivo, recomenda-se extrair as proteínas antes da desmineralização para maximizar o rendimento proteico e a qualidade (JOHNSON; PENISTON, 1982). O

fluxograma para o isolamento da quitina, por tratamento químico está apresentado na Figura 3.



**Figura 3-** Etapas do processo de extração da quitina a partir carapaças de crustáceos.

Adaptado de NO; MEYERS, 1995.

Em caranguejos e camarões, a quitina faz parte de uma complexa malha proteica, na qual se acumula carbonato de cálcio para constituir o exoesqueleto resistente. A conexão entre a quitina e as proteínas é intensa, havendo ainda uma fração minoritária de proteínas que participa de uma matriz complexa com o polissacarídeo (HORST; WALKER; KLAR, 1993). A fermentação bacteriana também é utilizada; neste caso, os processos de remoção de proteínas e minerais acontecem conjuntamente (NO; MEYERS, 1995; YOUNES; RINAUDO, 2015).

A etapa inicial da extração da quitina é a escolha adequada da matéria-prima, que é crucial para o resultado do processo. Em casos como o de lagostas e caranguejos, essa seleção tem um papel fundamental na qualidade do material isolado obtido. O procedimento ideal envolve a escolha de conchas de tamanho uniforme e da mesma espécie. Para camarões, que possuem carapaças mais finas, o processo de isolamento da quitina tende a ser mais fácil do que com outros crustáceos (HORST; WALKER; KLAR, 1993; YOUNES; RINAUDO, 2015).

### 3.1.2 DESPROTEINIZAÇÃO QUÍMICA

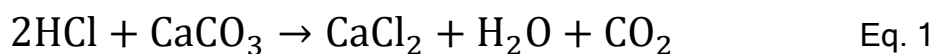
O procedimento para retirar proteínas envolve desfazer as ligações químicas entre a quitina e as proteínas. Esta etapa é realizada de maneira desigual, empregando-se compostos químicos que também podem fragmentar o biopolímero. A

eliminação completa da proteína é essencial para aplicações na área de saúde, como biomateriais, visto que uma parcela da população humana é sensível a crustáceos, sendo a parte proteica o principal agente alergênico (AYE; STEVENS, 2004; LOPES *et al.*, 2018).

As estratégias químicas foram os primeiros métodos empregados na desproteínização. Uma extensa variedade de agentes químicos foi testada para essa fase, englobando hidróxido de sódio, carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, hidróxido de potássio, carbonato de potássio, hidróxido de cálcio, sulfito de sódio, bissulfito de sódio, bissulfito de cálcio, fosfato de sódio tribásico e sulfeto de sódio. As condições de cada reação diferem marcadamente em cada pesquisa. O hidróxido de sódio é comumente o reagente preferido, sendo aplicado em concentrações que oscilam entre 0,125 a 5,0 molar, em temperaturas que podem alcançar até 160°C e durante tempos que variam de alguns minutos até diversos dias. A utilização do hidróxido de sódio pode provocar a desacetilação parcial da quitina e a sua subsequente hidrólise, provocando a redução do peso molecular do polímero, que pode ser favorável ou não para determinadas aplicações. Em aplicações em que propriedades antimicrobianas são requeridas, a redução do peso molecular é favorável. Por outro lado, quando são necessárias propriedades como maior viscosidade, o maior peso molecular é mais favorável (YOUNES; RINAUDO, 2015; TOKATLI; DEMİRDÖVEN, 2018).

### 3.1.3 DESMINERALIZAÇÃO QUÍMICA

O processo de desmineralização consiste na eliminação de minerais, principalmente carbonato de cálcio. Usualmente, é feito por tratamento ácido empregando reagentes tais como ácido clorídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido acético e ácido fórmico (NO; HUR, 1998; PERCOT; VITON; DOMARD, 2003). Dentre estes ácidos, o ácido clorídrico diluído é frequentemente escolhido. A desmineralização é realizada com a quebra do carbonato de cálcio em sais de cálcio que são solúveis em água com a liberação de dióxido de carbono, conforme ilustrado na Equação 1.



Os demais minerais presentes reagem de maneira similar, originando sais que são solúveis na presença de ácido, que podem ser separados por meio de filtração da fase sólida da quitina, seguida de lavagem com água deionizada. Os procedimentos de desmineralização são frequentemente baseados na experiência e variam de acordo com o nível de minerais na matéria-prima, o período de extração, a temperatura, o tamanho das partículas, a concentração do ácido e a proporção soluto/solvente. A remoção completa depende da quantidade de ácido, dado que duas moléculas de ácido clorídrico são necessárias para transformar uma molécula de carbonato de cálcio em cloreto de cálcio (JOHNSON; PENISTON, 1982; SHAHIDI; SYNOWIECKI, 1991). Devido à dificuldade de remover todos os minerais pela heterogeneidade do sólido, utiliza-se um volume maior ou uma solução de ácido mais concentrada. O processo de desmineralização pode ser acompanhado por titulação ácida, com a mudança do pH para neutralidade indicando a conclusão do uso de ácido, enquanto a persistência de acidez sinaliza a continuidade da reação (TOLAIMATE *et al.*, 2003).

A desmineralização com HCl pode ser geralmente alcançada em 2 a 3 horas sob agitação (JOHNSON; PENISTON, 1982). No entanto, o tempo de reação pode variar de 15 minutos a 48 horas dependendo do método de preparação (PERCOT; VITON; DOMARD, 2003). Um tempo de desmineralização mais longo, de até vários dias, resulta numa ligeira redução do teor de cinzas, mas também pode causar a degradação do polímero (OKAFOR, 1965; SHIMAHARA; OHKOUCHI; IKEDA, 1992).

Elevadas temperaturas potencializam o processo de remoção de minerais, pois facilitam a infiltração do solvente na estrutura da quitina. Portanto, algumas reações para extrair os minerais são efetuadas em ambientes de maior temperatura (TRUONG *et al.*, 2007). Ademais, a incursão do solvente na estrutura da quitina é grandemente influenciada pela dimensão das partículas. O sucesso na extração dos minerais está vinculado à superfície de contato entre a estrutura de quitina e o solvente. No entanto, temperaturas altas, períodos de processamento extensos e concentrações elevadas de ácido afetam as características físico-químicas finais da quitina obtida (MARQUIS-DUVAL, 2008).

### 3.1.4 DESPIGMENTAÇÃO

Procedimentos ácidos e alcalinos, isoladamente, tendem a produzir quitina pigmentada. Para obter quitina incolor, os pigmentos podem ser retirados empregando diversos agentes. Estes incluem etanol e éter (HACKMAN, 1954), preparado aquoso de hipoclorito de sódio com 0,5% de cloro ativo (BLUMBERG *et al.*, 1951), acetona pura (KAMASASTRI; PRABHU, 1961; MIMA *et al.*, 1983), triclorometano (ANDERSON *et al.*, 1978), peróxido de hidrogênio (BRINE; AUSTIN, 1981; MOORJANI *et al.*, 1975), acetato de etila (BREZSKI, 1982), ou uma sequência de tratamento com acetona seguida de um composto aquoso de hipoclorito de sódio (NO *et al.*, 1989). Como ilustração, HACKMAN (1954) obteve uma quitina de tom creme de lagosta com a lavagem com etanol e éter. NO *et al.* (1989) conseguiram uma quitina branca de lagosta, inicialmente extraída com acetona e depois branqueada com um preparado aquoso de hipoclorito de sódio a 0,315%. A cor da quitina resultante pode variar de branco a rosa.

### 3.1.5 PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO

No estudo realizado por TOLAIMATE *et al.*, (2003), foi sugerida uma abordagem inovadora que utiliza banhos sequenciais com baixas concentrações de ácido clorídrico (0,55 M) e hidróxido de sódio (0,3 M). A quantidade total de banhos varia dependendo da espécie animal de onde a matéria-prima é derivada. Este método provou ser eficiente na diminuição de proteínas e minerais, bem como na manutenção da forma original da quitina em 12 espécies distintas de crustáceos e celacantos, como ilustrado na Tabela 1. Os graus de acetilação das quitinas produzidas foram determinados utilizando a técnica de ressonância magnética nuclear de carbono-13 (<sup>13</sup>C-RMN), variando entre 96% e 100% para todas as espécies. Por exemplo, para as carapaças do camarão, a quitina extraída apresentou 100% de acetilação. Até o presente momento, esse alto grau de acetilação não havia sido relatado na literatura (YOUNES; RINAUDO, 2015).

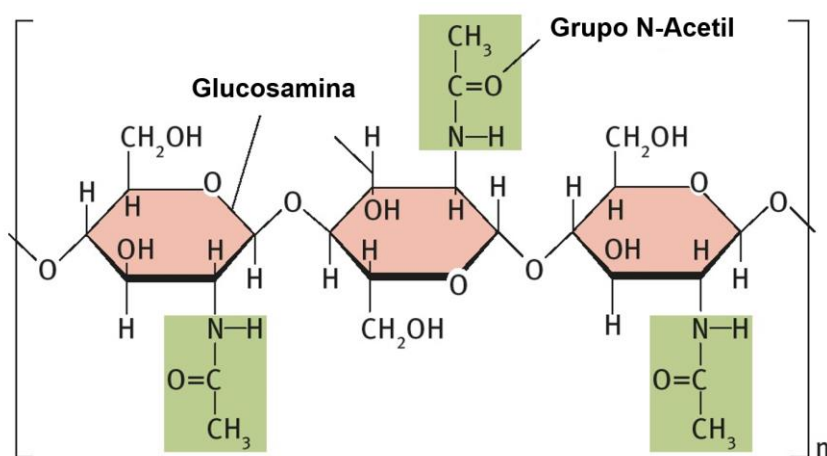
**Tabela 1-** Comparação da produção de quitina de diferentes fontes.

| Fonte biológica (crustáceos) |                       | Número de banhos para desproteinização (NaOH; 3M; 80°C; 1h) | Número de banhos para desmineralização (HCl; 0,55 M; 25°C; 2h) | Grau de acetilação (%GA) |
|------------------------------|-----------------------|---|--|--------------------------|
| <b>Cirripedia</b>            | <b>Anatife</b>        | 4   | 2  | 100                      |
| <b>Reptantia Brachyura</b>   | Caranguejo vermelho   | 3   | 5  | 97                       |
|                              | Caranguejo marmoreado | 3   | 3  | 99                       |
|                              | Caranguejo aranha     | 3   | 3  | 96                       |
| <b>Reptantia Macrura</b>     | Lagosta               | 3   | 3  | --                       |
|                              | Lagostim              | 7   | 3  | 100                      |
|                              | Lagosta "Slipper"     | 3   | 2  | --                       |
|                              | Lagostim de água doce | 3   | 2  | --                       |
| <b>Natantia</b>              | Camarão rosa          | 3   | 3  | 100                      |
|                              | Camarão cinza         | 2   | 2  | 100                      |
| <b>Stomatopoda</b>           | Squilla               | 3   | 3  | 100                      |
| <b>Cephalopoda</b>           | Lula                  | 2   | 2  | 100                      |

Adaptado de TOLAIMATE *et al.*, 2003.

### 3.1.6 ESTRUTURAS POLIMÓRFICAS

A quitina, um polissacarídeo (aminoglicano) composto por unidades de N-acetil-D-glicosamina unidas em  $\beta(1-4)$  (Figura 4), é encontrada nos revestimentos externos, nas membranas de proteção de muitos invertebrados e nas estruturas celulares de algas verdes, além de alguns fungos e leveduras (FRANCESKO *et al.*, 2010).



**Figura 4-** Cadeia molecular da quitina.

Adaptado de BEREZINA, 2016.

A quitina é estruturalmente e funcionalmente semelhante à celulose, ocorre naturalmente em três formas distintas: alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) e gama ( $\gamma$ ), cada uma com diferentes orientações de microfibrilas de quitina (RUDALL, 1963). A forma alfa, composta por cadeias antiparalelas, é a mais comum na natureza e pode ser encontrada em exoesqueletos de crustáceos, conchas de moluscos e cutículas de insetos. Também está presente nas paredes celulares dos fungos (GARDNER; BLACKWELL, 1975; KAMEDA *et al.*, 2005). A forma beta é formada por cadeias paralelas e é menos comum. Pode ser encontrada nos gládios (conchas) das lulas e nas espinhas extracelulares das diatomáceas (microorganismos unicelulares que habitam ambientes úmidos e aquáticos) (HERTH; BARTHLOTT, 1979), assim como nos tubos dos pogonóforos (animais marinhos vermiformes e tubícolas) (BLACKWELL, 1969). A forma gama é composta tanto por cadeias paralelas quanto antiparalelas e está presente nos casulos dos insetos (RUDALL; KENCHINGTON, 1973). Na natureza, a quitina raramente é encontrada em sua forma pura; geralmente está associada às proteínas nas matrizes (KNORR, 1982). As três estruturas polimórficas da quitina são mostradas na Figura 5.

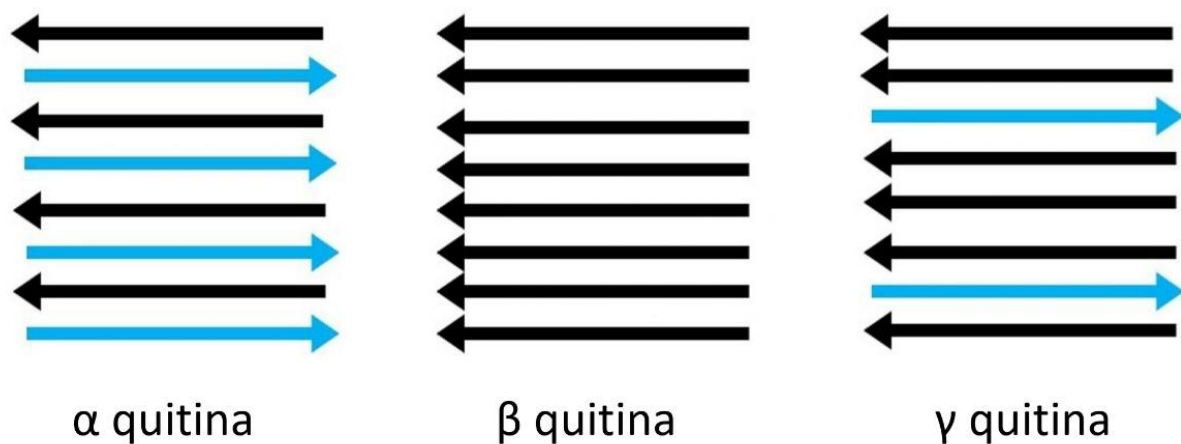


Figura 5- Estrutura de diferentes conformações das cadeias de quitina (alfa, beta e gama).

Adaptado de PAKIZEH; MORADI; GHASSEMI, 2021.

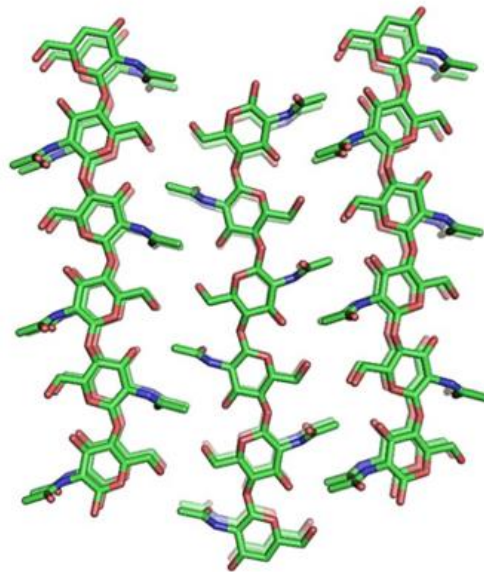
As três formas cristalinas alomórficas, denominadas alfa, beta e gama, identificadas por estudos de difração de raios X (ROBERTS, 1992; SUKSANGPANYA *et al.*, 2017), exibem características e propriedades variadas que influenciam a função da quitina em tecidos e funções fisiológicas dos seres vivos que contêm esse material



em sua estrutura. Por exemplo, a estrutura rígida dos camarões mantis (*Stomatopoda*) é definida pela presença de fibras de quitina organizadas em uma estrutura espiral torcida da quitina, seguida por mineralização e ligação com proteínas (SUKSANGPANYA *et al.*, 2017). Esta configuração específica proporciona ao camarão mantis propriedades mecânicas notáveis, permitindo flexibilidade, tenacidade e resistência ao impacto, além de exibir uma adaptação evolutiva significativa para defesa e predação (ZHANG *et al.*, 2016).

A variante alfa da quitina é a mais estável, com cadeias de polímeros organizadas de forma antiparalela, resultando em fortes ligações de hidrogênio, conforme ilustrado na Figura 6 (SIKORSKI; HORI; WADA, 2009). A estrutura da  $\alpha$ -quitina tem um grupo espacial ortorrômbico  $P2_12_12_1$  com uma célula unitária de dimensões  $a = 4,74 \text{ \AA}$ ,  $b = 18,86 \text{ \AA}$  e  $c$  (eixo da fibra)  $= 10,32 \text{ \AA}$  (MINKE; BLACKWELL, 1978; BECKHAM; CROWLEY, 2011; ROBERTS, 1992; SUKSANGPANYA *et al.*, 2017).

Estrutura polimórfica de  $\alpha$  quitina

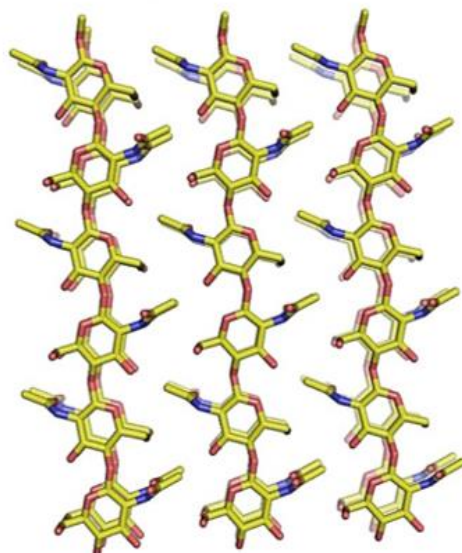


**Figura 6**-Estrutura polimórfica da  $\alpha$ -quitina.  
Adaptado de HOU; AYDEMIR; DUMANLI, 2021.

As cadeias de polímeros da forma beta estão dispostas de maneira paralela, como mostrado na Figura 7. As ligações de hidrogênio (uma por célula unitária) entre as cadeias cristalizam-se no grupo espacial monoclinico  $P2_1$ . A célula unitária monoclinica dessa cadeia tem dimensões  $a = 4,85 \text{ \AA}$ ,  $b = 9,26 \text{ \AA}$  e  $c$  (eixo da fibra) =

10,38 Å, com um ângulo  $\gamma$  de 97,5° (NISHIYAMA; NOISHIKI; WADA, M., 2011; CHIRIBOGA; LEDUFF; RORRER, 2020; HAJJI *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2019).

#### Estrutura polimórfica de $\beta$ quitina



**Figura 7**-Estrutura polimórfica da  $\beta$ -quitina.

Adaptado de HOU; AYDEMIR; DUMANLI, 2021.

A configuração das cadeias de  $\beta$ -quitina é semelhante à polaridade da cadeia paralela encontrada nas estruturas polimórficas de celulose. Um aspecto notável é que enquanto a maioria dos cristais de polissacarídeo naturais exibe uma estrutura paralela, o polimorfo estável e comum da quitina, a  $\alpha$ -quitina, apresenta uma configuração de cadeia antiparalela e polaridade, sendo que o entendimento dos processos de polimerização ainda é limitado (HOU; AYDEMIR; DUMANLI, 2021). O alinhamento da cadeia polimérica da  $\alpha$ -quitina é resultado da presença de uma estrutura agregada formada por ligações de hidrogênio. Por outro lado, a  $\beta$ -quitina possui uma estrutura mais flexível e quimicamente "aberta", e os grupos funcionais da quitina estão orientados de maneira a permitir uma maior atividade química.

Em relação à terceira forma polimórfica da quitina, a  $\gamma$ -quitina, a disposição das cadeias poliméricas e da estrutura cristalina é um pouco mais complexa, consistindo em três cadeias de quitina com cadeias de polímeros paralelas e antiparalelas alternadas (DAS; ROY; SEN, 2016). Comparada às estruturas  $\alpha$  e  $\beta$ , a ocorrência da estrutura  $\gamma$  não é tão comum, sendo relatada em alguns estudos apenas

na presença de fibras de casulo de escaravelho (MOUSSIAN, 2019). Esta estrutura também pertence ao grupo espacial monoclinico  $P2_1$ , com dimensões de célula unitária  $a = 4,7 \text{ \AA}$ ,  $b = 10,3 \text{ \AA}$  e  $c$  (eixo das fibras)  $= 28,4 \text{ \AA}$  e  $\beta = 90^\circ$  (ROBERTS, 1992).

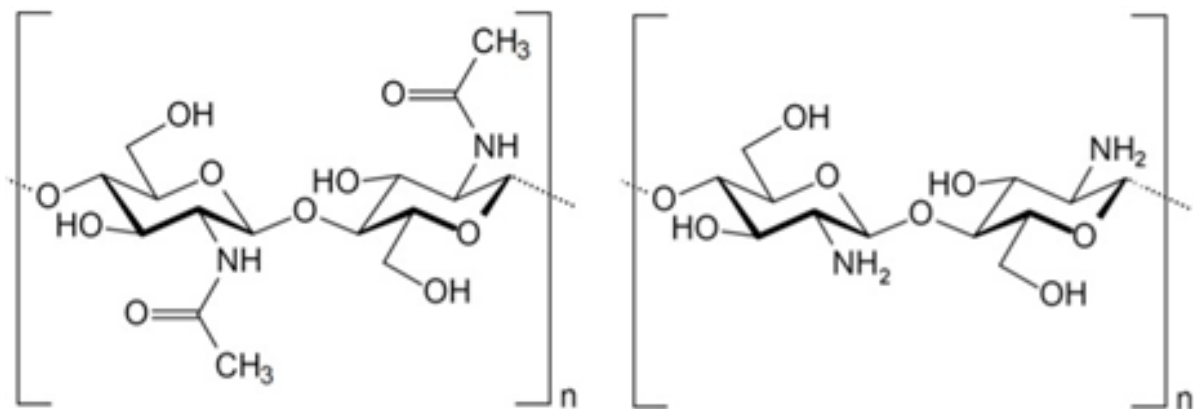
Estudos indicam que, embora a  $\gamma$ -quitina seja distinta das demais, ela possui uma estrutura similar à  $\alpha$ -quitina. A difração de raios X (DRX) é frequentemente utilizada para distinguir essas estruturas, e pode ser complementada por outras técnicas como microscopia eletrônica de varredura (MEV), calorimetria diferencial de varredura (DSC), espectroscopia de infravermelho (FTIR), análise termogravimétrica (TGA), espectroscopia Raman. As análises de FTIR e espectroscopia Raman auxiliam na confirmação da semelhança estrutural entre  $\gamma$ -quitina e  $\alpha$ -quitina. Além disso, o MEV revela a existência de nanofibras nas estruturas de alfa-quitina e beta-quitina, enquanto a gama-quitina é distinguida por ter microfibras em sua superfície (KAYA *et al.*, 2017).

CAMPANA-FILHO *et al.*, (2007) destacaram que a  $\alpha$ -quitina possui uma cristalinidade superior à  $\beta$ -quitina, conforme evidenciado pela análise de DRX e FTIR. Essas técnicas também confirmam a variação estrutural entre elas, apesar das semelhanças existentes. A maioria dos solventes não consegue dissolver as estruturas da  $\alpha$ -quitina e  $\beta$ -quitina, exibindo uma solubilidade restrita e lenta em substâncias limitadas, como ácido fórmico anidro e ácidos fortes concentrados. Adicionalmente, a dissolução em ambientes de alta acidez pode resultar na despolimerização da estrutura. Mesmo após um período extenso de tentativas de solubilização, a  $\beta$ -quitina se dissolve em um intervalo mais curto do que a  $\alpha$ -quitina e mostra uma habilidade aumentada para absorver umidade - uma propriedade ligada à sua menor cristalinidade quando comparada à  $\alpha$ -quitina.

## 3.2 QUITOSANA

Nos últimos anos, a quitosana tem sido altamente notada por suas características e propriedades, que englobam biocompatibilidade, biodegradabilidade, atividade antimicrobiana e a habilidade de auxiliar em processos de cicatrização na engenharia de tecidos. O interesse na quitosana é ampliado pela sua capacidade de criar filmes e pela possibilidade de ser alterada tanto física quanto quimicamente (HUA *et al.*, 2021; KUMARIHAMI *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2021).

A quitosana é produzida por processo de desacetilação da quitina e comercialmente tem geralmente uma massa molar em torno de 100g/mol (AGUILA-ALMANZA *et al.*, 2021; MOURA *et al.*, 2011). As estruturas da quitina e da quitosana são formadas por unidades de 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose (GlcNAc) e 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose (GlcN) ligadas por ligações glicosídicas  $\beta(1\rightarrow4)$ . Contudo, os polímeros exibem variações na proporção relativa dessas unidades, afetando assim a solubilidade dos materiais. Por exemplo, a quitina é insolúvel na maioria dos solventes devido à predominância das unidades de GlcNAc, enquanto a quitosana, que possui uma maior proporção de unidades GlcN, é solúvel em meio ácido (GUINESI; CAVALHEIRO, 2006; PAVONI; LUCHESE; TESSARO, 2019). Durante o processo de desacetilação ocorre a transformação dos grupos acetamida em grupos amino como mostrado na Figura 8 (YOUNES; RINAUDO, 2015).



**Figura 8-** Representação das moléculas da quitina e quitosana.

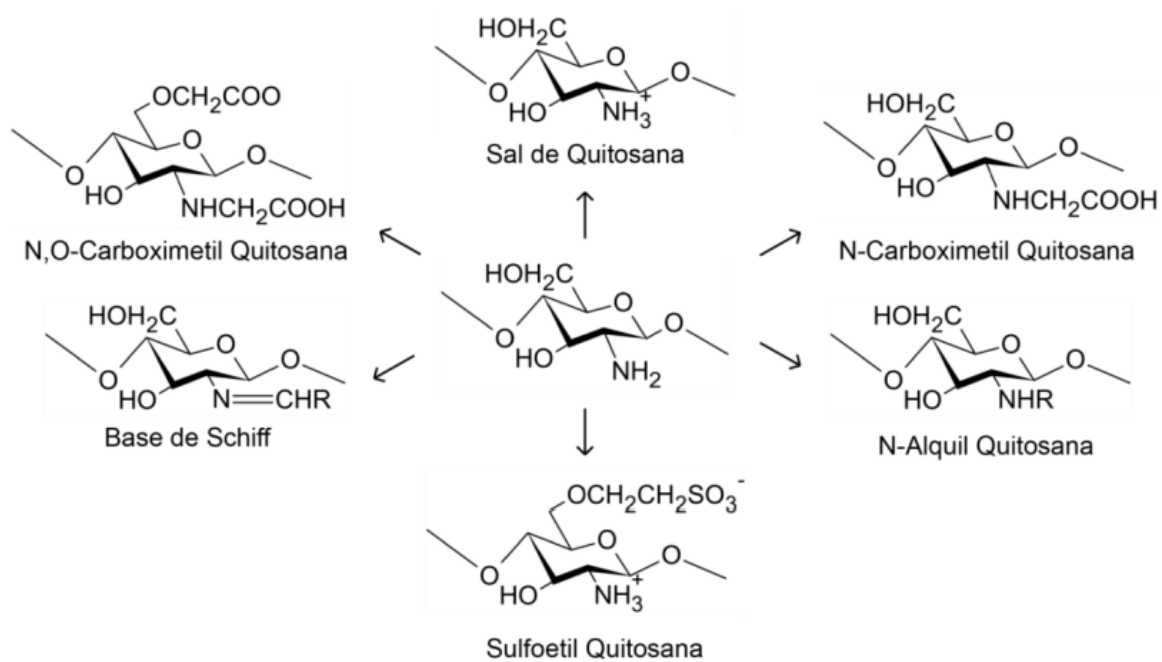
Adaptado de YOUNES; RINAUDO, 2015.

A presença do grupo livre  $\text{NH}_2$  na porção GlcN da quitosana aumenta sua reatividade química e bioquímica em comparação à quitina. O incremento na reatividade da quitosana deve-se ao caráter catiônico do grupo amina livre. Esse aspecto contribui para propriedades como biocompatibilidade, baixa toxicidade, biodegradabilidade e atividade antimicrobiana, despertando interesse crescente na utilização da quitosana em diversas aplicações nas áreas de agricultura, alimentos, biomedicina, cosmética, entre outras (MORIN-CRINI *et al.*, 2019). Para avaliar a capacidade da quitosana em uma aplicação específica, é crucial a identificação de suas características físicas (solubilidade, densidade, dimensão das partículas e viscosidade), químicas (pH, nível de desacetilação, habilidade de retenção de água,

peso molecular) e biológicas (biocompatibilidade, citotoxicidade, pirogenicidade) (RIANDE, 2000).

A transformação da quitina em quitosana ocorre por um procedimento adicional de desacetilação, utilizando soluções alcalinas para transformar, em diferentes níveis, os grupos acetamido ( $\text{NHCOCH}_3$ ) em grupos amino ( $\text{NH}_2$ ). À medida que o grau de desacetilação (GD) da quitina aproxima-se de 50%, dependendo da origem biológica do polímero, ela torna-se solúvel em soluções aquosas acidificadas e passa a ser denominada quitosana (QAVAMI *et al.*, 2017; BRASSELET *et al.*, 2019). As variações de processo e estruturas polimórficas justificam a complexidade do processamento e as diferenças nas propriedades químicas da quitosana, mesmo quando produzida da mesma fonte biológica (KOU; PETERS; MUCALO, 2021).

Em comparação com outros biopolímeros, a quitosana é notável por seu caráter catiônico, em contraste com a maioria que apresenta caráter neutro (como amido, dextrana e celulose) ou aniônico (carragenina, xantana e alginato). Tal particularidade é responsável pelas propriedades exclusivas da quitosana, incluindo métodos específicos para entrelaçar suas cadeias (SANTOS *et al.*, 2003). A solubilização da quitosana normalmente se dá com ácidos orgânicos, como fórmico e acético, embora também possa ser efetuada em ácidos inorgânicos diluídos, tais como nítrico, clorídrico, perclórico e fosfórico. A hidratação da quitosana em meio aquoso é otimizada após sua solução em ambiente ácido, uma vez que os grupos amino livres se protonam, agregando versatilidade química ao composto e possibilitando alterações, como a geração de sais de quitosana, N-alquilação, N-carboxilação, N-sulfonação e bases de Schiff com cetonas e aldeídos, conforme demonstrado na Figura 9 (FILHO; SIGNINI; CARDOSO, 2007).



**Figura 9-** Possíveis modificações da quitosana.

Adaptado de FILHO; SIGNINI; CARDOSO, 2007.

As modificações químicas em quitosana conduzem à obtenção de características e propriedades específicas. Os derivados carboximetilquitosana (N-, O- e O,N-carboximetilquitosana), por exemplo, são solúveis em amplo espectro de pH, tornando-os adequados para aplicações médicas e farmacêuticas (ABREU; CAMPANA-FILHO, 2005). Em contrapartida, os sais quaternários de amônio em quitosana adicionam cargas positivas permanentes nas cadeias poliméricas devido à quaternização dos átomos de nitrogênio dos grupos amino. A TMQ (N,N,N-trimetilquitosana) é solúvel numa extensa faixa de pH, exibindo potencial para facilitar a absorção intestinal de fármacos (CURTI; DE BRITTO; CAMPANA-FILHO, 2003; SENRA, 2015). Embora as modificações químicas em quitosana ocorram majoritariamente nos grupos amino, as hidroxilas presentes também são suscetíveis a alterações estruturais (GONÇALVES; ARAÚJO, 2011). Tais mudanças estruturais influenciam aspectos como solubilidade, cristalinidade, grau de desacetilação e massa molar, fatores que afetam a capacidade do polímero de formar filmes (PAVONI; LUCHESE; TESSARO, 2019).

### 3.2.1 OBTENÇÃO DA QUITOSANA POR DESACETILAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA

A quitina pode ser processada de forma homogênea ou heterogênea. No método homogêneo, a quitina é dissolvida em álcali concentrado a 25 °C durante 3 horas e, após isso, dispersa em gelo a cerca de 0 °C (ZAMANI; TAHERZADEH, 2010). No processo heterogêneo, a quitina é tratada com uma solução alcalina quente de alta concentração e, em seguida, lavada com água destilada em temperatura ambiente até que o pH seja neutralizado. Existe dificuldade para obter quitosana com um alto grau de desacetilação. A adição de tiofenol como catalisador durante este processo ajuda a minimizar a degradação do polímero, pois retém o oxigênio e melhora o processo efetivo de desacetilação. Um processo eficaz de desacetilação da quitina permite a preparação de quitosana se a concentração alcalina for quatro vezes maior que o total de grupos amino no polissacarídeo, a uma temperatura de cerca de 100 °C por 1 hora. Contudo, para evitar a degradação do polímero, é preferível usar soluções alcalinas de baixa concentração e um curto tempo de contato com o material (THOMAS; THOMAS, 2013).

A desacetilação química apresenta desvantagens relacionadas ao consumo de energia e à poluição ambiental, caso não sejam tomados os devidos cuidados e otimizados os processos (RAVAL; RAVAL; MOERSCHBACHER, 2013). Como alternativa ao método químico, desenvolveu-se o método enzimático para minimizar esses inconvenientes. A enzima para desacetilação da quitina atua como catalisador, hidrolisando as ligações de N-acetamida (PAGNONCELLI *et al.*, 2010). Esta enzima, que é termicamente estável e tem afinidade com as ligações poliméricas  $\beta(1-4)$  ligadas a N-acetil-D-glucosamina, pode ser extraída de fungos como *Mucor rouxii*, *Absidia coerulea*, *Aspergillus nidulans* e duas cepas de *Colletotrichum lindemuthianum* (SINHA; CHAND; TRIPATHI, 2014).

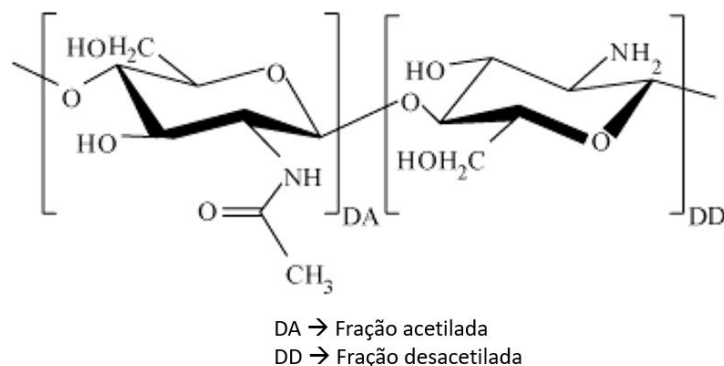
### 3.2.2 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

A quitina é um composto incolor, que pode apresentar formas cristalinas ou amorfas, não se dissolve em água nem em solventes orgânicos, ácidos diluídos ou soluções alcalinas. Ela só se solubiliza em ácidos minerais concentrados, mas isso provoca a degradação do polímero (MATHUR; NARANG, 1990). A quitosana tem a

mesma insolubilidade em água que a quitina, mas pode ser solubilizada por vários ácidos, tanto orgânicos quanto inorgânicos (ácido acético, fórmico, clorídrico, nítrico etc). A forma e a composição da quitina e quitosana dependem da origem biológica e do método usado na sua obtenção (BRINE; AUSTIN, 1981). Estudos indicam que os métodos e as características desses produtos são variados. As propriedades físico-químicas da quitina e quitosana são influenciadas pelo peso molecular ( $M_w$ ) e pelo grau de desacetilação (%GD), que por sua vez são definidos pelas condições do processo ou método de extração empregado (BRINE; AUSTIN, 1981; BOUGH *et al.*, 1978). O peso molecular e o grau de desacetilação são determinados pelas condições processuais ou pelos métodos de extração utilizados (CHO; NO; MEYERS, 1998).

### 3.2.3 GRAU DE DESACETILAÇÃO

O grau de desacetilação (GD) é a razão molar de glucosamina (GlcN) nos copolímeros de quitosana em comparação com N-acetilglucosamina (GlcNAc) (SHIGEMASA *et al.*, 1996), como mostra a Figura 10.



**Figura 10**-Representação das frações acetiladas e desacetiladas da molécula da quitosana.

Adaptado de ZHANG *et al.*, 2016.

A análise do %GD é fundamental para determinar as composições químicas, propriedades físicas e interações químicas da quitosana. Isso é essencial para estabelecer uma base para prever suas funções e aplicações potenciais (MUANPRASAT; CHATSUDTHIPONG, 2017). Assim, um processo confiável para medir os valores de GD é indispensável para avançar nas aplicações práticas deste material (ZHANG *et al.*, 2014; KUMIRSKA *et al.*, 2010).



Várias metodologias foram desenvolvidas e empregadas para identificar o GD da quitosana, de acordo com os estudos de SHIGEMASA *et al.*, (1996), que investigaram o efeito de diversos níveis de desacetilação nas taxas de absorção usando FTIR para analisar esse parâmetro em amostras de quitina; KUMIRSKA *et al.*, (2010) examinaram a eficiência dos métodos espectroscópicos (DRX, FTIR, UV-VIS, espectroscopia de massas, RMN) para a avaliação estrutural e determinação do %GD da quitina e quitosana; ZAJAC *et al.*, (2015) quantificaram a fração dos grupos N-acetilados empregando a espectroscopia Raman. Cada técnica apresenta diferentes graus de precisão e confiabilidade. Portanto, é importante realizar técnicas ajustadas a métodos de determinação do GD mais precisos, como UV-VIS e RMN.

### 3.2.4 MASSA MOLECULAR

A massa molecular da quitosana sofre influência de aspectos como temperatura, concentrações dos reagentes, ordem das etapas e condições atmosféricas (TOLAIMATE *et al.*, 2003). O método químico apresenta limitações como dificuldades no controle dos parâmetros  $M_w$  e %GD (CHO; NO; MEYERS, 1998; HWANG *et al.*, 2002; KURITA, 2006).

O processo enzimático é uma alternativa para sintetizar a quitosana, oferecendo maior facilidade na obtenção dos parâmetros desejados (ILYINA *et al.*, 2000). Neste processo, são utilizadas bactérias produtoras de ácido lático para a desmineralização de cascas de crustáceos. O ácido lático reage com o carbonato de cálcio, facilitando a remoção ao precipitá-lo. A desproteínização ocorre com o uso de enzimas proteases de bactérias como *Serratia marcescens* FS-3, *Bacillus subtilis*, *Serratia sp.*, *Bacillus sp* e *Pseudomonas aeruginosa* K-187, pois são bactérias que produzem enzimas deacetilases, promovendo a desacetilação da quitina para obtenção de quitosana (HAMED; ÖZOGUL; REGENSTEIN, 2016). Uma desacetilação eficaz pode ser alcançada com a lavagem intermitente do produto intermediário com água durante o tratamento alcalino (MIMA *et al.*, 1983). O peso molecular médio da quitosana obtida por este método é de aproximadamente 500 kDa, com um grau de desacetilação elevado, próximo de 100%. O GD aumenta rapidamente durante a primeira hora de tratamento alcalino, alcançando cerca de 68% (com 50% m/V de NaOH, a 100°C), e após esse período, o aumento do GD se torna mais lento (BOUGH, *et al.*, 1978).

Existem diversos métodos para estimar o peso molecular, abrangendo técnicas de espalhamento de luz, cromatografia de permeação em gel (GPC) e viscosimetria capilar. A viscosimetria capilar é o método mais simples e eficiente para avaliar o  $M_w$  da quitosana. Durante o ensaio, um viscosímetro capilar do tipo Ubbelohde é utilizado para medir o tempo de fluxo das soluções que passam pelo capilar a 25°C. São usadas várias formulações da quitosana com diferentes viscosidades, contendo concentrações do polímero variando entre 0,00125% e 0,15%, em diferentes composições solventes; por exemplo, foi relatado o uso de uma mistura de NaCl 0,1 M e ácido acético 0,2M. O viscosímetro é preenchido com a amostra e mantido em um banho termostático a 25°C. Os tempos de fluxo da amostra e do solvente são registrados para calcular a viscosidade relativa. A equação proposta por Mark-Houwink-Sakurada (Equação 2), estabelece a relação entre a viscosidade intrínseca ( $\eta$ ) e o  $M_w$  (HWANG *et al.*, 2002).

$$[\eta] = K * [M_w]^a = 3.04 \times 10^{-5} * [M_w]^{1.26} \quad \text{Eq. 2}$$

Onde K e  $\alpha$  são constantes definidas pelo sistema soluto-solvente ( $\alpha = 0,83$  e  $K = 1,4 \times 10^{-4}$  em sistema de solvente composto por 0,25 M de ácido acético e 0,25 M de acetato de sódio) (HWANG *et al.*, 2002).

Com base no  $M_w$ , a quitosana é classificada em três tipos diferentes: quitosana de baixo peso molecular ( $M_w < 50$  kDa), quitosana de médio peso molecular ( $M_w = 50$  a 250 kDa) e quitosana de alto peso molecular ( $M_w > 250$  kDa). Vários autores afirmam que a quitosana de baixo peso molecular apresenta características excepcionais, como propriedades antibacterianas e antifúngicas, efeito no metabolismo lipídico e dissacaridase intestinal (SONG *et al.*, 2011), além de propriedades mucoadesivas (LUO *et al.*, 2008; CHIU *et al.*, 2017). Além disso, o  $M_w$  também influencia significativamente as características reológicas do biopolímero, contribuindo diretamente para a produção de biomateriais à base de quitosana (SOUZA; DOTTO, 2017). A quitosana de baixo peso molecular é usada para criar um acabamento resistente, sendo posteriormente aplicada no tratamento antigordurante de tecidos de algodão. Por outro lado, a quitosana de alto peso molecular é empregada na fabricação de filmes com sais quaternários, exibindo características como solubilidade em água e neutralização dos radicais livres. Esta variação da quitosana também é utilizada na mistura dos polímeros e na separação das fases (SOUZA; DOTTO, 2017).

### 3.2.5 VISCOSIDADE

A quitosana apresenta propriedades únicas, com sua natureza policatiónica evidente quando dissolvida em solução ácida (em valores de  $pK_a = 6,0$ ). A quitosana pode ser dissolvida em solução ácida, gerando um líquido viscoso. Essa viscosidade da solução está relacionada com o  $M_w$ , com o %GD, a concentração de polímero, o pH e a temperatura. A viscosidade da solução de quitosana, a nível molecular, é uma medida do volume das moléculas do polímero, que, por sua vez, é governada pelo tamanho molecular ou comprimento da cadeia. A viscosidade e as propriedades de fluxo das soluções concentradas de quitosana com diferentes graus de desacetilação são distintas. As viscosidades e as propriedades de fluxo não newtonianas das soluções aumentam com o grau de desacetilação (GD) crescente da quitosana (KUMARI; KISHOR, 2020).

A quitosana apresenta características que dependem da sua polidispersão e massa molar. Se a massa molar for conhecida e houver uma boa compreensão da conformação do polímero no meio solvente, as propriedades reológicas e mecânicas podem ser estimadas (KASAAI, 2007). Em soluções diluídas, as interações entre o polímero e o solvente podem fornecer informações sobre o volume hidrodinâmico da cadeia no solvente e as dimensões da macromolécula. A viscosimetria capilar é um método experimental que fornece essas informações. Há um grande interesse em desenvolver métodos experimentais e matemáticos que possam simultaneamente reduzir o tempo de determinação experimental desses parâmetros e fornecer resultados com pequena margem de erro (DELPECH *et al.*, 2007; DELPECH; OLIVEIRA, 2005; DELPECH; COUTINHO; HABIBE, 2002; COUTINHO; DELPECH; GARCIA, 2002; MELLO *et al.*, 2006).

### 3.2.6 SOLUBILIDADE

A quitosana é facilmente solúvel em meio ácido diluído abaixo de seu  $pK_a$  ( $pH = 6,5$ ). Já a quitina não apresenta solubilidade na maior parte dos ácidos diluídos e solventes orgânicos. Os grupos amino da quitosana aumentam a ionização em pH ácido, protonando o grupo amino (formando o grupamento  $NH_3^+$ ), o que aumenta a solubilidade do polissacarídeo, enquanto que em pH mais elevado (superior a 6,0), o polímero precipita. A capacidade dos meios ácidos de protonar a quitosana influencia

a ionização e a solubilidade dos polieletrólitos. A quitosana apresenta solubilidade em meios ácidos diluídos, como ácido acético, ácido fórmico (HUNT; HUCKERBY, 1987), ácido L-glutâmico, ácido láctico, ácido succínico, entre outros (ROMANAZZI *et al.*, 2009).

A quitosana pode ser solubilizada em soluções ácidas diluídas desde que apresente um grau de desacetilação em torno de 50% ou mais, devido à presença de unidades de N-amino-D-glucosamina (CHO *et al.*, 2000). Outros parâmetros, como a temperatura, o tempo de desacetilação e os tratamentos prévios aplicados durante o isolamento da quitina, também afetam diretamente a solubilidade da quitosana. Por conseguinte, a fração de unidades de N-amino-D-glucosamina tem uma grande influência sobre a solubilidade e as propriedades da solução (SANNAN *et al.*, 1976).

### 3.3 APLICAÇÕES DA QUITINA E QUITOSANA

A quitosana possui grupos funcionais, como hidroxilas e grupos amino, que podem ser modificados por reações químicas controladas para alterar suas propriedades físicas e de solubilidade. Devido às suas propriedades únicas, abre-se um amplo horizonte de possibilidades de aplicações, como em biomedicina, agricultura (bioestimulantes, recobrimentos para ampliação do tempo de prateleira (*shelf-life*) de frutas, legumes e verduras, entre outros), embalagem de alimentos, têxteis, bioplásticos, nanocompósitos, entre outras (SANFORD, 1989).

#### 3.3.1 APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

A maior parte dos tecidos vivos apresenta carga negativa, enquanto a quitosana apresenta carga positiva por conta da predominância de grupos catiônicos ( $\text{NH}_2$ ). Isso faz com que este biopolímero seja atraído por tecidos, pele, osso e cabelo. A superfície externa da maioria dos micróbios é também carregada negativamente (ANTONINO *et al.*, 2017). Portanto, a capacidade da quitosana de interagir eletrostaticamente é uma propriedade fundamental no desenvolvimento de aplicações biomédicas. Seu uso também depende das propriedades biológicas que se deseja explorar, sendo relevante a avaliação quanto à porosidade e ao tamanho. Esse polímero também apresenta potencial para o transporte de medicamentos, bem como para a imobilização enzimática e celular (RINAUDO; DOMARD, 1989). Na Figura 11

apresentamos as principais propriedades biológicas da quitina, quitosana e seus derivados.

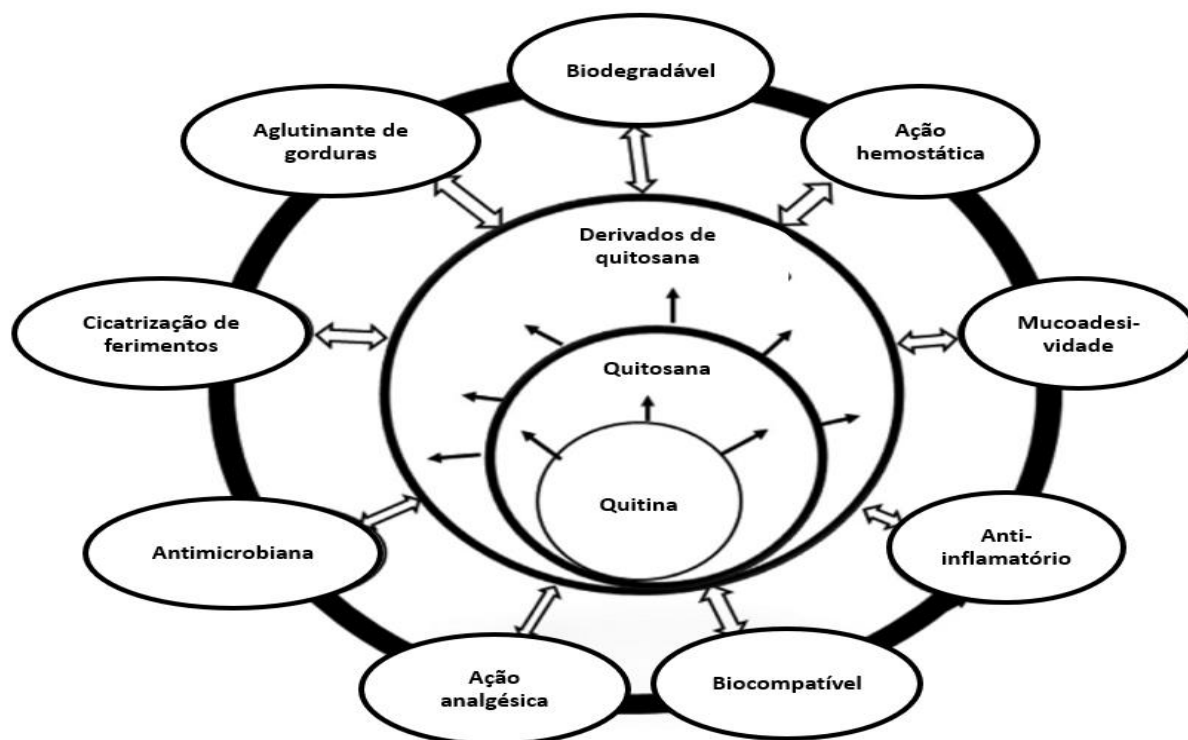


Figura 11-Propriedades biológicas da quitina, quitosana e derivados.

Adaptado de THOMAS; PIUS; GOPI, 2020.

A quitosana apresenta biocompatibilidade, capacidade de promover a regeneração de tecidos, possui ação antibacteriana, propriedades anti-inflamatórias e hemostáticas. Suas aplicações biomédicas estão relacionadas principalmente com a sua biocompatibilidade e biodegradabilidade (HARUGADE; SHERJE; PETHE, 2023; JAGDALE *et al.*, 2024; ELIZALDE-CÁRDENAS *et al.*, 2024). A biocompatibilidade está diretamente relacionada com a citotoxicidade do material. O método de cultura celular é a forma mais acessível e muito empregada para estudar tanto a toxicidade quanto as interações da quitosana com as células (ALI; AHMED, 2018; ZHAO *et al.*, 2018).

Dentre as principais características da quitosana, o fato dela não induzir inflamação e não provocar reação do sistema imunológico do organismo possui grande relevância. As avaliações deste material têm demonstrado que a variação do seu peso molecular e grau de desacetilação possibilitam otimizar as propriedades biológicas da quitosana (HUANG; KHOR; LIM, 2004; CHIEN; YEN; MAU, 2016; AIPING *et al.*, 2006; YAN *et al.*, 2015).

Normalmente, devido à natureza catiônica do polímero, as soluções de quitosana têm propriedades bacteriostáticas e bacteriológicas. A carga positiva na cadeia do polímero adere às superfícies bacterianas, induzindo alterações na permeabilidade da parede da membrana que impedem o crescimento microbiano (GOY; DE BRITTO; ASSIS, 2009; VALDEZ *et al.*, 2022; ZHAO *et al.*, 2022).

Um baixo grau de desacetilação e baixo pH da quitosana promovem melhor atividade antibacteriana. A redução do peso molecular pode aumentar as atividades antibacterianas contra bactérias gram-negativas e diminuir as atividades contra bactérias gram-positivas. Além disso, a quitosana apresenta uma ampla gama de atividades antimicrobianas contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, com uma elevada taxa de mortalidade por meio da interação entre a quitosana e seus derivados e a parede celular bacteriana (YOUNES *et al.*, 2014). Esta interação entre a quitosana e a célula bacteriana depende da hidrofiliabilidade da parede celular, o que pode explicar a menor toxicidade da quitosana para as células de mamíferos (KONG *et al.*, 2010; ZOE; DAVID; RAJABALAYA, 2023; MANJUBAASHINI *et al.*, 2023).

A capacidade da quitosana de aderir às superfícies é uma de suas principais características. Isso não só gera novas abordagens para fornecer moléculas benéficas através de vias mucosas, mas também ajuda a adsorver moléculas que não têm afinidade com o muco (BUGNICOURT; LADAVIÈRE, 2016). Através da permeação, a quitosana aumenta a aderência dos polímeros, o que é útil para acessar junções epiteliais que geralmente são de difícil acesso (YAMAMOTO *et al.*, 2005; MOINE *et al.*, 2021).

Ainda, a quitosana está sendo amplamente usada em estudos relacionados com a sua capacidade de coagulação sanguínea. De fato, a quitosana pode acelerar a taxa de cicatrização de feridas através de interações entre plaquetas e grupos aminoácidos (OKAMOTO *et al.*, 2003; FENG, *et al.*, 2021). As propriedades hemostáticas da quitosana têm sido largamente utilizadas na cicatrização de feridas. Como material para cicatrização de feridas, a quitosana apresenta várias características, tais como quimiotração, ativação de macrófagos e neutrófilos, aceleração de processos de reepitelização, propriedades analgésicas, resposta fisiológica do corpo para a prevenção e interrupção de sangramentos e hemorragias e propriedades antibacterianas intrínsecas (BUSILACCHI *et al.*, 2013; DO *et al.*, 2022; VALENCIA *et al.*, 2021).

Trabalhos demonstram que a quitosana e materiais que podem ser obtidos a partir da mesma têm atividades antitumorais em modelos *in vitro* e *in vivo*. O efeito antitumoral dos derivados da quitosana é causado pelo aumento da secreção de interleucina (IL)-1 e 2, que resulta na maturação e infiltração de linfócitos T citolíticos (TOKORO *et al.*, 1988; ADHIKARI; YADAV, 2018; ABEDIA *et al.*, 2019).

É conhecido que os antioxidantes têm efeitos benéficos na saúde, pois evitam a destruição de lípidos de membranas, proteínas e DNA pelas moléculas reativas dos radicais de oxigênio do organismo (NGO; KIM, 2014). Estudos demonstraram que a quitosana e seus derivados conseguem realizar a neutralização dos radicais livres de oxigênio ativos *in vitro*. As moléculas de quitosana de baixo peso molecular apresentam várias vantagens sobre as de alto peso no processo de eliminação dos radicais livres (PARK; JE; KIM, 2003). Um estudo sugeriu que o mecanismo da atividade antioxidante da quitosana pode ser através da estabilização dos radicais livres por grupos amino e carboxilo na quitosana (YOUNES; RINAUDO, 2015).

A degradação da quitosana em organismos biológicos pode ser catalisada por bioenzimas para despolimerizar a molécula. Os produtos de degradação desta molécula são N-acetil glicose e glucosamina, que são não tóxicos para o corpo humano. Os produtos intermediários de degradação não se acumulam no corpo e não possuem imunogenicidade (WANG *et al.*, 2011).

### 3.3.2 APLICAÇÕES NA AGRICULTURA

O controle e a gestão de doenças em plantas cultivadas sempre foram considerados temas de grande interesse devido aos enormes prejuízos financeiros que provocam. Durante muitos anos, o controle de agentes patogênicos foi realizado principalmente pela aplicação de agrotóxicos químicos, devido ao seu fácil uso, ao custo relativamente baixo e ao amplo espectro de ação. A aplicação de venenos na proteção das lavouras tem sido amplamente utilizada desde o período pós-guerra, a partir de 1945, e contribuiu para um significativo aumento na produtividade agrícola fomentando o desenvolvimento econômico, reduzindo a incidência de doenças endêmicas, protegendo e restaurando plantações e diversos produtos agrícolas (ECOBICHON, 2000). Na realidade, as doenças das plantas representam um problema crítico para o sucesso da produção. A produtividade agrícola tem se beneficiado da utilização de pesticidas tanto quantitativa quanto qualitativamente; por

exemplo, quando os pesticidas são devidamente utilizados, contribuem para uma maior produção e melhores características de qualidade das culturas. No entanto, a sua utilização também provoca problemas e inconvenientes relacionados com dois aspectos principais: a saúde humana e o impacto ambiental. De fato, os produtos químicos fitofarmacêuticos, incluindo o cobre permitido na agricultura orgânica, são na sua maioria tóxicos, persistentes, bioacumulativos e extremamente prejudiciais não só para a saúde humana, mas também para muitos organismos vivos (AKTAR; SENGUPTA; CHOWDHURY, 2009). Os pesticidas podem contaminar as matrizes ambientais (como solo, água da superfície) sobre aquíferos (HARIA; HODNETT; JOHNSON, 2003), causando danos diretos e permanentes ao ecossistema. Além disso, há a possibilidade real de seus resíduos entrarem na cadeia alimentar dos consumidores (BOOBIS *et al.*, 2008). A utilização maciça dessas substâncias químicas favorece também o aparecimento de fenômenos de resistência nas principais pragas dessas culturas (HOLLINGWORTH; DONG, 2008) e o desaparecimento contemporâneo de muitos inimigos naturais das “pragas”, tais como abelhas, borboletas e demais insetos (VAN LENTEREN, 2003).

A aplicação de pesticidas e seus efeitos constituem um tema de grande preocupação. De acordo com as novas diretivas europeias a favor de uma agricultura sustentável, muitos produtos fitofarmacêuticos atualmente em uso serão substituídos por substâncias de menor impacto ambiental. Por essa razão, muitos estudos científicos e investigações têm se centrado no desenvolvimento de abordagens alternativas à utilização de pesticidas para a gestão de doenças das culturas. Essas experiências têm seguido diferentes caminhos, incluindo métodos físicos (SCHMITT *et al.*, 2009) de gestão integrada de pragas e controle biológico (TINIVELLA *et al.*, 2009). Uma abordagem promissora consiste na utilização de compostos naturais, como extratos de plantas e seus princípios ativos (alcaloides, fenóis, monoterpenos, sesquiterpenos, isoprenoides), que têm sido estudados por suas várias propriedades antifúngicas, antibacterianas e antioxidantes (ISMAN, 2000; MARINELLI *et al.*, 2012; RICCONI; ORZALI, 2011), além de compostos derivados de animais, como a quitosana. Esta tem se mostrado muito interessante para o controle de doenças das plantas (EL HADRAMI *et al.*, 2010), demonstrando possuir atividade antimicrobiana de amplo espectro contra vários organismos fitopatogênicos e induzir numerosas respostas biológicas nas plantas (MALERBA; CERANA, 2016).



Uma das propriedades mais estudadas da quitosana é sua elevada atividade antimicrobiana contra uma série de microrganismos, como bactérias, fungos e vírus. Uma substância antimicrobiana é definida como uma substância que elimina ou efetua a inibição do crescimento de microrganismos (ANDREWS, 2001).

Foi descrita uma atividade fungicida de largo espectro da quitosana, que inibe o crescimento fúngico *in vitro* de muitos fungos patogênicos, por exemplo, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporoides* e *Rhizopus stolonifer*. A inibição foi observada em diferentes fases do desenvolvimento patogênico, como crescimento micelial, esporulação, viabilidade dos esporos, germinação e na produção de fatores de virulência fúngica (BADAWY; RABEA, 2011). Além disso, a atividade antifúngica foi também demonstrada *in vivo* em muitos sistemas diferentes de plantas-patógenos, como na pera contra *A. kikuchiana* e *Physalospora piricola* (MENG *et al.*, 2010), na videira e no morango contra *B. cinerea* (FELIZIANI; LANDI; ROMANAZZI, 2015; REGLINSKI *et al.*, 2010) e na pitiaia contra *C. gloeosporoides* (ZAHID *et al.*, 2015). No arroz, a atividade antifúngica contra *R. solani* foi ainda demonstrada por observações ao microscópio eletrônico de transmissão e testes de patogenicidade (LIU *et al.*, 2012).

A forma exata da atividade antimicrobiana direta da quitosana ainda é ambígua, e diferentes mecanismos foram propostos e descritos (BADAWY; RABEA, 2011; XING *et al.*, 2015), mas nenhum deles é mutuamente exclusivo. O principal modo de ação proposto está relacionado com suas propriedades catiônicas (SHARP, 2013), hipótese apoiada pela falta de atividade antifúngica dos oligômeros de quitina não carregados (PARRA; RAMÍREZ, 2002). Ao contrário da quitosana, a forma polimérica da quitina é naturalmente não carregada e não apresenta atividade antimicrobiana substancial. Com base neste modelo, as cargas positivas nas moléculas de quitosana interagem com as superfícies patogênicas carregadas negativamente (interações eletrostáticas), levando à destruição da estrutura celular, causando uma extensa alteração da superfície celular e aumentando a permeabilidade da membrana (CHUNG *et al.*, 2004; RABEA *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2004). Outro mecanismo proposto envolve a alteração da permeabilidade celular pela quitosana, que inclui sua deposição na superfície da célula patogênica, criando uma camada polimérica impermeável que impede a absorção de nutrientes na célula e, enquanto isso, altera a excreção de metabolitos na matriz extracelular (XING *et al.*, 2015).

A produção vegetal é um dos elementos mais importantes da agricultura e da economia, que requer progresso contínuo. A introdução de várias tecnologias inovadoras contribuiu para o rápido aumento do desempenho agrícola, mas a busca por soluções ecológicas que aumentem a eficiência da produção vegetal tornou-se essencial atualmente (KATIYAR; HEMANTARANJAN; SINGH, 2015). As atividades pró-ecológicas nesta área são também reforçadas pelas últimas mudanças nas políticas agrícolas, como o Acordo Verde Europeu, que visa reduzir a utilização de produtos fitofarmacêuticos e promover a agricultura biológica (*A EUROPEAN GREEN DEAL.*, 2021). Assim, o interesse na utilização de substâncias de origem natural como estimulantes do crescimento e desenvolvimento das plantas, os chamados bioestimulantes, tem aumentado nos últimos anos. O conceito de bioestimulantes foi proposto no final do século XX, mas ainda não foi claramente definido até à data. Além disso, não existem regulamentos legais adequados para a sistematização das preparações disponíveis ou registro de novos agentes. No entanto, o termo "bioestimulante vegetal" é usado para designar qualquer substância ou formulação que não seja um constituinte vegetal, fertilizante ou pesticida, mas que contenha compostos naturais (simples ou misturas) ou microrganismos. Destina-se a ser aplicado na planta inteira, numa parte da planta, ou na rizosfera (região onde o solo e as raízes das plantas entram em contato) para intensificar os processos fisiológicos naturais, aumentar a resistência das plantas ao estresse, melhorar a utilização de minerais, e melhorar o tamanho e qualidade dos rendimentos das culturas (DMYTRYK *et al.*, 2014; MATYJASZCZYK, 2015; POSMYK; SZAFRAŃSKA, 2016).

A literatura destaca o potencial da quitosana na indústria de fertilizantes como ingrediente que atua na liberação controlada de nutrientes. O interesse neste polímero tem sido despertado principalmente pelo seu efeito benéfico no solo e nas plantas e por algumas características físico-químicas. Dadas às suas propriedades de formação de película, bem como sua elevada biocompatibilidade e biodegradabilidade, a quitosana pode ser empregada como material de revestimento regulador da taxa de liberação de minerais na solução do solo; além disso, pode ser utilizada para resolver o problema com a eliminação de resíduos de revestimentos produzidos de polímeros não biodegradáveis. Na indústria agroquímica, as nanopartículas de quitosana são utilizadas tanto para otimizar a atividade e eficiência de vários tipos de formulações como para reduzir a sua toxicidade para o ambiente (LUBKOWSKI; GRZMIL, 2007; MALERBA; CERANA, 2016; GUMELAR *et al.*, 2020). Um exemplo de tal aplicação foi

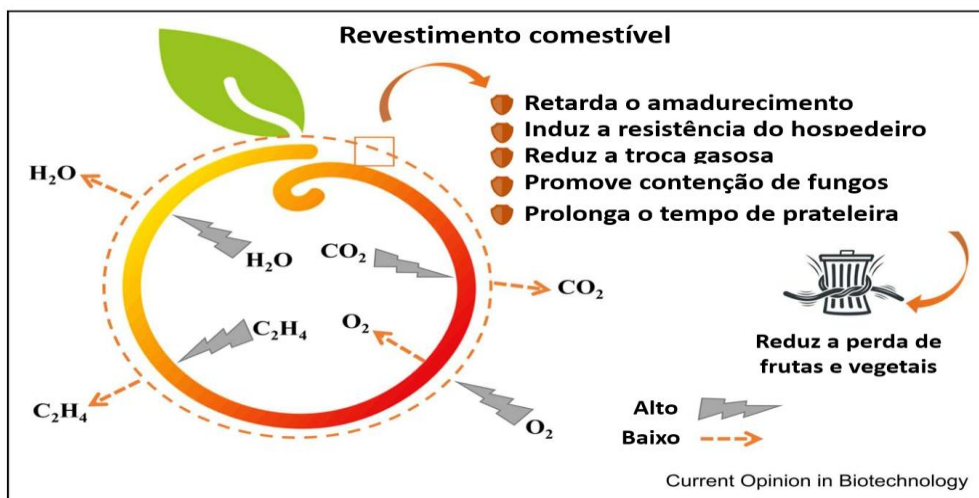
mostrado em uma experiência realizada por ABDEL-AZIZ *et al.*, 2016, na qual a aplicação foliar de um fertilizante à base de nanoquitosana-NPK contribuiu para um aumento do crescimento e rendimento do trigo em comparação com plantas tratadas com formas tradicionais de nitrogênio, fósforo e potássio.

Frutas e vegetais frescos contêm alta porcentagem de água e continuam a atividade metabólica após a colheita, resultando em maturação, aumento da sensibilidade a fungos causadores de decomposição e, conseqüentemente, perda e desperdício. Os revestimentos comestíveis, preparados de fontes renováveis naturais, podem contribuir para a redução de resíduos, respeitando o ambiente e a saúde dos consumidores. A quitosana e outros materiais utilizados na obtenção de revestimentos comestíveis formam uma camada fina ao redor do produto fresco, atuando como agente protetor, prolongando a vida útil e tendo o potencial de controlar o processo de maturação e manter as propriedades nutricionais do produto revestido (ROMANAZZI; MOUMNI, 2022).

A quitosana é um material com grande potencial para desenvolvimento e obtenção de revestimentos comestíveis devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioatividade, sendo um material poderoso aplicável em medicina regenerativa, cosmética e agricultura. Quando aplicada em frutas e vegetais, a quitosana promove estímulos que favorecem o sistema de defesa do hospedeiro, proporcionando atividade antimicrobiana contra fungos causadores de decomposição e produzindo uma película semipermeável na superfície tratada. Contudo, é importante destacar que nesse tipo de aplicação é necessário combinar a quitosana com outros componentes a fim de obter um revestimento com melhor eficiência (ROMANAZZI; FELIZIANI; SIVAKUMAR, 2019). Os revestimentos comestíveis têm sido amplamente aplicados na conservação pós-colheita de frutas e legumes frescos. A literatura científica sobre revestimentos comestíveis utilizando quitosana tem aumentado nos últimos anos, explicado pela importância da quitosana na proteção das plantas como agente fungicida natural e estimulador da defesa das plantas, e pela sua utilização para prolongar o armazenamento de uma variedade de frutas e vegetais mundialmente. Este biopolímero pode formar uma película semipermeável em superfícies de frutas e vegetais, reduzindo a taxa respiratória ao ajustar a permeabilidade de O<sub>2</sub> e a produção de CO<sub>2</sub>, e ao aumentar a atividade antioxidante (SHAH; HASHMI, 2020). A quitosana tem atividade antimicrobiana de amplo espectro e efeitos inibidores comprovados em diversos agentes patogênicos fúngicos pós-

colheita (LANDI *et al.*, 2021; RAJESTARY; LANDI; ROMANAZZI, 2021), demonstrando que pode atuar como um elicitador exógeno induzindo atividades de várias enzimas relacionadas à defesa na fruta da papaia. Nos últimos anos, numerosos estudos revelaram a eficácia da quitosana aplicada sozinha ou combinada com outros compostos naturais para manter as propriedades físicas de várias frutas e vegetais (SINGHA *et al.*, 2023; HANANI *et al.*, 2023; ROMANAZZI; MOUMNI, 2022). A incorporação de diversos óleos essenciais em matrizes poliméricas atraiu grande atenção, pois este biopolímero reduz a volatilidade dos óleos essenciais e mascara o mau sabor que podem promover (DANILA *et al.*, 2021; SÁNCHEZ ALDANA *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2022).

Os revestimentos podem alterar a composição da atmosfera ao redor do fruto, resultando na criação de uma barreira à troca de gases, como oxigênio, dióxido de carbono e etileno, envolvidos no processo respiratório, conforme demonstrado na Figura 12. Foram relatados diferentes revestimentos comestíveis para preservar o valor nutricional dos frutos de forma semelhante ou até melhor que a embalagem convencional (KARAGÖZ; DEMIRDÖVEN, 2019).



**Figura 12-**Principais propriedades dos revestimentos comestíveis aplicados em frutas e vegetais, afetando a permeabilidade ao etileno ( $C_2H_4$ ), água ( $H_2O$ ), oxigênio ( $O_2$ ), e dióxido de carbono ( $CO_2$ ).

Adaptado de ROMANAZZI; MOUMNI, 2022.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Estão apresentados os dois fluxogramas (Figuras 13 e 14) que demonstram as etapas do trabalho e as respectivas análises de caracterização realizadas.

**1ª Parte:** avaliação dos tempos dos processos de desmineralização e desproteíntização da quitina.

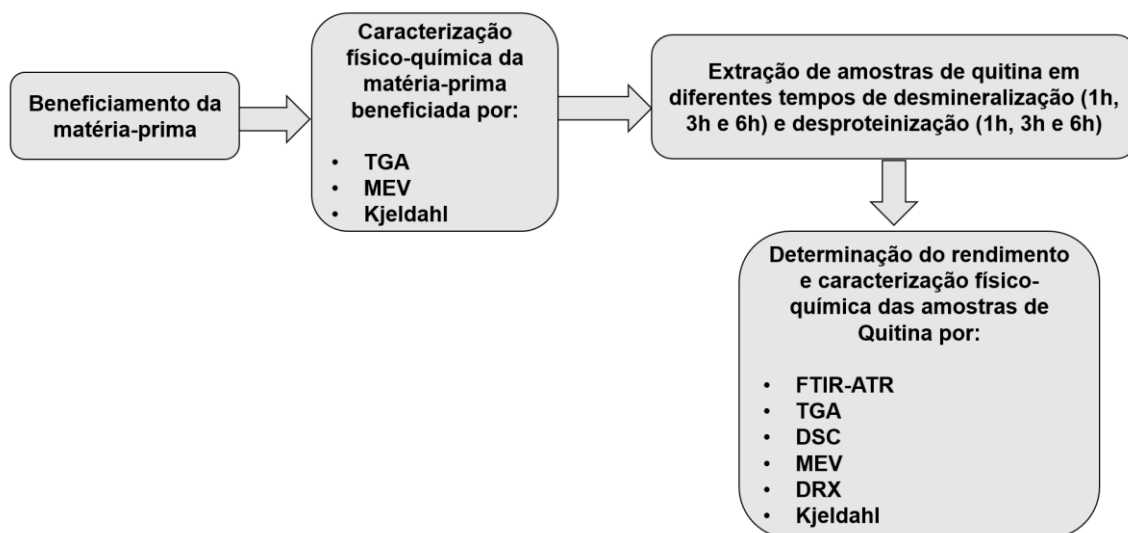


Figura 13-Etapas para extração da quitina e respectivas análises de caracterização realizadas.

Elaborado pelo autor, 2023.

**2ª Parte:** avaliação da influência do congelamento no processo de obtenção da quitosana.

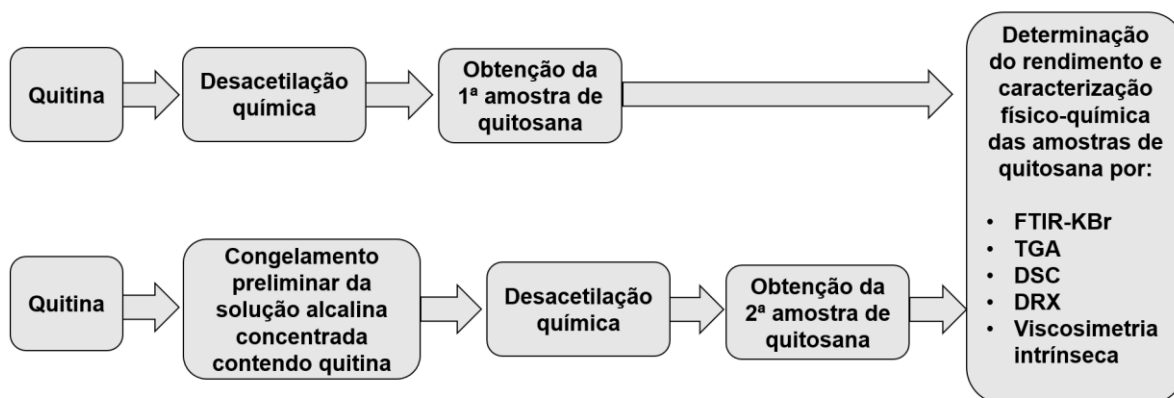


Figura 14-Etapas para obtenção das amostras de quitosanas e respectivas análises de caracterização realizadas.

Elaborado pelo autor, 2023.

#### 4.1 BENEFICIAMENTO DA MATÉRIA-PRIMA

As matérias-primas empregadas no trabalho foram cascas de camarão do Padífico *Litopenaeus vannamei*, fornecidas pela Agroindústria de Pescados e Camarão Lucrecio, localizada no município de Tavares, no estado do Rio Grande do Sul (RS). As cascas foram beneficiadas pelo seguinte processo, apresentado na Figura 15:



**Figura 15**-Processo de beneficiamento da matéria-prima.

Elaborado pelo autor, 2023.

Foram separadas cerca de 10kg de cascas de camarão, as quais foram submetidas a lavagem contínua com água corrente durante 30 minutos, a fim de eliminar impurezas grosseiras, como restos da proteína animal, sujidades e pigmentos. Esse processo foi auxiliado por uma peneira para areia, confeccionada em aro de polipropileno com diâmetro de 55 cm e malha 8 (granulometria de 2 mm). Após a remoção dessas impurezas, visível a olho nu, procedeu-se à fervura a 100°C do

material por 2 horas em uma panela de ferro fundido de 30 litros, visando minimizar o odor. Seguiu-se uma nova etapa de lavagem em água corrente, novamente com o auxílio da peneira para areia, para remover as impurezas restantes, incluindo matéria orgânica e pigmentos. Obtidas as cascas visualmente limpas (apresentadas na Figura 16), elas foram dispostas em bandejas de aço inox e secas em estufa com circulação forçada de ar a 80°C por 24 horas. Após a secagem, o material foi triturado em um liquidificador industrial (da marca Spolu, modelo SPL - 052). Em cada ciclo de moagem, utilizou-se 1kg de casca, processada por 15 minutos, facilitando assim a armazenagem em uma caixa de polipropileno de 30 litros com tampa. O material obtido ao final está apresentado na Figura 17.



**Figura 16**-Cascas de camarão após processo de lavagem com remoção de sujidades grosseiras.

Elaborado pelo autor, 2023.



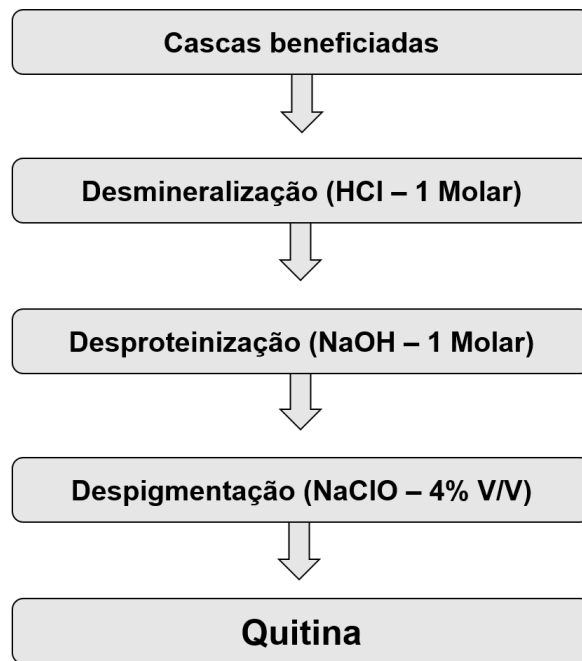
**Figura 17-Cascas de camarão beneficiadas.**

Elaborado pelo autor, 2023.

#### **4.2 PROCESSO QUÍMICO DE EXTRAÇÃO DA QUITINA**

O processo químico adotado neste trabalho para a extração da quitina das cascas beneficiadas consistiu na realização das etapas apresentadas na Figura 18.





**Figura 18**-Etapas do processo químico de extração de quitina.  
Elaborado pelo autor, 2023.

As condições para as etapas de desmineralização, desproteínização e despigmentação estão detalhadas na Tabela 2. A desmineralização foi conduzida a 25°C, enquanto a desproteínização ocorreu a 80°C. A despigmentação foi realizada a 25°C, com um tempo fixo de 30 minutos para todas as amostras. A nomenclatura adotada para os tempos de desmineralização e desproteínização é baseada nos intervalos de tempo, onde “M” representa o tempo em horas para a desmineralização e “P” representa o tempo em horas para a desproteínização. Os tempos empregados neste estudo foram estimados de forma a tornar o processo dinâmico e eficiente, tornando-o adequado para aplicações industriais e escalonáveis.

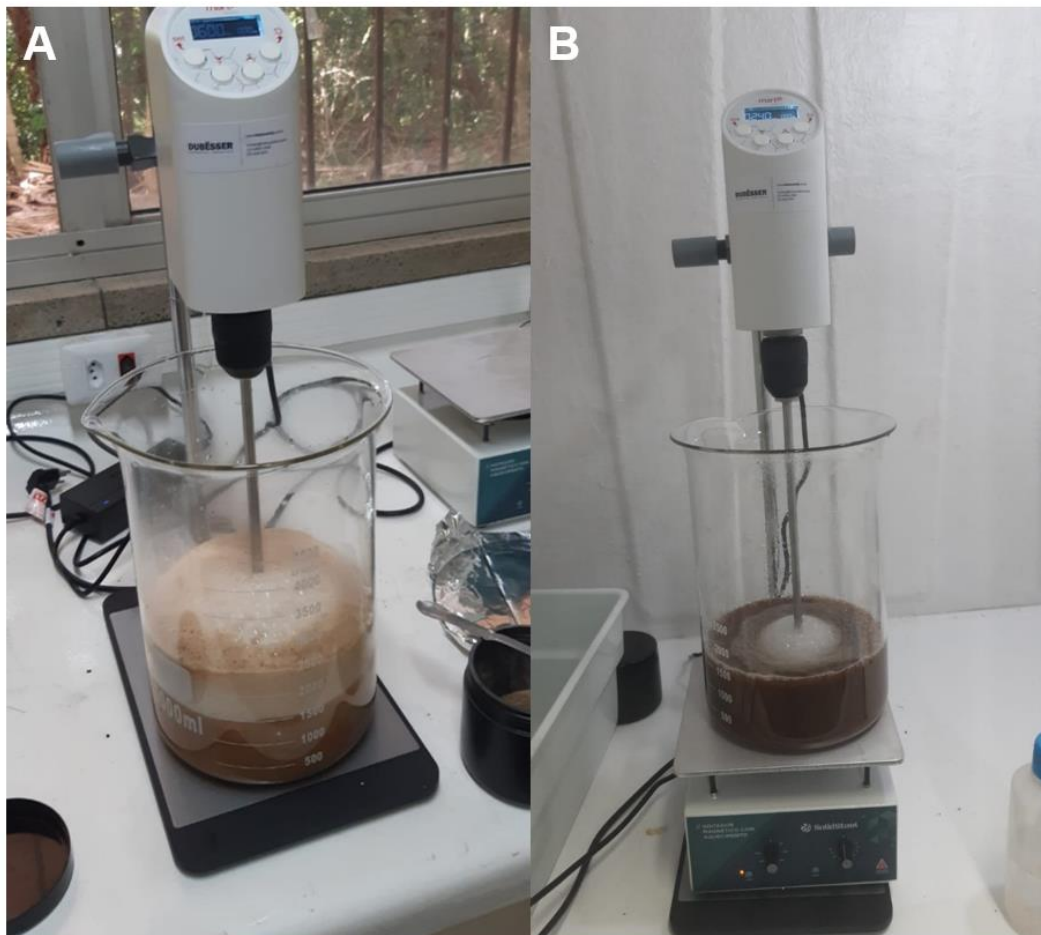
**Tabela 2-** Condições e respectivos tempos adotados em cada etapa para obtenção de quitina.

| <b>Amostras de Quitina</b> | <b>Desmineralização (HCl – 1 Molar, 25°C)</b> | <b>Desproteínização (NaOH – 1 Molar, 80°C)</b> | <b>Despigmentação (NaClO – 4% V/V, 25°C)</b> |
|----------------------------|---|--|--|
| <b>M1P3</b>                | 1 hora  | 3 horas  | 0,5 horas                                    |
| <b>M3P3</b>                | 3 horas                                       | 3 horas  |  |
| <b>M6P3</b>                | 6 horas                                       | 3 horas  |  |
| <b>M6P1</b>                | 6 horas                                       | 1 hora   |  |
| <b>M6P6</b>                | 6 horas                                       | 6 horas  |  |

M = tempos de desmineralização; P = tempos de desproteínização.

Elaborado pelo autor, 2023.

Todos os procedimentos para a preparação da quitina foram realizados em um béquer de 5L, com a mistura sendo efetuada por um agitador mecânico do tipo hélice, modelo ONESENSE20 da Marte Científica. A partir de 200 g de cascas beneficiadas por amostra, o processo de mistura ocorreu a 240 RPM, utilizando-se a proporção sólido/líquido de 1g/10mL para desmineralização e 1g/20mL para desproteínização e despigmentação. Essas proporções são geralmente empregadas em outros trabalhos, como os de SALEH *et al.*, 2016, CARDOSO, 2008 e ANTONINO *et al.*, 2017. Quando necessário, o aquecimento foi feito com o apoio de uma chapa de aquecimento, modelo SSAGA 10L da Solid Steel. Os equipamentos usados na preparação das amostras de quitina estão ilustrados nas Figuras 19 A e 19 B.



**Figura 19**-Equipamentos utilizados nas etapas de obtenção das amostras de quitina. A Figura 19 A demonstra a realização da etapa de desmineralização e a Figura 19 B demonstra a etapa de desproteíntização.

Elaborado pelo autor, 2023.

#### 4.2.1 DESMINERALIZAÇÃO

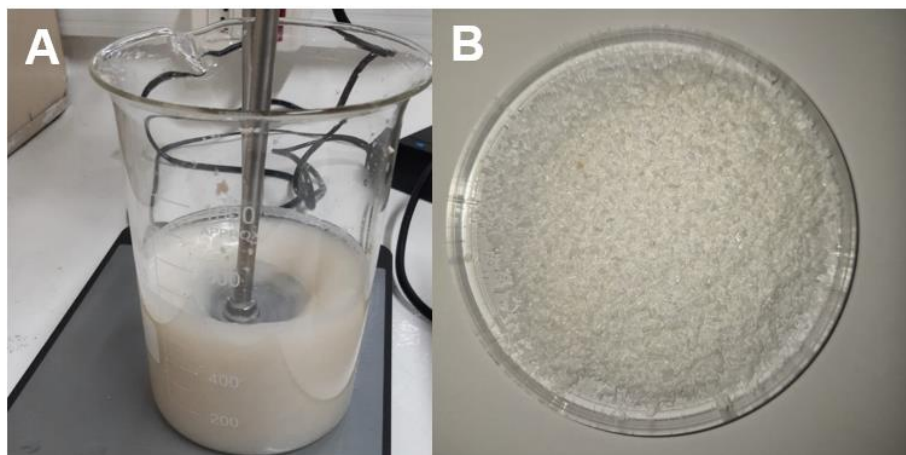
Foi adicionada às cascas uma solução 1 Molar de ácido clorídrico (HCl - 37% P.A. - Química Moderna, lote: 10426). Ao final, as cascas desmineralizadas foram lavadas com água destilada até atingir pH neutro, com o auxílio de um filtro de poliéster. A água destilada utilizada foi fornecida pelo Laboratório de Biomateriais e Cerâmicas Avançadas (Labiomat) e pela Incubadora Empresarial do Centro de Biotecnologia (IECBiot), ambos localizados na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Em seguida, o material foi submetido à secagem em estufa (marca Solid Steel, modelo SSDc 180L) com circulação forçada de ar, a 80°C, por 24 horas, a fim de garantir que a etapa subsequente apresente a proporção sólido/líquido desejada.

#### 4.2.2 DESPROTEINIZAÇÃO

Os processos de desproteínização das cascas desmineralizadas foram realizados por meio de reação heterogênea em solução de hidróxido de sódio (NaOH - P.A. - Neon, lote: 34646), 1 molar. Em seguida, o material foi lavado com água destilada até atingir pH neutro, com o auxílio de um filtro de poliéster. Ao final, o material foi submetido à secagem a 80°C em estufa com circulação forçada de ar, por 24 horas, para possibilitar que a etapa subsequente apresente a proporção sólido/líquido desejada.

#### 4.2.3 DESPIGMENTAÇÃO

A despigmentação foi realizada com uma solução de hipoclorito de sódio (NaClO 4% V/V - Marca Quimifel) por 30 minutos, mantendo uma proporção de 1g/20ml. Essa proporção possibilitou uma remoção visual eficaz dos pigmentos, garantindo que eles não influenciem a aparência visual dos produtos derivados do material. Foi adotada agitação constante a 240 RPM e temperatura de 25°C. Após, a quitina obtida foi lavada com água destilada para remover a solução remanescente de hipoclorito de sódio. Ao final, o material foi submetido à secagem a 80°C em estufa com circulação forçada de ar, por 24 horas. O processo de despigmentação realizado em solução de hipoclorito de sódio e a quitina seca ao final do processo estão apresentados nas Figuras 20 A e 20 B.



**Figura 20**-Processo de despigmentação em solução de hipoclorito de sódio representada na Figura 20 A. Na Figura 20 B é possível verificar a quitina após o processo de lavagem e secagem.

Elaborado pelo autor, 2023.

### 4.3 DESACETILAÇÃO QUÍMICA DA QUITINA PARA OBTENÇÃO DA QUITOSANA

Uma amostra de quitina foi selecionada e preparada de acordo com as especificações do processo da amostra M6P6 para a obtenção de quitosana, tanto com quanto sem congelamento prévio. Essa amostra foi escolhida porque um tempo maior de desproteínização (6h) a uma temperatura de 80°C favorece uma desacetilação parcial da quitina, possibilitando a obtenção de uma quitosana com maior %GD (YOUNES; RINAUDO, 2015; TOKATLI; DEMİRDÖVEN, 2018). Além disso, baseia-se na premissa de que períodos mais longos resultam em maior eficiência na redução do teor de cinzas e proteínas. No entanto, é importante notar que um tempo prolongado também pode levar à degradação da cadeia polimérica, conforme apontado por YOUNES; RINAUDO (2015). As condições específicas adotadas para a obtenção de quitosana estão descritas na Tabela 3. A nomenclatura consiste em: “Q” indica que é quitosana; “M” se refere ao tempo de desmineralização; “P” é referente ao tempo de desproteínização; “F” indica o uso de ultrafreezer. O congelamento da amostra QM6P6F foi realizado a -30°C durante 72h. O processo de desacetilação química para a obtenção das duas amostras ocorreu em solução de NaOH 12,5M, à 110°C durante 6h.

Tabela 3-Parâmetros do processo de obtenção de quitosana.

| Amostra de quitosana | Congelamento (-30°C, 72 horas) | Desacetilação (NaOH 12,5 M, 110°C) |
|----------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| QM6P6                | Não                            | 6 horas                            |
| QM6P6F               | Sim                            |                                    |

Q = quitosana; M = tempo de desmineralização; P = tempo de desproteínização; F = indica o uso de ultrafreezer.

Elaborado pelo autor, 2023.

Para cada experimento (ensaio), foram empregados 20g de quitina, à qual foi adicionada uma solução de hidróxido de sódio 12,5M, numa razão massa/volume de 1g/20mL, mesma proporção utilizada por HORN, 2008, embora este tenha adotado uma solução alcalina de 10 Molar. A solução correspondente à amostra QM6P6F foi preparada em um balão de fundo redondo com 3 bocas e capacidade de 500mL. O balão foi submetido ao congelamento em um ultrafreezer, modelo DUO 240 D, da

marca Indrel Scientific, por 72 horas, tomando-se cuidados para evitar o rompimento. Após esse período, a amostra foi descongelada em uma estufa a 100°C por 60 minutos. Com o completo descongelamento, o sistema foi preparado para a desacetilação química. Embora o meio seja altamente alcalino, utilizou-se um balão de vidro, pois, para as condições de processo estabelecidas, o recomendado seria o uso de um recipiente em aço inox 316. Este recipiente não estava disponível, mas é evidente que, para processos industriais, tal material é de suma importância para este processamento (WANG *et al.*, 2023).

As condições de processo para a desacetilação química, adotadas para o preparo das duas amostras, foram as mesmas: temperatura de 110°C (em banho de glicerina), durante 6 horas. O sistema montado para esse procedimento consistiu no uso de uma chapa aquecedora com agitação, modelo digital C-MAG HS 7 da IKA, um termômetro de contato e controlador de temperatura eletrônico ETS-D5 da IKA, um condensador de refluxo do tipo Allihn (Bola) e um resfriador tipo chiller, modelo CA-1115 da marca Eyela, que manteve a água de recirculação a uma temperatura de 19°C durante o procedimento. O sistema adotado está apresentado nas Figuras 21 e 22. Ao final de ambos os processos, procedeu-se à lavagem com água destilada até atingir pH neutro. Em seguida, o material obtido foi submetido à secagem em estufa com circulação forçada de ar a 80°C por 24 horas.



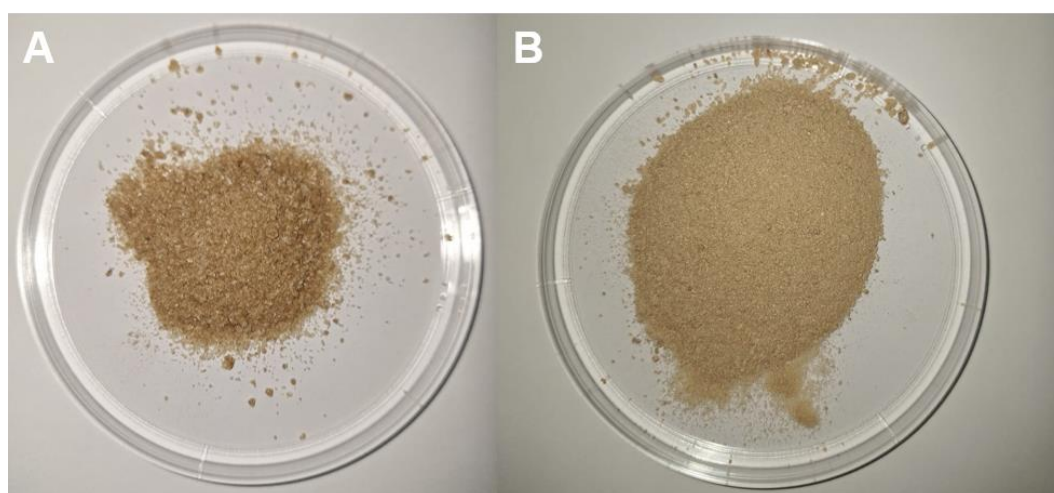
**Figura 21**-Sistema para realização da desacetilação química da quitina.

Elaborado pelo autor, 2023.



**Figura 22-** Chiller empregado para recirculação de água no condensador de refluxo.  
Elaborado pelo autor, 2023.

As quitosanas QM6P6F, obtida com congelamento, e QM6P6, obtida sem congelamento, são apresentadas nas Figuras 23 A e 23 B, respectivamente. Ambas as amostras foram depositadas em placas de Petri lisas, com dimensões de 60mm x 15mm (diâmetro X altura), e apresentaram cor cinza. Nota-se que a QM6P6F é caracterizada por apresentar uma tonalidade mais escura do que a QM6P6.



**Figura 23-**Demonstração das amostras de quitosana QM6P6F (A) e QM6P6 (B), respectivamente.  
Elaborado pelo autor, 2023.

## 4.4 RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO DA QUITINA E OBTENÇÃO DA QUITOSANA

A determinação dos rendimentos obtidos em cada etapa do processo de extração de quitina foi realizada com base na amostra M1P3, que apresenta os menores tempos de processo de desmineralização e desproteíntização. Isso favorece processos em larga escala que requerem etapas com tempos otimizados. O rendimento da obtenção da quitosana foi determinado com base na amostra QM6P6F. O rendimento percentual foi calculado com base na matéria-prima beneficiada, partindo de uma quantidade inicial de 200g de material seco. A massa do material foi determinada após cada etapa, com a pesagem sendo realizada após a secagem em estufa (em base seca).

## 4.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS MATERIAIS OBTIDOS

### 4.5.1 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER COM REFLEXÃO TOTAL ATENUADA (FTIR-ATR) E FTIR POR TRANSMISSÃO

Para identificar os principais grupos funcionais das amostras de quitina (análise qualitativa), foi realizada uma análise por FTIR-ATR. Utilizou-se um espectrômetro Nicolet 6700 (*Thermo Scientific*), com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ , no modo ATR com cristal de Germânio. Os dados foram coletados na região de 800 a  $4000\text{ cm}^{-1}$ . Para a caracterização das amostras de quitosana, utilizou-se o espectrômetro *Alpha* (*Bruker*) no modo de transmissão, tanto para análise qualitativa quanto quantitativa, utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr), na proporção 10:1 (proporção de KBr : proporção de quitosana) em uma faixa de varredura de 400 a  $4000\text{ cm}^{-1}$ . A determinação do percentual de desacetilação (%GD) por meio da técnica FTIR seguiu as abordagens propostas por DOMSZY; ROBERTS (1985), e BRUGNEROTTO *et al.* (2001). Neste processo, linhas de base foram aplicadas para calcular as áreas integradas dos picos característicos da amida I ( $1655\text{ cm}^{-1}$ ) e do grupo hidroxila ( $3450\text{ cm}^{-1}$ ), bem como dos picos da amida III ( $1320\text{ cm}^{-1}$ ) e do grupo  $\text{CH}_2$  ( $1420\text{ cm}^{-1}$ ), conforme expresso nas equações 3 e 4, respectivamente. Posteriormente, os dados obtidos foram processados no software Origin 2015.



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

$$\%GD = 100 - \left( \left( \frac{A_{1320}}{A_{1420}} \right) - 0,3822 \right) / 0,03133 \quad \text{Eq. 4}$$

Na equação 3, as regiões de absorvância  $A_{1655}$  e  $A_{3450}$  correspondem às bandas de amida I e à vibração de estiramento do grupo amina (NH) na quitosana, respectivamente. Estas bandas são características da quitosana e da quitina. A razão 100/1,33 é utilizada para normalizar a equação e corresponde a uma constante para amostras de quitina completamente N-acetiladas. A confiabilidade desta equação foi validada ao ser comparada com métodos analíticos de titulação de sal de hidrobrometo e determinação de salicilaldeído residual. A titulação de sal de hidrobrometo é um procedimento quantitativo baseado na medida da quantidade de um reagente de concentração conhecida consumida pelo analito. O salicilaldeído é frequentemente utilizado em análises químicas devido à sua reatividade com certos grupos funcionais. Assim, a equação fornece uma maneira direta e confiável de determinar o grau de desacetilação da quitosana, que é uma característica química importante influenciadora em diversas aplicações da quitosana (DOMSZY; ROBERTS, 1985; RINAUDO, 2006; KASAAI, 2008).

Quanto à equação 4, a região  $A_{1320}$  está associada às vibrações de deformação do grupo acetilado na quitosana, o que a torna sensível às mudanças no grau de desacetilação. Já a região  $A_{1420}$  relaciona-se com as vibrações de deformação das ligações C-H em grupos metila e metileno, sendo menos afetada pela desacetilação e servindo como referência interna estável. O fator de correção 0,3822 ajusta a razão  $A_{1320}/A_{1420}$  para alinhar os resultados da espectroscopia infravermelha com os valores obtidos por métodos analíticos absolutos, como RMN e UV-VIS. O fator de escala (0,03133) converte a razão ajustada em um valor percentual, refletindo diretamente o grau de desacetilação da quitosana. Essa abordagem garante que a medida do %GD obtido por FTIR seja precisa e comparável a métodos analíticos mais diretos e confiáveis (BRUGNEROTTO *et al.*, 2001; ANTONINO *et al.*, 2017).

#### **4.5.2 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA E DIFERENCIAL TÉRMICA (TGA/DTA)**

A análise termogravimétrica e diferencial térmica (TGA/DTA) foi realizada nas amostras de quitina e quitosana para avaliar a taxa de decomposição e determinar o teor de cinzas, utilizando um equipamento modelo SDT Q600 (*TA Instruments*). O gás utilizado foi ar, com uma vazão de 100 mL/min, em um cadinho de alumina, a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, entre 30 e 800 °C. Os termogramas foram gerados utilizando o software Origin 2015.

#### **4.5.3 ANÁLISE DE CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)**

Realizou-se a análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) nas amostras de quitina e quitosana para identificar as transições físicas e/ou químicas ocorridas durante o processo de decomposição. Utilizou-se o equipamento NETZSCH, modelo Pegasus® DSC 404 F3. As condições do ensaio foram: forno de prata; cadinho de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; gás N<sub>2</sub>; vazão de gás de purga de 50mL/min; rampa de aquecimento de 30 a 500°C; taxa de aquecimento de 10°C/min. Os dados foram processados com o auxílio do software Origin 2015 e Proteus 6.1.

#### **4.5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)**

Com o objetivo de analisar a morfologia das amostras de casca de camarão beneficiada e das amostras de quitina obtidas, realizaram-se MEV utilizando o equipamento Zeiss EVO MA 10, com o parâmetro de tensão ajustado em 10 kV. Antes de realizar as microscopias, as amostras foram revestidas com ouro.

#### **4.5.5 DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX) E DETERMINAÇÃO DE CRISTALINIDADE**

O perfil cristalino das amostras de quitina e quitosana foi avaliado utilizando um difratômetro Philips, modelo X'pert MPD. O tubo de Raios X com radiação Cu K $\alpha$  foi empregado no intervalo de varredura de 5-50° para caracterização das amostras de quitina e 10-50° para caracterização das amostras de quitosana, com uma

velocidade de 0,05° por segundo, fenda de 1/2° e janela de 20mm. Da DRX, é possível estabelecer os níveis de cristalinidade da quitina. O índice de cristalinidade ( $I_{CR}$ ) pode ser calculado utilizando a equação 5 (ANDRADE, 2012).

$$I_{CR} = \frac{I_C - I_A}{I_C} * 100 \quad \text{Eq. 5}$$

Sendo:

$I_{CR}$  = Índice de cristalinidade;

$I_C$  = Intensidades dos sinais nas regiões cristalinas ( $2\theta \cong 20^\circ$ );

$I_A$  = Intensidades dos sinais nas regiões amorfas ( $2\theta \cong 10^\circ$  a  $13^\circ$ ).

#### 4.5.6 DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO TOTAL PELO MÉTODO DE KJELDAHL

O teor de nitrogênio total foi medido para acompanhar o comportamento deste parâmetro na casca de camarão beneficiada e nas amostras de quitina (amostras M1P3, M3P3, M6P3, M6P1 e M6P6). O método de Kjeldahl determina o nitrogênio total de uma amostra (HAYES, 2020). A base do processo de Kjeldahl é a conversão do nitrogênio presente na amostra em sal amoniacal (sulfato de amônio, por meio de  $H_2SO_4$ ). Em seguida, desloca-se o amônio para uma solução ácida (ácido bórico). A quantidade de nitrogênio que deu origem ao amônio é determinada por titulação. A equação 6 expressa o cálculo utilizado para a determinação do teor de nitrogênio total das amostras (ICTA UFRGS, 2017).

$$\%N_{Total} = \frac{(F_c * V_{H_2SO_4} * 0,14)}{m_{amostra}} \quad \text{Eq. 6}$$

Sendo:

$F_c$  = Fator de correção do Ácido Sulfúrico 0,1N;

$V_{H_2SO_4}$  = Volume, em mL, de Ácido Sulfúrico 0,1N gasto na titulação;

$m_{\text{amostra}}$  = Massa de amostra digerida, em g.

#### 4.5.7 VISCOSIDADE INTRÍNSECA

A massa molecular das amostras de quitosana foi determinada utilizando o método de viscosimetria intrínseca, conforme descrito por RINAUDO *et al.* (1993). Esse procedimento baseia-se na fórmula de Mark-Houwink-Sakurada, indicada na equação 7 do estudo.

$$[\eta] = K * M_v^\alpha \quad \text{Eq. 7}$$

Onde:

$[\eta]$  = Viscosidade intrínseca;

$K$  e  $\alpha$  = Constantes viscosimétricas ( $K = 0,076 \text{ mL/g}$  e  $\alpha = 0,76$ );

$M_v$  = Massa molecular viscosimétrica média.

As medições foram realizadas com o auxílio de um viscosímetro de Ubbelohde, em um ambiente composto por uma solução de ácido acético e acetato de sódio nas concentrações de 0,3 mol/L e 0,2 mol/L, respectivamente. Para garantir a precisão das medições, as amostras foram analisadas em um banho maria de água potável, mantido a uma temperatura constante de 25°C (o sistema utilizado está apresentado na Figura 24).



**Figura 24**-Sistema empregado para determinação da viscosidade intrínseca.  
Elaborado pelo autor, 2023.

Foram realizadas medições dos tempos de fluxo tanto para o solvente puro ( $t_0$ ) quanto para as soluções diluídas de quitosana ( $t$ ), sendo estas últimas preparadas em concentrações conhecidas. Utilizando a relação entre esses tempos de fluxo ( $t/t_0$ ), calculou-se a viscosidade relativa ( $\eta_{rel}$ ) da solução, conforme estabelecido na equação 8.

$$n_{rel} = \frac{n}{n_0} \cong \frac{t}{t_0}, \rho \cong \rho_0 \quad \text{Eq. 8}$$

Após obtida a viscosidade relativa ( $n_{rel}$ ) é possível calcular a viscosidade específica ( $n_{sp}$ ) de acordo com a Equação 9.

$$n_{sp} = \frac{n}{n_0} - 1 \cong \frac{t}{t_0} - 1 \quad \text{Eq. 9}$$

A viscosidade reduzida ( $n_{red}$ ) das soluções de quitosana foi calculada utilizando a equação 10, baseando-se na proporção entre a viscosidade específica ( $n_{sp}$ ) e a concentração das soluções ( $c$ ).

$$n_{red} = \frac{n_{sp}}{c} \quad \text{Eq. 10}$$

Conseqüentemente, gerou-se uma curva representando a viscosidade reduzida ( $\frac{n_{sp}}{c}$ ) em função da concentração ( $c$ ) para cada amostra, utilizando soluções de quitosana em diferentes concentrações conhecidas. Da análise dessa curva e de um ajuste linear preciso, extrapolou-se o valor de viscosidade intrínseca  $[\eta]$  no eixo vertical (ordenadas). Posteriormente, realizou-se o tratamento matemático dos dados obtidos, seguindo a equação 6 e utilizando os valores previamente mencionados das constantes viscosimétricas para obtenção da massa molecular viscosimétrica média ( $M_v$ ).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO DA QUITINA E OBTENÇÃO DE QUITOSANA

A Tabela 4 apresenta os rendimentos obtidos em cada etapa do processo de extração de quitina (amostra M1P3) e obtenção de quitosana (amostra QM6P6F). O rendimento percentual é calculado com base na matéria-prima beneficiada, a partir de uma quantidade inicial de 200g de material seco. A massa do material foi determinada após cada etapa, sendo a pesagem realizada após a secagem em estufa (em base seca).

**Tabela 4**-Rendimento de extração de quitina (amostra M1P3) e de obtenção de quitosana (QM6P6).

| Etapa                     | Massa em g | Percentual em relação a matéria-prima beneficiada |
|---------------------------|------------|---|
| Matéria-prima beneficiada | 200g       | 100%  |
| Após desmineralização     | 80,3g      | 40,2%   |
| Após desproteínização     | 30,5g      | 15,2%   |
| Após despigmentação       | 29,2g      | 14,6%   |
| Após desacetilação        | 13,5g      | 6,75%   |

Elaborado pelo autor, 2023.

A extração de quitina a partir da matéria-prima beneficiada (após a desodorização e secagem) resultou em um rendimento de 14,6%, enquanto a obtenção de quitosana resultou em um rendimento de 6,75%. É comum encontrar variações nos rendimentos relatados na literatura, pois isso pode depender se a matéria-prima considerada é antes ou após o beneficiamento, e se está em base úmida ou em base seca. No estudo de MOURA *et al.*, 2007, que extraiu quitina e obteve quitosana a partir de carapaças de camarão (sem especificar a espécie), os rendimentos relatados foram de 4,8% para quitina e 2,4% para quitosana. Essa diferença pode estar relacionada ao percentual de massa associado à matéria-prima antes do beneficiamento, o que pode levar a valores de rendimento inferiores aos obtidos neste trabalho. No estudo de MACHADO, 2023, que avaliou a obtenção de quitina e quitosana a partir de resíduos da produção dos insetos *Zophobas morio* e

*Tenebrio molitor*, os rendimentos de quitina e quitosana em percentual de massa de exoesqueletos secos variaram de 11,21% a 20,89% e 6,26% a 7,07%, respectivamente, mostrando compatibilidade com os resultados obtidos neste trabalho.

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE QUITINA

### 5.2.1 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER COM REFLEXÃO TOTAL ATENUADA (FTIR-ATR)

Com o objetivo de avaliar os grupos químicos das amostras de quitina obtidas, realizou-se o ensaio de FTIR-ATR apresentados nas Figuras 25 a 29:

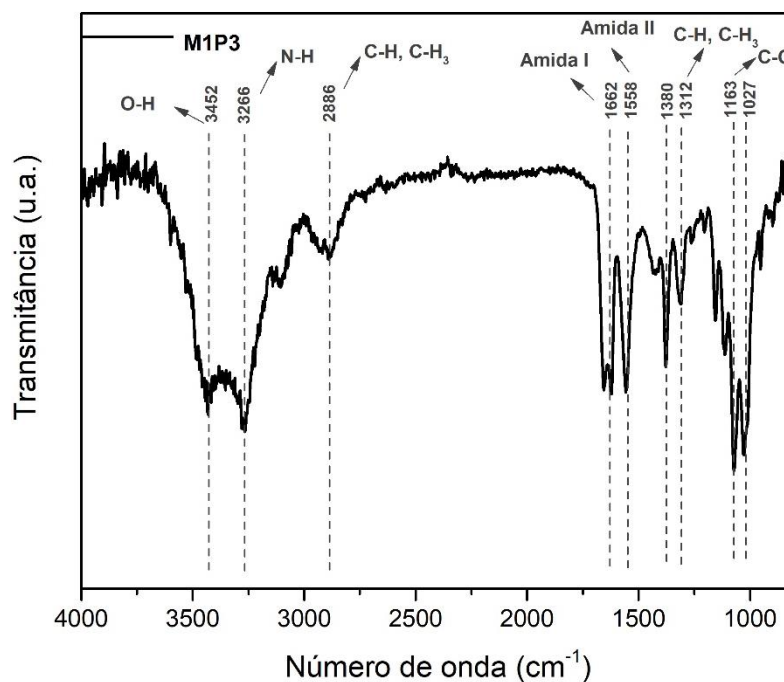


Figura 25-Espectro de FTIR-ATR da amostra M1P3.

Elaborado pelo autor, 2023.



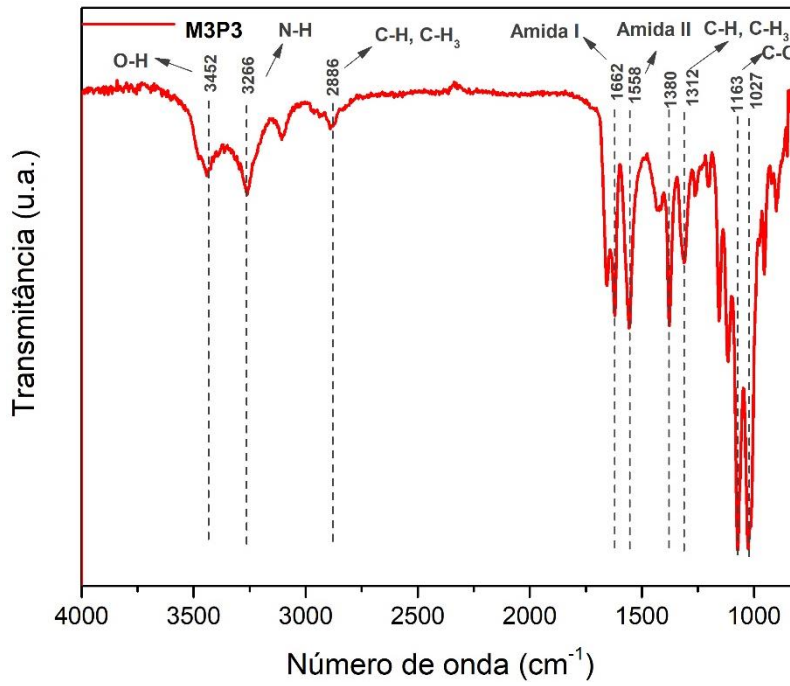


Figura 26-Espectro de FTIR-ATR da amostra M3P3.

Elaborado pelo autor, 2023.

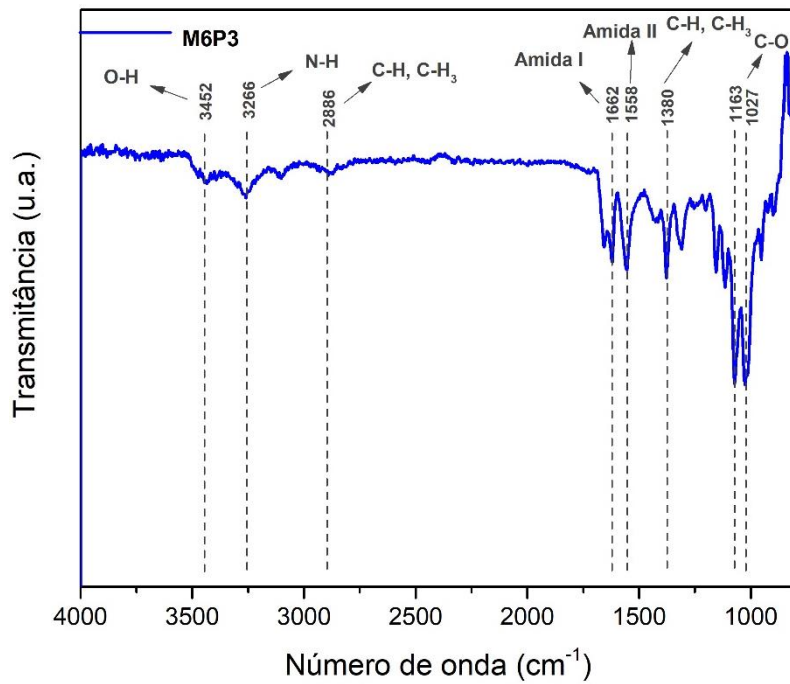


Figura 27-Espectro de FTIR-ATR da amostra M6P3.

Elaborado pelo autor, 2023.

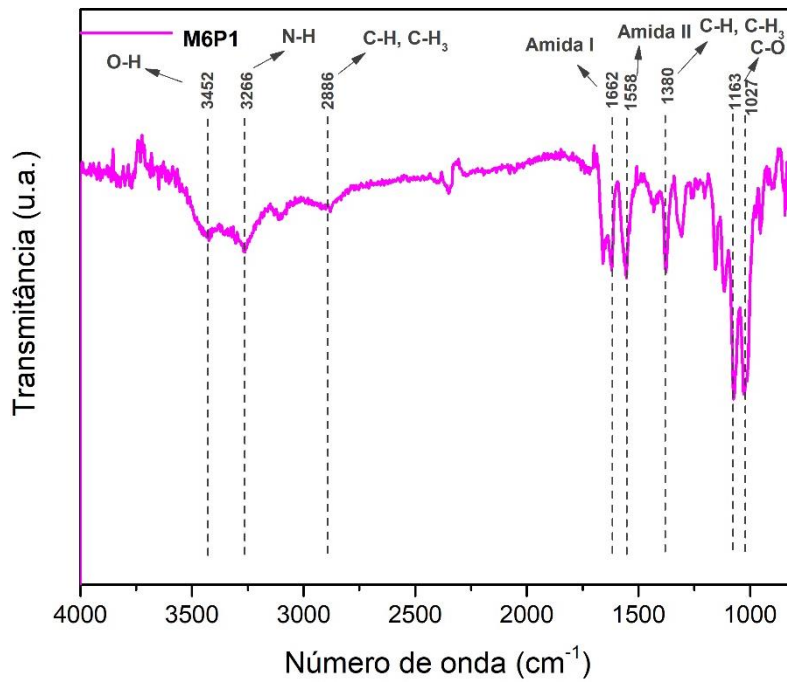


Figura 28-Espectro de FTIR-ATR da amostra M6P1.

Elaborado pelo autor, 2023.

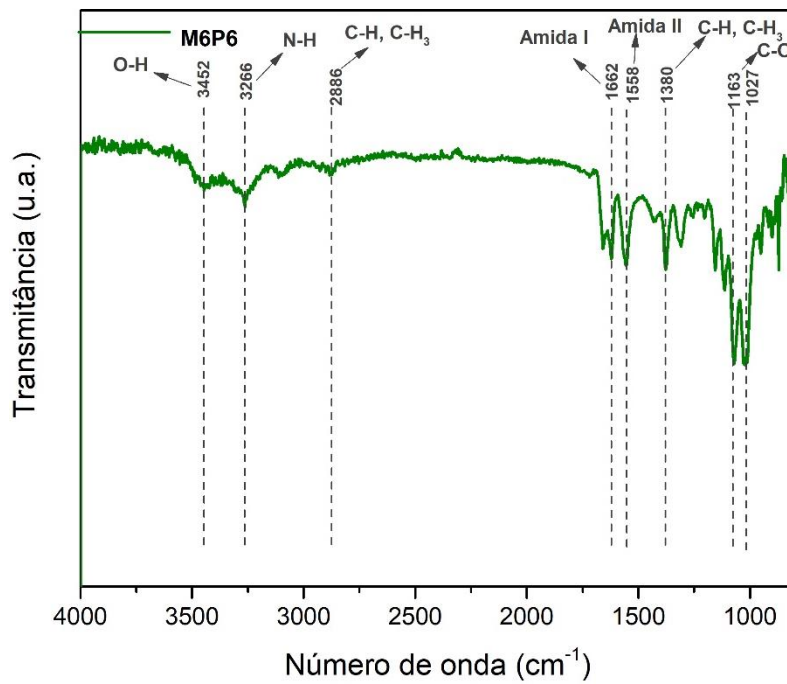


Figura 29-Espectro de FTIR-ATR da amostra M6P6.

Elaborado pelo autor, 2023.

Nos espectros, foram observadas bandas intensas em 3452 e 3266  $\text{cm}^{-1}$ . De acordo com CHEN *et al.* (2014), essas bandas são, respectivamente, associadas ao estiramento das ligações OH e NH. Estes picos são esperados, pois a quitina possui uma abundância destes grupos funcionais, que desempenham um papel crucial em suas propriedades e estrutura.

As bandas na região de 2886 a 2961  $\text{cm}^{-1}$  podem ser atribuídas à vibração de estiramento simétrico de grupos CH e  $\text{CH}_3$  e ao estiramento assimétrico de  $\text{CH}_2$ . Essas observações estão alinhadas com a presença de grupos alquil em estruturas como a quitina. Mais especificamente, as bandas em 1380 e 1312  $\text{cm}^{-1}$  indicam a deformação de  $\text{CH}_3$  e a agitação de  $\text{CH}_2$ , respectivamente (CHEN *et al.*, 2014).

Quanto aos picos distintos em 1629 e 1662  $\text{cm}^{-1}$ , ISLAM; ARNOLD; PADHYE (2015) os associam à banda Amida I. Isso sugere a presença de dois tipos de ligações de hidrogênio em um grupo C=O com os grupos NH e OH das cadeias de quitina, evidenciando a complexidade da rede de interações intramoleculares.

Finalmente, bandas que variam de 1027 a 1163  $\text{cm}^{-1}$  foram identificadas. Segundo FATIMA (2020), estas bandas estão associadas ao oxigênio da ponte assimétrica e ao estiramento C-O, comuns em polissacarídeos como a quitina.

Os resultados confirmaram qualitativamente a presença dos grupamentos funcionais típicos esperados para a quitina e evidenciam que as etapas de desmineralização e desproteínização não alteraram os seus grupamentos funcionais, em comparação com os relatados na literatura (CHEN *et al.*, 2014; ISLAM; ARNOLD; PADHYE, 2015; FATIMA2020). Além disso, a análise espectral demonstra a manutenção dos grupamentos químicos após processamento. Isso é crucial, pois a manutenção desses grupos funcionais é fundamental para a preservação das propriedades biológicas e químicas da quitina, o que, por sua vez, influencia sua aplicabilidade (KUMIRSKA *et al.*, 2011).

## 5.2.2 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA E DIFERENCIAL TÉRMICA (TGA/DTA)

A análise de TGA / DTA foi realizada para avaliar a estabilidade térmica das amostras de quitina obtidas, bem como para quantificar o teor de cinzas relacionado com o teor de minerais remanescentes nas amostras após o processo de desmineralização. Está apresentada a curva de TGA / DTA obtida para a casca do

camarão (Figura 30). A casca de camarão beneficiada foi considerada na análise para avaliar o teor de cinzas inicial presente no material.

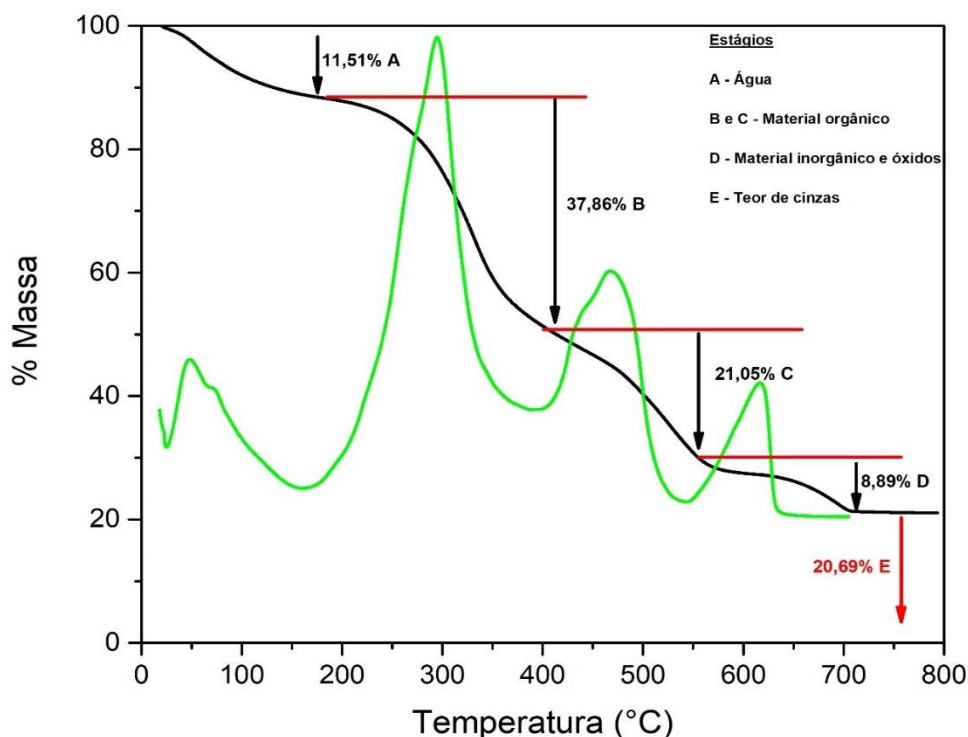


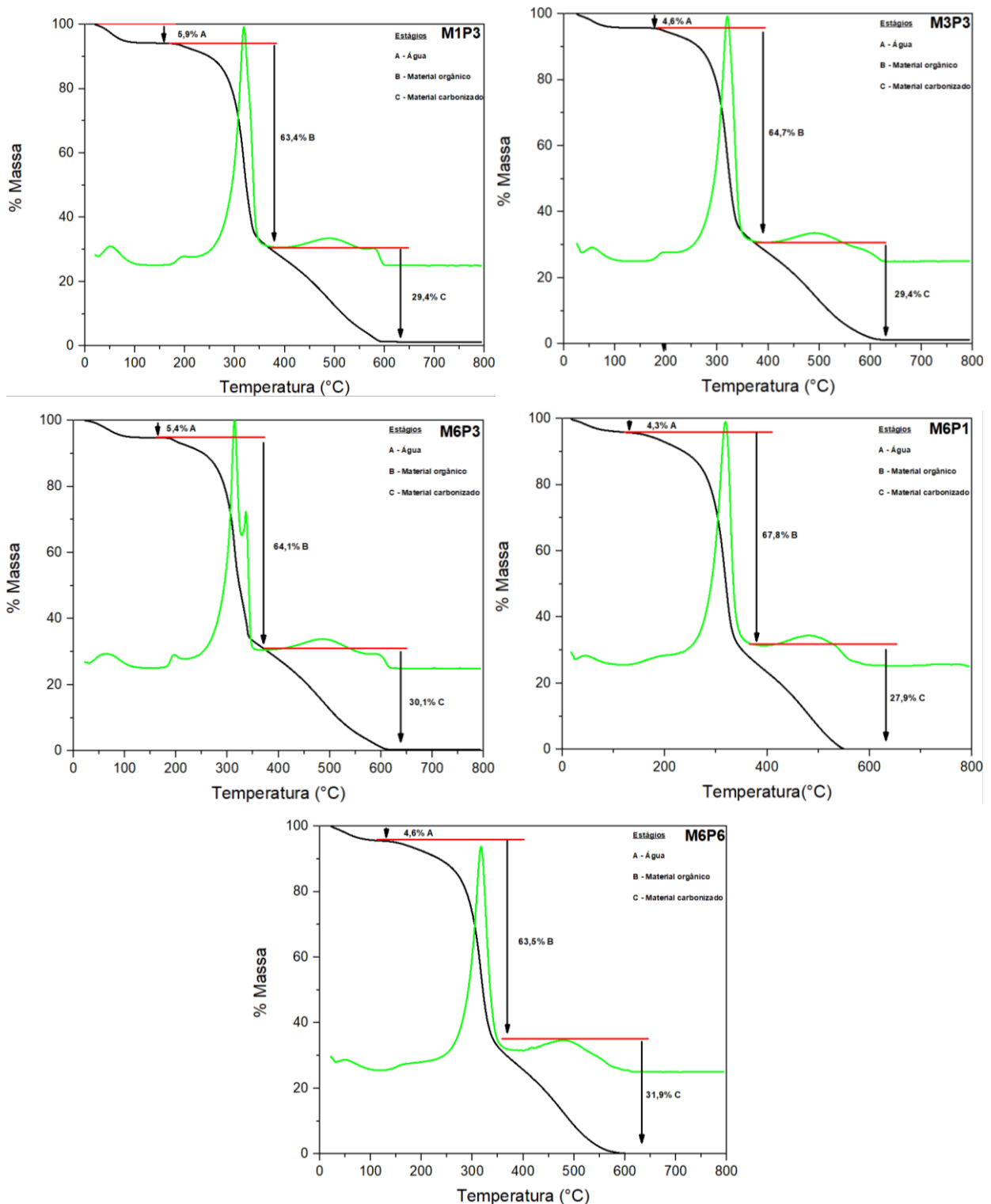
Figura 30-Curvas TGA / DTA de casca de camarão beneficiada.

Elaborado pelo autor, 2023.

A Figura 30 apresenta as curvas TG / DTA sobrepostas para a amostra de cascas de camarão, submetida à razão de aquecimento de  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$  sob atmosfera de ar. As curvas apresentam 4 eventos térmicos, semelhante ao que é relatado no trabalho de ANTONINO, 2007: perda de água (11,51%), duas curvas que correspondem a perda de material orgânico, tais como proteínas e lipídios (37,86% e 21,05%) e, por final, perda de material inorgânico e possível formação de óxidos (8,89%). O teor remanescente de 20,7% em massa na casca de camarão beneficiada é atribuído à sua parte inorgânica, representando o teor de cinzas. O resultado revelou um padrão de degradação em múltiplos estágios, com uma perda total de massa de 79,31%. Este comportamento é semelhante ao descrito por MIRON *et al.*, 2022, em relação aos diversos estágios, embora tenham encontrado uma perda total de massa de 65,57%. Fatores como espécie do camarão empregado, etapas de pré-tratamento da matéria-prima podem influenciar na obtenção de diferentes percentuais de degradação.

As demais etapas do trabalho de MIRON *et al.*, 2022 também apresentam semelhanças como: evaporação da água e compostos voláteis na faixa de 30 a 150°C, decomposição das proteínas e lipídios no segundo estágio de degradação, que ocorreu entre 150 e 400°C. A etapa final de degradação térmica, entre 600 e 700 °C, corresponde à decomposição de CaCO<sub>3</sub> em CaO e CO<sub>2</sub>. Este padrão de degradação térmica é reforçado por trabalhos como o de HAJJI *et al.*, 2017; QUEIROZ *et al.*, 2015; PHUNG HAI; SUGIMOTO, 2018, que também documentam eventos semelhantes na decomposição de compostos de cálcio a altas temperaturas. Esses estudos corroboram a ideia de que a composição e as propriedades térmicas das cascas de camarão são consistentes em diferentes amostras e métodos de análise, apesar das variações inerentes às fontes naturais.

São apresentadas as curvas TGA / DTA das amostras correspondentes às amostras M1P3, M3P3, M6P3, M6P1 e M6P6 de quitina (Figura 31). Todas apresentam os três estágios principais de degradação: perda de água, perda de material orgânico e perda de material carbonizado, identificadas nas figuras como estágios A, B e C, respectivamente.



**Figura 31**-Curvas TGA / DTA das amostras de quitina M1P3, M3P3, M6P3, M6P1 e M6P6.

Elaborado pelo autor, 2023.

As cinco amostras apresentaram perfis de decomposição semelhantes, representados pelos seguintes eventos: perda de água (na faixa de 55°C a 100°C), perda de material orgânico (de 185°C a 350°C) e perda de material carbonizado (de

367°C a 590°C). Os picos de temperatura correspondentes aos três eventos citados das amostras, bem como os respectivos percentuais de perda de massa associados, estão apresentados na Tabela 5:

**Tabela 5-**Picos de temperatura para cada etapa de decomposição e respectivos % de perda de massa correspondentes às curvas TGA / DTA obtidas.

| Amostra | Temperatura de pico de perda de água e % de massa | Temperatura de pico de perda de material orgânico e % de massa | Temperatura de pico de perda de material carbonizado e % de massa | Teor de cinzas |
|---------|---|--|---|----------------|
| M1P3    | 55°C e 5,9%                                       | 320°C e 63,4%  | 490°C e 29,4%   | 1,3%           |
| M3P3    | 57,5°C e 4,6%                                     | 321,2°C e 64,7%  | 494,5°C e 29,4%   | 1,3%           |
| M6P3    | 67,5°C e 5,4%                                     | 315,2°C e 64,1%  | 484,8°C e 30,1%   | 0,4%           |
| M6P1    | 50,0°C e 4,3%                                     | 317,6°C e 67,8%  | 484°C e 27,9%   | ~0%            |
| M6P6    | 57,0°C e 4,6%                                     | 318,2°C e 63,5%  | 483,6°C e 31,9%   | ~0%            |

Elaborado pelo autor, 2023.

O comportamento verificado apresentou similaridades, conforme também relatado no trabalho de ANTONINO (2007), que descreve a obtenção de curvas em amostras de quitina tratadas com diferentes concentrações de HCl (0,25M, 0,5M e 1M) e NaOH (1% e 10% m/V). A faixa de perda de massa relatada nesse estudo para cada etapa foi de 5,85% a 7,5% para a perda de água, 59,8% a 64,6% para a perda de material orgânico, através da degradação da estrutura sacarídica das moléculas, incluindo a desidratação dos anéis sacarídicos e a decomposição das unidades acetiladas da quitina, e 26,45% a 30,4% para a perda de material inorgânico.

O teor de cinzas remanescente nas amostras de quitina variou de aproximadamente 0% a 1,3%. Especificamente, as três amostras que passaram por

um processo de desmineralização de 6 horas (Amostras M6P3, M6P1 e M6P6) foram as que apresentaram os menores percentuais de teor de cinzas. Nas amostras M6P1 e M6P6, o gráfico apresentou um teor de cinzas negativo, possivelmente devido a um erro de análise associado à calibração do equipamento. O tempo de desmineralização no processo de purificação da quitina apresenta implicações significativas para a otimização de sua qualidade e para aplicações posteriores. Os resultados de TGA/DTA evidenciam a eficiência do processo de desmineralização na eliminação do carbonato de cálcio (não havendo degradação entre 600 e 700°C).

### **5.2.3 ANÁLISE DE CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)**

Utilizando a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), analisaram-se as amostras de quitina para identificar as alterações físicas e/ou químicas ocorridas durante seu processo de decomposição. As curvas de DSC ilustram o comportamento térmico das amostras de quitina M1P3, M3P3, M6P3, M6P1, M6P6, como demonstrado na Figura 32.



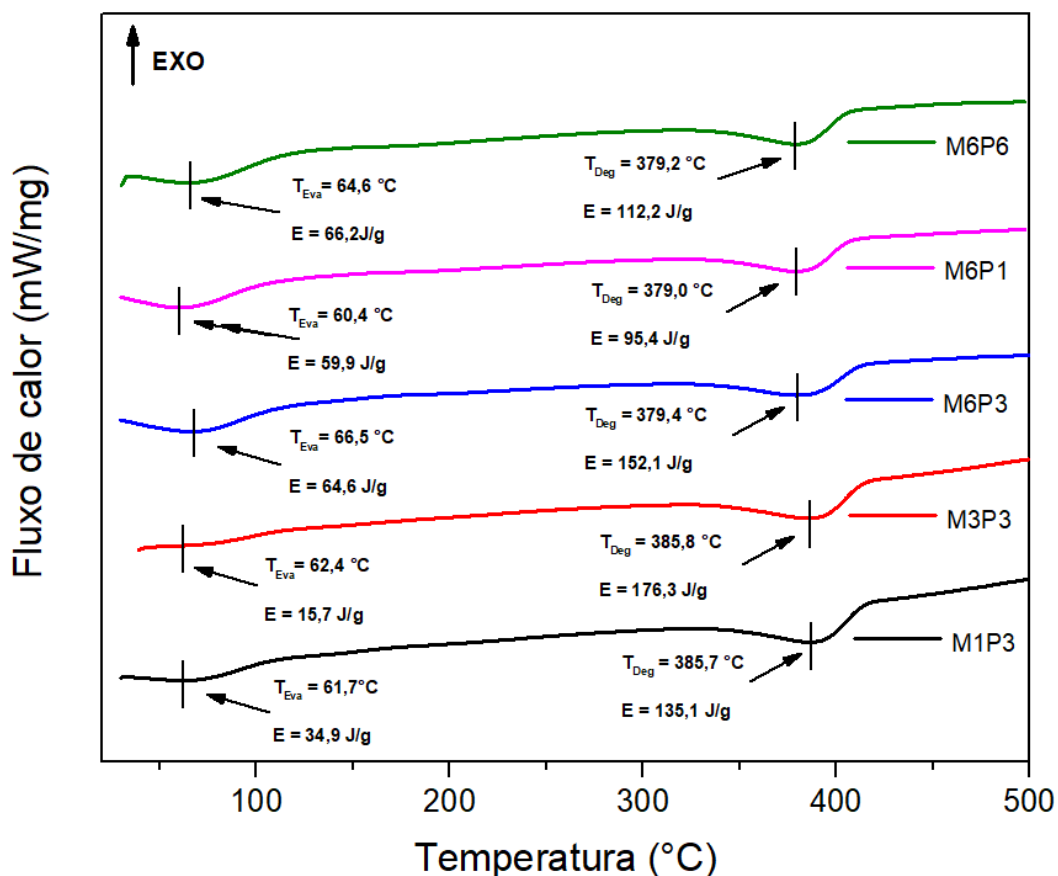


Figura 32-Curvas de DSC das amostras de quitina.

$T_{Eva}$  = Temperatura de evaporação de água; E = Calores de Transição;  $T_{Deg}$  = Temperatura de Degradação da Quitina.

Elaborado pelo autor, 2023.

No trabalho de KAYA *et al.*, 2017, que avaliam de maneira mais abrangente as características físico-químicas das diferentes estruturas polimórficas da quitina ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ), são apresentadas informações relevantes para a caracterização desse polímero. No estudo, as análises de DSC identificam dois picos endotérmicos para as três formas de quitina. No entanto, para esta comparação, serão considerados apenas os dados da  $\alpha$ -quitina, a qual é predominante em carapaças de camarão e foi a escolhida para o presente trabalho. O primeiro pico endotérmico, referente à evaporação de água, segundo KAYA *et al.*, 2017, ocorreu a 65,2°C ( $T_{Eva}$ ), sendo compatível com os valores de temperatura encontrados em todas amostras de quitina (valores variando de 60,4°C a 66,4°C). Para o segundo pico, que está relacionado à degradação do polímero ( $T_{Deg}$ ), KAYA *et al.*, 2017 encontraram para a  $\alpha$ -quitina um pico em 375,3°C. De acordo com o trabalho mencionado, a  $\alpha$ -quitina é a estrutura

polimórfica que apresenta a maior temperatura endotérmica para o segundo pico, e os resultados encontrados neste trabalho foram compatíveis com os dos autores supracitados, variando de 379°C a 385,7°C, mantendo compatibilidade com o comportamento da  $\alpha$ -quitina.

No trabalho de JANG *et al.*, 2004, as características físico-químicas das formas polimórficas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  da quitina também são exploradas. Ao avaliar as curvas de DSC nesse estudo, constatou-se um pico endotérmico amplo e fraco para a primeira transição endotérmica da quitina, de 50°C a 140°C aproximadamente, atribuído à evaporação da água adsorvida à quitina. Os resultados apresentados na Figura 32 também evidenciam uma transição endotérmica fraca e ampla para as cinco amostras de quitina na mesma faixa de temperatura. Quanto ao segundo pico endotérmico, de acordo com JANG *et al.*, 2004, a  $\alpha$ -quitina possui uma estrutura cristalina muito rígida devido às ligações de hidrogênio intrafolhas (ligações na mesma camada da estrutura cristalina) e interfolhas (ligações entre as camadas da estrutura cristalina), refletindo na maior temperatura de pico encontrada para esta estrutura cristalina em comparação às estruturas  $\beta$  e  $\gamma$  ( $\beta$  possui uma força intermolecular relativamente fraca devido à interação intrafolha; já a quitina  $\gamma$ , com uma estrutura antiparalela e paralela, apresenta um pico endotérmico entre aqueles da quitina  $\alpha$  e quitina  $\beta$ ). O pico endotérmico para a  $\alpha$ -quitina no trabalho citado foi o mais elevado entre as estruturas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , sendo de 330°C. Destaca-se que o fato deste valor ser inferior aos 375,3°C indicados por KAYA *et al.*, 2017, reforça que a fonte biológica da matéria-prima, a região geográfica e demais atributos conferem diferenças físico-químicas, especialmente na avaliação dos calores endotérmicos identificados na análise de DSC. Além disso, em ambos os trabalhos, informa-se que a fonte biológica é o caranguejo, mas sem especificar a espécie utilizada e demais características que possibilitassem uma distinção entre as fontes biológicas empregadas em ambos os estudos.

Observa-se uma diferença na região do segundo pico endotérmico entre as amostras M6P3, M6P1 e M6P6 em comparação às amostras M1P3 e M3P3. Isso sugere uma relação entre os tempos de processo e o pico de temperatura desta transição térmica. De acordo com ANTONINO (2007), as diferentes entalpias relacionadas à segunda transição endotérmica podem estar associadas à estabilidade do material, que por sua vez se relaciona com a %GD deste material (valores que não foram determinados neste trabalho).

Pesquisas sobre as propriedades térmicas de polissacarídeos, tais como quitina e celulose, geralmente apresentam complexidades, sobretudo devido às dificuldades na preparação das amostras e à sua decomposição térmica antes da Transição Vítrea ( $T_G$ ) e da Temperatura de Fusão ( $T_m$ ). Essa problemática origina-se da presença de cadeias rígidas nesses materiais, o que também dificulta a identificação da  $T_G$  e  $T_m$  em outros polissacarídeos. Consequentemente, esses dados não estão especificados na Figura 32.

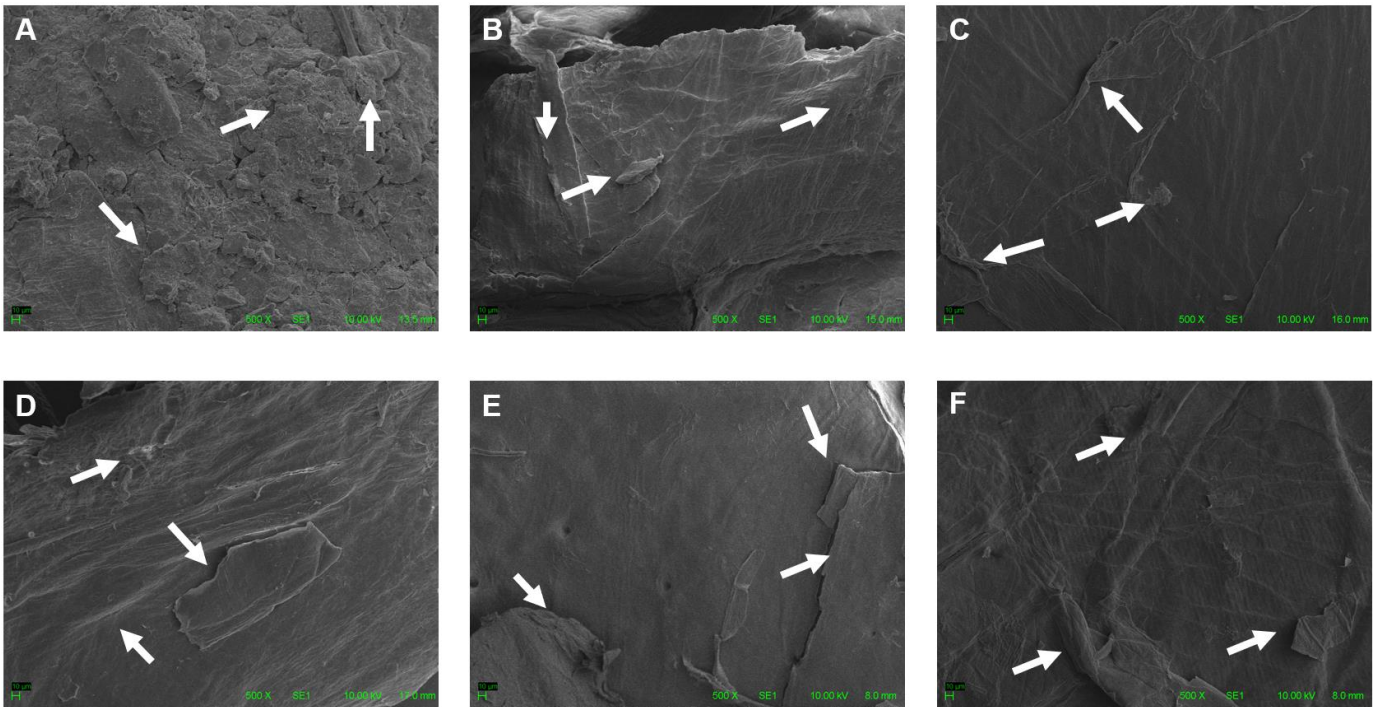
#### 5.2.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

MEV é uma técnica que proporciona imagens de alta resolução, superiores às da microscopia óptica. Esta técnica facilita a análise dos aspectos morfológicos dos materiais. Ao examinar as imagens obtidas por MEV da casca de camarão beneficiada e das amostras de quitina, torna-se evidente que o processo químico de desmineralização, desproteíntização e despigmentação altera a morfologia do material, demonstrando diferenças visuais significativas entre a casca beneficiada e as amostras de quitina.

Destaca-se que análises de MEV da quitosana não foram realizadas, pois, conforme relatado por ANTONINO *et al.* (2017) e ANTONINO (2007), não há variações morfológicas significativas entre a quitina e a quitosana. A variação morfológica mais significativa ocorre nas etapas iniciais do processo, que correspondem à desmineralização, desproteíntização e despigmentação. Adicionalmente, de acordo com JANTZEN DA SILVA LUCAS *et al.* (2021), a morfologia da superfície da quitina e quitosana varia conforme a espécie da fonte biológica e também pode variar dentro da mesma espécie, exibindo diferentes morfologias superficiais que vão desde lisas sem nanoporos até fibrilares com ou sem nanoporos e nanofibras distintas, provavelmente devido às diferenças na estrutura.

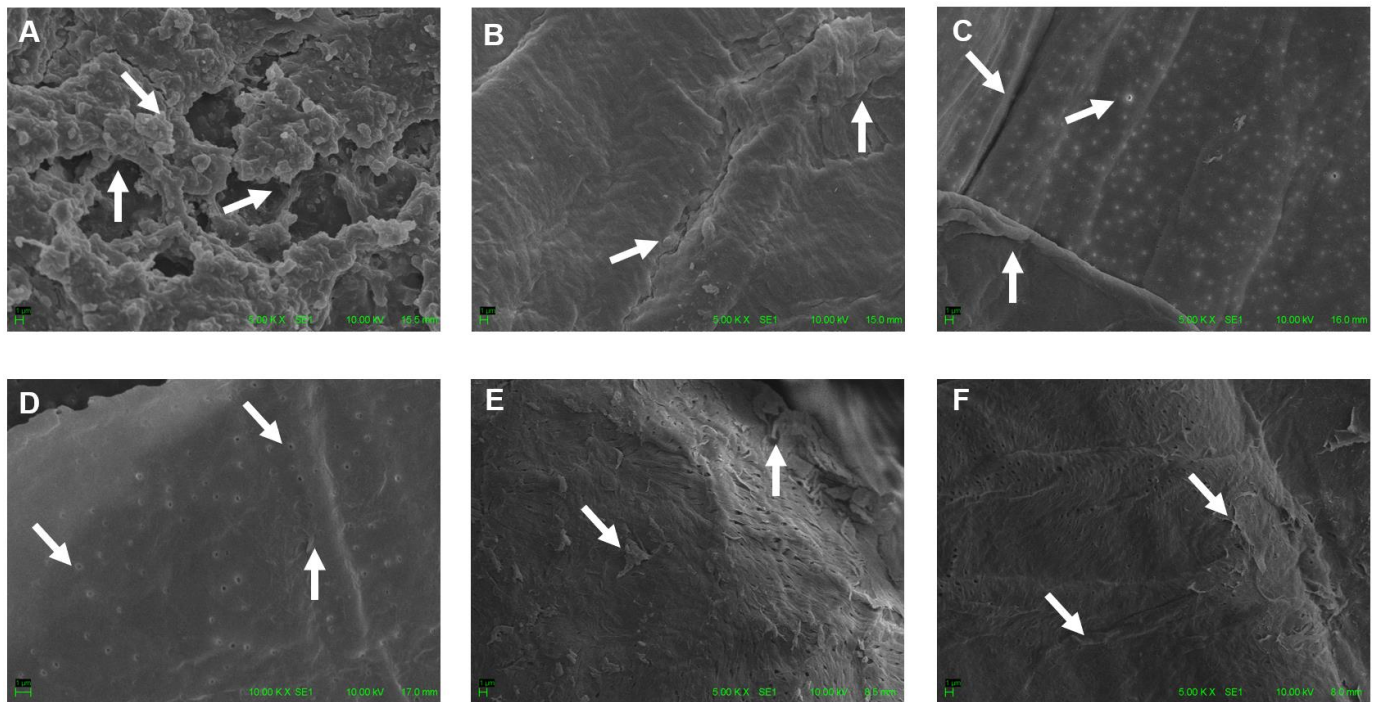
São apresentadas as imagens correspondentes à morfologia da casca de camarão beneficiada (imagem A), comparadas com as amostras de quitina M1P3 (imagem B), M3P3 (imagem C), M6P3 (imagem D), M6P1 (imagem E) e M6P6 (imagem F) nas ampliações de 500x (Figura 33), 5.000x (Figura 34) e 10.000x (Figura 35). Na casca beneficiada, observa-se uma estrutura compacta, caracterizada por uma textura rugosa e irregular (indicada por setas), promovida pela presença de fases minerais e orgânicas. As imagens das amostras de quitina, após as etapas de

desmineralização, desproteinização e despigmentação, revelam um material com menos irregularidades do que a casca original, mas com a presença de multicamadas fibrosas ásperas e compactas sobre a superfície e presença de poros, em especial nas amostras M3P3 (Figura C) e M6P3 (Figura D), conforme indicado por setas apresentadas nas Figuras 34 e 35, demonstrando compatibilidade com os resultados de ANTONINO *et al.* (2017).



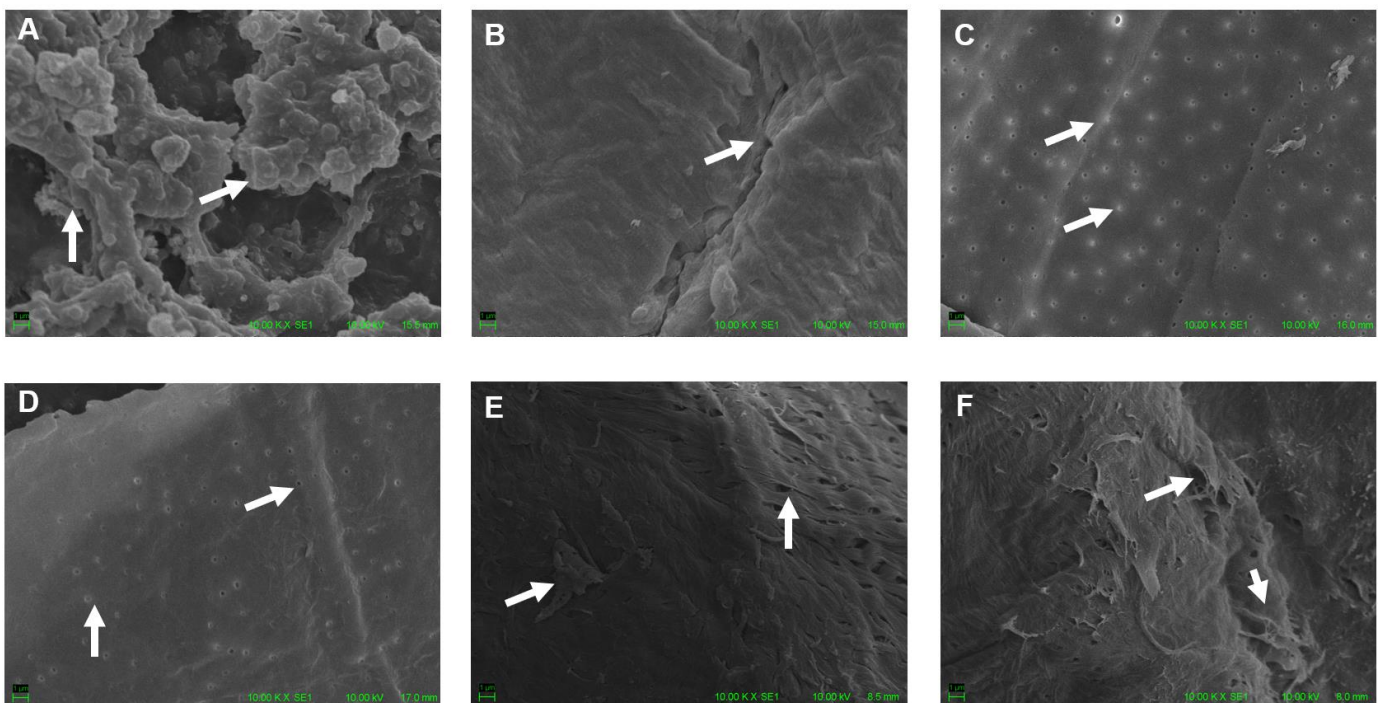
**Figura 33**-Imagens de MEV (magnificação de 500x) da casca de camarão beneficiada “A” (superfície rugosa e com irregularidades) e amostras de quitina: M1P3 “B”, M3P3 “C”, M6P3 “D”, M6P1 “E” e M6P6 “F” (presença de multicamadas, ásperas e compactas).

Elaborado pelo autor, 2023.



**Figura 34**-Imagens de MEV (magnificação de 5.000x) da casca de camarão beneficiada “A” (superfície rugosa e com irregularidades) e amostras de quitina: M1P3 “B”, M3P3 “C”, M6P3 “D”, M6P1 “E” e M6P6 “F” (presença de poros, multicamadas, ásperas e compactas).

Elaborado pelo autor, 2023.



**Figura 35**-Imagens de MEV (magnificação de 10.000x) da casca de camarão beneficiada “A” (superfície rugosa e com irregularidades) e amostras de quitina: M1P3 “B”, M3P3 “C”, M6P3 “D”, M6P1 “E” e M6P6 “F” (presença de poros, multicamadas, ásperas e compactas).

Elaborado pelo autor, 2023.

### 5.2.5 ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX) E DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE CRISTALINIDADE

A técnica de DRX é amplamente utilizada na caracterização de materiais, permitindo obter informações detalhadas sobre a estrutura de um material, incluindo o arranjo dos átomos e o perfil cristalino. Esta técnica é eficaz para diferenciar claramente a quitina original de seus derivados desacetilados. O padrão de difração da quitina exibe picos mais definidos e numerosos em comparação com os da quitosana, o que é atribuído à presença de domínios cristalinos maiores e em maior quantidade na quitina (ROBERTS, 1992; ZHANG *et al.*, 2000).

Ao analisar o espectro de DRX da quitina, identificaram-se picos ocorrendo nas regiões de 9,3°, 12,7°, 19,2°, 20,6°, 23,4°, 26,5° e 39,2° - 2 $\theta$ , que correspondem aos planos cristalográficos (002), (012), (101), (110), (103), (031) e (211), respectivamente, como ilustrado na Figura 36. Com base na análise dos picos obtidos na DRX da quitina, foi possível confirmar a presença da forma  $\alpha$ -quitina nas cinco amostras, o que já era presumível dos resultados das curvas de DSC que indicavam a presença dessa forma polimórfica. Os picos identificados são compatíveis com aqueles relatados por CARLSTRÖM (1957), KUMIRSKA *et al.* (2010) e ANTONINO *et al.* (2017).

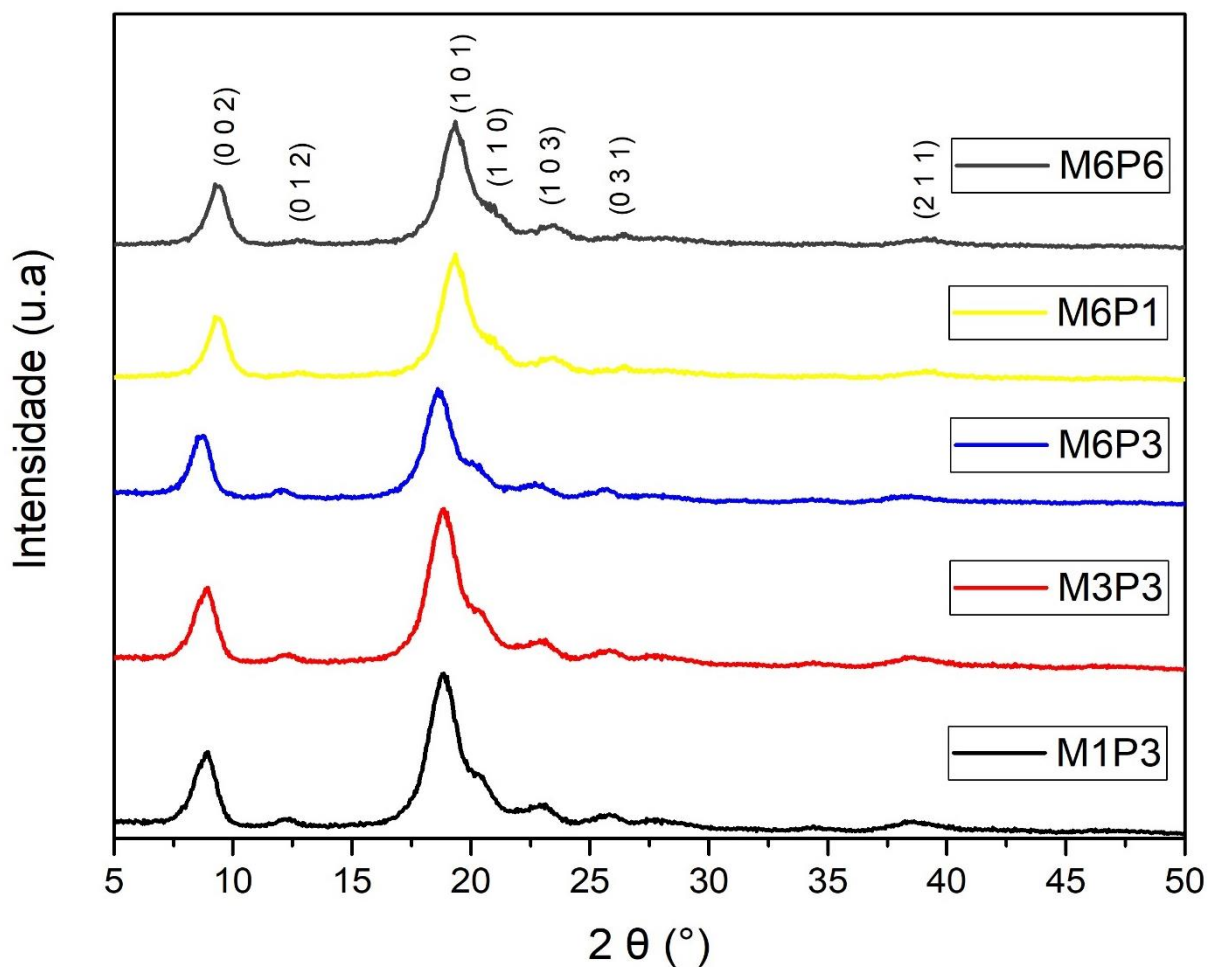


Figura 36-Padrão de DRX das 5 amostras de quitina confirmando a estrutura cristalina da  $\alpha$ -quitina.

Elaborado pelo autor, 2023.

A Tabela 6 apresenta os valores de intensidades, considerando os sinais nas regiões cristalinas ( $2\theta \cong 20^\circ$ ) e nas regiões amorfas ( $2\theta \cong 10^\circ$  a  $13^\circ$ ). Também são apresentados os resultados dos índices de cristalinidade calculados para as cinco amostras de quitina, conforme a equação 5 (item 4.5.5).

**Tabela 6-**Determinação do índice de cristalinidade das amostras de quitina.

| <b>Amostra</b> | <b>Intensidade na região cristalina<br/>(<math>2\theta \cong 20^\circ</math>)</b> | <b>Intensidade na região amorfa<br/>(<math>2\theta \cong 10^\circ</math> a <math>13^\circ</math>)</b> | <b>Índice de cristalinidade</b> |
|----------------|---|---|---------------------------------|
| M1P3           | 4483,0  | 104,0   | <b>97,7%</b>                    |
| M3P3           | 4472,3  | 103,3   | <b>97,7%</b>                    |
| M6P3           | 2887,9  | 107,3   | <b>96,3%</b>                    |
| M6P1           | 3257,7  | 62,3  | <b>98,0%</b>                    |
| M6P6           | 3237,0  | 38,9  | <b>98,8%</b>                    |

Elaborado pelo autor, 2023.

Os resultados obtidos indicam a obtenção de quitina com um índice de cristalinidade superior a 97%, sendo o alto índice de cristalinidade uma característica da estrutura polimórfica da  $\alpha$ -quitina. Contudo, de acordo com FAN; SAITO; ISOGAI., 2008 e FAN; SAITO, 2009, o cálculo do índice de cristalinidade de amostras de quitina varia conforme o método empregado, podendo os valores oscilar entre 57% e 93%. No estudo de IOELOVICH, 2014, que avalia a cristalinidade e hidrofiliçidade de quitina e quitosana, foi determinado um índice de cristalinidade de 93% para uma quitina extraída de caranguejos e obtida da Sigma-Aldrich (com grau de desacetilação de 85% e  $M_w$  de 400kDa), usando a mesma metodologia de cálculo adotada neste trabalho. IOELOVICH (2014) também avalia a influência do processo de moagem sobre o índice de cristalinidade, utilizando um moinho de bolas de laboratório com esferas de cerâmica por 5 e 24 horas a 250 RPM. Observou-se uma relação direta entre a redução do índice de cristalinidade e o tempo de moagem, atingindo índices de 72% e 46% para 5h e 24h, respectivamente. Portanto, os resultados sugerem que os processos químicos de desmineralização, desproteinização e despigmentação



realizados neste trabalho não influenciaram o índice de cristalinidade da quitina, uma vez que todos os valores ficaram dentro da faixa de 96,3% a 98,8%. Contudo, é evidente que tratamentos subsequentes, como a moagem prolongada em moinhos de bolas, podem reduzir esse índice, conforme relatado por IOELOVICH, 2014.

### 5.2.6 DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO TOTAL PELO MÉTODO DE KJELDAHL

A partir da metodologia de cálculo apresentada na equação 6 (item 4.5.6), obtiveram-se os seguintes resultados para o nitrogênio total na casca de camarão beneficiada e nas cinco amostras de quitina, os quais estão sumarizados na Tabela 7.

**Tabela 7-**Teores de nitrogênio total pelo método de Kjeldahl.

| <b>Amostra</b>               | <b>Teor de Nitrogênio Total (%)</b> |
|------------------------------|-------------------------------------|
| Casca de camarão beneficiada | <b>5,8%</b>                         |
| M1P3                         | <b>5,3%</b>                         |
| M3P3                         | <b>5,5%</b>                         |
| M6P3                         | <b>5,8%</b>                         |
| M6P1                         | <b>5,3%</b>                         |
| M6P6                         | <b>5,8%</b>                         |

Elaborado pelo autor, 2023.

Os resultados indicaram que as cinco amostras de quitina e a casca de camarão beneficiada apresentaram teores de nitrogênio total muito semelhantes, todos abaixo de 6%. A proximidade do teor de nitrogênio da casca de camarão beneficiada em relação às amostras de quitina sugere a eficácia do processo de

beneficiamento na redução do teor de nitrogênio total, possivelmente associado à presença de proteínas no material. O beneficiamento incluiu etapas de lavagem preliminar, desodorização por fervura, lavagem final, secagem, trituração e armazenamento. A literatura sugere que a submissão do material a altas temperaturas e lavagens sucessivas é eficaz na redução do teor de nitrogênio total, facilitando a remoção das proteínas remanescentes. Isso é corroborado pela aplicação do processo de desodorização por fervura, que envolveu a exposição do material a água quente (aproximadamente 100°C). Estudos como o de BENHABLES *et al.*, 2013 relatam processos semelhantes, como lavagens em água corrente morna para remover substâncias orgânicas solúveis, proteínas aderentes e outras impurezas, seguidas de fervura por 1 hora para remoção de tecidos. ALDILA *et al.*, 2020 mencionam o enxague dos resíduos de camarão várias vezes com água fervente para eliminar outras impurezas, seguido de lavagem com água destilada e secagem ao sol (aproximadamente 27°C) por 4 horas. ANTONINO *et al.*, 2017 descrevem um processo de lavagem das cascas com água para remover impurezas, seguido de secagem em forno de ar quente a 90°C por 6 horas. Portanto, o beneficiamento das cascas de camarão, especialmente nas etapas de lavagens preliminares e finais, assim como a exposição à água fervente por 2 horas, sugere uma significativa redução do teor de nitrogênio total, relacionado à presença de proteínas e outras impurezas. Destaca-se que o uso de água fervente para separar a casca da carne do camarão é uma prática comum na culinária, oferecendo vantagens também aplicáveis a processos industriais de extração de quitina, possibilitando a obtenção de um material com menor presença de impurezas.

Os teores de nitrogênio total das cinco amostras de quitina mostraram-se compatíveis com a literatura. No estudo de ROSMAWATI; RUMHAYATI; SRIHARDYASTUTIE, 2019, que aborda a biorecuperação de quitina a partir de resíduos de casca de camarão (*Litopenaeus vanamme*) utilizando fermentação e co-fermentação de *L. plantarum* e *B. thuringiensis*, foi relatado um teor de nitrogênio total inferior a 7%. Em outra pesquisa, conduzida por VALLEJO-DOMÍNGUEZ *et al.*, 2021, o uso de ultrassom no processo de desproteíntização para produção de quitina e quitosana revelou que a quitina obtida pelo método químico tradicional tinha um teor de nitrogênio total de 5,66%, valor que se enquadra no intervalo encontrado neste trabalho. Isso reforça a consistência do teor de nitrogênio total das amostras de quitina com o geralmente reportado na literatura. Além disso, os resultados mostram que a

etapa de desproteíntização é desnecessária ou que ela foi totalmente ineficiente nos tempos aplicados (de 1h a 6h), uma vez que as amostras de quitina não tiveram uma redução significativa nesse teor após o processo de desproteíntização. Portanto, se o material for submetido a um processo de beneficiamento eficaz (como o adotado neste trabalho), a etapa de desproteíntização poderia ser realizada em períodos mais curtos ou em concentrações menores, ou até mesmo essa etapa poderia não ser necessária, dependendo da aplicação final desejada para o material.

### **5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE QUITOSANA**

#### **5.3.1 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) POR TRANSMISSÃO**

A análise de FTIR por transmissão foi conduzida para identificar os grupos químicos da quitosana e determinar seus graus de desacetilação, com base nas equações 3 e 4 propostas por DOMSZY; ROBERTS, 1985 e BRUGNEROTTO *et al.*, 2001. Os espectros de FTIR da amostra QM6P6, sem congelamento, e da amostra QM6P6F, que passou por congelamento, estão apresentados na Figura 37. Esta figura detalha os picos de FTIR característicos, facilitando a identificação dos grupos químicos presentes na quitosana.

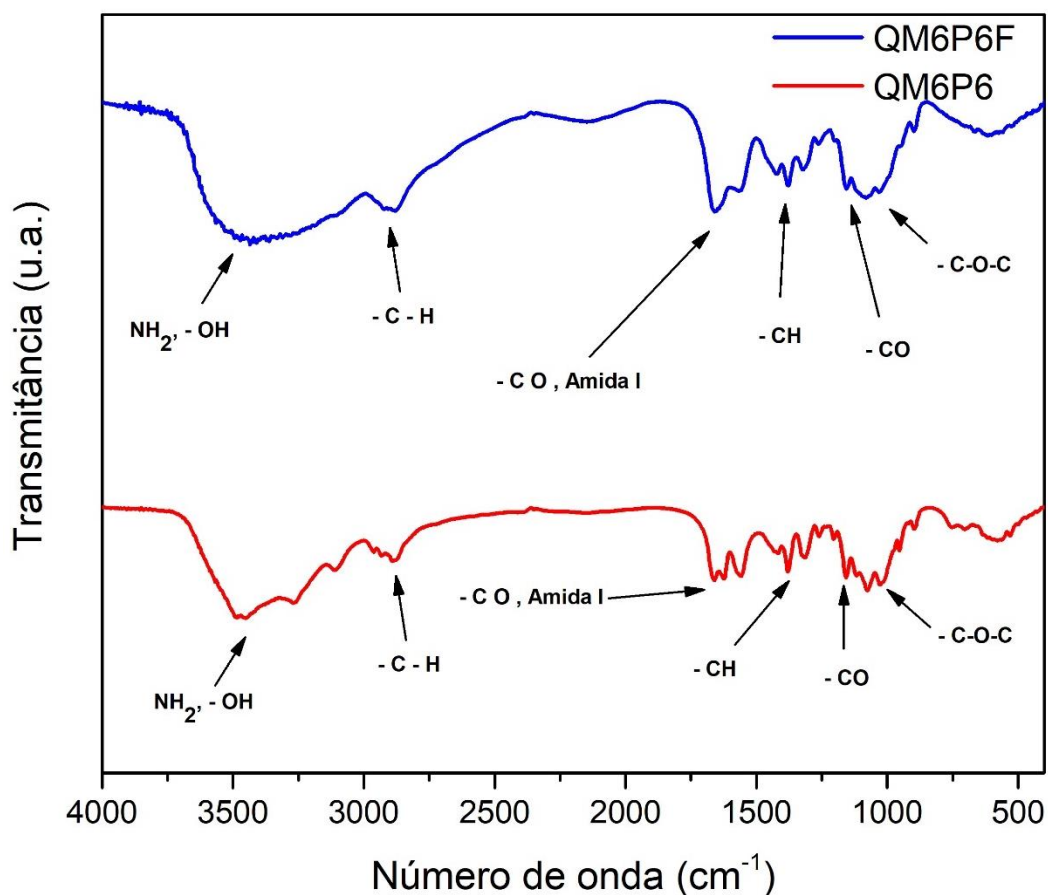


Figura 37-Espectros de FTIR das amostras de quitosana QM6P6 e QM6P6F.

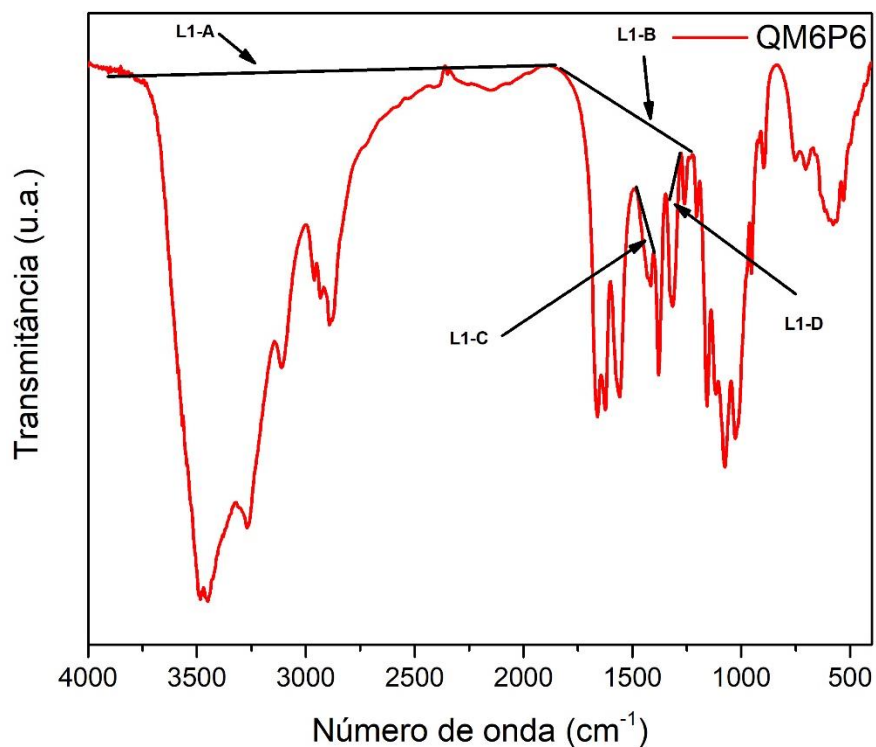
Elaborado pelo autor, 2023.

No estudo de BHARDWAJ *et al.* 2020, quitosanas de diversos graus de desacetilação foram avaliadas em seu desempenho químico para aplicações superficiais em embalagens de papel. As análises de FTIR realizadas nessas quitosanas, com desacetilação de 77%, 84% e 94%, revelaram mudanças sutis nos espectros, como deslocamento e alargamento de algumas bandas de absorção. Essas variações indicam a influência do grau de desacetilação na intensidade e largura das bandas características.

Ambas as amostras exibiram todos os grupos químicos típicos da quitosana, conforme descrito tanto por BHARDWAJ *et al.*, 2020 quanto por DRABCZYK *et al.* 2020. Foram identificadas bandas de absorção devido à vibração de estiramento do grupo OH a  $3697\text{ cm}^{-1}$  e na faixa de  $3400\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$  em ambas as amostras. A vibração de estiramento do grupo  $\text{NH}_2$  contribui para as bandas de absorção na mesma faixa que o grupo OH. As vibrações de estiramento dos grupos alquil (-C-H) são visíveis entre  $2900\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ . As vibrações de estiramento carbonil (C=O) e

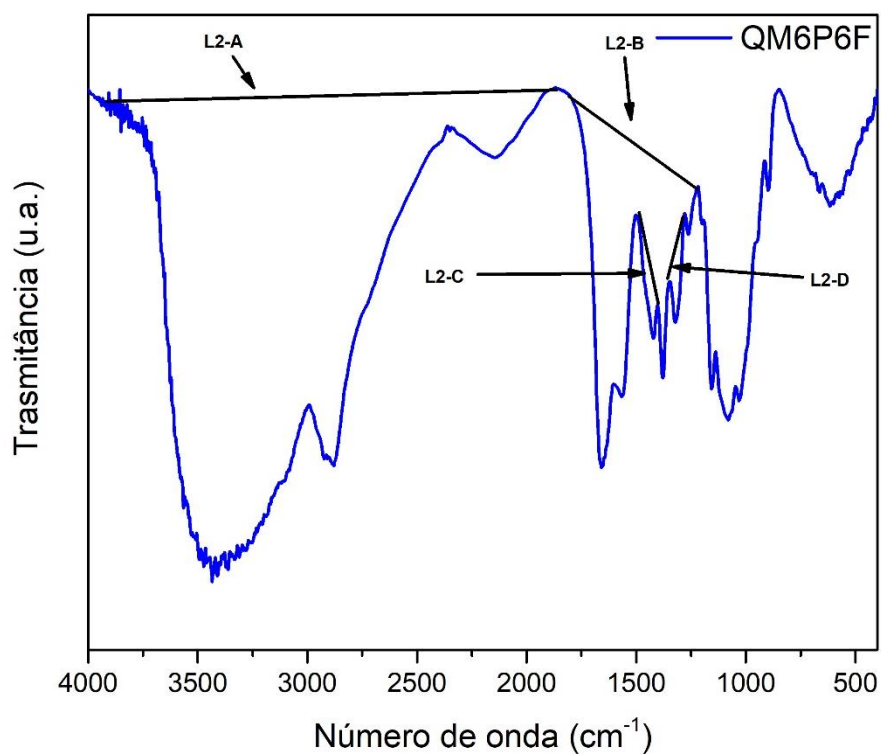
Amida I (-NH<sub>2</sub>) são identificadas entre 1750 cm<sup>-1</sup> e 1634 cm<sup>-1</sup>. A vibração do grupo alquil CH<sub>2</sub> foi observada entre 1417 e 1377 cm<sup>-1</sup>, enquanto o estiramento C-O-C simétrico foi detectado em 1160 cm<sup>-1</sup> e 1001 cm<sup>-1</sup>.

Para determinar o %GD, foram utilizados espectros de FTIR, aplicando-se quatro linhas de base distintas. Estas foram categorizadas como L1-A, L1-B, L1-C e L1-D para a amostra QM6P6 (sem congelamento) e L2-A, L2-B, L2-C e L2-D para a amostra QM6P6F (com congelamento). As amostras QM6P6 e QM6P6F foram analisadas em triplicata, ou seja, três análises de FTIR foram realizadas para cada amostra. Isso possibilitou a obtenção de três espectros para cada uma delas, conferindo maior confiabilidade e precisão aos resultados obtidos. As linhas de base correspondem a quatro regiões específicas dos espectros, com picos centrais localizados em 3450 cm<sup>-1</sup>, 1655 cm<sup>-1</sup>, 1420 cm<sup>-1</sup> e 1320 cm<sup>-1</sup>. As áreas utilizadas para o cálculo do %GD foram determinadas com a função de integração de áreas do software Origin 2015. Para melhor visualização das áreas entre as linhas de base e os espectros, os dois são apresentados em figuras distintas (um espectro de cada amostra). As linhas de base, adequadas para calcular as absorções conforme as equações 3 e 4 (item 4.5.1), estão posicionadas segundo o método proposto por KHAN; PEH; CH'NG, 2002, e ANTONINO *et al.*, em 2017. O espectro da amostra QM6P6 é exibido na Figura 38, e o da QM6P6F, na Figura 39.



**Figura 38**-Espectro FTIR da amostra QM6P6 obtido com a utilização de pastilha de KBr, exibindo a representação das linhas de base selecionadas.

Elaborado pelo autor, 2023.



**Figura 39**-Espectro FTIR da amostra QM6P6F obtido com a utilização de pastilha de KBr, exibindo a representação das linhas de base selecionadas.

Elaborado pelo autor, 2023.

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados de %GD para as amostras QM6P6 e QM6P6F, ambas em triplicata, considerando as equações de DOMSZY; ROBERTS (1985) e BRUGNEROTTO *et al.* (2001).

**Tabela 8**-Resultados do %GD para as amostras de quitosana.

| Amostra<br>n=3 | %GD médio calculado<br>por DOMSZY e<br>ROBERTS | Desvio padrão | %GD médio<br>calculado por<br>BRUGNEROTTO | Desvio padrão |
|----------------|--|---------------|---|---------------|
| QM6P6          | 77,6%  | 2,2%          | 74,8%                                     | 1,5%          |
| QM6P6F         | 85,0%  | 0,2%          | 84,8%                                     | 0,9%          |

Elaborado pelo autor, 2023.

Os resultados evidenciam que a amostra QM6P6F atingiu um %GD de aproximadamente 85%, conforme comprovado por duas metodologias de cálculo distintas. Em contraste, a amostra QM6P6 alcançou um grau de desacetilação em torno de 75%, indicando uma variação percentual de cerca de 10%. Esta diferença sugere que o congelamento da quitina em solução de hidróxido de sódio antes do processo de desacetilação aumenta o grau de desacetilação na amostra QM6P6F. Tal observação é particularmente relevante, visto que ambas as amostras foram submetidas às mesmas condições de desacetilação, empregando solução alcalina de NaOH a 12,5M, temperatura de 110°C e tempo de reação de 6 horas, com o auxílio de um condensador de refluxo.

Este fenômeno é corroborado pelas descobertas de MUKHERJEE, 2001, que em sua patente argumenta que o resfriamento potencializa a formação de cadeias de quitina em forma amorfa ou relaxada, tornando-as mais suscetíveis ao ataque de ácidos ou álcalis nas etapas subsequentes do tratamento. Esse processo resulta em uma produção mais eficaz de quitosana, reduzindo a necessidade de reagentes químicos como ácido clorídrico e hidróxido de sódio, o que torna a produção mais sustentável e menos poluente.

Em um estudo conduzido por LAMARQUE *et al.*, 2005, foi desenvolvida uma nova técnica de desacetilação de quitinas  $\alpha$  e  $\beta$  por ciclos de congelamento e extração

por vácuo, seguidos por descongelamento, aplicando quitina em solução de NaOH a 50% (m/V) em temperaturas de 80°C a 110°C. Este estudo comprovou que tais ciclos aumentam significativamente a eficácia da reação ao tornar as estruturas cristalinas das quitinas mais permeáveis às soluções alcalinas, otimizando a desacetilação.

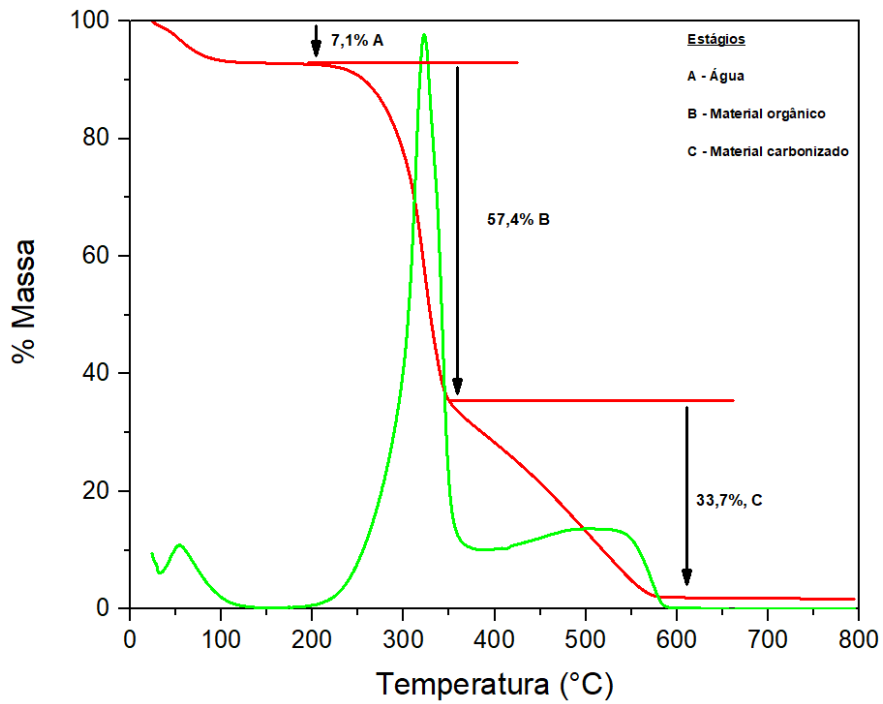
Conforme LIU *et al.*, 2010, o tratamento de congelamento e descongelamento altera as ligações de hidrogênio do polímero, desestruturando-o e tornando-o mais reativo. Essa técnica tem sido aplicada com sucesso na produção de hidrogéis à base de polissacarídeos e na pesquisa de encapsulação (COSTA; XU; BURGESS, 2014; MUTSCHLER; WOCHNER; HOLLIGER, 2015; QI *et al.*, 2015).

No estudo de BAN *et al.*, 2018, foi avaliada uma metodologia aprimorada para a produção de quitosana fúngica, empregando congelamento e descongelamento. Comparado ao método tradicional, o novo protocolo incluiu adicionar uma solução aquosa de hidróxido de sódio (400 mL de NaOH a 50% - m/V) à quitina, seguido de ciclos repetidos de congelamento com nitrogênio líquido e descongelamento à temperatura ambiente. Após 4 ciclos, a solução foi aquecida e mantida a 104°C por 10 minutos, seguida de resfriamento e separação da fase sólida por centrifugação. A quitosana foi então neutralizada, lavada, centrifugada e secada. Este método elevou o grau de desacetilação da quitosana para 72% a 85%, em comparação com 50% a 70% pelo método tradicional.

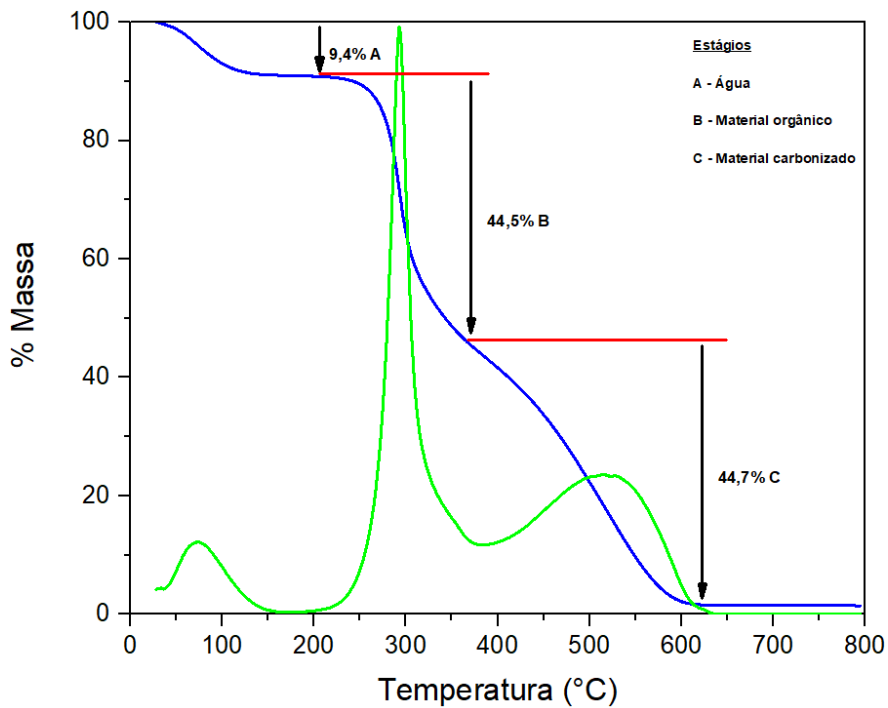
### 5.3.2 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA E DIFERENCIAL TÉRMICA (TGA/DTA)

São apresentadas as análises de TGA / DTA para as amostras QM6P6 e QM6P6F nas Figuras 40 e 41, respectivamente, com o intuito de avaliar a estabilidade térmica e a decomposição desses materiais.





**Figura 40**-Curvas TGA / DTA da amostra QM6P6 de quitosana.  
 Elaborado pelo autor, 2023.



**Figura 41**-Curvas TGA / DTA da amostra QM6P6F de quitosana.  
 Elaborado pelo autor, 2023.

Os picos de temperatura correspondentes aos três eventos das amostras QM6P6 e QM6P6F de quitosana, assim como os respectivos percentuais de perda de massa associados, estão apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9**-Picos de temperatura para cada etapa de decomposição das amostras de quitosana e respectivos % de perda de massa correspondentes às curvas TGA / DTA obtidas.

| Amostra de quitosana | Temperatura de pico de perda de água e % de massa | Temperatura de pico perda de material orgânico e % de massa | Temperatura de pico perda de material carbonizado e % de massa | Teor de cinzas |
|----------------------|---|---|--|----------------|
| QM6P6                | 55°C e 7,1%                                       | 323°C e 57,4%   | 528°C e 33,7%  | 1,7%           |
| QM6P6F               | 75°C e 9,4%                                       | 294°C e 44,5%   | 522°C e 44,7%  | 1,4%           |

Elaborado pelo autor, 2023.

Assim como nas amostras de quitina, as de quitosana também exibiram curvas de decomposição com três eventos térmicos: perda de água, perda de material orgânico e perda de material carbonizado, identificados nos gráficos como estágios A, B e C, respectivamente. O teor de cinzas remanescentes nas amostras, que é de 1,7% para a amostra QM6P6 e de 1,4% para a amostra QM6P6F, pode estar relacionado à presença de acetato de sódio residual que possivelmente não foi totalmente removido durante as etapas de lavagem. Isso ocorre porque a formação deste sal durante a desacetilação é algo esperado, devido à reação entre o hidróxido de sódio e os grupos acetilados da quitina (LAMARQUE; CHAUSSARD; DOMARD, 2007). As diferenças mais significativas nos perfis de decomposição foram observadas nos estágios B e C. Isso sugere que o processo de congelamento influenciou a estabilidade térmica do polímero, reduzindo-a. A quitosana da amostra QM6P6, com grau de desacetilação de aproximadamente 75%, apresentou um perfil de decomposição muito similar ao das quitinas, como mostrado na Figura 31 (item 5.2.2).

A relação entre maior grau de desacetilação e menor estabilidade térmica é confirmada pelo trabalho de BARBOSA *et al.*, 2019, que avaliaram a decomposição térmica de quitinas e quitosanas com diferentes graus de desacetilação usando TG-

FTIR acoplado. A ordem para a razão da perda de massa entre a segunda e a primeira etapas (desconsiderando a etapa de perda de água) foi a seguinte:

$$CCht > Cht_{25} \approx Cht_{50} \approx Ch_{70} > Ch_{90} \approx Ch_{100}$$

Sendo:

CCht = quitina como recebida;

Cht<sub>25</sub> = quitina com GD de 26,9%;

Cht<sub>50</sub> = quitina com GD de 47,5%;

Ch<sub>70</sub> = quitosana com GD de 71,8%;

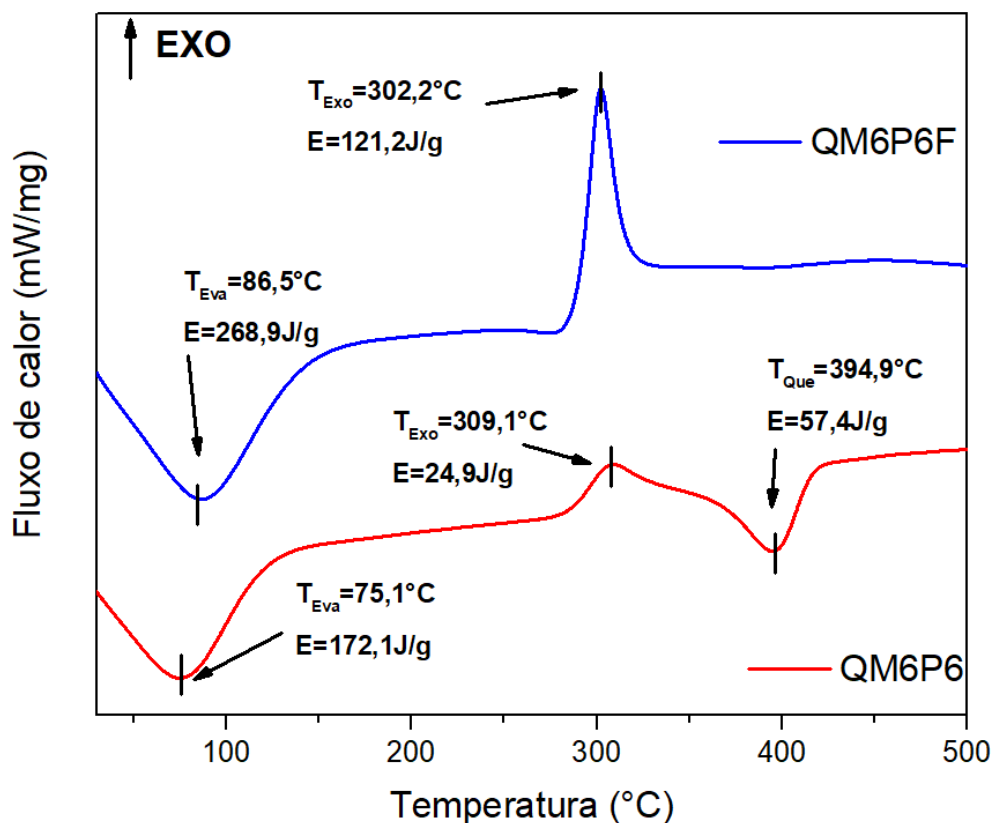
Ch<sub>90</sub> = quitosana com GD de 87,3%;

Ch<sub>100</sub> = quitosana com GD de 98,5%.

Conforme BARBOSA *et al.*, 2019, as quitosanas mostraram uma decomposição térmica em duas etapas (excluindo a perda de água), enquanto as quitinas se decompuseram principalmente na primeira etapa, com a segunda sendo mais lenta. O estudo de GÁMIZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2017, que analisa a cinética da degradação térmica da quitosana em função do %GD, constataram que o segundo processo de degradação se apresenta como uma curva que se estende no lado de alta temperatura do pico principal. Este estudo também observou que a estabilidade térmica aumenta à medida que o %GD diminui, indicando uma relação inversamente proporcional entre a estabilidade térmica e o %GD.

### 5.3.3 ANÁLISE DE CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

São apresentadas na Figura 42 as curvas de DSC obtidas para as amostras QM6P6 e QM6P6F de quitosana.



**Figura 42**-Curvas de DSC das amostras de quitosana.

$T_{Eva}$  = Temperatura de evaporação de água;  $E$  = Calores de transição;  $T_{Exo}$  = Temperatura de transição exotérmica;  $T_{Que}$  = Temperatura de queima de material carbonizado.

Elaborado pelo autor, 2023.

Na Tabela 10 são apresentadas as transições identificadas, bem como os respectivos picos de temperatura.

**Tabela 10**-Transições endo/exotérmicas e temperaturas de pico das amostras de quitosana.

| Amostra | 1ª transição endotérmica e temperatura de pico | 2ª transição endotérmica e temperatura de pico | Transição exotérmica e temperatura de pico |
|---------|--|--|--|
| QM6P6   | 172,1 J/g e 75,1 °C                            | 57,4 J/g e 394,9°C                             | 24,9 J/g e 309,1 °C                        |
| QM6P6F  | 268,9 J/g e 86,5 °C                            | -----  | 121,2 J/g e 302,2 °C                       |

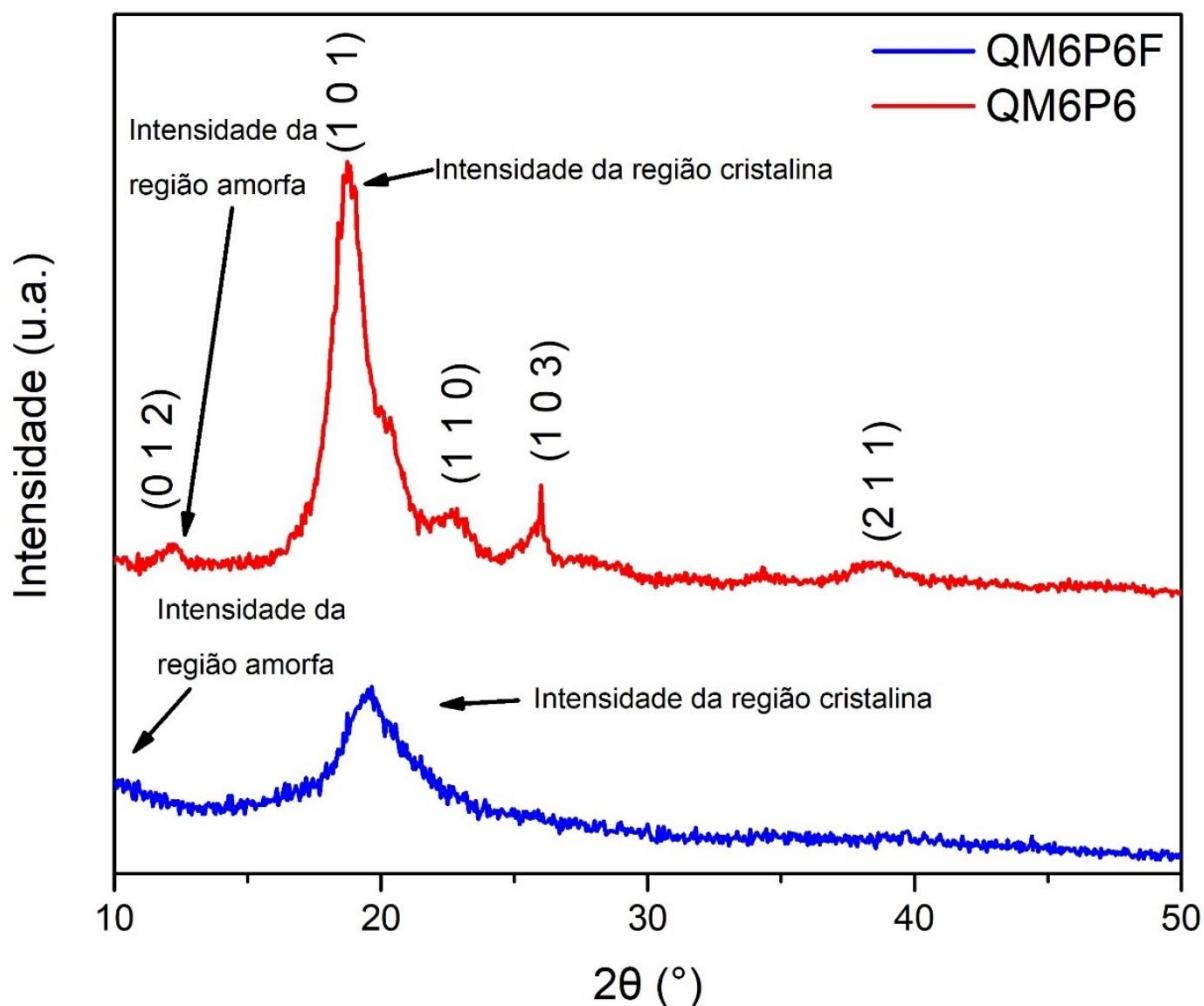
Elaborado pelo autor, 2023.

Os termogramas das amostras QM6P6 e QM6P6F revelaram uma transição endotérmica com temperaturas de pico de 86,5°C e 75,1°C, respectivamente,

associadas à desidratação do polímero (evaporação de água), ou seja, aos grupos hidrofílicos da quitosana. Adicionalmente, observou-se um segundo pico, exotérmico, com variações em sua intensidade entre ambas as amostras: na amostra QM6P6F, esse pico exotérmico foi bem definido, ocorrendo a 302,2°C, enquanto na amostra QM6P6, ele foi menos intenso, a 309,1°C. O pico exotérmico é atribuído à degradação térmica da quitosana que promove a desidratação do monômero, quebra da ligação glicosídica e decomposição das unidades acetiladas e desacetiladas (CHANDRA DEY *et al.*, 2016). Adicionalmente, a amostra QM6P6 também exibiu um pico endotérmico a 394,9°C, similar ao observado nas amostras de quitina, conforme ilustrado na Figura 32. Este segundo pico endotérmico da amostra QM6P6 pode estar relacionado ao seu menor grau de desacetilação em comparação com a QM6P6F, sendo esta uma característica conhecida da quitina com menor grau de desacetilação (%GD<50°), conforme relatado por CHANDRA DEY *et al.*, 2016, CHEUNG; WAN; YU, 2002, e KITTUR *et al.*, 2002. Este terceiro evento da amostra QM6P6 também pode corresponder à queima de material carbonizado (SANTOS *et al.*, 2003). Cabe destacar que a quitosana apresenta fortes interações intermoleculares resultantes das ligações de hidrogênio, de modo que sua transição vítrea ( $T_G$ ) é dificilmente observada por análises térmicas uma vez que as fortes ligações de hidrogênio inter e intramoleculares reduzem a mobilidade molecular. Algo semelhante ocorre com a temperatura de fusão ( $T_m$ ) da quitosana que só pode ser observada em condições muito bem controladas em laboratório e sem fins práticos. Efeito similar ocorre com a celulose, outro polímero natural em que as ligações de hidrogênio intermoleculares exercem papel fundamental (GRANDE, R., 2010).

#### 5.3.4 ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX) E DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE CRISTALINIDADE

Os resultados de DRX para as amostras QM6P6 e QM6P6F são apresentados na Figura 43, evidenciando as intensidades características da quitosana nas regiões de  $2\theta \cong 20^\circ$  e  $2\theta \cong 10^\circ$  a  $13^\circ$  (intensidades correspondentes as regiões cristalinas e amorfas). Contudo, observa-se uma diferença nas intensidades entre as duas amostras.



**Figura 43-** Padrão de DRX das amostras QM6P6 e QM6P6F de quitosana.  
Elaborado pelo autor, 2023.

A amostra QM6P6 mostrou picos mais definidos e intensos, revelando uma cristalinidade superior, incluindo alguns picos característicos que possuem posições semelhantes às da quitina, especialmente nas regiões de ângulo  $2\theta$  de  $23,4^\circ$ ,  $26,5^\circ$  e  $39,2^\circ$ . Isso ocorre porque o menor grau de desacetilação nessa amostra favorece a presença de picos de DRX de seu precursor. Por outro lado, a amostra QM6P6F exibiu uma intensidade ampla na região de ângulo  $2\theta \cong 20^\circ$ , indicando a formação de uma quitosana menos cristalina e, portanto, mais amorfa (a intensidade correspondente à região amorfa não está bem definida). Esse resultado está em concordância com KUMAR; KOH, 2012, que estudaram as propriedades físico-químicas, ópticas e biológicas de derivados de quitosana combinados com cromonas para aplicações biomédicas. Na análise de DRX deste estudo, a amostra de quitosana pura exibiu um padrão de difração amplo na região de  $2\theta \cong 20^\circ$ , com um pico menos intenso entre

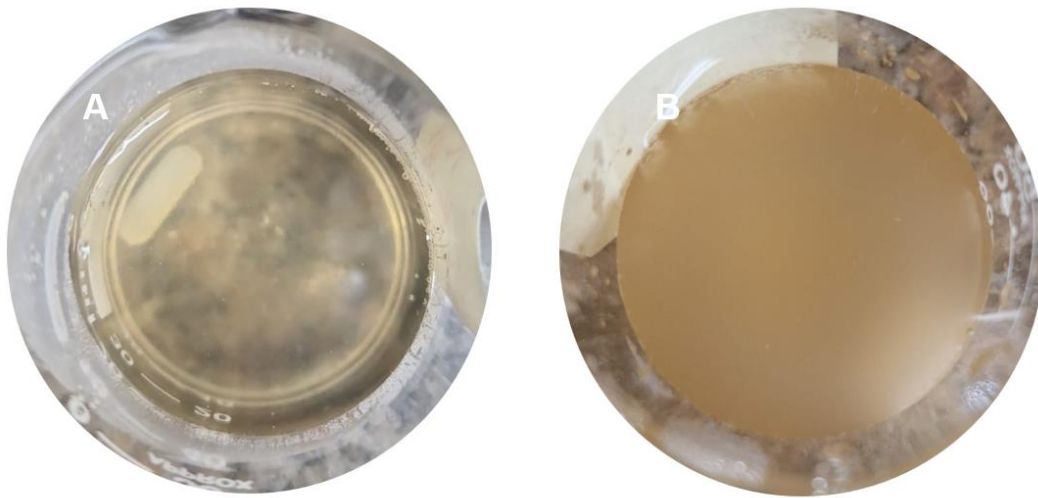
10° e 15°. Resultados similares foram observados por AZIZ *et al.*, 2019 em seus estudos sobre eletrólitos poliméricos de alta condução de prótons à base de quitosana, onde um pico na região de  $2\theta \cong 15,1^\circ$  aparece quase sobreposto pelo pico amplo em  $2\theta \cong 20^\circ$ .

As diferenças dos difratogramas entre as duas amostras demonstram que o comportamento da cristalinidade do material está alinhado com o que a literatura estabelece, já que um maior grau de desacetilação favorece a diminuição da cristalinidade, sendo estes parâmetros inversamente proporcionais (ANDRADE *et al.*, 2010). A amostra QM6P6F, que apresentou um %GD aproximado de 85%, apresentou intensidades amplas indicando uma estrutura mais amorfa, enquanto a QM6P6, com %GD próximo a 75%, apresentou maior cristalinidade com picos mais bem definidos e mais intensos. Portanto, o tratamento realizado durante a preparação da QM6P6F não só favoreceu a obtenção de uma quitosana com maior grau de desacetilação, mas também possibilitou a produção de uma quitosana mais amorfa. Isso favorece o desenvolvimento de novas estratégias para garantia de um maior controle sobre parâmetros físico-químicos deste material, como solubilidade, massa molecular, viscosidade, entre outros.

### 5.3.5 VISCOSIDADE INTRÍNSECA

A massa molecular da quitosana é fundamental para avaliar suas propriedades físicas, químicas e biológicas em diversas aplicações. Diversas técnicas podem ser empregadas para medir a massa molecular de polímeros, destacando-se a viscosimetria intrínseca, que é uma técnica de baixo custo, simples e confiável (MARANI; HJELM; WANDEL, 2013). Inicialmente, observou-se que apenas a amostra QM6P6F pôde ter sua massa molecular avaliada, uma vez que a amostra QM6P6 não se solubilizou adequadamente no solvente utilizado. Essa falta de solubilidade pode estar relacionada ao menor grau de desacetilação (entre 75% e 78% dependendo do método), já que a solubilidade é influenciada pelo grau de desacetilação, sendo necessário pelo menos 85% de desacetilação para alcançar a solubilidade apropriada (AL-HASSAN, 2016). A amostra QM6P6 ficou decantada na solução de ácido acético e acetato de sódio, com concentrações de 0,3 mol/L e 0,2 mol/L, respectivamente, o que impediu a determinação da massa molecular dessa amostra específica. Na Figura 44 A e 44 B, é apresentado um comparativo entre as duas soluções concentradas

(5000ppm), evidenciando claramente a diferença de solubilidade entre ambas as amostras.



**Figura 44-**Diferença visual da solubilidade das soluções concentradas das amostras de quitosana QM6P6F (A) e QM6P6 (B).  
Elaborado pelo autor, 2023.

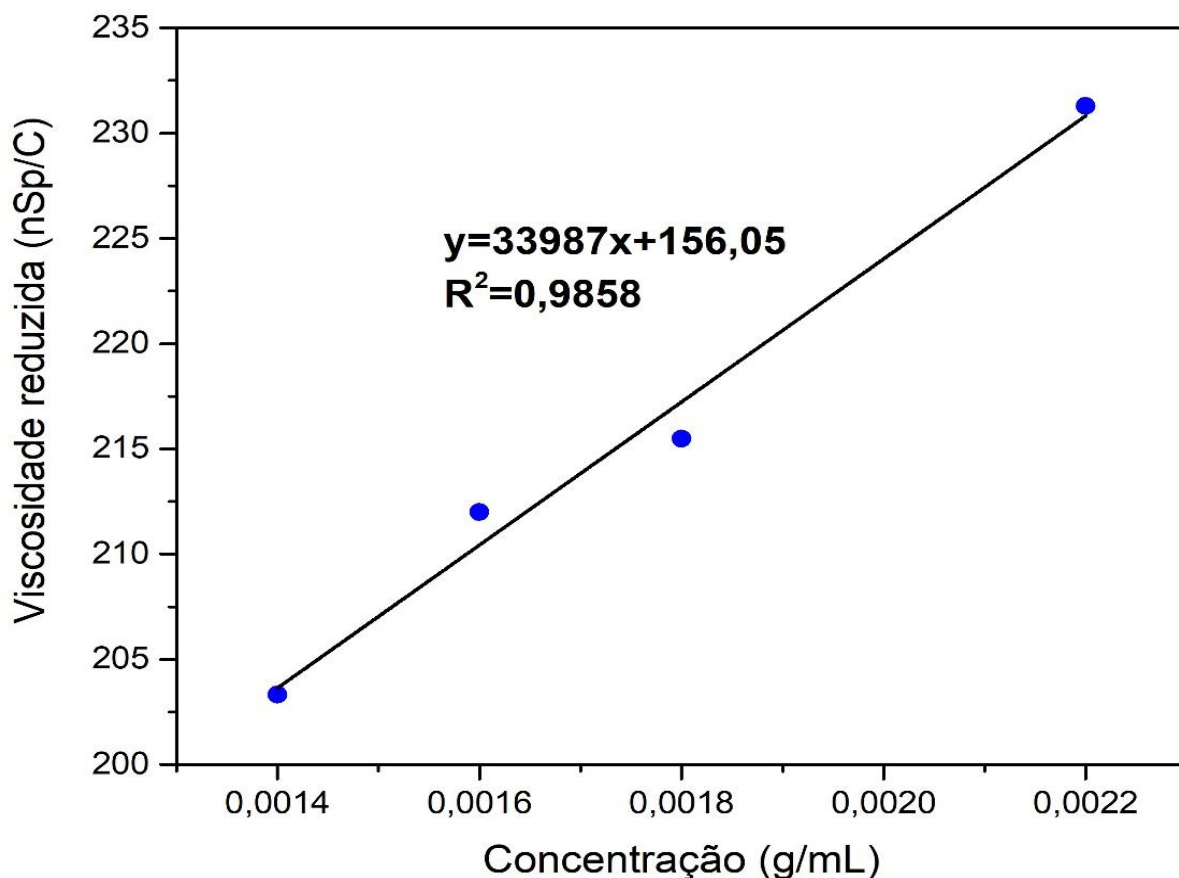
Na Figura 45, é possível observar o material que decantou (indicado por seta) durante o preparo das soluções diluídas da amostra de QM6P6, em tubos do tipo Falcon.



**Figura 45-**Amostra QM6P6 decantada durante o preparo das soluções diluídas devido à baixa solubilidade no meio.  
Elaborado pelo autor, 2023.



Portanto, baseando-se nos dados médios de viscosidades relativa e específica da amostra QM6P6F, obtiveram-se os valores de viscosidade reduzida média, os quais foram empregados na plotagem do gráfico de viscosidade reduzida em função da concentração, apresentado na Figura 46.



**Figura 46-**Viscosidade reduzida (nSp/C) em função da concentração (g/mL).

Elaborado pelo autor, 2023.

A curva de calibração obtida das soluções de quitosana em diferentes concentrações conhecidas apresentaram um ajuste linear apropriado, demonstrando um coeficiente de correlação superior a 0,98. São apresentados na Tabela 11 os resultados de viscosidade intrínseca média ( $\eta$ ) e massa molecular viscosimétrica média ( $M_v$ ).

**Tabela 11-** Resultados de viscosidade intrínseca média e massa molecular viscosimétrica média.

| <b>Amostra (n=3)</b> | <b>Viscosidade intrínseca média [<math>\eta</math>]</b> | <b>Massa molecular viscosimétrica média (g/mol)</b> | <b>Massa molecular média em kDa</b> |
|----------------------|---|---|-------------------------------------|
| QM6P6F               | 172,83 $\pm$ 1,31                                       | 26.313,87 $\pm$ 574,80                              | 26,31 $\pm$ 0,57                    |

Elaborado pelo autor, 2023.

Diante dos resultados obtidos, é possível afirmar que se obteve quitosana de baixo peso molecular. Baseando-se em seu peso molecular, a quitosana pode ser classificada como de peso molecular baixo (<100 kDa), médio (100-1000 kDa) e alto (>1000 kDa) (SANTOSO *et al.*, 2020). Durante a etapa de desacetilação, o peso molecular é influenciado por fatores como concentração de álcali, tempo de reação e temperatura. O processo de congelamento favorece a formação de cadeias de quitina em estado amorfo ou relaxado, tornando-as mais suscetíveis ao ataque da solução de hidróxido de sódio na etapa subsequente de desacetilação. Esse processo sugere que, além de uma desacetilação mais acentuada, ocorre também um favorecimento da hidrólise da cadeia de quitosana, levando a uma maior redução do peso molecular. No entanto, tratamentos prolongados ou em altas temperaturas podem causar a degradação da cadeia polimérica (AZEVEDO *et al.*, 2007; MUKHERJEE, 2001). As quitosanas de baixo peso molecular são conhecidas por suas altas atividades biológicas, permitindo seu uso como elicitores de defesa em plantas, estimuladores de crescimento, aditivos alimentares, agentes antimicrobianos, entre outros (MINH; VAN HOA; TRUNG, 2020).

## 6. CONCLUSÃO

O processo de obtenção de quitina, que envolve etapas de desmineralização, desproteíntização e despigmentação, bem como a obtenção de quitosana após a desacetilação química, demonstrou ser eficaz. Os rendimentos foram de 14,6% para a obtenção de quitina e de 6,75% para a obtenção da quitosana, ambos em base seca.

Em relação à extração da quitina, é possível concluir que:

- Cinco amostras (M1P3, M3P3, M6P3, M6P1 e M6P6) foram obtidas satisfatoriamente, apresentando características físico-químicas compatíveis com o que é descrito na literatura;
- Os resultados de FTIR-ATR confirmaram qualitativamente a presença dos grupamentos funcionais típicos esperados para a quitina, evidenciando que o processo químico utilizado para sua obtenção não alterou esses grupamentos;
- A análise de TGA/DTA confirmou as curvas de degradação características da quitina. Essas curvas são caracterizadas pelas perdas de água (de 4,3% a 5,9%, com temperatura de pico de 50,0°C a 57,5°C), perda de material orgânico (de 63,4% a 67,8%, com temperatura de pico de 315,2°C a 321,2°C), perda de material inorgânico (27,9% a 31,9%, com temperatura de pico de 483,6°C a 494,5°C) e teor de cinzas de aproximadamente 0% a 1,3%, sugerindo que um tempo de desmineralização mais longo tende a favorecer a obtenção de um material com menor teor de cinzas;
- O DSC apresentou os calores endotérmicos característicos deste material, relacionados à perda de água (de 15,7J/g a 66,2 J/g, na região de temperatura de 60,4°C a 66,5°C) e degradação do polímero (de 95,4 J/g a 176,3 J/g, na região de temperatura de 379,0°C a 385,8°C). Essas variações de entalpia entre as amostras podem estar associadas à estabilidade e ao %GD das mesmas;
- O DRX, em conjunto com o TGA e o DSC, confirmou a obtenção da quitina na sua forma polimórfica  $\alpha$ , caracterizada por um alto índice de cristalinidade (de 96,3% a 98,8%). Os difratogramas são caracterizados por

apresentar o mesmo perfil de difração (alguns deslocamentos dos picos podem estar associados à calibração do equipamento);

- O MEV mostrou que o processo químico de obtenção da quitina (desmineralização, desproteínização e despigmentação) altera a morfologia do material, possibilitando a redução das irregularidades em relação à casca beneficiada, com a presença de multicamadas fibrosas ásperas e compactas sobre a superfície e presença de poros;
- A determinação do nitrogênio total pelo método de Kjeldahl evidenciou que os diferentes tempos da etapa de desproteínização não influenciaram o teor de nitrogênio total, pois a casca beneficiada e as amostras de quitina apresentaram teor de nitrogênio total abaixo de 6%, demonstrando a eficácia do processo de beneficiamento na redução do teor de nitrogênio total.

Em relação à obtenção das amostras de quitosana, é possível concluir que:

- Foi observada a presença de grupos químicos característicos deste polímero, com variação nos picos de FTIR que refletem diferentes níveis de desacetilação. Isso evidencia que o congelamento potencializa a obtenção de amostras com maior %GD, tornando as cadeias mais vulneráveis ao álcali. Isso permitiu que a amostra QM6P6F apresentasse %GD de 84,8% a 85% (de acordo com o método de cálculo), enquanto a QM6P6 apresentou 74,8% a 77,6%;
- As análises de TGA/DTA das amostras indicaram as curvas de degradação características, perda de água (de 7,1% e 9,4%, com temperatura de pico de 55°C e 75°C para as amostras QM6P6 e QM6P6F, respectivamente), perda de material orgânico (de 44,5% e 57,4%, com temperatura de pico de 323°C e 294°C para as amostras QM6P6 e QM6P6F, respectivamente) e perda de material carbonizado (de 33,7% e 44,7%, com temperatura de pico de 528°C e 522°C para as amostras QM6P6 e QM6P6F, respectivamente). Os teores de cinzas foram de 1,4% (QM6P6) e 1,7% (QM6P6F), o que pode estar relacionado à presença de sal residual (acetato de sódio) que pode não ter sido totalmente removido após as

etapas de lavagens. Também foi evidenciado que a maior desacetilação diminui a estabilidade térmica do polímero;

- O DSC revelou transições térmicas típicas. A amostra QM6P6 apresentou duas transições endotérmicas (172,1 J/g em 75,1°C e 57,4 J/g em 394,9°C) e uma transição exotérmica (24,9 J/g em 309,1°C) associada ao menor %GD. Enquanto isso, a amostra QM6P6F apresentou uma transição endotérmica (268,9 J/g em 86,5°C) e uma transição exotérmica (121,2 J/g em 302,2°C);
- A partir do DRX, notou-se uma cristalinidade acentuada na amostra QM6P6, evidenciando uma correlação inversa entre cristalinidade e desacetilação. A amostra QM6P6F apresentou predominância de regiões amorfas, proporcionada pelo maior relaxamento das cadeias favorecido pelo processo de congelamento;
- Em relação à massa molecular viscosimétrica média, a amostra QM6P6F (26,31kDa) se enquadrou na categoria de quitosanas de baixo peso molecular. Isso sugere que o processo de congelamento favorece a hidrólise da cadeia, levando à diminuição do peso molecular.

A obtenção da quitina e quitosana representa uma oportunidade para o desenvolvimento de novas tecnologias e produtos voltados à resolução de desafios reais da sociedade. Isso abre caminho para a geração de novos negócios, *startups*, processos de inovação aberta e cooperação com grandes empresas de diferentes segmentos, alinhando-se totalmente com os objetivos de desenvolvimento sustentável da ONU. Além disso, está fortemente relacionado com a responsabilidade ambiental, social e de governança (ESG). Considerando que um resíduo proveniente da indústria pesqueira, que impacta negativamente o meio ambiente, pode se transformar em uma oportunidade de geração de uma nova cadeia de valor com grande potencial para trazer soluções aos mais diversos problemas e desafios globais, como segurança alimentar, agricultura sustentável, consumo e produção sustentáveis, entre outros. Para isso, o empreendedorismo e a academia devem avançar conjuntamente, proporcionando assim que o conhecimento acadêmico possa ser aplicado na vida real das pessoas, e não se concentre apenas na geração de conhecimento não aplicado na resolução dos problemas reais da sociedade.

## 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar a extração de quitina aplicando tempos reduzidos, inferiores a 1h, para a etapa de desmineralização e avaliar a influência no teor de cinzas e na presença de carbonato de cálcio por meio da análise de EDS;
- Avaliar o teor de nitrogênio total por Kjeldahl em amostras da casca de camarão antes do processo de beneficiamento para avaliar a eficiência do processo;
- Avaliar a influência de tempos de desacetilação química inferiores a 6h na obtenção da quitosana e determinar o %GD por técnicas complementares como titulação potenciométrica, RMN e UV-VIS;
- Realizar congelamentos da solução alcalina contendo quitina em tempos inferiores a 72h e determinar a influência no %GD e  $M_v$  após a desacetilação química;
- Determinar o  $M_v$  utilizando outros sistemas de solvente que não sejam baseados na mistura de ácido acético e acetato de sódio, com concentrações de 0,3 mol/L e 0,2 mol/L, respectivamente, a fim de avaliar a confiabilidade do método;
- Determinar o  $M_w$  da quitosana a partir da técnica de cromatografia de permeação em gel (GPC).

## 8. REFERÊNCIAS

ABDEL-AZIZ, H. M. M.; HASANEEN, M. N. A.; OMER, A. M. Nano chitosan-NPK fertilizer enhances the growth and productivity of wheat plants grown in sandy soil. *Spanish Journal of Agricultural Research* 14, (2016).

ABEDIA, Z.; MOGHADAMNIA, A. A.; ZABIHI, E.; POURBAGHER, R.; GHASEMI, M.; NOURI, H. R.; JENABIAN, N. Anticancer properties of chitosan against osteosarcoma, breast cancer and cervical cancer cell lines. *Caspian Journal of Internal Medicine* 10, 439-446 (2019).

ABREU, F.R., CAMPANA-FILHO, S. P. Preparation and characterization of carboxymethylchitosan. *Polímeros*, 15(2), 79-83, (2005).

ADHIKARI, H. S.; YADAV, P. N. Anticancer Activity of Chitosan, Chitosan Derivatives, and Their Mechanism of Action. *International Journal of Biomaterials*, (2018).

ANDRADE, S. D., *et al.* Extração E Caracterização De Quitina E Quitosana e a Sua Utilização Na Fabricação De Nanofibras. *Abcm.Org.Br*, 2010.

ANDRADE, S. M. B. Eletrofiliação e caracterização de membranas biopoliméricas à base de quitosana extraídas dos exoesqueletos de crustáceos [Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte]. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, Centro de Tecnologia, UFRN (2012).

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* 2.3, 27-34 (2007).

AZIZ, S. B.; HAMSAN, M. H.; KARIM, W. O.; KADIR, M. F. Z.; BRZA, M. A.; ABDULLAH, O. G. High proton conducting polymer blend electrolytes based on

chitosan: Dextran with constant specific capacitance and energy density. *Biomolecules* 9, (2019).

A EUROPEAN GREEN DEAL. Available online: <https://ec.europa.eu/info/strategy/priorities-2019-2024/european-green-deal> (accessed on 7 December 2021).

ÁGUILA-ALMANZA, E.; LOW, S. S.; HERNÁNDEZ-COCOLETZI, H.; ATONAL-SANDOVAL, A.; RUBIO-ROSAS, E.; VIOLANTE-GONZÁLEZ, J.; SHOW, P. L. Facile and green approach in managing sand crab carapace biowaste for obtention of high deacetylation percentage chitosan. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 9, (2021).

AIPING, Z.; TIAN, C.; LANHUA, Y.; HAO, W.; PING, L. Synthesis and characterization of N-succinyl-chitosan and its self-assembly of nanospheres. *Carbohydrate Polymers* 66, 274-279 (2006).

AKTAR, W.; SENGUPTA, D.; CHOWDHURY, A. Impact of pesticides use in agriculture: Their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, 2(1), 1-12, (2009).

ALDILA, H.; ASMAR; FABIANI, V. A.; DALIMUNTHER, D. Y.; IRWANTO, R. The effect of deproteinization temperature and NaOH concentration on deacetylation step in optimizing extraction of chitosan from shrimp shells waste. in *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 599, (IOP Publishing Ltd, 2020).

AL-HASSAN, A. A. Utilization of Waste: Extraction and Characterization of Chitosan from Shrimp Byproducts. *Civil and Environmental Research* 8, 117-123, (2016).

ALI, A.; AHMED, S. A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V, (2018).

ANDERSON, C. G. *et al.* Antarctic Krill (*Bcplrartsia srrperba*) as a source of chitin and chitosan. (Ed.), p. 54. *MIT Sea Grant Program*, Cambridge, MA, (1978).



ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(SUPPL. 1), 5-16, 2001.

ANTONINO, N. A. Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundos da indústria pesqueira paraibana [Dissertação de mestrado, Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Departamento de Química, Programa de Pós-Graduação em Química] (2007).

ANTONINO, R. S. C. M. D. Q.; FOOK, B. R. P. L.; LIMA, V. A. D. O.; RACHED, R. Í. D. F.; LIMA, E. P. N.; LIMA, R. J. D. S.; FOOK, M. V. L. Preparation and characterization of chitosan obtained from shells of shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). *Marine Drugs* 15, (2017).

AYE, K. N.; STEVENS, W. F. Improved chitin production by pretreatment of shrimp shells. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79(4), 421-425, (2004).

BADAWY, M. E. I.; RABEA, E. I. A Biopolymer Chitosan and Its Derivatives as Promising Antimicrobial Agents against Plant Pathogens and Their Applications in Crop Protection. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2011, 1-29, (2011).

BAN, Z.; HOREV, B.; RUTENBERG, R.; DANAY, O.; BILBAO, C.; MCHUGH, T.; POVERENOV, E. Efficient production of fungal chitosan utilizing an advanced freeze-thawing method; quality and activity studies. *Food Hydrocolloids* 81, 380-388 (2018).

BARBOSA, H. F. G.; FRANCISCO, D. S.; FERREIRA, A. P. G.; CAVALHEIRO, É. T. G. A new look towards the thermal decomposition of chitins and chitosans with different degrees of deacetylation by coupled TG-FTIR. *Carbohydrate Polymers* 225, (2019).

BECKHAM G. T.; CROWLEY M. F. Examination of the  $\alpha$ -chitin structure and decrystallization thermodynamics at the nanoscale. *Journal of Physical Chemistry B*, 115(15), 4516-4522, (2011).

BENHABILES, M. S.; ABDI, N.; DROUICHE, N.; LOUNICI, H.; PAUSS, A.; GOOSEN, M. F. A.; MAMERI, N. Protein recovery by ultrafiltration during isolation of chitin from shrimp shells *Parapenaeus longirostris*. *Food Hydrocolloids* 32, 28-34 (2013).

BEREZINA, N. Production and application of chitin. *Physical Sciences Reviews* 1, (2016).

BHARDWAJ, S.; BHARDWAJ, N. K.; NEGI, Y. S. Effect of degree of deacetylation of chitosan on its performance as surface application chemical for paper-based packaging. *Cellulose* 27, 5337-5352 (2020).

BLACKWELL, J. Structure of beta-chitin or parallel chain systems of poly-beta-(1-4)-N-acetyl-D-glucosamine. *Biopolymers. Vol 7*, 281-298, (1969).

BLUMBERG, R.; SOUTHALL, C. L.; VAN RENSBERG, N. J. & VOLCKMAN, O. B. South african fish products. XXXII.–The rock lobster: A study of chitin production from processing wastes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2, 571-576 (1951).

BOOBIS, A. R.; OSSENDORP, B. C.; BANASIAK, U.; HAMEY, P. Y.; SEBESTYEN, I.; MORETTO, A. Cumulative risk assessment of pesticide residues in food. *Toxicology Letters* 180, 137-150 (2008).

BOUGH, W. A.; SALTER, W. L.; WU, A. C. M.; PERKINS, B. E. Influence of manufacturing variables on the characteristics and effectiveness of chitosan products. I. Chemical composition, viscosity, and molecular-weight distribution of chitosan products. *Biotechnology and Bioengineering* 20, 1931-1943 (1978).

BRASSELET, C., PIERRE, G., DUBESSAY, P., DOLS-LAFARGUE, M., COULON, J., MAUPEU, J., DELATTRE, C. Modification of chitosan for the generation of functional derivatives. *Applied Sciences (Switzerland)* 9, (2019).

BRINE, C.I.; AUSTIN, P.R. Chitin variability with species and method of preparation. *Comp. Biochem. Physiol.* 698: 283, (1981).

BRUGNEROTTO, J.; LIZARDI, J.; GOYCOOLEA, F. M.; ARGÜELLES-MONAL, W.; DESBRIÈRES, J.; RINAUDO, M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer* 42, 3569-3580 (2001).

BRZESKI, M.M. Concept of chitin/chitosan isolation from Antarctic Krill (*Euphausia superba*) shells on a technical scale. In Proceedings of the Second International Conference on Chitin and Chitosan, S. Hirano and S. Tokura (Ed.), p. 15. *The Japan Society of Chitin and Chitosan*, Sapporo, Japan, (1982).

BUGNICOURT, L.; LADAVIÈRE, C. Interests of chitosan nanoparticles ionically cross-linked with tripolyphosphate for biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. Elsevier Ltd, (2016).

BUSILACCHI, A.; GIGANTE, A.; MATTIOLI-BELMONTE, M.; MANZOTTI, S.; MUZZARELLI, R. A. A. Chitosan stabilizes platelet growth factors and modulates stem cell differentiation toward tissue regeneration. *Carbohydrate Polymers* 98, 665-676 (2013).

CAMPANA-FILHO, S. P.; DE BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; LAVALL, R. L. Extração, Estruturas e Propriedades de  $\alpha$ - e  $\beta$ -Quitina. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 3, 644-650, (2007).

CARDOSO, M. B. Contribuição ao estudo da reação de desacetilação de quitina: Estudos da desacetilação assistida por ultra-som de alta potência. *Tese (Doutorado em Ciências), Instituto de Química de São Carlos, São Carlos-SP* 103p (2008).

CARLSTROM, D. The crystal structure of alpha-chitin (poly-N-acetyl-D-glucosamine). *The Journal of biophysical and biochemical cytology* 3, 669-683 (1957).

CHANDRA DEY, S.; AL - AMIN, M.; UR RASHID, T.; ZAKIR SULTAN, M.; ASHADUZZAMAN, M.; SARKER, M.; MD SHAMSUDDIN, S. PREPARATION , CHARACTERIZATION AND PERFORMANCE EVALUATION OF CHITOSAN AS AN ADSORBENT FOR REMAZOL RED. *International Journal of Latest Research in Engineering and Technology* 52-62 (2016).

CHEN, X.; CHEW, S. L.; KERTON, F. M.; YAN, N. Direct conversion of chitin into a N-containing furan derivative. *Green Chemistry* 16, 2204-2212 (2014).

CHEUNG, M. K.; WAN, K. P. Y.; YU, P. H. Miscibility and morphology of chiral semicrystalline poly-(R)-(3-hydroxybutyrate)/chitosan and poly-(R)-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/chitosan blends studied with DSC, <sup>1</sup>H T1 and T1ρ CRAMPS. *Journal of Applied Polymer Science* 86, 1253-1258 (2002).

CHIEN, R. C.; YEN, M. T.; MAU, J. L. Antimicrobial and antitumor activities of chitosan from shiitake stipes, compared to commercial chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers*, 138, 259-264, (2016).

CHIRIBOGA O. G.; LEDUFF P.; RORRER G. L. Extracellular Chitin Nanofibers from Marine Diatoms. In *Encyclopedia of Marine Biotechnology* (pp. 1083-1092). Wiley, (2020).

CHIU, C. Y.; FENG, S. A.; LIU, S. H.; CHIANG, M. T. Functional comparison for lipid metabolism and intestinal and fecal microflora enzyme activities between low molecular weight chitosan and chitosan oligosaccharide in high-fat-diet-fed rats. *Marine Drugs* 15, (2017).

CHO, Y. W.; JANG, J.; PARK, C. R.; KO, S. W. Preparation and solubility in acid and water of partially deacetylated chitins. *Biomacromolecules* 1, 609-614 (2000).

CHO, Y. I.; NO, H. K.; MEYERS, S. P. Physicochemical Characteristics and Functional Properties of Various Commercial Chitin and Chitosan Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 3839-3843, (1998).

CHUNG, Y. C.; SU, Y. P.; CHEN, C. C.; JIA, G.; WANG, H. L.; WU, J. C. G.; LIN, J. G. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacologica Sinica* 25, 932-936 (2004).

COSTA, A. P.; XU, X.; BURGESS, D. J. Freeze-anneal-thaw cycling of unilamellar liposomes: Effect on encapsulation efficiency. *Pharmaceutical Research* 31, 97-103 (2014).

COUTINHO, F. M. B.; DELPECH, M. C.; GARCIA, M. E. F. Evaluation of gas permeability of membranes obtained from poly(urethane-urea)s aqueous dispersions based on hydroxyl-terminated polybutadiene. *Polymer Testing*, 21(6), 719-723, (2002).

CURTI, E.; DE BRITTO, D.; & CAMPANA-FILHO, S. P. Methylation of Chitosan with Iodomethane: Effect of Reaction Conditions on Chemoselectivity and Degree of Substitution. in *Macromolecular Bioscience* 3, 571-576 (2003).

DABAS, N.; JAISWAR, G. Fundamentals of processing and characterization of polysaccharide nanocrystal-based materials. In *Innovation in Nano-polysaccharides for Eco-sustainability: From Science to Industrial Applications* (pp. 61-81). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823439-6.00014-3>, (2021).

DANILA, A.; MURESAN, E. I.; IBANESCU, S. A.; POPESCU, A.; DANU, M.; ZAHARIA, C.; STARAS, A. I. Preparation, characterization, and application of polysaccharide-based emulsions incorporated with lavender essential oil for skin-friendly cellulosic support. *International Journal of Biological Macromolecules* 191, 405-413 (2021).

DAS, S.; ROY, D.; SEN, R. Utilization of Chitinaceous Wastes for the Production of Chitinase. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 78, pp. 27-46). Academic Press Inc, (2016).

DELPECH, M. C.; COUTINHO, F. M. B.; HABIBE, M. E. S. Viscometry study of ethylene-cyclic olefin copolymers. *Polymer Testing*, 21(4), 411-415, (2002).

DELPECH, M. C.; COUTINHO, F. M. B.; SOUSA, K. G. M.; CRUZ, R. C. Estudo viscosimétrico de prepolímeros uretânicos. *Polímeros* 17, 294-298 (2007).

DELPECH, M. C.; OLIVEIRA, C. M. F. Viscometric study of poly(methyl methacrylate-g-propylene oxide) and respective homopolymers. *Polymer Testing*, 24(3), 381-386, (2005).

DMYTRYK, A., *et al.* Effect of new biostimulators on the initial phase of plant growth. *Przem. Chem*, 93, 1020-1025. (In Polish), (2014).

DOMSZY, J. G.; ROBERTS, G. A. F. Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analysing chitosan. *Die Makromolekulare Chemie* 186, 1671-1677 (1985).

DO, N. H. N.; TRUONG, Q. T.; LE, P. K.; HA, A. C. Recent developments in chitosan hydrogels carrying natural bioactive compounds. *Carbohydrate Polymers* 294, (2022).

DRABCZYK, A.; KUDŁACIK-KRAMARCZYK, S.; GŁAB, M.; KEDZIERSKA, M.; JAROMIN, A.; MIERZWIŃSKI, D.; TYLISZCZAK, B. Physicochemical investigations of chitosan-based hydrogels containing Aloe vera designed for biomedical use. *Materials* 13, (2020).

ECOBICHON, D. J. Our changing perspectives on benefits and risks of pesticides: A historical overview. *NeuroToxicology*, 2000.

EL HADRAMI, A.; ADAM, L. R.; EL HADRAMI, I.; DAAYF, F. Chitosan in plant protection. *Marine Drugs* 8, 968-987 (2010).

ELIZALDE-CÁRDENAS, A.; MARÍA RIBAS-APARICIO, R.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, A.; LEYVA-GÓMEZ, G.; RÍOS-CASTAÑEDA, C.; GONZÁLEZ-TORRES, M. Advances in chitosan and chitosan derivatives for biomedical applications in tissue engineering: An updated review, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 262, Part 1, (2024).

ESSAWY, A. A.; HEFNI, H.; EL-NGGAR, A. M. in *Sustainable Polymer Composites and Nanocomposites* 143-183 (Springer International Publishing, 2019). doi:10.1007/978-3-030-05399-4\_5.

FAN, Y.; SAITO, T. "Nano-Fibrillation of Chitins by TEMPO-Mediated. Oxidation or Protonation of Amino Groups", *Function & Materials*, Vol. 29, pp. 19-24, (2009).

FAN, Y.; SAITO, T.; ISOGAI, A. Chitin nanocrystals prepared by TEMPO-mediated oxidation of  $\alpha$ -chitin. *Biomacromolecules* 9, 192-198 (2008).

FATIMA, B. in Modern Spectroscopic Techniques and Applications. *IntechOpen*. doi:10.5772/intechopen.89708 (2020).

FELIZIANI, E.; LANDI, L.; ROMANAZZI, G. Preharvest treatments with chitosan and other alternatives to conventional fungicides to control postharvest decay of strawberry. *Carbohydrate Polymers*, 132, 111-117, (2015).

FENG, P.; LUO, Y.; KE, C.; QIU, H.; WANG, W.; ZHU, Y.; WU, S. Chitosan-Based Functional Materials for Skin Wound Repair: Mechanisms and Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 9, (2021).

FILHO, S. P. C.; SIGNINI, R.; CARDOSO, M. B. Propriedades e Aplicações da Quitosana. *Processos Químicos*, v. 1, p. 9-20, 2007.

FRANCESKO, A.; DÍAZ GONZÁLEZ, M.; LOZANO, G. R.; TZANOV, T. in *Advances in Textile Biotechnology* 288-311 (Elsevier Inc.). doi:10.1533/9780857090232.2.288, (2010).

GÁMIZ-GONZÁLEZ, M. A.; CORREIA, D. M.; LANCEROS-MENDEZ, S.; SENCADAS, V.; GÓMEZ RIBELLES, J. L.; VIDAURRE, A. Kinetic study of thermal degradation of chitosan as a function of deacetylation degree. *Carbohydrate Polymers* 167, 52-58 (2017).

GARDNER, K. H.; BLACKWELL, J. Refinement of the structure of  $\beta$ -chitin. *Biopolymers*, 14(8), 1581-1595, 1975.

GIRI, S.; DUTTA, P.; KUMARASAMY, D.; GIRI, T. K. Natural polysaccharides: Types, basic structure and suitability for forming hydrogels. In *Plant and Algal Hydrogels for Drug Delivery and Regenerative Medicine* (pp. 1-35), (2021).

GONSALVES, A. de A.; ARAÚJO, C. R. M. Diferentes estratégias para reticulação de quitosana. *Revista Química Nova*, v. 34, n. 7, p. 1215-1223, (abr. 2011).

GOY, R. C.; DE BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros*. Associação Brasileira de Polímeros, (2009).

GUINESI, L. S.; CAVALHEIRO, É. T. G. The use of DSC curves to determine the acetylation degree of chitin/chitosan samples. *Thermochimica Acta*, 444(2), 128-133, (2006).

GUMELAR, M. D.; HAMZAH, M.; HIDAYAT, A. S.; SAPUTRA, D. A.; IDVAN. Utilization of Chitosan as Coating Material in Making NPK Slow Release Fertilizer. *Macromolecular Symposia* 391, (2020).

HACKMAN, R. H. Studies on chitin. I. Enzymatic degradation of chitin and chitin esters. *Aust. J. Biol. Sci.* 7: 168, (1954).

HAJJI, S.; TURKI, T.; BOUBAKRI, A.; AMOR, M. B.; MZOUGH, N. Study of cadmium adsorption onto calcite using full factorial experiment design. *Desalination and Water Treatment* 83, 222-233 (2017).

HAJJI, S.; YOUNES, I.; GHORBEL-BELLAAJ, O.; HAJJI, R.; RINAUDO, M.; NASRI, M.; JELLOULI, K. Structural differences between chitin and chitosan extracted from three different marine sources. *International Journal of Biological Macromolecules*, 65, 298-306, (2014).

HAMED, I.; ÖZOGUL, F.; REGENSTEIN, J. M. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier Ltd, (2016).



HANANI, Z. A. N.; SOO, K. L.; ZUNAIRAH, W.I. W.; RADHIAH, S. Prolonging the shelf life of fresh-cut guava (*Psidium guajaya* L.) by coating with chitosan and cinnamon essential oil, *Heliyon*, Volume 9, Issue 12, (2023).

HARIA, A. H.; HODNETT, M. G.; JOHNSON, A. C. Mechanisms of groundwater recharge and pesticide penetration to a chalk aquifer in southern England. *Journal of Hydrology*, 275(1-2), 122-137, (2003).

HARUGADE, A.; SHERJE, A. P.; PETHE, A. Chitosan: A review on properties, biological activities and recent progress in biomedical applications. *Reactive and Functional Polymers* 191, (2023).

HAYES, M. Measuring protein content in food: An overview of methods. *Foods* 9, (2020).

HERTH, W.; BARTHLOTT, W. The site of beta-chitin fibril formation in centric diatoms. I. Pores and fibril formation. *Journal of Ultrastructure Research* 68, 6-15, (1979).

HOLLINGWORTH, R. M.; DONG, K. The biochemical and molecular genetic basis of resistance to pesticides in arthropods. In *Global Pesticide Resistance in Arthropods* (pp. 40-89). CABI Publishing, (2008).

HORN, M. M. Obtenção e caracterização de hidrogéis de quitosana, xantana e colágeno aniônico [Dissertação de mestrado, Instituto de Química de São Carlos]. Universidade de São Paulo (2008).

HORST M.N.; WALKER A.N.; KLAR E. The pathway of crustacean chitin synthesis. In: Horst M.N., Freeman J.A., editors. *The Crustacean Integument: Morphology and Biochemistry*. CRC; Boca Raton, FL, USA: pp. 113-149, (1993).

HOU, J.; AYDEMIR, B. E.; DUMANLI, A. G. Understanding the structural diversity of chitins as a versatile biomaterial. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. Royal Society Publishing, 2021.

HUA, L.; DENG, J.; WANG, Z.; WANG, Y.; CHEN, B.; MA, Y.; XU, B. Improving the functionality of chitosan-based packaging films by crosslinking with nanoencapsulated clove essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 192, 627-634, (2021).

HUANG, M.; KHOR, E.; LIM, L. Y. Uptake and Cytotoxicity of Chitosan Molecules and Nanoparticles: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation. *Pharmaceutical Research*, 21(2), 344-353, (2004).

HUNT, S.; HUCKERBY, T. N. A comparative study of molluscan and crustacean chitin proteoglycans by carbon-13 NMR spectroscopy. Identification of carbohydrate and amino acid contributions and the determination of amino acid chemical shifts in anhydrous formic acid. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry And*, 88(4), 1107-1116, (1987).

HWANG, K. T.; JUNG, S. T.; LEE, G. D.; CHINNAN, M. S.; PARK, Y. S.; PARK, H. J. Controlling molecular weight and degree of deacetylation of chitosan by response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 1876-1882 (2002).

ICTA UFRGS. *Determinação do teor de proteínas - Método Kjeldhal*. LANAT - Laboratório de Análise de Alimentos e Antioxidantes Naturais. 2017.

ILYINA, A. V.; TIKHONOV, V. E.; ALBULOV, A. I.; VARLAMOV, V. P. Enzymic preparation of acid-free-water-soluble chitosan. *Process Biochemistry* 35, 563-568 (2000).

IOELOVICH, M. Crystallinity and Hydrophilicity of Chitin and Chitosan. *Research and Reviews: Journal of Chemistry* 3, 7-14, (2014).

ISLAM, S.; ARNOLD, L.; PADHYE, R. Comparison and characterisation of regenerated chitosan from 1-butyl-3-methylimidazolium chloride and chitosan from crab shells. *BioMed Research International*, (2015).

ISMAN, M. B. Plant essential oils for pest and disease management. In *Crop Protection* (Vol. 19, pp. 603-608), (2000).

JAGDALE, S.; AGARWAL, B.; DIXIT, A.; GAWARE, S. Chitosan as excellent bio-macromolecule with myriad of anti-activities in biomedical applications - A review, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 257, Part 2, (2024).

JANG, M. K.; KONG, B. G.; JEONG, Y. I.; LEE, C. H.; NAH, J. W. Physicochemical characterization of  $\alpha$ -chitin,  $\beta$ -chitin, and  $\gamma$ -chitin separated from natural resources. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* 42, 3423-3432 (2004).

JANTZEN DA SILVA LUCAS, A.; QUADRO ORESTE, E.; LEÃO GOUVEIA COSTA, H.; MARTÍN LÓPEZ, H.; DIAS MEDEIROS SAAD, C.; PRENTICE, C. Extraction, physicochemical characterization, and morphological properties of chitin and chitosan from cuticles of edible insects. *Food Chemistry* 343, (2021).

JOHNSON, E.L.; PENISTON, Q.P.. Utilization of shellfish waste for chitin and chitosan production. *Ch. 19. In Chemistry & Biochemistry of Marine Food Products*, RE Martin, G.J. Flick, C.E. Hebard, and D.R. Ward (Ed.), p. 415. AVI Publishing Co., Westport, CT, (1982).

JUNCEDA-MENA, I.; GARCÍA-JUNCEDA; REVUELTA, J. From the problem to the solution: Chitosan valorization cycle. *Carbohydrate Polymers* 309, (2023).

KAMASASTRI, P.V; PRABHU, P.V. Preparation of chitin & glucosamine horn prawn shell waste. *J. Sci. Ind. Res.* 20D: 466, (1961).

KAMEDA, T.; MIYAZAWA, M.; ONO, H.; YOSHIDA, M. Hydrogen bonding structure and stability of  $\alpha$ -chitin studied by  $^{13}\text{C}$  solid-state NMR. *Macromolecular Bioscience* 5, 103-106 (2005).

KARAGÖZ, S.; DEMIRDÖVEN, A. Effect of chitosan coatings with and without Stevia rebaudiana and modified atmosphere packaging on quality of cold stored fresh-cut apples. *LWT*, 108, 332-337, (2019).

KASAAI, M. R. Calculation of Mark-Houwink-Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent-temperature system using experimental reported viscometric constants data. *Carbohydrate Polymers*, 68(3), 477-488, (2007).

KATIYAR, D.; HEMANTARANJAN, A.; SINGH, B. Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review. *Indian Journal of Plant Physiology*. Springer Verlag, (2015).

KAYA, M.; MUJTABA, M.; EHRLICH, H.; SALABERRIA, A. M.; BARAN, T.; AMEMIYA, C. T.; LABIDI, J. On chemistry of  $\gamma$ -chitin. *Carbohydrate Polymers*, 176, 177-186, (2017).

KHAN, T. A.; PEH, K. K.; CH'NG, H. S. Reporting degree of deacetylation values of chitosan: The influence of analytical methods. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5, 205-212 (2002).

KIM, Y.; PARK, R. D. Progress in bioextraction processes of chitin from crustacean biowastes. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 58, 545-554, (2015).

KITTUR, F. S.; HARISH PRASHANTH, K. V.; UDAYA SANKAR, K.; THARANATHAN, R. N. Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry. *Carbohydrate Polymers* 49, 185-193 (2002).

KNORR, D. Functional Properties of Chitin and Chitosan. *Journal of Food Science*, 47(2), 593-595, (1982).

KONG, M.; CHEN, X. G.; XING, K.; PARK, H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology* 144, 51-63 (2010).

KOU, S., G.; PETERS, L. M.; MUCALO, M. R. Chitosan: A review of sources and preparation methods. *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V., (2021).

KUMAR, S. & KOH, J. Physiochemical, optical and biological activity of chitosan-chromone derivative for biomedical applications. *International Journal of Molecular Sciences* 13, 6102-6116, 2012.

KUMARI, S.; KISHOR, R. Chitin and chitosan: origin, properties, and applications. In *Handbook of Chitin and Chitosan: Volume 1: Preparation and Properties* (pp. 1-33). Elsevier, (2020).

KUMARIHAMI, H. M. P. C.; KIM, Y. H.; KWACK, Y. B.; KIM, J.; KIM, J. G. Application of chitosan as edible coating to enhance storability and fruit quality of Kiwifruit: A Review. *Scientia Horticulturae* 292, (2022).

KUMIRSKA, J.; CZERWICKA, M.; KACZYŃSKI, Z.; BYCHOWSKA, A.; BRZOZOWSKI, K.; THÖMING, J.; STEPNOWSKI, P. Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. *Marine Drugs*. MDPI AG, 2010.

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

KURITA, K. Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine Biotechnology*, 2006.

LAMARQUE, G.; CHAUSSARD, G.; DOMARD, A. Thermodynamic aspects of the heterogeneous deacetylation of  $\beta$ -chitin: Reaction mechanisms. *Biomacromolecules* 8, 1942-1950 (2007).

LAMARQUE, G.; CRETENET, M.; VITON, C.; DOMARD, A. New route of deacetylation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -chitins by means of freeze-pump out-thaw cycles. *Biomacromolecules* 6, 1380-1388 (2005).

LANDI, L.; PERALTA-RUIZ, Y.; CHAVES-LÓPEZ, C.; ROMANAZZI, G. Chitosan Coating Enriched With *Ruta graveolens* L. Essential Oil Reduces Postharvest Anthracnose of Papaya (*Carica papaya* L.) and Modulates Defense-Related Gene Expression. *Frontiers in Plant Science* 12, (2021).

LI, K.; XING, R.; LIU, S.; LI, P. Chitin and Chitosan Fragments Responsible for Plant Elicitor and Growth Stimulator. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68, 12203-12211 (2020).

LIU, H.; DU, Y.; WANG, X.; SUN, L. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *International Journal of Food Microbiology* 95, 147-155 (2004).

LIU, H.; TIAN, W.; LI, B.; WU, G.; IBRAHIM, M.; TAO, Z.; SUN, G. Antifungal effect and mechanism of chitosan against the rice sheath blight pathogen, *Rhizoctonia solani*. *Biotechnology Letters* 34, 2291-2298 (2012).

LIU, T.; LI, B.; ZHENG, X.; LIANG, S.; SONG, X.; ZHU, B.; XIA, J. Effects of freezing on the condensed state structure of chitin in alkaline solution. *Carbohydrate Polymers* 82, 753-760 (2010).

LIU, X.; COOPER, A. M. W.; ZHANG, J.; ZHU, K. Y. Biosynthesis, modifications and degradation of chitin in the formation and turnover of peritrophic matrix in insects. *Journal of Insect Physiology* 114, 109-115 (2019).

LOPES, C.; ANTELO, L. T.; FRANCO-URÍA, A.; ALONSO, A. A.; PÉREZ-MARTÍN, R. Chitin production from crustacean biomass: Sustainability assessment of chemical and enzymatic processes. *Journal of Cleaner Production*, 172, 4140-415, (2018).

LUBKOWSKI, K.; GRZMIL, B. Controlled release fertilizers. *Polish Journal of Chemical Technology*, 9(4), 83-84, (2007).

LUO, K., YIN, J., KHUTORYANSKAYA, O. V. & KHUTORYANSKIY, V. V. Mucoadhesive and elastic films based on blends of chitosan and hydroxyethylcellulose. *Macromolecular Bioscience* 8, 184-192 (2008).

MACHADO, S. S. N. Potencial Sustentável da Obtenção de Quitina e Quitosana a Partir de Resíduos da Produção de Insetos. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (PGALI) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), (2023).

MADDALONI, M.; VASSALINI, I.; ALESSANDRI, I. Green Routes for the Development of Chitin/Chitosan Sustainable Hydrogels. *Sustainable Chemistry* 1, 325-344 (2020).

MALERBA, M.; CERANA, R. Chitosan effects on plant systems. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG, (2016).

MALIKI, S.; SHARMA, G.; KUMAR, A.; MORAL-ZAMORANO, M.; MORADI, O.; BASELGA, J.; GARCÍA-PEÑAS, A. Chitosan as a Tool for Sustainable Development: A Mini Review. *Polymers* 14, (2022).

MANJUBAASHINI, N.; BARGAVI, P.; THOMAS, N. G.; KRISHNAN, N.; BALAKUMAR, S. Chitosan bioactive glass scaffolds for in vivo subcutaneous implantation, toxicity assessment, and diabetic wound healing upon animal model, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 256, Part 1, (2024).

MARANI, D.; HJELM, J.; WANDEL, M. Use of Intrinsic Viscosity for evaluation of polymer-solvent affinity. *Nordic Rheology Society. Annual Transactions* (2013).

MARINELLI, E.; ORZALI, L.; LOTTI, E.; RICCIONI, L. Activity of some essential oils against pathogenic seed borne fungi on legumes. *Asian Journal of Plant Pathology* 6, 66-74 (2012).

MARQUIS-DUVAL, F.O. *Ph.D. Dissertation*. Laval University; Quebec, Canada: 2008. Isolation et valorisation des constituants de la carapace de la crevette nordique.

MATHUR, N. K.; NARANG, C. K. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. *Journal Of Chemical Education*, 67(11), 938-942, (1990).

MATYJASZCZYK, E. The introduction of biostimulants on the polish market. The present situation and legal requirements. *Przemysl Chemiczny*, 94(10), 1841-1844, (2015).

MELLO, I. L.; DELPECH, M. C.; COUTINHO, F. M. B.; ALBINO, F. F. M. Viscometric Study of high-cis polybutadiene in toluene solution. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 17, 194-199 (2006).

MENG, X.; YANG, L.; KENNEDY, J. F.; TIAN, S. Effects of chitosan and oligochitosan on growth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit. *Carbohydrate Polymers* 81, 70-75 (2010).

MIMA, S.; MIYA, M.; IWAMOTO, R.; YOSHIKAWA, S. Highly deacetylated chitosan and its properties. *Journal of Applied Polymer Science* 28, 1909-1917 (1983).

MINH, N. C.; VAN HOA, N.; TRUNG, T. S. in *Handbook of Chitin and Chitosan: Volume 1: Preparation and Properties* 453-471. doi:10.1016/B978-0-12-817970-3.00015-8, (Elsevier, 2020).

MINKE, R.; BLACKWELL, J. The structure of  $\alpha$ -chitin. *Journal of Molecular Biology*, 120(2), 167-181, (1978).

MIRON, A.; SARBU, A.; ZAHARIA, A.; SANDU, T.; IOVU, H.; FIERASCU, R. C.; IORDACHE, T. V. A Top-Down Procedure for Synthesizing Calcium Carbonate-Enriched Chitosan from Shrimp Shell Wastes. *Gels* 8, (2022).

MOINE, L.; CANALI, M. M.; PORPORATTO, C.; CORREA, S. G. Reviewing the biological activity of chitosan in the mucosa: Focus on intestinal immunity. *International Journal of Biological Macromolecules* 189, 324-334 (2021).



MOORJANI, M.N., et al. Parameters affecting the viscosity of chitosan from prawn waste. *J. Food Sci. Technol.* 12: 187, (1975).

MORIN-CRINI, N.; LICHTFOUSE, E.; TORRI, G.; CRINI, G. Applications of chitosan in food, pharmaceuticals, medicine, cosmetics, agriculture, textiles, pulp and paper, biotechnology, and environmental chemistry. *Environmental Chemistry Letters*, Springer Verlag, 17 (4), pp.1667 - 1692, (2019).

MOURA, C. M. D.; MUSZINSKI, P.; SCHMIDT, C.; ALMEIDA, J.; PINTO, L. A. D. A. Quitina e quitosana produzidas a partir de resíduos de camarão e siri: avaliação do processo em escala piloto. *VETOR - Revista de Ciências Exatas e Engenharias* 16,1, 37-45 (2007).

MOURA, C. M. DE; MOURA, J. M. DE; SOARES, N. M.; PINTO, L. A. DE A. Evaluation of molar weight and deacetylation degree of chitosan during chitin deacetylation reaction: Used to produce biofilm. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 50, 351-355 (2011).

MOUSSIAN B. Chitin: Structure, chemistry and biology. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1142, pp. 5-18). Springer New York LLC, (2019).

MUANPRASAT, C.; CHATSUDTHIPONG, V. Chitosan oligosaccharide: Biological activities and potential therapeutic applications. *Pharmacology and Therapeutics*. Elsevier Inc, (2017).

MUKHERJEE, D. P. Method for Producing Chitin or Chitosan. Patente dos Estados Unidos Nº US6310188B1. Publicada em 30 de outubro de 2001. Cessionário Atual: Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College. United States Patent and Trademark Office (2001).

MUTSCHLER, H.; WOCHNER, A.; HOLLIGER, P. Freeze-thaw cycles as drivers of complex ribozyme assembly. *Nature Chemistry* 7, 502-508 (2015).

NGO D.H.; KIM S.K. Chapter Two-Antioxidant effects of chitin, chitosan, and their derivatives. *Adv. Food Nutr. Res.*;73:15-31, (2014).

NISHIYAMA, Y.; NOISHIKI, Y.; WADA, M. X-ray structure of anhydrous  $\beta$ -chitin at 1 Å resolution. *Macromolecules*, 44(4), 950-957, (2011).

NO H.K.; HUR E.Y. Control of foam formation by antifoam during demineralization of crustacean shell in preparation of chitin. *J. Agric. Food. Chem.* (1998).

NO, H. K.; MEYERS, S. P. Preparation and Characterization of Chitin and Chitosan—A Review. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 4(2), 27-52, (1995).

NO, H. K.; MEYERS, S. P.; LEE, K. S. Isolation and Characterization of Chitin from Crawfish Shell Waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37, 575-579 (1989).

OKAFOR N. Isolation of chitin from the shell of the cuttlefish, *Sepia officirralis* L. *Biochim. Biophys. Acta*;101:193-200, (1965).

OKAMOTO, Y.; YANO, R.; MIYATAKE, K.; TOMOHIRO, I.; SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S. Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. *Carbohydrate Polymers* 53, 337-342 (2003).

PAGNONCELLI, M. G. B.; DE ARAÚJO, N. K.; DA SILVA, N. M. P.; DE ASSIS, C. F.; RODRIGUES, S.; DE MACEDO, G. R. Chitosanase production by *Paenibacillus ehimensis* and its application for chitosan hydrolysis. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53, 1461-1468 (2010).

PAKIZEH, M.; MORADI, A.; GHASSEMI, T. Chemical extraction and modification of chitin and chitosan from shrimp shells. *European Polymer Journal*. Elsevier Ltd, (2021).

PARK, P. J.; JE, J. Y.; KIM, S. K. Free radical scavenging activity of chitooligosaccharides by electron spin resonance spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16), 4624-4627, (2003).

PARRA, Y.; RAMÍREZ, M. A. EFECTO DE DIFERENTES DERIVADOS DE LA QUITINA SOBRE EL CRECIMIENTO In Vitro DEL HONGO *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Instituto Nacional de Ciências Agrícolas*, 23(2), 73-75, (2002).

PAVONI, J. M. F., LUCHESE, C. L., & TESSARO, I. C. Impact of acid type for chitosan dissolution on the characteristics and biodegradability of cornstarch/chitosan based films. *International Journal of Biological Macromolecules*, (2019).

PELLIS, A.; GUEBITZ, G. M.; NYANHONGO, G. S. Chitosan: Sources, Processing and Modification Techniques. *Gels* 8, (2022).

PERCOT A.; VITON C.; DOMARD A. Percot A., Viton C., Domard A. Characterization of shrimp shell deproteinization. *Biomacromolecules*, 4:1380-1385, (2003).

PHUNG HAI, T. A.; SUGIMOTO, R. Fluorescence control of chitin and chitosan fabricated: Via surface functionalization using direct oxidative polymerization. *RSC Advances* 8, 7005-7013, (2018).

POSMYK, M. M.; SZAFRAŃSKA, K. Biostimulators: A new trend towards solving an old problem. *Frontiers in Plant Science*. Frontiers Research Foundation, (2016).

QAVAMI, N., NAGHDI BADI, H., LABBAFI, M., MEHREGAN, M., TAVAKOLI, M., & MEHRAFARIN, A. Overview on Chitosan as a valuable ingredient and biostimulant in pharmaceutical industries and agricultural products. *Trakia Journal of Science* 15, 83-91 (2017).

QI, X.; HU, X.; WEI, W.; YU, H.; LI, J.; ZHANG, J.; DONG, W. Investigation of Salecan/poly(vinyl alcohol) hydrogels prepared by freeze/thaw method. *Carbohydrate Polymers* 118, 60-69 (2015).

QIN, Y. A brief description of textile fibers. In *Medical Textile Materials* (pp. 23-42). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100618-4.00003-0>, (2016).

QUEIROZ, M. F.; MELO, K. R. T.; SABRY, D. A.; SASSAKI, G. L.; ROCHA, H. A. O. Does the use of chitosan contribute to oxalate kidney stone formation? *Marine Drugs* 13, 141-158 (2015).

RABEA, E. I.; BADAWY, M. E. T.; STEVENS, C. V.; SMAGGHE, G.; STEURBAUT, W. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules* 4, 1457-1465 (2003).

RAJESTARY, R.; LANDI, L.; ROMANAZZI, G. Chitosan and postharvest decay of fresh fruit: Meta-analysis of disease control and antimicrobial and eliciting activities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 20, 563-582 (2021).

RAVAL, R.; RAVAL, K.; MOERSCHBACHER, B. M. Enzymatic Modification of Chitosan Using Chitin Deacetylase Isolated from *Bacillus cereus*. *Open Access Scientific Reports*, 2(1), 2-5, (2013).

REGLINSKI, T.; ELMER, P. A. G.; TAYLOR, J. T.; WOOD, P. N.; HOYTE, S. M. Inhibition of *Botrytis cinerea* growth and suppression of botrytis bunch rot in grapes using chitosan. *Plant Pathology* 59, 882-890 (2010).

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

RICCIONI, L.; ORZALI, L. Activity of tea tree (*Melaleuca alternifolia*, Cheel) and thyme (*Thymus vulgaris*, Linnaeus.) essential oils against some pathogenic seed borne fungi. *Journal of Essential Oil Research*, 23(6), 43-47, (2011).

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science* (Oxford) 31, 603-632 (2006).

RINAUDO, M.; DOMARD, A. Solution properties of chitosan. Chitin and Chitosan. *ResearchGate*, 71-79, (1989).

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

ROBERTS G. A. F. Chitin chemistry. London, UK: Macmillan International Higher Education. 26. Kaya M, et al. 2017 On chemistry of  $\gamma$ -chitin. *Carbohydr. Polym.* 176, 177-186, (1992).

ROMANAZZI, G.; FELIZIANI, E.; SIVAKUMAR, D. Chitosan, a biopolymer with triple action on postharvest decay of fruit and vegetables: Eliciting, antimicrobial and film-forming properties. *Frontiers in Microbiology*, 9, (2019).

ROMANAZZI, G.; GABLER, F. M.; MARGOSAN, D.; MACKEY, B. E.; SMILANICK, J. L. Effect of chitosan dissolved in different acids on its ability to control postharvest gray mold of table grape. *Phytopathology* 99, 1028-1036 (2009).

ROMANAZZI, G.; MOUMNI, M. Chitosan and other edible coatings to extend shelf life, manage postharvest decay, and reduce loss and waste of fresh fruits and vegetables *Current Opinion in Biotechnology*, Volume 78, 102834, ISSN 0958-1669, (2022).

ROSMAWATI, A.; RUMHAYATI, B.; SRIHARDYASTUTIE, A. Biorecovery of chitin from shrimp shell waste (*Litopenaeus vanammei*) using fermentation and co-fermentation of *L.plantarum* and *B.thuringiensis*. in *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* 546, (Institute of Physics Publishing, 2019).

RUDALL, K. M.. The Chitin/Protein Complexes of Insect Cuticles. *Advances in Insect Physiology*, 1(C), 257-313, (1963).

RUDALL, K., M.; KENCHINGTON. The chitin system. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 48(4), 597-633, (1973).

SALEH, Y.; NASR, A.; ZAKI, H.; MOHAMED, M.; KANDILE, NADIA. Extraction and Characterization of Chitosan from Shrimp Shells (Egypt: case study). *Journal of Scientific Research in Science* 33, 396-407 (2016).

SÁNCHEZ ALDANA, D., et al. Preparation, characterization, and application of polysaccharide-based emulsions incorporated with lavender essential oil for skin-friendly cellulosic support. *International Journal of Biological Macromolecules*, 191, 405-413, (2021).

SANFORD, P. A. Biomedical applications of high purity chitosan: physical, chemical and bioactive properties. In *American Chemical Society, Polymer Preprints, Division of Polymer Chemistry* (Vol. 30, p. 365). Publ by ACS, (1989).

SANNAN, T.; KURITA, K.; IWAKURA, Y. Studies on Chitin, 1 - Effect of Deacetylation on Solubility. *Die Makromolekulare Chemie*, 177(12), 3589-3600, (1976).

SANTOS, J. E. DOS, SOARES, J. DA P., DOCKAL, E. R., CAMPANA FILHO, S. P., & CAVALHEIRO, É. T. G. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. *Polímeros* 13, 242-249 (2003).

SANTOS, V. P.; MAIA, P.; ALENCAR, N. DE S.; FARIAS, L.; ANDRADE, R. F. S.; SOUZA, D.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.. Recovery of chitin and chitosan from shrimp waste with microwave technique and versatile application. *Arquivos do Instituto Biológico* 86, (2019).

SANTOSO, J.; ADIPUTRA, K. C.; SOERDIRGA, L. C.; TARMAN, K. Effect of acetic acid hydrolysis on the characteristics of water soluble chitosan. in *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 414, (Institute of Physics Publishing, 2020).

SCHMITT, A.; KOCH, E.; STEPHAN, D.; KROMPHARDT, C.; JAHN, M.; KRAUTHAUSEN, H.-J.; P, S. Evaluation of non-chemical seed treatment methods for the control of *Phoma valerianellae* on lamb's lettuce seeds. *Journal of Plant Diseases and Protection* 116, 200-207 (2009).

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

SHAH, S.; HASHMI, M. S. Chitosan-aloe vera gel coating delays postharvest decay of mango fruit. *Horticulture Environment and Biotechnology*, 61(2), 279-289, (2020).

SHAHIDI F.; SYNOWIECKI J. Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. *J. Agric. Food Chem.* ;39:1527-1532, (1991).

SHARP, R. G. A review of the applications of chitin and its derivatives in agriculture to modify plant-microbial interactions and improve crop yields. *Agronomy*. MDPI AG, (2013).

SHIGEMASA, Y., MATSUURA, H., SASHIWA, H., & SAIMOTO, H. Evaluation of different absorbance ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of deacetylation in chitin. *International Journal of Biological Macromolecules* 18, 237-242 (1996).

SHIMAHARA K.; OHKOUCHI K.; IKEDA M. In: *Chitin Chemistry*. Roberts G.A.F., editor. Macmillan Press; London, UK: p. 56, (1992).

SINGHA, S. K.; HOQUE, S. M.; DAS, H.; ALIM, M. A. Evaluation of chitosan-Ag/TiO<sub>2</sub> nanocomposite for the enhancement of shelf life of chili and banana fruits, *Heliyon*, Volume 9, Issue 11, (2023).

SINHA, S.; CHAND, S.; TRIPATHI, P. Production, purification and characterization of a new chitosanase enzyme and improvement of chitosan pentamer and hexamer yield in an enzyme membrane reactor. *Biocatalysis and Biotransformation*, 32(4), 208-213, (2014).

SONG, M. J.; PARK, C. H.; KIM, J. D.; KIM, H. Y.; BAE, S. H.; CHOI, J. Y.; LEE, H. G. Drug-eluting bead loaded with doxorubicin versus conventional Lipiodol-based

transarterial chemoembolization in the treatment of hepatocellular carcinoma: A case-control study of Asian patients. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 23, 521-527 (2011).

SOUZA, V.C.; DOTTO, G.L. Application of chitosan based materials as edible films and coatings, *Frontiers in Biomaterials: Chitosan Based Materials and Its Applications*, vol. 3, pp. 249-271, (2017).

SUKSANGPANYA, N.; YARAGHI, N. A.; KISAILUS, D.; ZAVATTIERI, P. Twisting cracks in Bouligand structures. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 76, 38-57 (2017).

THOMAS, D.; THOMAS, S. Chemical Modification of Chitosan and Its Biomedical Application. In *Biopolymer Nanocomposites* (pp. 33-51). John Wiley & Sons, Inc., (2013).

THOMAS, S.; PIUS, A.; GOPI, S. *Handbook of Chitin and Chitosan: Volume 1: Preparation and Properties. Handbook of Chitin and Chitosan: Volume 1: Preparation and Properties* (pp. 1-492). Elsevier, (2020).

TINIVELLA, F.; HIRATA, L. M.; CELAN, M. A.; WRIGHT, S. A. I.; AMEIN, T.; SCHMITT, A.; GULLINO, M. L. Control of seed-borne pathogens on legumes by microbial and other alternative seed treatments. *European Journal of Plant Pathology* 123, 139-151 (2009).

TOKATLI, K.; DEMIRDÖVEN, A. Optimization of chitin and chitosan production from shrimp wastes and characterization. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(2), (2018).

TOKORO, A.; TATEWAKI, N.; SUZUKI, K.; MIKAMI, T.; SUZUKI, S.; SUZUKI, M. Growth-Inhibitory Effect of Hexa-N-acetylchitohexaose and Chitohexaose against Meth-A Solid Tumor. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 36, 784-790 (1988).



TOLAIMATE, A.; DESBRIERES, J.; RHAZI, M.; ALAGUI, A. Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties. *Polymer*, 44(26),7939-7952. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2003.10.025> (2003).

TRIUNFO, M.; TAFI, E.; GUARNIERI, A.; SALVIA, R.; SCIEUZO, C.; HAHN, T.; FALABELLA, P.. Characterization of chitin and chitosan derived from *Hermetia illucens*, a further step in a circular economy process. *Scientific Reports* 12, (2022).

TRUONG, T. O.; HAUSLER, R.; MONETTE, F.; NIQUETTE, P. The valorization of industrial fishery waste through the hydrothermal-chemical transformation of chitosan [Valorisation des résidus industriels de pêches pour la transformation de chitosane par technique hydrothermo-chimique]. *Revue des Sciences de l'Eau* 20, 253-262 (2007).

VALDEZ, M. I.; GARCIA, J.; UBEDA-MANZANARO, M.; MARTINEZ, A.; RODRIGO, D. Insect chitosan as a natural antimicrobial against vegetative cells of *Bacillus cereus* in a cooked rice matrix. *Food Microbiology* 107, (2022).

VALENCIA, A. M.; VALENCIA, C. H.; ZULUAGA, F.; GRANDE-TOVAR, C. D. Synthesis and fabrication of films including graphene oxide functionalized with chitosan for regenerative medicine applications. *Heliyon* 7, (2021).

VALENTI, W. C.; BARROS, H. P.; MORAES-VALENTI, P.; BUENO, G. W.; CAVALLI, R. O. Aquaculture in Brazil: past, present and future. *Aquaculture Reports* 19, (2021).

VALLEJO-DOMÍNGUEZ, D.; RUBIO-ROSAS, E.; AGUILA-ALMANZA, E.; HERNÁNDEZ-COCOLETZI, H.; RAMOS-CASSELLIS, M. E.; LUNA-GUEVARA, M. L.; LOKE SHOW, P. Ultrasound in the deproteinization process for chitin and chitosan production. *Ultrasonics Sonochemistry* 72, (2021).

VAN LENTEREN, J. C. Need for quality control of mass-produced biological control agents. In *Quality Control and Production of Biological Control Agents: Theory and Testing Procedures* (pp. 1-18), (2003).

VERMA, D.; FORTUNATI, E. Biopolymer processing and its composites: An introduction. In *Biomass, Biopolymer-Based Materials, and Bioenergy: Construction, Biomedical, and other Industrial Applications* (pp. 3-23). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102426-3.00001-1>.

WANG, H.; QIU, X.; LI, Y.; LIU, B.; LI, W.; SU, D.; TANG, Z. Short-Term Corrosion Behavior and Mechanism of 316 Stainless Steel in Liquid Pb at 650 and 750 °C. *Journal of Materials Engineering and Performance* (2023). doi:10.1007/s11665-023-08479-z.

WANG, J. J.; ZENG, Z. W.; XIAO, R. Z.; XIE, T.; ZHOU, G. L.; ZHAN, X. R.; WANG, S. L. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. *International journal of nanomedicine* 6, 765-774 (2011).

XING, K.; ZHU, X.; PENG, X.; QIN, S. Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review. *Agronomy for Sustainable Development* 35, 569-588 (2015).

YAMAMOTO, H.; KUNO, Y.; SUGIMOTO, S.; TAKEUCHI, H.; KAWASHIMA, Y. Surface-modified PLGA nanosphere with chitosan improved pulmonary delivery of calcitonin by mucoadhesion and opening of the intercellular tight junctions. *Journal of Controlled Release* 102, 373-381 (2005).

YAN, C. YUN; GU, J. WEI; HOU, D. PING; JING, H. YING; WANG, J.; GUO, Y. ZHI; YAMAMOTO, A. Synthesis of Tat tagged and folate modified N-succinyl-chitosan self-assembly nanoparticles as a novel gene vector. *International Journal of Biological Macromolecules* 72, 751-756 (2015).

YOUNES, I.; RINAUDO, M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine Drugs*. MDPI AG, (2015).

YOUNES, I.; SELLIMI, S.; RINAUDO, M.; JELLOULI, K.; NASRI, M. Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities. *International Journal of Food Microbiology* 185, 57-63 (2014).

ZAHID, N.; MAQBOOL, M.; SIDDIQUI, Y.; MANICKAM, S.; ALI, A. Regulation of inducible enzymes and suppression of anthracnose using submicron chitosan dispersions. *Scientia Horticulturae* 193, 381-388 (2015).

ZAJĄC, A.; HANUZA, J.; WANDAS, M.; DYMIŃSKA, L. Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 134, 114-120 (2015).

ZAMANI, A.; TAHERZADEH, M. J. Production of low molecular weight chitosan by hot dilute sulfuric acid. *BioResources*, 5(3), 1554-1564, (2010).

ZHANG, C. M.; YU, S. H.; ZHANG, L. S.; ZHAO, Z. Y.; DONG, L. L. Effects of several acetylated chitoooligosaccharides on antioxidation, antiglycation and NO generation in erythrocyte. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 24, 4053-4057 (2014).

ZHANG, M.; HAGA, A.; SEKIGUCHI, H.; HIRANO, S. Structure of insect chitin isolated from beetle larva cuticle and silkworm (*Bombyx mori*) pupa exuvia. *International Journal of Biological Macromolecules* 27, 99-105 (2000).

ZHANG, W.; JIANG, H.; RHIM, J. W.; CAO, J.; JIANG, W. Effective strategies of sustained release and retention enhancement of essential oils in active food packaging films/coatings. *Food Chemistry* 367, (2022).

ZHANG, X.; ISMAIL, B. B.; CHENG, H.; JIN, T. Z.; QIAN, M.; ARABI, S. A.; GUO, M. Emerging chitosan-essential oil films and coatings for food preservation - A review of advances and applications. *Carbohydrate Polymers* 273, (2021).

ZHANG, Y.; PARIS, O.; TERRILL, N. J.; GUPTA, H. S. Uncovering three-dimensional gradients in fibrillar orientation in an impact-resistant biological armour. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep26249> (2016).

ZHAO, D.; YU, S.; SUN, B.; GAO, S.; GUO, S.; ZHAO, K. Biomedical applications of chitosan and its derivative nanoparticles. *Polymers* 10, (2018).

ZHAO, H.; ZHANG, L.; ZHENG, S.; CHAI, S.; WEI, J.; ZHONG, L.; XUE, J. Bacteriostatic activity and cytotoxicity of bacterial cellulose-chitosan film loaded with in-situ synthesized silver nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* 281, (2022).

ZOE, L. H.; DAVID, S. R.; RAJABALAYA, R. Chitosan nanoparticle toxicity: A comprehensive literature review of in vivo and in vitro assessments for medical applications. *Toxicology Reports* 11, 83-106 (2023).