



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA PARA RECURSOS AMAZÔNICOS



Produção de Quitosana a partir dos Caranguejos *Dilocarcinus pagei* Stimpson,  
1861, Capturados no Município de Itacoatiara (AM)

Ana Gracy Oliveira Ribeiro

ITACOATIARA  
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA PARA RECURSOS AMAZÔNICOS

Produção de Quitosana a partir dos Caranguejos *Dilocarcinus pagei* Stimpson,  
1861, Capturados no Município de Itacoatiara (AM)

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, no Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em **Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos**.

Área de concentração: Ciências Ambientais.

Linha de pesquisa: Agrobioenergia, análise e manejo de recursos amazônicos.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Frigi Perotti

Co-orientador: Prof. Dr. Gustavo Yomar Hattori

ITACOATIARA  
2017

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Ribeiro, Ana Gracy Oliveira  
R484p Produção de Quitosana a partir dos Caranguejos *Dilocarcinus*  
pagei Stimpson, 1861, Capturados no Município de Itacoatiara (AM)  
/ Ana Gracy Oliveira Ribeiro. 2017  
88 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Gustavo Frigi Perotti  
Coorientador: Gustavo Yomar Hattori  
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia para Recursos  
Amazônicos) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Crustacea. 2. Trichodactylidae. 3. biopolímero. 4. quitina. 5.  
grau de desacetilação. I. Perotti, Gustavo Frigi II. Universidade  
Federal do Amazonas III. Título



## ATA DE DEFESA

Aos dezessete dias do mês de julho do ano de 2017, às dez horas na Sala 309, do 2º pavimento do Bloco A do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia, realizou-se a Defesa de dissertação, intitulada "Produção de Quitosana a Partir dos Caranguejos *Dilocarcinus pagei* Stimpson, 1861, Capturados na Região de Itacoatiara (AM)", de autoria da Candidata ANA GRACY OLIVEIRA RIBEIRO, aluna do curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos. A Comissão Examinadora esteve constituída pelos professores: Dr. GUSTAVO FRIGI PEROTTI da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Dr. PAULO JOSÉ DE SOUSA MAIA da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e Dr. VALDOMIRO LACERDA MARTINS da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Concluídos os trabalhos de apresentação e arguição, a candidata foi ~~APROVADA~~..... pela Comissão Examinadora. Foi concedido um prazo de 60 (sessenta) dias, para a candidata efetuar as correções sugeridas pela Comissão Examinadora e apresentar o trabalho em sua redação definitiva, sob pena de não expedição do Diploma. E, para constar, foi lavrada a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão.

Dr. Gustavo Frigi Perotti  
Orientador

Dr. Paulo José de Sousa Maia  
Membro da Banca Examinadora

Dr. Valdomiro Lacerda Martins  
Membro da Banca Examinadora



*DEDICO*

*Essa dissertação é dedicada ao que tenho  
demais importante; minha vida, minha  
família que me deu força e incentivo  
para a realização desta obra.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus que sempre me protege e me ilumina;

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Gustavo Frigi Perotti, pela orientação, dedicação, confiança e pelos conhecimentos transmitidos;

Ao meu Co-orientador Prof. Dr. Gustavo Yomar Hattori por todo tempo e orientações dados, pelos ensinamentos transmitidos, e principalmente pela credibilidade;

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vera Regina Leopoldo Constantino e ao Laboratório de Sólidos Lamelares do Instituto de Química da Universidade de São Paulo pela disponibilidade na obtenção dos dados relevantes para esse trabalho;

À FAPESP pelo apoio financeiro e confiança no desenvolvimento científico;

À Universidade Federal do Amazonas, pela estrutura fornecida para realização deste trabalho;

Ao Instituto de Ciências e Exatas – ICET, Universidade Federal do Amazonas – UFAM por todo auxílio prestado, durante a fase experimental desta pesquisa;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos pela oportunidade de aprender mais;

Aos meus pais, aos meus irmãos e a toda minha família, que mesmo distante sempre me fortalece com seu amor;

Ao Prof. Dr. Jorge Yoshio Kanda pelas ideias transmitidas nos momentos mais difíceis, assim como, pela atenção, paciência e ensinamentos transmitidos;

Ao Prof. Dr. Elson Almeida de Souza pelo apoio e ensinamentos transmitidos;

Aos amigos de Mestrado, especialmente a Adriano Honorato e Evren Ney, por todo incentivo e apoio prestado;

Aos professores do Mestrado em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos que contribuíram para a minha formação profissional e pessoal, assim como, pela amizade e conhecimentos transmitidos durante o curso, em especial Prof. Dr. Jorge Yoshio Kanda, Prof. Dr. Gustavo Yomar Hattori, Prof. Dr. Gustavo Frigi Perotti, Prof. Dr. Bruno Sampaio Sant'Anna e Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Renata Takeara.

Aos meus colegas de laboratório, Aldeíza, Elessandra Matos, Fênix Rafaela, Fagnaldo, Jardel Ramos, Josiane Amorim, Marcia Loyana Pedreno, e Ozanei pelo clima de descontração, amizade e colaboração;

À Daiane Rosas secretária do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos -PPGCTRA, pela atenção e amizade;

Aos técnicos Almir, Francisco, Emerson, Marcos e Roberto, pela colaboração e amizade durante a fase experimental desta pesquisa;

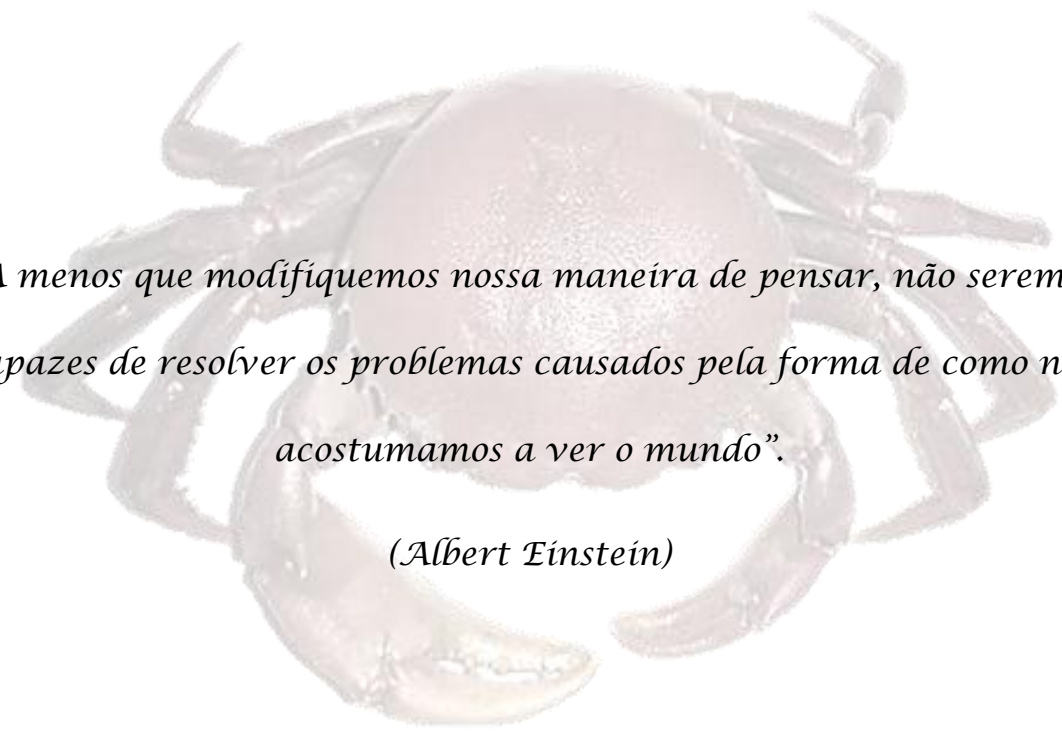
Ao Simba e Babi pela companhia e amor incondicional durante as noites em claro para a escrita dessa dissertação;

A todos, que de forma direta e indireta, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

**Obrigada!**

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

*(Antoine Lavoisier)*



*“A menos que modifiquemos nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma de como nos acostumamos a ver o mundo”.*

*(Albert Einstein)*

*“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito e sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória nem derrota”.*

*(Theodore Roosevelt)*



## RESUMO

Ribeiro, A. G. O. **Produção de Quitosana a partir dos Caranguejos *Dilocarcinus pagei* Stimpson, 1861, Capturados na Região de Itacoatiara (AM), 2017/Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, Universidade Federal do Amazonas, Amazonas.**

Os exoesqueletos de crustáceos são uma das principais fontes de obtenção de quitina, um biopolímero precursor da quitosana. Este trabalho teve como principal objetivo a extração de quitina do resíduo dos caranguejos *Dilocarcinus pagei* coletados no município de Itacoatiara (AM) e posterior conversão em quitosana, além de analisar as propriedades físicas e químicas dos materiais obtidos. O tratamento de desmineralização foi realizado empregando soluções de HCl de diferentes concentrações e por diferentes períodos de tempo, no qual o tratamento utilizando a solução ácida de  $0,50 \text{ mol L}^{-1}$  e tempo de reação de 30 minutos exibiu maior perda de massa. A remoção do conteúdo orgânico ocorreu através do contato do remanescente desmineralizado com soluções de NaOH de  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  à  $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$  por diferentes períodos de tempo, onde foi observado maior perda de massa para o período de 24 horas. A obtenção da quitina ocorreu através da exposição do material desproteinizado com uma solução de NaClO  $0,14 \text{ mol L}^{-1}$  por um período de 8 horas. A partir da análise do rendimento final de cada etapa, encontrou-se que os resíduos do caranguejo amazônico são constituídos por 78,45 % de  $\text{CaCO}_3$  e 21,55 % de matéria orgânica. Da fração orgânica, 51,93 % (10,99 % da massa inicial dos resíduos) é constituída por proteínas e lipídeos, enquanto 48,07 % (10,56 % da massa inicial dos resíduos) é constituída por uma associação de quitina e pigmentos. Dessa associação, 23,95 % (2,53 % da massa inicial dos resíduos) é formada por pigmentos e 76,05 % (8,03 % da massa inicial dos resíduos) é formada

por quitina. O conteúdo encontrado de quitina é similar ao encontrado na literatura para outras espécies de caranguejo. Através das técnicas de difração de raios X e análise termogravimétrica, constatou-se que a quitina obtida possui padrões de difração característicos da fase cristalográfica  $\alpha$ -quitina e a quitosana obtida possui uma estrutura semicristalina. O perfil de decomposição térmica é característico de biopolímeros, com a existência de eventos não oxidativos e oxidativos de perda de massa. Constatou-se com auxílio da técnica de espectroscopia vibracional na região do infravermelho que o grau de desacetilação das quitosanas obtidas após processamento da quitina em solução  $10,0 \text{ mol L}^{-1}$  de NaOH a  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  pelos tempos de 60, 90 e 120 minutos foi de 68,45 % a 81,92 %

Palavras chaves: Crustacea, Trichodactylidae, biopolímero, quitina, grau de desacetilação.

## ABSTRACT

Ribeiro, A. G. O. **Production of Chitosan from *Dilocarcinus pagei* crab Stimpson, 1861, Captured in Itacoatiara Region (AM), 2017/Master Dissertation – Post-Graduation in Science and Technology for Amazonian Resources Program, Federal University of Amazon, Amazon.**

The exoskeleton of crustaceans is one of the main sources of chitin, a biopolymer precursor of chitosan. This work aimed the extraction of chitin from the residues of the *Dilocarcinus pagei* crab collected in the city of Itacoatiara (AM), and eventually converted to chitosan and also the analysis of the physicochemical properties of the obtained materials. The demineralization step used acid solutions of different concentrations and under different reaction times, in which the condition using acid solution of 0.50 mol L<sup>-1</sup> and reaction time of 30 minutes exhibited greater mass loss. Removal of the organic content occurred through the contact of the demineralised remnant with 1.0 mol L<sup>-1</sup> NaOH solutions at 70 ° C for different time lengths, where a larger mass loss was observed for the 24-hour period. Chitin was obtained by exposing the deproteinized material to a 0.14 mol L<sup>-1</sup> NaClO solution for 8 hours. From the analysis of the final yield of each stage, it was found that the residues of the Amazonian crab is constituted by 78.45% CaCO<sub>3</sub> and 21.55% organic matter. Of the organic fraction, 51.93% (10.99% of the initial mass of the residues) consists of proteins and lipids, whereas 48.07% (10.56% of the initial mass of the residues) consists of an association of chitin and pigments. From this association, 23.95% (2.53% of the initial mass of the residues) is formed by pigments and 76.05% (8.03% of the initial mass of the residues) is formed by chitin. The content of chitin found is similar to that found in the literature for other species of crab. According to X-ray diffraction and thermogravimetric analysis, it was verified that the chitin obtained has diffraction

patterns characteristic of the  $\alpha$ -chitin crystallographic phase and the obtained chitosan has semi-crystalline structure. The thermal decomposition profile is characteristic of biopolymers, with the existence of non oxidative and oxidative events of mass loss. It was found through Infrared spectroscopy that the degree of deacetylation of the obtained chitosan samples after chitin treatment with 10.0 mol L<sup>-1</sup> NaOH solution at 105 ° for 60, 90 e 120 minute were between 68.45 % and 81.92 %.

**Key words:** Crustacea, Trichodactylidae, biopolymer, chitin, degree of deacetylation.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Foto representativa da morfologia externa do caranguejo de água doce *Dilocarcinus pagei*.....21
- Figura 2 - Comparação entre as estruturas moleculares da celulose, quitina e quitosana.....23
- Figura 3 - Disposição cristalina das cadeias poliméricas de quitina.....24
- Figura 4 - Mecanismo reacional para a produção de quitosana a partir de quitina por via alcalina.....27
- Figura 5 - Fluxograma do processo de obtenção da quitina e quitosana.....34
- Figura 6 - Difratoograma de raios X de isolamento da quitina a partir do exoesqueleto do caranguejo de tamanho de partícula (menor que 125  $\mu\text{m}$ ) em diferentes condições experimentais para a desmineralização: (1a) 0,25 mol L<sup>-1</sup> de HCl por 30 min; (1b) 0,50 mol L<sup>-1</sup> HCl por 30 min e (1c) 0,75 mol L<sup>-1</sup> HCl por 60 min.....46
- Figura 7 - Curvas TGA das condições experimentais de reação: desmineralização com ácido clorídrico em solução de concentração 0,25 mol L<sup>-1</sup> (1a - vermelha), 0,5 mol L<sup>-1</sup> (1b - preta), por 30 min e 0,75 mol L<sup>-1</sup> (1c - azul), 1 hora sob agitação constante a temperatura ambiente.....48
- Figura 8 - Difratoograma de três condições de reação de desproteíntização do exoesqueleto do caranguejo desmineralizado pelos procedimentos 2a, 2b e 2c. O difratograma (1b) corresponde ao resultado de difração obtido para o exoesqueleto de caranguejo desmineralizado na condição de reação 1b.....53
- Figura 9 - Curvas TGA do processo de desproteíntização com hidróxido de sódio em solução de 1,0 mol L<sup>-1</sup> em tempos de 8 horas (2a - azul) 12 horas (2b - verde) e 24 horas (2c - vermelha), e

do processo de desmineralização com HCl em solução de 0,50 mol L <sup>-1</sup> no tempo de 30 minutos (1b - preta).....	55
Figura 10 - Amostra desproteïnizada (a) e amostra despigmentada (b) .....	56
Figura 11 - Difratoograma da quitina extraído do caranguejo <i>D. pagei</i> .....	58
Figura 12 - Curvas TGA (a) do material despigmentado e fragmentos MS obtidos para (b) m/z = 18 (água), (c) m/z = 30 (óxido de nitrogênio), (d) m/z = 44 (dióxido de carbono) e (e) m/z = 46 (dióxido de nitrogênio) .....	60
Figura 13 - Amostras das quitosanas obtidas através de diferentes tempos de reação.....	62
Figura 14 - Difratoogramas de raios-X das quitosanas obtidas a partir da quitina extraída do exoesqueleto do caranguejo <i>D. pagei</i> , as quais foram produzidas em diferentes tempos de reação: Q60 (azul), Q90 (preto) e Q120 (vermelho), as quais foram produzidas em diferentes tempos de reação.....	66
Figura 15 - Curvas TGA dos quitosanas obtidas em diferentes tempos: Q60 (preta), Q90 (vermelha) e Q120 (azul).....	68
Figura 16 - Espectro vibracional na região do Infravermelho da $\alpha$ -quitina de caranguejo.....	69
Figura 17 - Espectros vibracionais na região do Infravermelho das quitosanas obtidas em tempos de reação de 60 (Q60), 90 (Q90) e 120 (Q120) minutos.....	70

## LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Principais fontes e quitina.....	20
Tabela 2 - Áreas de aplicação e potenciais usos da quitina e seu derivado.....	31
Tabela 3 - Reagentes utilizados na extração de quitina e produção de quitosana .....	33
Tabela 4 - Equipamentos e materiais utilizados na extração de quitina e produção de quitosana.....	33
Tabela 5 - Condições de reação no processo de otimização da desmineralização do exoesqueleto do caranguejo <i>D. pagei</i> .....	42
Tabela 6 - condições de reação e rendimento do remanescente orgânico na desproteinização do exoesqueleto de caranguejo em três tempos distintos 8, 12 e 24 horas.....	50
Tabela 7 - Rendimentos das quitosanas obtidas em diferentes tempos de reação.....	63

## **LISTA DE SIGLAS**

ANOVA	Análise de Variância
XRD	Difração de raios X
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FTIR	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho por Transformada de Fourier
GD	Grau de Desacetilação
ICET	Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia
MS	Espectrômetro de Massas
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
TGA	Análise Termogravimétrica
UFAM	Universidade Federal do Amazonas



## **LISTA DE SIMBOLOS**

$\alpha$  - Alfa

$\beta$  - Beta

$\gamma$  - Gama

$\theta$  - Teta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>1.1 Considerações gerais</b> .....	16
<b>1.2 Quitina e Quitosana</b> .....	19
1.2.1 Fonte de Quitina .....	19
1.2.2 Propriedades física e químicas da quitina e quitosana .....	21
1.2.3 Obtenção de quitina e quitosana.....	25
1.2.4 Aplicações de quitosana.....	28
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	32
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	33
<b>3.1. Reagentes</b> .....	33
<b>3.2. Equipamentos e materiais</b> .....	33
<b>3.3. Procedimentos</b> .....	34
3.3.1 Extração de quitina e conversão em quitosana .....	35
3.3.2 Pré-tratamento .....	35
3.3.3 Desmineralização do resíduo de caranguejo .....	35
3.3.4 Desproteínização do remanescente orgânico .....	36
3.3.5 Despigmentação da quitina .....	37
3.3.6 Desacetilação da quitina .....	37
<b>3.4 Análise estatística das amostras</b> .....	38
<b>3.5. Caracterização das amostras</b> .....	39
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	41

<b>4.1 Isolamento e caracterização da quitina</b> .....	41
4.1.1 Desmineralização do exoesqueleto de caranguejo .....	41
<b>4.2 Difração de Raios X do caranguejo desmineralizado</b> .....	45
<b>4.3 Análise Termogravimétrica do material desmineralizado</b> .....	47
<b>4.4 Desproteíntização do exoesqueleto de caranguejo</b> .....	49
<b>4.5 Difração de raios X do material desproteíntizado</b> .....	52
<b>4.6 Análise Termogravimétrica do material desproteíntizado</b> .....	54
<b>4.7 Despigmentação e obtenção de quitina</b> .....	56
<b>4.8 Padrões de Difrração de raios X da <math>\alpha</math>-quitina</b> .....	57
<b>4.9 Análise térmica da quitina</b> .....	59
<b>4.10 Desacetilação da quitina e obtenção da quitosana</b> .....	61
<b>4.11 Padrões de Difrração de raios X da quitosana</b> .....	65
<b>4.12 Análise térmica da quitosana</b> .....	67
<b>4.13 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho por transformada de Fourier</b>	68
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	73
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	75

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Considerações gerais

Nos últimos anos têm ocorrido grandes investimentos na produção pesqueira em todo mundo (FAO, 2014). Segundo a definição contida no Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) considera-se “pescado” todos os peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios, quelônios e mamíferos marinhos ou dulcícolas usados para a alimentação humana (LEI Nº 1.283, DE 18 DE DEZEMBRO DE 1.950). Conforme os dados coletados pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO, 2014), em 2012, a produção mundial aquícola atingiu cerca de 66,6 milhões de toneladas, sendo que desta produção, 6,4 milhões de toneladas são de crustáceos (9,7 % do total), e cerca de 2,53 toneladas (3,7 %) são atribuídas à produção de crustáceos de água doce.

O Brasil apresenta grande diversidade de crustáceos, entre elas o caranguejo *Dilocarcinus pagei* Stimpson, 1861. Essa espécie de crustáceo é muito comum na região amazônica, como também em demais estados do território nacional (MAGALHÃES, 2003; MAGALHÃES *et al.*, 2016). Conforme informações contidas na Lei Estadual nº 2.898, de 29 de outubro de 2004, essa espécie tem sido intensamente explorada como isca-viva na pesca esportiva principalmente nas regiões do estado do Mato Grosso do Sul (MATO GROSSO DO SUL, 2004).

Apesar da ampla disponibilidade desta espécie na região amazônica, o caranguejo *D. pagei* ainda não é explorado comercialmente em larga escala. No entanto, pode ser considerado uma importante fonte de renda alternativa no futuro, visto que tem sido reportado na literatura que a espécie tem potencial para ser explorado na indústria alimentícia (COSTA, 2015). Assim,

prevê-se a necessidade de realizar estudos que possam abordar tanto o potencial produtivo desta espécie quanto que possam contribuir para a sua preservação.

De modo geral, seja para uso comercial ou experimental, de fonte extrativista ou aquícola, todas as produções de pescados geram resíduos. Na maioria das vezes esses rejeitos são despejados de forma inadequada e por consequência, podem provocar problemas ambientais (HEU, 2003). Apesar dos inúmeros benefícios atrelados a estas atividades, há uma preocupação relacionada ao descarte adequado dos resíduos que são gerados. Nesse sentido, os resíduos (parte não comestível do animal, como o exoesqueleto) provenientes de crustáceos têm sido utilizados como matéria-prima para a produção de materiais com maior valor agregado (HAMED, OZOGUL e REGENSTEIN, 2016). Na literatura, existem trabalhos que descrevem o aproveitamento destes resíduos, tais como a elaboração de produtos flavorizantes (MATOS, 2005), pigmentos carotenóides (OGAWA *et al.*, 2007; CAHÚ *et al.*, 2012), quitina e consecutivamente a transformação da mesma em quitosana, por meio de reações químicas (RHAZI *et al.*, 2000; OLORUNSOLA, 2015).

Depois da celulose, que é produzida a partir da fotossíntese nas plantas, a quitina é o segundo biopolímero mais abundante encontrado na biomassa (YOUNES e RINAUDO, 2015; SHEN *et al.*, 2016). Após uma reação química realizada na cadeia da quitina por um processo chamado de desacetilação, produz-se a quitosana. Estes polissacarídeos têm sido produzidos por uma gama de animais marinhos, principalmente caranguejos e camarões oriundos da produção alimentícia, mas também podem ser encontrados em insetos, alguns fungos e algas (MATHUR e NARANG, 1990; KUMAR, 2000; RAABE *et al.*, 2007; PILLAI, PAUL e SHARMA, 2009; YOUNES *et al.*, 2012; KAYA *et al.*, 2015a).

Nos crustáceos, a quitina é associada aos demais constituintes do exoesqueleto como materiais inorgânicos, principalmente o carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) e materiais orgânicos não polimerizados como proteínas, lipídios e pigmentos (CANELLA, 2001; CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007), e convencionalmente o seu isolamento tem ocorrido por tratamentos químicos. Alguns autores reportam em seus trabalhos reações em condições diferentes para extração da quitina e produção da quitosana, mesmo em casos de mesma espécie (WESKA *et al.*, 2007; ABDU, NAGY e ELSABEE, 2008; YONES *et al.*, 2012). Isso sugere a necessidade de otimizar o processo de extração da quitina e consequente conversão em quitosana, pois suas propriedades, assim como o grau de pureza, definirão a sua aplicação.

Esses biopolímeros possuem propriedades e características peculiares o que os possibilita múltiplas aplicações (AKILA, 2014; ANITHA *et al.*, 2014; PUVVADA; VANKAYALAPATI; SUKHAVASI, 2012; TELI e SHEIKH, 2012; RINAUDO, 2006). Seja em sua forma natural ou manipulada, essas macromoléculas apresentam excelentes propriedades para aplicações diversas, como em filmes, emulsificantes, hidrogéis, carreadores de drogas e enzimas e suporte para imobilização de drogas (SENEL *et al.*, 2000; KHOR; LIM, 2003; PRASHANTH; THARANATHAN, 2007; ORREGO *et al.*, 2010).

Comercialmente, a produção de quitina e quitosana são oriundas da produção pesqueira de crustáceos marinhos (ROBERTS, 1992; ABRAM e HIGUERA, 2004; KHANAFARI, MARANDI e SANATEI, 2008) e os vários estudos voltados para extração e obtenção de quitina e quitosana são realizados majoritariamente com espécies marinhas. Assim, poucos trabalhos têm sido realizados com espécies de caranguejo de água doce (BOLAT *et al.*, 2010), principalmente da Região Amazônica.

O aproveitamento do exoesqueleto de crustáceos pode contribuir para redução dos resíduos gerados e agregar valor ao material descartado, gerando uma fonte de renda alternativa para as comunidades ribeirinhas da Região Amazônica que vivem do processamento e comercialização de crustáceos. Além do mais, servirão de referência para produção desses biopolímeros, que permitirão futuros estudos sobre as aplicações desses materiais em diferentes áreas da ciência.

## **1.2 Quitina e Quitosana**

### **1.2.1 Fonte de Quitina**

Na literatura, há relatos que o abundante biopolímero quitina tenha sido isolado pela primeira vez em 1811 por Henri Braconnot a partir das paredes celulares de fungos (ROBERTS, 1992; ABREU e CAMPANA-FILHO, 2005; PARK e KIM, 2010). O termo “quitina” tem origem grega e deriva da palavra *Quiton* que significa túnica ou cobertura. Neste sentido, a quitina funciona como revestimento protetor em animais invertebrados (ROBERTS, 1992).

Esse biopolímero tem importante função nos exoesqueletos e paredes celulares nos organismos nos quais são constituintes (AUSTIN *et al.*, 1981; JEUNIAUX, 1982;), sendo comumente encontrada no exoesqueleto de artrópodes, como crustáceos, insetos e aracnídeos (ABDOU, NAGY e ELSABEE, 2008; YOUNES *et al.*, 2012; KAYA *et al.*, 2013; KAYA *et al.*, 2014a; KAYA *et al.*, 2015a; KAYA *et al.*, 2015b; KAYA *et al.*, 2015c; KAYA *et al.*, 2016a; (KAYA *et al.*, 2014b), conchas de moluscos como a de lula (ABDOU, NAGY e ELSABEE, 2008) mas também pode ser encontrada em outros organismos vivos, como fungos (SU *et al.*, 1997; IFUKU *et al.*, 2011) e alguns tipos de algas (WU *et al.*, 2005; CAMPANA-FILHO *et al.*,

2007). Diferentes organismos podem apresentar diferentes quantidades de quitina e isso pode estar relacionado com a própria constituição biológica dos organismos, assim como, o habitat e sazonalidade dos ecossistemas dos quais ocorrem (ASSIS e BRITO, 2008) como observado na Tabela 1.

Tabela 1 - Principais fontes de quitina.

Organismos	Quitina no exoesqueleto %	
Crustáceos	Caranguejo	14,00
	Lagosta	69,80
	Camarão	25,30
	( <i>Macrobrachium rosenbergi</i> )	
Insetos	Borboleta	64,00
	Mosca	54,80
Fungos	<i>Mucos rouxil</i>	44,50
	<i>Aspergillus niger</i>	42,00

Adaptado de CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007.

Como mencionado anteriormente, os crustáceos são as principais fontes de quitina e quitosana. Para o caranguejo *D. pagei* apesar de sua abundância, ainda não há relatos de estudo dessa espécie como fonte de quitina para a produção de quitosana. A Figura 1 mostra a representação morfológica do exoesqueleto do caranguejo *D. pagei*, o qual foi fonte de matéria-prima neste estudo.





Figura 1 - Imagem representativa da morfologia externa do caranguejo de água doce *Dilocarcinus pagei*.

Fonte: Pedreno, 2015.

### 1.2.2 Propriedades física e químicas da quitina e quitosana

A quitina  $[(C_8H_{13}O_5N)_n]$  é um polissacarídeo de cadeia linear formado por unidades de N-acetil-2-dioxi-D-glicopirranose, que são interligadas por ligações glicosídicas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), (ARANAZ *et al.*, 2009; PARK *et al.*, 2010) definindo-se assim os terminais redutor e não-redutor das cadeias poliméricas, os quais correspondem às extremidades que contêm grupo hidroxila livre ligado ao carbono 1 e carbono 4 do anel glicopiranosídico (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007; ABDOL; NAGY; ELSABEE, 2008; ARANAZ *et al.*, 2009).

A quitina é um polímero natural e após seu isolamento se apresenta na forma de pó castanho claro de estrutura semicristalina ou amorfa, que é altamente insolúvel em água e em solventes orgânicos e que em termos de solubilidade e reatividade química se assemelha à celulose (ELIEH-ALI-KOMI e HAMBLIN, 2016). Entretanto, este biopolímero pode apresentar solubilidade na presença de hexafluoracetona, hexafluorisopropano, cloroálcoois, adicionados a

soluções aquosas de ácidos minerais e dimetilacetamida contendo 5 % de cloreto de lítio (KUMAR, 2000).

Sabe-se que a quitina, dependendo da fonte e da função que desempenha, forma arranjos microfibrilares em organismos vivos (CARLSTROM, 1957). Esta pode apresentar três formas polimórficas, a  $\alpha$ -quitina (cadeia anti-paralela),  $\beta$ -quitina (cadeia paralela) e  $\gamma$ -quitina, sendo que nesta última ocorre a combinação das cadeias anti-paralelas e paralelas (ABRAM, HIGUERA, 2004; YOUNES; RINAUDO, 2015), conforme ilustrado na Figura 2.

A forma mais abundante encontrada na natureza é a  $\alpha$ -quitina (MUZZARELLI, 1977) e pode ser encontrada em estruturas rígidas e resistentes, como exoesqueleto ou cutícula de artrópodes, sendo geralmente associada principalmente a materiais inorgânicos ou proteínas, isoladamente ou com ambos. A disposição cadeia anti-paralela da  $\alpha$ -quitina favorece a formação de numerosas ligações hidrogênio inter e intramoleculares, resultando em um empacotamento denso. Além disso, os grupos hidroxilas auxiliam no estabelecimento de ligações hidrogênio e as formas entre cadeias de diferentes lâminas tornam a  $\alpha$ -quitina insolúvel na maioria dos solventes (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007).

Os polimorfos  $\beta$ -quitina e  $\gamma$ -quitina podem ser encontradas em estruturas mais flexíveis e com menor rigidez, como na lula e fungos (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007; ELIEH-ALIKOMI e HAMBLIN, 2016). Em lulas do gênero *Loligo*, a  $\alpha$ -quitina constitui uma fina camada que reveste as paredes do esôfago e do estômago, a  $\beta$ -quitina ocorre na concha, e a  $\gamma$ -quitina integra uma espessa cutícula que recobre outras zonas do estômago (ABRAM; HIGUERA, 2004).

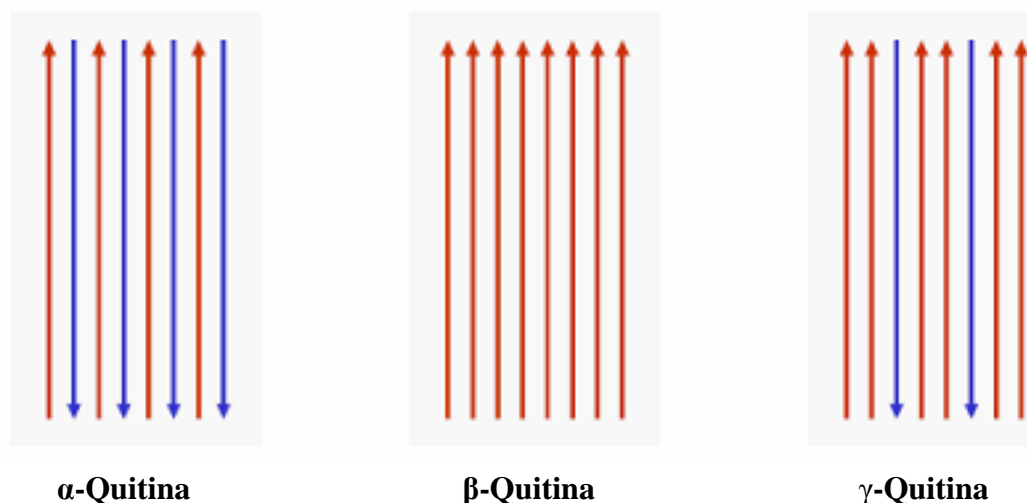
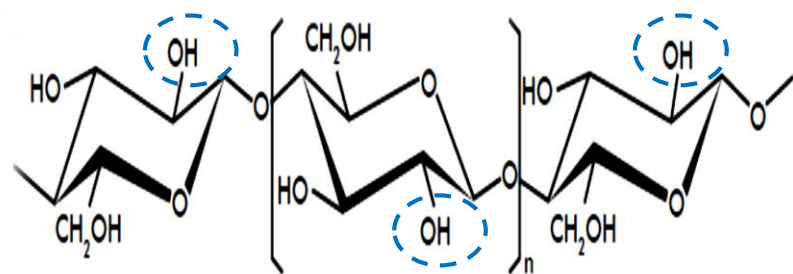


Figura 2 - Disposição cristalina das cadeias poliméricas de quitina.

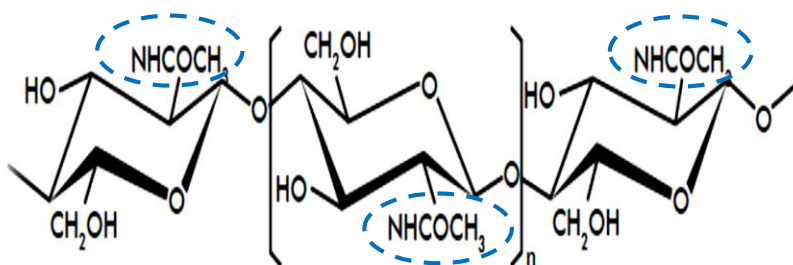
Fonte: Antonino, 2007.

Os biopolímeros quitina e quitosana são estruturalmente semelhantes à celulose, diferenciando-se apenas pela substituição dos grupos na posição do carbono 2 do anel glicopiranosídico. Enquanto na celulose ocorre a presença de um grupo hidroxila (OH), na quitina há a substituição pelo grupo acetamida (NHCOCH<sub>3</sub>) e na quitosana há presença do grupo amina (NH<sub>2</sub>), como mostra a Figura 3.

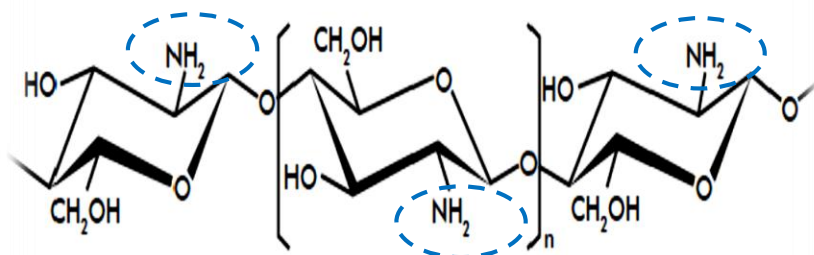
A quitosana é um polissacarídeo de cadeia linear de  $\beta$  (1→4)-2-amino-2-desoxi-glicopiranosose e  $\beta$  (1→4)-2-acetamino-2-desoxi-glicopiranosose. Este pode ser obtido pela desacetilação de sua precursora, a quitina (CLARK; SMITH, 1936; RINAUDO, 2006; ISLAM *et al.*, 2011; MOHAMMED; WILLIAMS; TVEREZOVSAYA, 2013), e sua unidade monomérica completamente desacetilada pode ser descrita como [C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>5</sub>]<sub>n</sub>. Esta é raramente solúvel em água, mas torna-se solúvel na presença de soluções de ácidos orgânicos como ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH) e ácido fórmico (HCOOH) (BOLAT *et al.*, 2010).



Celulose



Quitina



Quitosana

Celulose: R= OH
Quitina: R= NHCOCH <sub>3</sub>
Quitosana: R= NH <sub>2</sub>

Figura 3 - Comparação entre as estruturas macromoleculares da celulose, quitina e quitosana.

Fonte: Ramírez *et al.*, 2010.

### 1.2.3 Obtenção de quitina e quitosana

A quitina e quitosana geralmente podem ser obtidas pelo método químico ou métodos biológicos, tais como a fermentação microbiana e reações enzimáticas (ZHANG *et al.*, 1999, RINAUDO, 2006; YOUNES *et al.*, 2012; ARBIA *et al.*, 2013). No entanto, a nível comercial, este último não tem sido utilizado em larga escala, uma vez que não é considerado um método economicamente viável (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007).

Nos últimos anos, os métodos de extração de quitina do exoesqueleto de crustáceos têm chamando bastante atenção de pesquisadores (ABDOU; NAGY; ELSABEE, 2008; YEN; YANG; MAU, 2009; AL SAGHEER *et al.*, 2009; BENHABILES *et al.*, 2012; KAYA *et al.*, 2013; HAJJI *et al.*, 2014) e várias condições têm sido aplicada no processo de isolamento da quitina. No entanto, ainda não há um processo único padronizado, isso pode ser atribuído à constituição biológica dos diferentes organismos utilizados, assim como as diferentes etapas utilizadas no processo de extração da quitina.

Geralmente, em escala comercial, os procedimentos para o isolamento de quitina do exoesqueleto de crustáceos envolvem tratamentos com ácido e base para o processo de desmineralização e desproteínização (ROBERTS, 1992; PERCOT; VITON; DOMARD, 2003; ABDOU; NAGY; ELSABEE, 2008), assim como na sua desacetilação (YEN; YANG; MAU, 2009). A desacetilação da quitina é realizada para produzir seu principal derivado, a quitosana (ROBERTS, 1992; CHIAPPISI; GRADZIELSKI, 2015).

No método químico, a quitina, na maioria das vezes, é desacetilada com solução aquosa concentrada de NaOH aquecida, conseqüentemente produzindo quitosana e tais concentrações geralmente variam em torno de 10,0 mol L<sup>-1</sup> a 12,5 mol L<sup>-1</sup> de NaOH (CANELLA; GARCIA,

2001; GALED *et al.*, 2005; YEN; YANG; MAU, 2009; PUVVADA; VANKAYALAPATI; SUKHAVASI, 2012). A existência dos grupos acetila e extensa cristalização tornam a quitina insolúvel em água e outros solventes orgânicos. No entanto, durante o curso de desacetilação da quitina, em partes do polímero, as ligações N-acetila são quebradas durante o contato com solução alcalina, ocorrendo a formação de unidades de D-glucosamina que contêm aminas livres na cadeia da quitosana.

De fato, a quantidade e distribuição aleatória dos grupos acetamida na estrutura molecular da quitosana afetam as interações intra e intermolecular, uma vez que estes grupos favorecem o estabelecimento das ligações de hidrogênio e apresentam caráter hidrofóbico através de grupos metílicos. Os grupos amino determinam as interações eletroestáticas em meio ácido através dos sítios amino protonados e as ligações de hidrogênio, assumindo uma natureza hidrofílica (ALVES, 2013). O aumento das ligações de hidrogênio intra e intermolecular e das interações hidrofóbicas promovem a formação de agregados em solução aquosa, o que favorece o aumento da solubilidade da quitosana em condições ácidas (RINAUDO, 2006; CHEN *et al.*, 2011; PHILIPPOVA *et al.*, 2012).

Apesar da hidrólise alcalina dos grupos acetoamida constituídos na cadeia molecular da quitina, que leva a obtenção de quitosana, seja uma reação consideravelmente simples, esta não ocorre de maneira homogênea e completa ao longo de toda a cadeia, (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007). Na Figura 4 é mostrado o mecanismo reacional de conversão da quitina em quitosana através da reação da molécula de quitina com o hidróxido de sódio (NaOH). A finalidade da desacetilação alcalina é romper as ligações de N-acetil do biopolímero, permitindo a formação das unidades de D-glicosamina que contém os grupos amínicos livres, principal fator das múltiplas aplicações tecnológicas (LERTSUTTHIWONG *et al.*, 2002). Portanto, esse processo se

trata de uma hidrólise de amida, no qual o ânion hidróxido ( $\text{OH}^-$ ) da base ataca o carbono da acila da ligação amida (a). Como a reação ocorre em meio aquoso, o intermediário de reação é destruído através do reestabelecimento da dupla ligação  $\text{C}=\text{O}$ , promovendo a cisão da ligação entre carbono e nitrogênio e a formação de uma ligação covalente coordenada entre o átomo de nitrogênio terminal da cadeia e um átomo de hidrogênio da água (b). Com isso, forma-se ao final da reação a estrutura da quitosana, hidróxido de sódio e ácido acético (c) (SOLOMONS; FRYHLE, 2006).

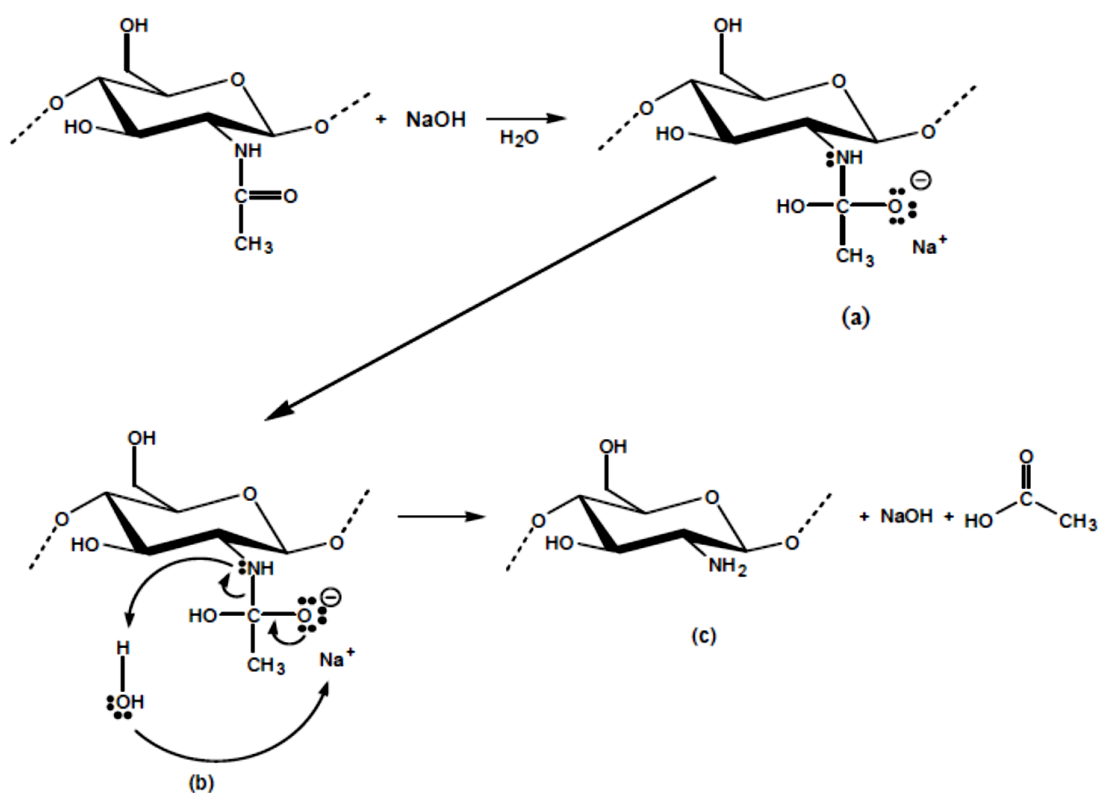


Figura 4 - Mecanismo reacional para a produção de quitosana a partir de quitina por via alcalina.

Fonte: HENNIG, 2009.

O grau de desacetilação (GD) é uma das características mais importantes da quitosana e pode variar entre 40 % e 95 %, dependendo do método aplicado (YEN; YANG; MAU, 2009).

Entretanto, condições de desacetilação mais fortes podem influenciar na massa molecular e na viscosidade do produto final da quitosana (VARUM; OTTOY; SMIDIROD, 2001).

Nesse sentido, têm sido abordado por diversos autores (TOLAIMATE *et al.*, 2000; RHAZI *et al.*, 2000; PAWADEE *et al.*, 2003; TOLAIMATE *et al.*, 2003; PERCOT, VITON; DOMARD, 2003; CHANDUMPAIA *et al.*, 2004; GALED *et al.*, 2005) as barreiras enfrentadas nos métodos de extração de quitina e produção de quitosana, uma vez que, a funcionalidade e as propriedades físicas e químicas da quitosana dependem de condições importantes como o grau de polimerização, o grau de desacetilação e a massa molecular. Tais condições podem ser influenciadas pelas fontes utilizadas, assim como pelas condições do processo de extração (RABEA *et al.*, 2003; GALED *et al.*, 2005).

#### **1.2.4 Aplicações de quitosana**

A quitina e seu derivado, a quitosana, são polímeros naturais que vêm despertando grande interesse científico e econômico, principalmente pelo potencial de aplicação em diferentes áreas da ciência (ANITHA *et al.*, 2014; PUVVADA; VANKAYALAPATI; SUKHAVASI, 2012; RINAUDO, 2006). O interesse pela produção da quitosana tem aumentado, uma vez que, a mesma é um biopolímero biodegradável, biocompatível, com baixa toxicidade, o que facilita sua utilização (YUAN *et al.*, 2011; TENG, 2011; ANAYA *et al.*, 2013).

Algumas das aplicações estão, por exemplo, na indústria de alimentos, na medicina, na indústria farmacêutica, no desenvolvimento de cosméticos, agricultura (MUZZARELLI *et al.*, 2012) e biomateriais (RINAUDO, 2008; FOSTER *et al.*, 2015). Os biomateriais produzidos à base de quitosana têm sido utilizados como géis, filmes, agente cicatrizante, agente



antimicrobiano, material de bandagem, molde para enxerto de pele, material para lentes de contato, cápsulas, micro-cápsulas ou soluções (SENEL *et al.*, 2000; SPIN-NETO; PAVONE; FREITAS, 2008).

A quitosana apresenta ampla utilização na indústria farmacêutica, como excipiente em formulações de fármacos, para liberação controlada de medicamentos, tem ampla aplicação como um agente de entrega de drogas (HU; SUN; WU, 2013). Uma elevada variedade de propriedades é obtida quando a quitosana é misturada com compostos anfífilos (CHIAPPISI; GRADZIELSKI, 2015). Pode-se ainda enumerar outras aplicações na área farmacêutica como, aglutinante na granulação úmida, diluente na compressão direta de comprimidos, liberação modificada de fármacos a partir de comprimidos e grânulos, carreador de fármacos em sistemas microparticulados, filmes para liberação controlada de fármacos, preparação de hidrogéis, agentes para o aumento da viscosidade de soluções, agente umectante e melhoramento de dissolução de medicamentos, polímero bioaderente, intensificador de absorção (por via nasal ou oral), polímero biodegradável (implantes, micropartículas) e terapia gênica (YOGESHKUMAR; ATUL; ADHIKRAO, 2013).

Na indústria de alimentos, a quitosana apresenta ampla variedade de aplicações, tais como formação de filmes biodegradáveis, purificação de água, recuperação de subprodutos, clarificação de sucos, emulsificante de aromas, agente antioxidante, e estabilizante (BORGOGNONI; POLAKIEWICZ; PITOMBO, 2006). Apesar de ainda controverso, têm sido relatado na literatura, que a quitosana possui propriedades capazes de inibir a absorção de gordura pelo organismo, sendo considerada uma fibra com efeito dietético, além de contribuir a redução da pressão arterial associada à redução de peso (ZAHORSKA-MARKIEWICZ *et al.*, 2002; TRIVEDI *et al.*, 2016).

Na agricultura, a quitosana tem sido aplicada como modelador do tempo de liberação de fertilizantes ou nutrientes no solo, revestimentos de sementes para controlar as pragas e melhorar as defesas biológicas das plantas contra atividades microbiana e fúngica (ZENG; MEI; WU, 2010). Mahdavi e Rahimi (2013) obtiveram resultados positivos quando testaram o efeito da quitosana na germinação e crescimento de ajowan (*Trachyspermum ammi*). Em outro estudo Zeng, Luo e Tu (2012) observaram benefícios significantes no crescimento e germinação na produção de soja quando esta foi revestida com quitosana.

Segundo Ilnicka, Walczyk e Lukaszewicz (2015) a quitosana também possui excelentes propriedades antifúngicas e antibacterianas. As características antimicrobianas da quitosana, entre outras, a distingue de outros polissacarídeos. A inibição de microrganismos, tais como, *Escherichia coli*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Helminthosporium* (*Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* (KUMAR, 2000), mostrou ser efetiva em testes laboratoriais. Dessa forma, tem sido relatado por alguns pesquisadores que a atividade antimicrobiana da quitosana ocorre através de seus grupos amínicos, que em contato com os fluidos fisiológicos se tornam protonados e se ligam a grupos aniônicos destes microrganismos, provocando aglutinação das células microbianas e, como consequência, provocam a inibição do seu crescimento (KUMAR, 2000; OKAMOTO *et al.*, 2003). Mohanasrinivasan, Mishra e Paliwal (2013) reportam que a quitosana tem potencial para ser usado como um agente antibacteriano para controlar doenças de plantas. Na Tabela 2 estão citadas outras aplicações e potenciais usos da quitina e seu derivado.

Tabela 2 - Áreas de aplicação e potenciais usos da quitina e seu derivado.

<b>Áreas</b>	<b>Exemplos de aplicações</b>
Biomédica	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fabricação de andaimos para regeneração de tecidos;</li> <li>- Desenvolvimento de pontos cirúrgicos.</li> </ul>
Produtos farmacêuticos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Suportes para ingredientes farmacêuticos;</li> <li>- Vectores não-virais para entrega de genes;</li> <li>- Gene e constituintes ativos;</li> <li>- Encapsulamento e proteção;</li> <li>- Liberação gradual de medicamentos;</li> <li>- Melhorar a chegada de ácidos nucleicos aos alvos terapêuticos.</li> </ul>
Cosméticos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Transportadores ativos de produtos cosméticos;</li> <li>- Produtos para pele, cabelo e cuidados bucais;</li> <li>- Hidratante e agente anti-envelhecimento.</li> </ul>
Têxteis	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fibras antimicrobianas e não alergênicas;</li> <li>- Agentes coagulantes e floculantes para a remoção de corantes e produtos químicos de águas residuais têxteis.</li> </ul>
Papel	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Resistência ao papel contra a umidade;</li> <li>- Embalagens biodegradáveis para alimentos, invólucro.</li> </ul>
Alimentos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Barreira protetora contra a deterioração dos alimentos;</li> <li>- Embalagens de biodegradável para embalar alimentos;</li> <li>- Compostos estabilizadores e espessantes;</li> <li>- Prebióticos (fibras dietéticas) ingredientes.</li> </ul>

Adaptado de HAMED; OZOGUL; REGENSTEIN, 2016.

## 2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem por finalidade a caracterização da quitina extraída dos resíduos do caranguejo *Dilocarcinus pagei* capturado na região do Médio Amazonas e a quitosana obtida a partir da quitina através de técnicas físicas e químicas.

Nessa dissertação foram realizados os objetivos específicos:

- Determinação dos percentual de perdas de materiais inorgânico e orgânico oriundos dos resíduos do caranguejo *Dilocarcinus pagei* nas etapas de desmineralização, desproteinização e despigmentação;
- Caracterização dos produtos das etapas de desmineralização, desproteinização e despigmentação pelas técnicas de difração de raios X e análise termogravimétrica;
- Investigação do efeito da reação de desacetilação da quitina sob diferentes tempos de reação para a produção da quitosana;
- Caracterização da quitosana obtida por difração de raios X, análise termogravimétrica, espectroscopia vibracional na região do infravermelho por Transformada de Fourier.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Reagentes

Os reagentes utilizados no desenvolvimento do trabalho se encontram na Tabela 3.

Tabela 3 - Reagentes utilizados na extração de quitina e produção de quitosana.

Reagente	Formula química	Procedência
Ácido clorídrico (solução 37% m/v)	HCl	Cinética
Hidróxido de sódio P. A.	NaOH	Cinética
Hipoclorito de sódio (solução comercial)	NaClO	Raimundo da Fonte S. A.
Nitrato de prata P. A. - ACS	AgNO <sub>3</sub>	Labimpex

#### 3.2. Equipamentos e materiais

Tabela 4 – Equipamentos e materiais utilizados na extração de quitina e produção de quitosana.

Equipamentos	Materiais
- Agitador Mecânico S P Labor, modelo RH B 1	- Erlenmeyers de 250, 500 e 1000 mL
- pHMetro Bante instrument, PHS-3BW	- Pipetas volumétricas de 2, 10 e 25 mL
- Bomba a vácuo Primatec, modelo 121	- Funil de bulchner
- Balança analítica Shimadzu, modelo AUY 220	- Filtros de papel
- Liquidificador doméstico Arno, modelo LN 27-110V	- Placas de Petri
- Peneira granulométrica com malha 125 µm	- Suporte e garra de argola
	- Béqueres de 100, 1000 e 8000 mL
	- Provetas de 100 e 500 mL
	- Tubos de ensaio com rosca
	- Dessecador
	- Cronômetro

### 3.3. Procedimentos

Os resíduos de caranguejo utilizados no presente estudo foram obtidos do laboratório de Zoologia do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia (ICET) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

O processo de extração de quitina seguiu as etapas de pré-tratamento, desmineralização, desproteinização, despigmentação e secagem. Após processo anteriormente mencionado, a quitina obtida foi exposta ao processo de desacetilação, originando a quitosana. A Figura 5 sumariza todas as etapas realizadas até a produção da quitosana.

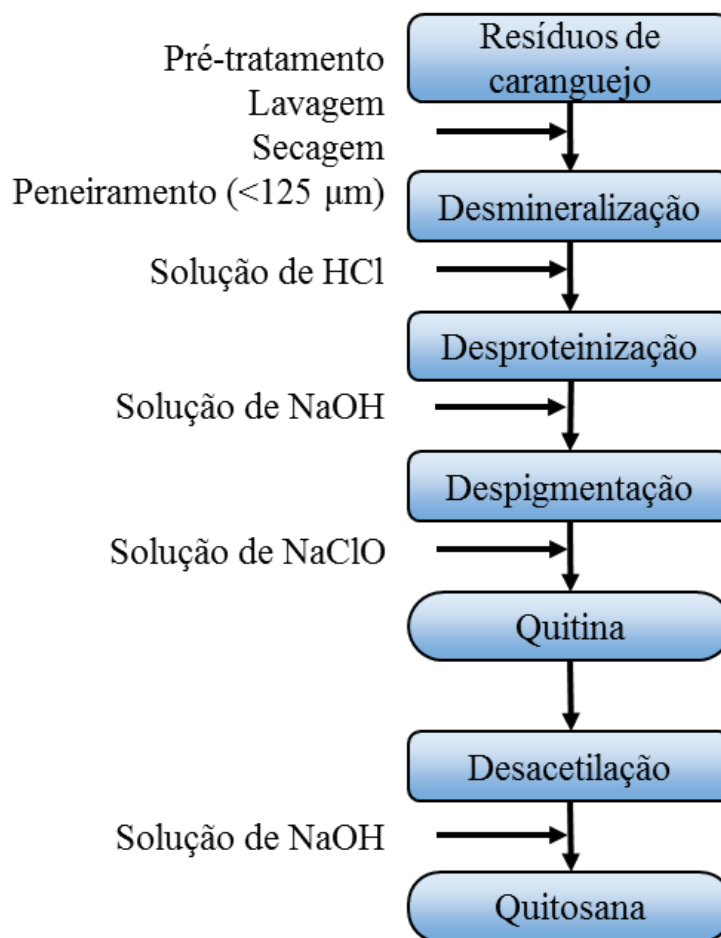


Figura 5 – Fluxograma do processo de obtenção da quitina e quitosana.

### **3.3.1 Extração de quitina e conversão em quitosana**

Os métodos utilizados para o processo de extração de quitina e quitosana foram adaptados dos métodos desenvolvidos por Percot, Viton e Domard (2003), Antonino (2007) e Yen, Yang e Mau (2009).

O isolamento da quitina do exoesqueleto do caranguejo foi iniciado com a preparação das amostras seguido das etapas de desmineralização, desproteíntização e despigmentação. Os tratamentos de otimização dos processos de desmineralização e desproteíntização foram realizadas com as amostras expostas em condições e tempos distintos.

### **3.3.2 Pré-tratamento**

No laboratório, os resíduos foram manualmente lavados e processados. Uma quantidade de 700 g de resíduos de caranguejo foi seca em estufa a temperatura de 70 °C por um período de 5 horas. O material seco foi mecanicamente moído em liquidificador doméstico e peneirado em peneira com malha de abertura de 125 µm (120 mesh) para obtenção de um sólido com granulometria uniforme.

### **3.3.3 Desmineralização do resíduo de caranguejo**

Esta etapa foi realizada com três amostras (a, b e c). Inicialmente, os experimentos foram realizados empregando soluções de concentração 0,25 mol L<sup>-1</sup>, 0,50 mol L<sup>-1</sup> e 0,75 mol L<sup>-1</sup> de HCl, sendo que as duas primeiras foram realizados em 30 minutos, enquanto que o experimento realizado empregando solução de concentração 0,75 mol L<sup>-1</sup> de HCl foi realizado

em 60 minutos. Em todos os casos, empregou-se a proporção 1:40 (massa/volume), sob agitação mecânica constante, a temperatura ambiente.

Após o processo de exposição em solução ácida, a mistura foi filtrada a vácuo e o sólido remanescente foi lavado com água destilada até a neutralidade da água de lavagem ( $\text{pH} = 7$ ). Em seguida, o material foi seco em estufa a temperatura de  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 horas. O material resultante foi obtido sob a forma de um pó com aparência de cor castanho escuro. A amostra obtida utilizando solução de  $\text{HCl}$   $0,25\text{ mol L}^{-1}$  e tempo de reação de 30 minutos foi denominada de 1a, enquanto a amostra obtida utilizando solução de  $\text{HCl}$   $0,50\text{ mol L}^{-1}$  e tempo de reação de 30 minutos foi denominada de 1b. Por último, a amostra obtida utilizando solução de  $\text{HCl}$   $0,75\text{ mol L}^{-1}$  e tempo de reação de 60 minutos foi denominada de 1c.

### **3.3.4 Desproteíntização do remanescente orgânico**

Após a obtenção do material desmineralizado nas condições otimizadas da etapa anterior, o material desmineralizado foi adicionado à solução de  $\text{NaOH}$   $1,0\text{ mol L}^{-1}$ . Os experimentos foram realizados em triplicatas na proporção 1:30 (massa/volume), empregando 10 g de material desmineralizado em tempos de 8, 12 e 24 horas, utilizando agitação mecânica contínua e temperatura constante de  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, a mistura foi filtrada a vácuo e o sólido obtido foi lavado com água destilada até a neutralidade da água de lavagem. Em seguida, o material foi seco em estufa a temperatura de  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 horas. A amostra obtida utilizando o tempo de reação de 8 horas foi denominada de 2a, enquanto a amostra obtida no tempo de reação de 12 horas foi denominada de 2b. Por último, a amostra obtida no tempo de reação de 24 horas foi denominada de 2c.



### **3.3.5 Despigmentação da quitina**

O material desproteínizado obtido previamente foi adicionado à solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a  $0,14 \text{ mol L}^{-1}$  na proporção 1:25 (massa/volume) e utilizando 5 g de material sólido. A mistura foi mantida a temperatura de  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  e sob agitação mecânica constante por 8 horas. Posteriormente, a mistura foi filtrada a vácuo e o sólido obtido foi lavado com água destilada até a neutralidade e até o ponto que não se detectava mais a presença de ânions cloreto na água de lavagem após mistura com solução diluída de nitrato de prata. Em seguida, o sólido obtido foi seco em estufa a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  por 12 horas.

### **3.3.6 Desacetilação da quitina**

O processo de desacetilação da quitina foi baseado no método utilizado por Yen, Yang e Mau (2009), empregando a proporção de 1:40 (m/v) de quitina despigmentada de caranguejo para a solução de NaOH a  $10,0 \text{ mol L}^{-1}$  em temperatura de  $105 \text{ }^\circ\text{C}$ , sob agitação mecânica constante e por diferentes tempos de reação: 60, 90 e 120 minutos. Após o término das reações, as quitosanas obtidas foram filtradas a vácuo e passaram por repetidas lavagens com água destilada até a atingir a neutralidade da água de lavagem, ( $\text{pH} = 7$ ). Finalizou-se o processo com a secagem do material em estufa a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  por 6 horas. A quitosana obtida no tempo de reação de 60 minutos foi denominada de Q60, enquanto a quitosana obtida no tempo de reação de 90 minutos foi denominada de Q90. Já a amostra obtida no tempo de reação de 120 minutos foi denominada de Q120.

### 3.4 Análise estatística das amostras

O rendimento global e das etapas individuais do processo de obtenção da quitina a partir do resíduo de caranguejo foi calculado levando-se em conta a massa inicial da matéria-prima processada e a quantidade da quitina obtida. Cada uma das etapas da obtenção da quitina foi realizada em triplicata e empregou-se 50,0 g de resíduo no processo de desmineralização, 15,0 g de material desmineralizado no processo de desproteínização e 5,0 g de material desproteínizado no processo de despigmentação para finalmente obter um valor médio de rendimento dos materiais produzidos por triplicata.

O rendimento da quitosana foi determinado a partir da determinação da massa final obtida empregando-se 1,0 g de quitina despigmentada para cada um dos três diferentes tempos de reação de desacetilação, realizando cada experimento em triplicata.

Para os rendimentos em cada procedimento foi aplicado a equação 1:

$$R = (PF/PI) * 100 \quad (1)$$

Sendo:

R = rendimento (%)

PF = peso final do material processado (g)

PI = peso inicial da amostra (g)

Os dados foram analisados com um programa de análise estatístico BioEstat (versão 5.0). Para o rendimento das amostras de quitosana, os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) de uma via, com nível de significância  $\alpha < 0,05$ , considerando os 3 tempos de reação distintos.

### 3.5. Caracterização das amostras

Os materiais produzidos foram caracterizados pelas técnicas de difração de raios X (XRD) e análise termogravimétrica acoplada a um espectrômetro de massas (TGA/MS). Para as amostras de quitina e quitosana, foi empregada adicionalmente a análise de espectroscopia vibracional na região do infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). Essas análises foram realizadas no Laboratório de Sólidos Lamelares do Instituto de Química Universidade de São Paulo.

Os materiais obtidos foram analisados pela técnica de difração de raios X em um difratômetro Rigaku modelo Miniflex (raios X gerados por um anodo de Cu ( $K_{\alpha}$ ) utilizando 30 kV de tensão, 15 mA de corrente, fendas variáveis e filtro de Ni). O passo utilizado foi de  $0,03^{\circ} s^{-1}$  e o intervalo analisado ( $2\theta$ ) foi de  $1,5$  a  $70^{\circ}$ . As amostras obtidas na forma de pó foram colocadas em um porta-amostra de vidro para o registro de seus difratogramas.

As curvas TGA e as a análise dos gases liberados por espectrometria de massa (TGA-MS) foram registrados em um equipamento TGA-DSC Netzsch modelo STA 409 PC *Luxx* acoplado a um espectrômetro de massa modelo QMS 403 C *Aeolos* empregando cadinho de alumina, fluxo de ar sintético ( $50 mL \cdot min^{-1}$ ) e intervalo de análise de  $30$  a  $1000^{\circ}C$ , com uma taxa de aquecimento de  $10^{\circ}C \cdot min^{-1}$  e utilizando uma massa de  $15$  mg por amostra.

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram registrados em um espectrofotômetro Bomem-Michelson FT-IR, modelo MB-102, na região de  $400$  a  $4000 \text{ cm}^{-1}$ , com acumulação de 64 espectros. Os espectros de foram obtidos usando pastilhas preparadas a partir de amostras de quitina e quitosana secas em estufas por 12 horas à temperatura de  $40^{\circ}C$ . Cerca de  $2,0$  mg de amostra foram misturadas a  $98$  mg de KBr previamente seco em estufa, e a

mistura homogeneizada em almofariz de ágata. A mistura foi prensada em prensa hidráulica para formar uma pastilha de aproximadamente 0,20 mm de espessura, em seguida foi analisada. Este procedimento envolve o uso da banda de amida I, a  $1655\text{ cm}^{-1}$ , e da banda de hidroxila em  $3450\text{ cm}^{-1}$ . O cálculo do grau de desacetilação (GD) foi determinado através da equação 2 (CANELLA; GARCIA, 2001).

$$GD = (A1655 / A3450).100/1,33 \quad (2)$$

Sendo:

$A1655$  = Absorbância em  $1655\text{ cm}^{-1}$

$A3450$  = Absorbância em  $3450\text{ cm}^{-1}$

1,33 = constante que representa a razão  $A1655/A3450$  para amostras de quitina completamente N-acetiladas.

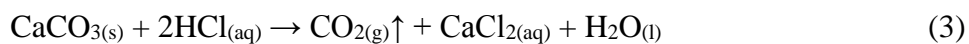
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Isolamento e caracterização da quitina

Inicialmente, foram investigados os efeitos do tempo de reação e da concentração da solução de HCl na etapa de desmineralização nos resíduos do caranguejo para remoção do conteúdo inorgânico presente e da solução de NaOH na etapa de desproteínização do remanescente desmineralizado para remoção do conteúdo orgânico não-polimérico. A parametrização adequada de cada uma dessas etapas é fundamental no estabelecimento de metodologias que empregam de modo mais eficiente possível as variáveis tempo e reagentes. Serão apresentados a seguir e discutidos os resultados das caracterizações do processo de isolamento de quitina e quitosana.

#### 4.1.1 Desmineralização do exoesqueleto de caranguejo

Na literatura, tem sido reportado que a remoção de minerais deve ser a primeira etapa do processo de isolamento da quitina, pois depende da espécie, geralmente é a fração que possui maior quantidade no exoesqueleto de crustáceos. Além disso, o conteúdo proteico ainda aderido à cadeia polimérica promove a proteção do biopolímero impedindo sua hidrólise e despolimerização (LERTSUTTHIWONG *et al.*, 2002; AZEVEDO *et al.*, 2007). Quimicamente, o processo desmineralização ocorre quando o ácido entra em contato com o carbonato de cálcio (PERCOT; VITON; DOMARD, 2003), como pode ser observado na equação 3.



O processo de remoção de materiais inorgânicos foi realizado utilizando amostras em diferentes condições de reação, como concentração da solução de HCl e o tempo de reação e os resultados estão mostrados na Tabela 5. A amostra 1a teve uma redução de 63,0 % em comparação à massa inicial, enquanto que tanto as amostras 1b e 1c tiveram uma redução próxima de 71,3 e 71,4 % em comparação à massa inicial, respectivamente. Observa-se que, o percentual de rendimento (sólido remanescente) diminuiu com o aumento da concentração de ácido clorídrico. Com isso, pode-se afirmar que para a primeira amostra (1a), a quantidade de ácido em solução não foi suficiente para a remoção de todo o conteúdo inorgânico, principalmente carbonato de cálcio, o qual é encontrado em maior quantidade no exoesqueleto de caranguejos (TOLAIMATE *et al.*, 2003).

Tabela 5 – Condições de reação no processo de otimização da desmineralização do exoesqueleto do caranguejo *D. pagei*.

Massa do exoesqueleto (g)	[HCl] (mol L <sup>-1</sup> )	Tempo de reação (min)	Massa de sólido (g)	Rendimento médio (g)	Denominação das amostras
10,0	0,25	30	3,678	3,670 ± 0,006	1a
			3,660		
			3,672		
10,0	0,50	30	2,861	2,863 ± 0,001	1b
			2,863		
			2,866		
10,0	0,75	60	2,849	2,856 ± 0,004	1c
			2,860		
			2,858		

Ambas as amostras 1b e 1c apresentam uma redução de massa maior que a amostra 1a, indicando que as condições empregadas para a obtenção da primeira amostra não foram

suficientes para a remoção de todo conteúdo inorgânico. Porém, torna-se importante realizar esta etapa de maneira cautelosa, uma vez que, condições mais drásticas de processamento podem afetar a estrutura molecular do produto final obtido, sendo preferido o uso de condições mais brandas (TOLAIMATE *et al.*, 2003). Uma vez que não foram encontrados valores significativamente diferentes entre as massas obtidas nas amostras 1b e 1c, optou-se por utilizar a condição experimental empregada para a amostra 1b, de 0,50 mol L<sup>-1</sup> de HCl e o tempo de 30 minutos para a sequência do estudo. Contudo, é importante frisar que os resultados obtidos nos experimentos desta primeira etapa não comprovam a retirada de todo o conteúdo inorgânico do material desmineralizado.

Segundo Tolaimate *et al.* (2003) o processo de desmineralização é relativo e varia com o grau de mineralização, tempo de extração, temperatura, tamanho da partícula, concentração do ácido e proporção empregada entre o sólido e a solução ácida (m/v), sendo que este último depende da concentração de ácido. Para que se tenha eliminação completa da carga mineral presente no exoesqueleto, a quantidade de ácido adicionada deve ser igual à quantidade de minerais ou ainda superior (SHAHIDI; SYNOWIECKI, 1991). Neste trabalho, definiu-se como condição de desmineralização eficiente àquela que apresentou maior remoção dos minerais empregando menor tempo de reação e menor concentração da solução ácida.

Percot, Viton e Domard (2003) realizaram a extração da quitina do exoesqueleto de camarão com finalidade de obter quitina na sua forma natural com maior massa molecular possível e a menor quantidade de desacetilação. Em seu trabalho, relatam otimização do processo de desmineralização utilizando uma solução de HCl 0,25 mol L<sup>-1</sup> na proporção de sólido para solvente de 1:40 (m/v) e um tempo de reação de 15 minutos. Essas condições não são otimizadas para o caranguejo *D. pagei* porque existe uma maior quantidade de carbonato de cálcio em seu

exoesqueleto, requisitando maior quantidade de HCl para removê-lo completamente ou na maior quantidade possível. Em razão dessa maior quantidade de material inorgânico, é necessário não somente aumentar a concentração de ácido, mas também o tempo de reação, uma vez que nem todo o  $\text{CaCO}_3$  pode reagir prontamente com o HCl em virtude da alta compactação da estrutura biológica.

Posteriormente à definição da condição adequada para desmineralizar o exoesqueleto do caranguejo, novas amostras foram obtidas em triplicata com 50,0 g de exoesqueleto seco por replicata para verificar o rendimento do processo, assim como percentual de mineral extraído. Os resultados revelaram o rendimento médio de 28,7 % para a etapa de desmineralização (71,3 % de conteúdo inorgânico extraído), obtendo-se  $14,367 \pm 0,059$  g de material desmineralizado. Portanto, observa-se que os resíduos do caranguejo amazônico (*D. pagei*) possuem um alto teor de minerais em sua composição. Resultado similar foi reportado por Oliveira e Nunes (2011), encontrando em resíduos do caranguejo *Ucides cordatus* 61,2 % de fração inorgânica. Segundo os mesmos autores, este elevado teor de minerais é um dos fatores que dificulta o processo de desmineralização na obtenção posterior de quitina.

Outros autores também reportam teores de cinzas tão altos como 63,6 % para o lagostim (sem identificação da espécie) (NO; MEYERS; LEE, 1989) e 54,7 % para lagostas *Linuparus trigonus* (AHN; LEE, 1992). O percentual de minerais encontrados no presente estudo é relativamente mais elevado em relação aos resultados relatados por outros autores a partir do exoesqueleto de outros crustáceos. Para camarões marinhos, Lertsutthiwong *et al.* (2002) encontraram percentual de 34,8 % de material inorgânico para o camarão *Penaeus monodon*, e Younes *et al.* (2014) encontraram percentual similar (35,3 %) de conteúdo mineral do camarão *Metapenaeus monoceros*. Em outro estudo realizado por Charoenvuttitham, Shi e Gauri (2006),



foi reportado um total de 31,2 % de cinzas para o camarão *Penaeus monodon* sobre a massa seca inicial. O teor de cinzas para o siri *Scylla serrata*, para a lagosta *Panulirus ornatus* e camarão *Penaeus indicus* foram de em 45 %, 35 % e 27 %, respectivamente (ODUOR-ODOTE; STRUSZCZYK; PETER, 2005). Assis e Brito (2008), relatam que as diferenças entre o conteúdo de minerais estão diretamente relacionadas à espécie, gêneros e a sazonalidade de cada um, o que pode justificar as diferentes condições de experimentos empregadas em outros estudos.

#### **4.2 Difração de Raios X do caranguejo desmineralizado**

Os padrões de XRD da estrutura cristalina a partir dos resíduos de caranguejo após o processo de desmineralização, expostos a diferentes tempos e concentrações de ácido estão presentes na Figura 6. Os resultados obtidos no experimento para a amostra (1a) mostraram a presença de picos de difração característicos da fase cristalina da  $\alpha$ -quitina nos valores de  $(2\theta)$  9,4 °, 19,6 °, 23,3 ° e 26,5 ° (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007; AL SAGHEER *et al.*, 2009). Adicionalmente, foram observados uma série de picos finos que vão de  $(2\theta)$  29,7 ° até 50,0 ° que estão relacionados a fase cristalográfica da calcita (carbonato de cálcio) (RAHMAN; HALFAR; SHINJO, 2013).

Através dessa análise pode-se verificar a existência de remanescentes inorgânicos na composição do material obtido e desta forma, avaliar se as condições experimentais aplicadas foram adequadas para a remoção do conteúdo inorgânico presente nos resíduos do caranguejo. Na amostra (1b), foram encontrados picos de difração  $(2\theta)$  próximos a 9,3 °, 12,5 °, 19,3 °, 26,5 ° e 35,0 °, os quais são característicos da fase cristalográfica da  $\alpha$ -quitina (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007; AL SAGHEER *et al.*, 2009), enquanto que para amostra (1c) observou-se picos de

difração similares à amostra 1b, com sinais registrados ( $2\theta$ ) próximos a  $9,3^\circ$ ,  $12,5^\circ$ ,  $19,3^\circ$ ,  $26,5^\circ$  e  $34,5^\circ$ .

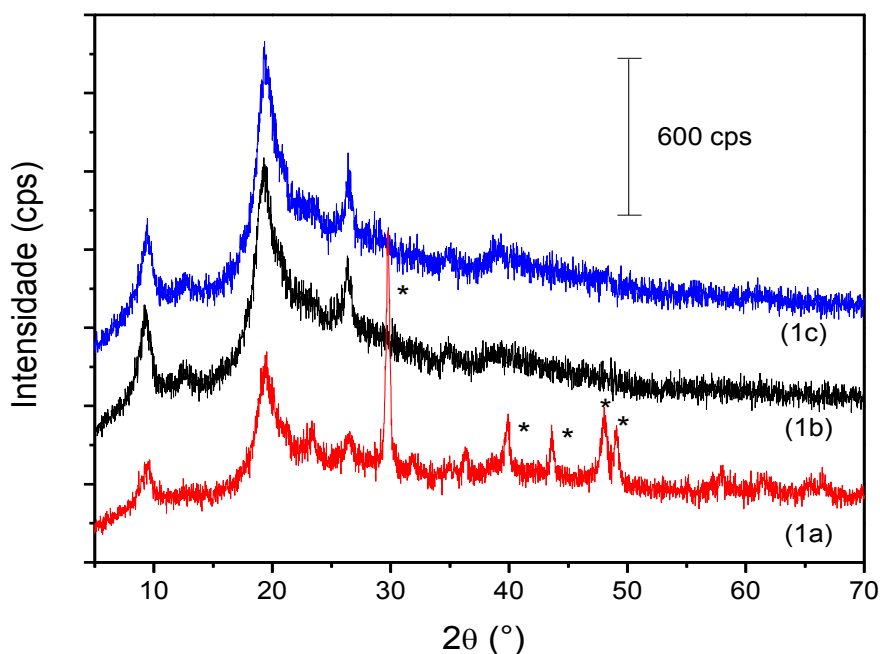


Figura 6 – Difratograma de raios X de isolamento da quitina a partir do exoesqueleto do caranguejo de tamanho de partícula (menor que 125  $\mu\text{m}$ ) em diferentes condições experimentais para a desmineralização: (1a)  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$  de HCl por 30 min; (1b)  $0,50 \text{ mol L}^{-1}$  HCl por 30 min e (1c)  $0,75 \text{ mol L}^{-1}$  HCl por 60 min.

\*Estão associados aos picos de difração da fase cristalográfica da calcita (carbonato de cálcio).

Portanto, foram observados sinais de difração mais intensos e em maior quantidade referentes à fase polimérica nas amostra 1b e 1c do que em relação à amostra 1a. A partir desses dados pode-se sugerir que, em termos de otimização, as condições experimentais aplicadas para a amostra (1b) foram as mais adequadas para remoção da maior parte do conteúdo mineral do exoesqueleto do caranguejo. Dessa forma, considerando condições de reação mais brandas, que não promovam eventual degradação do material polimerizado, não se utilizou as condições experimentais aplicadas para a amostra (1c).

### 4.3 Análise Termogravimétrica do material desmineralizado

O quantitativo de resíduos inorgânicos presentes nas amostras desmineralizadas puderam ser registrados através de informações obtidas pela análise termogravimétrica. Essa correlação pôde ser realizada conhecendo-se o percentual de massa remanescente do processo de decomposição térmica de uma amostra de carbonato de cálcio pura e admitindo-se que o resíduo obtido após o aquecimento das amostras corresponda apenas ao óxido de cálcio. A reação química do carbonato de cálcio, quando exposto a temperaturas elevadas, ocorre de acordo com a equação a seguir:



A Figura 7 mostra as curvas TGA sobrepostas para as amostras desmineralizadas 1a, 1b e 1c, revelando os perfis decomposição térmica das amostras com conteúdo reduzido de  $\text{CaCO}_3$ . Observa-se nos perfis das curvas TGA que a curva da condição de reação (1a) se dispõe de forma diferenciada do perfil de decomposição térmica das demais, evidenciando ainda a presença ainda de uma maior quantidade de material residual. Uma análise mais detalhada dos eventos de perda de massa se torna difícil de ser realizada nessa etapa, uma vez que, embora haja predominância de material orgânico na forma polimérica, ainda há outros compostos orgânicos presentes (MATHUR *et al.*, 1990; CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007). Ainda para a amostra 1a, observou-se um conteúdo residual de 8,59 % da massa inicial e que podem ser atribuídos ao óxido cálcio, indicando que o material desmineralizado continha inicialmente cerca de 15,34 % de massa inicial de carbonato de cálcio e considerando que 6,75 % dessa massa inicial se decompôs na forma de  $\text{CO}_2$ .

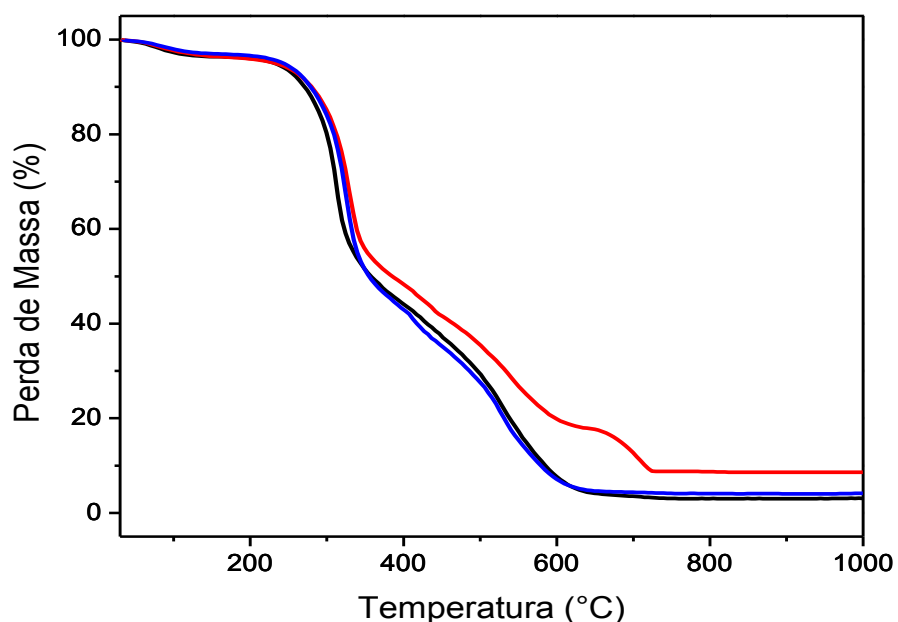


Figura 7 - Curvas TGA das condições experimentais de reação: desmineralização com ácido clorídrico em solução de concentração  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$  (1a - vermelha),  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  (1b - preta), por 30 min e  $0,75 \text{ mol L}^{-1}$  (1c - azul), 1 hora sob agitação constante a temperatura ambiente.

Por outro lado, as curvas das amostras 1b e 1c apresentaram perfis de decomposição térmica semelhantes e a análise do percentual de massa residual em ambos os casos é menor do que aquele registrado para a amostra 1a. Para ambas as amostras obteve-se o percentual residual próximo a 4,00 %, sendo que essa massa residual está associada a um percentual de massa de carbonato de cálcio inicialmente presente em ambas as amostras de 7,15 %. Embora o conteúdo inicial de  $\text{CaCO}_3$  nas amostras 1b e 1c sejam inferiores à amostra 1a, esses valores são consideravelmente altos, o que pode ser decorrente do alto conteúdo mineral encontrado para a espécie estudada frente a outras espécies reportadas na literatura. Somado ao total de 71,3 % de  $\text{CaCO}_3$  extraído no processo de desmineralização, encontrou-se um total de 78,45 % da constituição inicial dos resíduos do caranguejo amazônico formada por material inorgânico.

Nos trabalhos de Percot, Viton e Domard (2003) e Younes *et al.* (2014) o percentual de resíduos minerais encontrados após a etapa desmineralização a partir de crustáceos foi cerca de 1,8 e 1,3 %, respectivamente. Outros autores sugerem que o baixo conteúdo mineral deve ser considerado como um dos principais fatores que determinam o grau de pureza da quitina (TOLAIMATE *et al.*, 2003).

Para este estudo, definiu-se como condição de desmineralização adequada o experimento com maior remoção dos minerais que empregou a menor quantidade de reagentes e ocorreu no menor tempo, na qual a condição de reação empregada na amostra 1b. Tal medida foi adotada para que o material polimérico resultante obtido através de diferentes reações químicas apresente o maior grau de polimerização possível, uma vez que exposições prolongadas de quitina em meio ácido levam à fragmentação da cadeia (TOLAIMATE *et al.*, 2003). Ao final de todas as etapas de extração do material polimérico e de sua posterior desacetilação, é possível realizar procedimentos de purificação em condições mais brandas, que diminuiriam a redução no tamanho de cadeia. Portanto, confirma-se que dentre as 3 condições experimentais propostas, a condição 1b foi considerada a mais adequada e ela foi empregada para produção de maior quantidade de material desmineralizado para dar continuidade aos estudos apresentados nesse trabalho.

#### **4.4 Desproteínização do exoesqueleto de caranguejo**

O material desmineralizado obtido pela rota 1b foi tratado com solução de NaOH  $1 \text{ mol L}^{-1}$  para promover a remoção do conteúdo proteico em conjunto com os lipídios (MATHUR, *et al.*, 1990; CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007). Nesta etapa os experimentos foram realizados em diferentes tempos, conforme os dados apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Condições de reação e rendimento do remanescente orgânico na desproteínização do exoesqueleto de caranguejo em três tempos distintos 8, 12 e 24 horas.

Massa de material desmineralizado (g)	[NaOH] (mol L <sup>-1</sup> )	Tempo de reação (h) *	Massa de sólido (g)	Rendimento médio (g)	Denominação das amostras
5,0	1	8	2,545	2,545 ± 0,006	2a
			2,539		
			2,551		
5,0	1	8+4*	2,456	2,450 ± 0,006	2b
			2,443		
			2,450		
5,0	1	12+12*	2,409	2,409 ± 0,003	2c
			2,413		
			2,407		

\* Nos tempos onde há somatório denotam-se experimentos que foram realizados em dias consecutivos.

Os procedimentos experimentais das amostras 2a, 2b e 2c tiveram uma redução de suas massas iniciais em 49,1, 51,0 e 51,8 %, respectivamente, embora não haja diferenças estatisticamente diferentes entre os resultados obtidos. No entanto, pode-se concluir que na condição que emprega menor quantidade de tempo de reação, ainda existe a presença de conteúdo orgânico não polimérico que é retirado somente quando se aumenta o tempo de reação. Embora a perda de massa seja pequena em comparação com os procedimentos adotados nas amostras 2b e 2c, a exposição a maiores tempos de reação é capaz de realizar em maior extensão a hidrólise do conteúdo proteico, resultando em um produto com maior conteúdo polimérico. Por essa razão, optou-se por utilizar a rota que gerou a amostra 2c como o procedimento base para a etapa de desproteínização.

Resultado semelhante foi relatado por Percot, Viton e Domard (2003), que também consideraram a mesma condição de reação definida no presente estudo como condição suficiente

para desproteínização de exoesqueleto de camarão. De fato, o processo de desproteínização ocorre com a utilização de meio básico para reagir com as macromoléculas orgânicas sob condições de aquecimento. Nestas condições, ocorre a fragmentação da cadeia das proteínas, permitindo a separação do conteúdo proteico do sólido remanescente rico em material polimérico. O tratamento químico é usado para destruir as ligações químicas covalentes entre os complexos quitina-proteína (HAMODRAKAS; WILIS; ICONOMIDOU, 2002; NAKAGAWA *et al.*, 2015). Campana-Filho *et al.* (2007) relatam que as condições reacionais no processo de desproteínização devem ser moderadas para evitar a ocorrência de hidrólise dos grupos acetamida presentes na quitina e também sua despolimerização.

Dessa forma, após ser definida a condição adequada para a desproteínização, as amostras foram preparadas em triplicatas com 15,0 g de material desmineralizado pela rota 1b, obtendo o rendimento médio de 48,07 % e apresentando massa final de  $7,211 \pm 0,092$  g de material desproteínizado (6,852 g de material orgânico + 0,386 g de  $\text{CaCO}_3$  (5,35 % segundo análise do resíduo pela TGA)), indicando que a perda do conteúdo lipoproteico foi em torno de 51,00 % da massa inicial do material desmineralizado, confirmando o resultado obtido na fase teste para esta condição experimental nesta etapa.

Portanto, a partir destes resultados determinou-se que os resíduos dos caranguejos *D. pagei* continham 10,99 % de conteúdo lipoproteico em sua composição e 10,56 % de material orgânico desproteínizado. Oliveira e Nunes (2011) relataram um resultado similar do obtido neste estudo, a partir do exoesqueleto do caranguejo *U. cordatus*, com percentual de 13,20 % de proteínas e lipídeos.

O percentual de proteínas encontrado neste estudo é significativamente menor quando comparando com percentuais de proteínas reportados na literatura para diferentes espécies de camarão. Em um estudo foi verificado que o exoesqueleto de camarão *P. monodon* continha cerca de 47,4 % de proteína em sua composição (CHAROENVUTTITHAM; SHI; GAURI, 2006). Resultado semelhante foi relatado por Synowiecki e Al-Khateeb (2000) que encontraram o teor proteico na estrutura esquelética do camarão de *Crangon crangon* em torno de 40,6 % a partir da massa seca inicial. Benhabiles *et al.* (2012) também encontraram um percentual de proteína de 40,6 % no exoesqueleto do camarão *Parapenaeus longirostris*. Diversos fatores podem justificar os diferentes resultados citados, como por exemplo, as diferentes espécies utilizadas, as condições de reação e os métodos de processamento utilizados.

#### **4.5 Difração de raios X do material desproteínizado**

A análise de difração de raios X das amostras desproteínizadas 2a, 2b e 2c estão presentes na Figura 8. Observa-se nos padrões de difração da amostra 2a picos ( $2\theta$ ) próximos a  $9,2^\circ$ ,  $12,7^\circ$ ,  $19,3^\circ$  e  $26,4^\circ$ , enquanto que na amostra 2b foi observado picos de difração ( $2\theta$ ) em  $9,5^\circ$ ,  $12,9^\circ$ ,  $19,3^\circ$ ,  $23,5^\circ$ ,  $26,5^\circ$ ,  $34,8^\circ$  e  $39,4^\circ$ . Para a amostra 2c foram observados picos de difração ( $2\theta$ ) próximos a  $9,3^\circ$ ,  $12,7^\circ$ ,  $19,3^\circ$ ,  $23,5^\circ$ ,  $26,5^\circ$ ,  $34,8^\circ$  e  $38,9^\circ$ .

A amostra 2a apresentou picos menos resolvidos e de menor intensidade atribuídos à fase cristalográfica da  $\alpha$ -quitina quando comparados às amostras 2b e 2c. No caso das amostras 2b e 2c, os números de picos foram os mesmo para ambas, ocorrendo pequenas diferenças quanto as posições dos picos em ( $2\theta$ )  $9,5^\circ$ ,  $12,9^\circ$  e  $34,8^\circ$  na amostra 2b e ( $2\theta$ )  $9,3^\circ$ ,  $12,7^\circ$  e  $34,9^\circ$  para amostra 2c, os quais nesta última também foram mais resolvidos e característicos da fase cristalográfica da  $\alpha$ -quitina. Os picos obtidos nas condições experimentais para desproteínização



na amostra 2c estão similares com os resultados apresentados por outros autores (AL SAGHEER *et al.*, 2009).

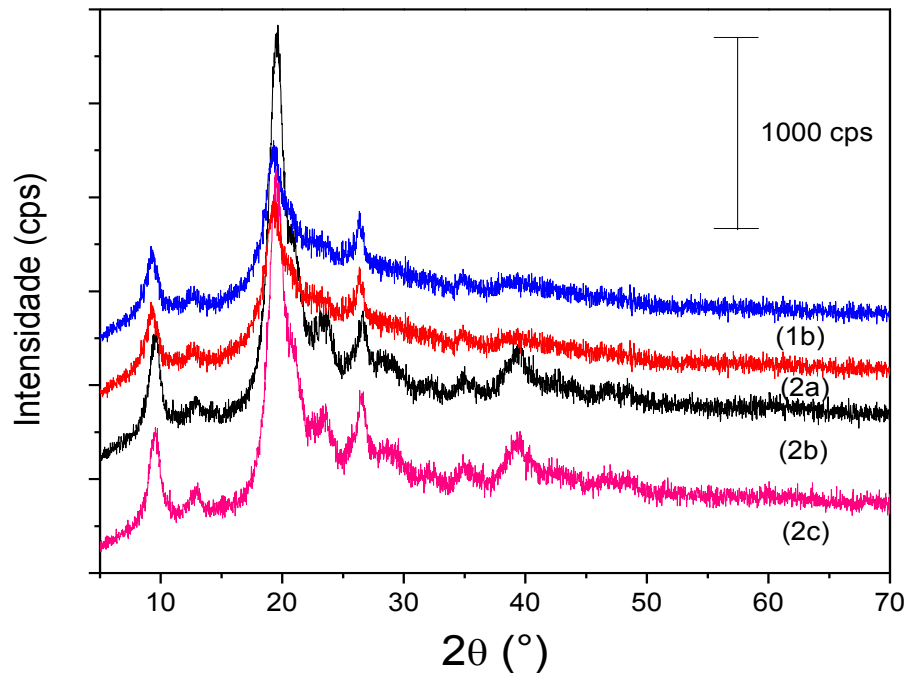


Figura 8 – Difratograma de três condições de reação de desproteínização do exoesqueleto do caranguejo desmineralizado pelos procedimentos 2a, 2b e 2c. O difratograma (1b) corresponde ao resultado de difração obtido para o exoesqueleto de caranguejo desmineralizado na condição de reação 1b.

Comparando os padrões de difração do material desmineralizado 1b e desproteínizado (2c), os quais foram obtidos a partir de condições experimentais consideradas otimizadas para cada etapa, pode-se observar que existem diferenças entre os sinais registrados, relacionadas tanto à quantidade de picos associados à fase  $\alpha$ -quitina quanto à intensidade e largura dos mesmos. Esse fato pode ser explicado devido à existência, na amostra desmineralizada, de uma grande quantidade de materiais orgânicos não polimérico que interferem de forma significativa na difração sobre os planos atômicos característicos da fase cristalográfica da  $\alpha$ -quitina. Isso ocorre porque esses compostos impedem a formação de estruturas espacialmente mais

organizadas das cadeias poliméricas, resultando na presença de sinais mais difusos e menos intensos de difração de raios X.

#### **4.6 Análise Termogravimétrica do material desproteínizado**

Os perfis térmicos das amostras 2a, 2b e 2c, bem como a curva TGA da amostra desmineralizada obtida da condição 1b estão mostradas na Figura 9. Primeiramente, observa-se no perfil térmico do material desmineralizado (curva preta) que o processo de perda de massa ocorre de forma menos pronunciada no evento não oxidativo, que ocorre entre o intervalo de temperatura de 190 a 325 °C de que no evento oxidativo, que ocorre entre o intervalo de temperatura de 325 a 610 °C. O evento não oxidativo refere-se à decomposição de matéria orgânica sem a participação de gás oxigênio, enquanto o evento oxidativo refere-se à transformação do material orgânico ou resíduo carbonáceo principalmente em CO<sub>2</sub> (ANTONINO, 2007). Um dos fatores determinantes da estabilidade térmica de um polímero é a energia das ligações da cadeia principal (LIM; WAN, 1995). A ligação C-C é uma das ligações químicas mais resistentes à decomposição térmica. A presença de átomos de hidrogênio nas cadeias do polímero diminui a energia entre as ligações C-C, motivo pelo qual os hidrocarbonetos com elevada massa molecular e seus derivados possuem baixa estabilidade térmica, sendo facilmente decompostos com o aquecimento a temperaturas mais elevadas (PENICHE-COVAS; JIMÉNEZ, 1988). Esse efeito observado pode ser atribuído à presença de maior quantidade de material orgânico não polimerizado no material desmineralizado na forma de um conteúdo lipoproteico que se decompõe termicamente de modo diferente do material polimérico presente na estrutura do exoesqueleto do caranguejo.

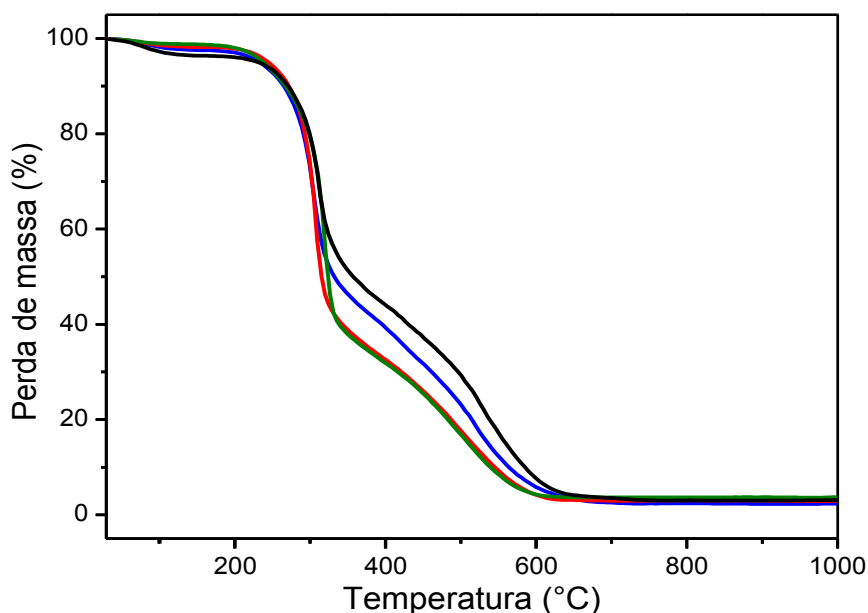


Figura 9 – Curvas TGA do processo de desproteínização com hidróxido de sódio em solução de  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  em tempos de 8 horas (2a - azul) 12 horas (2b - verde) e 24 horas (2c - vermelha), e do processo de desmineralização com HCl em solução de  $0,50 \text{ mol L}^{-1}$  no tempo de 30 minutos (1b - preta).

Observa-se também que a curva TGA da condição de reação realizada na amostra 2a apresentou um perfil de decomposição térmica diferenciado em relação às curvas das amostras 2b e 2c no intervalo de temperatura entre 325 e 610 °C. A amostra 2a exibe um menor evento de perda de massa atribuído ao processo não oxidativo do que as amostras 2b e 2c, devido à presença de um maior conteúdo lipoproteico na amostra que não se decompõe termicamente de modo não oxidativo em atmosfera oxidante. Por outro lado, as amostras realizadas nos tempos de 12 e 24 horas apresentaram perfis semelhantes, atestando que suas constituições químicas são muito similares entre si.

Ressalta-se que o perfil térmico obtido para o material desproteínizado (2c) não está relacionado somente à perda de massa da quitina, uma vez que o material desproteínizado ainda apresenta uma quantidade de conteúdo orgânico não polimérico principalmente na forma de

pigmentos que são somente removidos sob condições mais oxidantes (SEABRA; PEDROSA, 2010). Portanto, a discussão mais detalhada dos eventos de perda de massa pode ser mais bem descrita apenas após a remoção dessa impureza.

#### 4.7 Despigmentação e obtenção de quitina

A estrutura esquelética da maioria dos crustáceos é constituída também de pigmentos carotenoides, como a astaxantina (OGAWA *et al.*, 2007). A presença de grupos (OH) e (C = O) em cada anel ionona explica algumas das características de astaxantina, tal como a capacidade de ser esterificado, uma natureza mais polar e alta capacidade antioxidante (HIGUERA-CIAPARA; FELIX-VALENZUELA; GOYCOOLEA, 2006; LIU; OSAWA, 2007).

Para remover os pigmentos do material desproteínizado obtido pela rota 2c, foi realizada a etapa de despigmentação. Observou-se que após o contato desse material com a solução de hipoclorito de sódio, o mesmo apresentou uma coloração castanho mais claro que a inicial, comprovando a remoção dessa fração orgânica conforme observado na Figura 10.



Figura 10 – Amostra desproteínizada (a) e amostra despigmentada (b).

Para essa etapa, obteve-se uma massa final atribuída à quitina de  $3,772 \pm 0,049$  g partindo-se de 5,0 g de material desproteinizado por replicata. Portanto, a massa de material desproteinizado apresentou uma redução de cerca de 22,81 % (3,772 g de material total, sendo 3,599 g de quitina + 0,173 g de  $\text{CaCO}_3$  (3,46 % da massa inicial de 5,0 g de material desproteinizado) que estão associados à perda da massa inicial de pigmentos e possivelmente à fragmentação do material polimérico. Assumindo que essa redução de massa seja exclusivamente devido à retirada dos pigmentos o percentual de pigmentos encontrado no resíduo inicial de caranguejo foi de 2,53 %.

#### **4.8 Padrões de Difração de raios X da $\alpha$ -quitina**

A cristalinidade da quitina, conforme apreciado através de estudos de difração de raios X, depende principalmente do grau de acetilação e do processo pelo qual esta foi obtida (ANTONINO, 2007; CAMPANHA-FILHO *et al.*, 2007). A Figura 11 mostra o difratograma da  $\alpha$ -quitina obtida após o processo de despigmentação.

Os padrões de XRD da amostra despigmentada de caranguejo exibiram picos nos em  $(2\theta)$   $9,32^\circ$ ,  $12,70^\circ$ ,  $19,38^\circ$ ,  $23,45^\circ$ ,  $26,37^\circ$ ,  $28,80^\circ$ ,  $32,01^\circ$ ,  $34,62^\circ$ ,  $39,09^\circ$  e são atribuídos à fase  $\alpha$ -quitina. Observa-se reflexões de alta intensidade em  $(2\theta)$   $9,32^\circ$  e  $19,38^\circ$  e sinais menos intensos em  $(2\theta)$   $12,70^\circ$ ,  $23,45^\circ$  e  $26,37^\circ$ . Esses sinais se encontram em posições muito similares conforme registrado na literatura para esse biopolímero (Al SAGHEER *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2013; HAJJI *et al.*, 2014; ABDEL-RAHMAN, *et al.*, 2015). Além disso, esses valores também se encontram muito próximos aos reportados na literatura para diferentes fontes de quitina e quitosana (JANG *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2012; JUÁREZ-DE LA ROSA *et al.*, 2012; MOHAMMED; WILLIAMS; TVEREZOVSAYA, 2013; KAYA *et al.*, 2013; KUMARI;

RATH, 2014; KUMARI *et al.*, 2015, KAYA *et al.*, 2015d, ZELENKOVA *et al.*, 2015; ERDOGAN; KAYA, 2016).

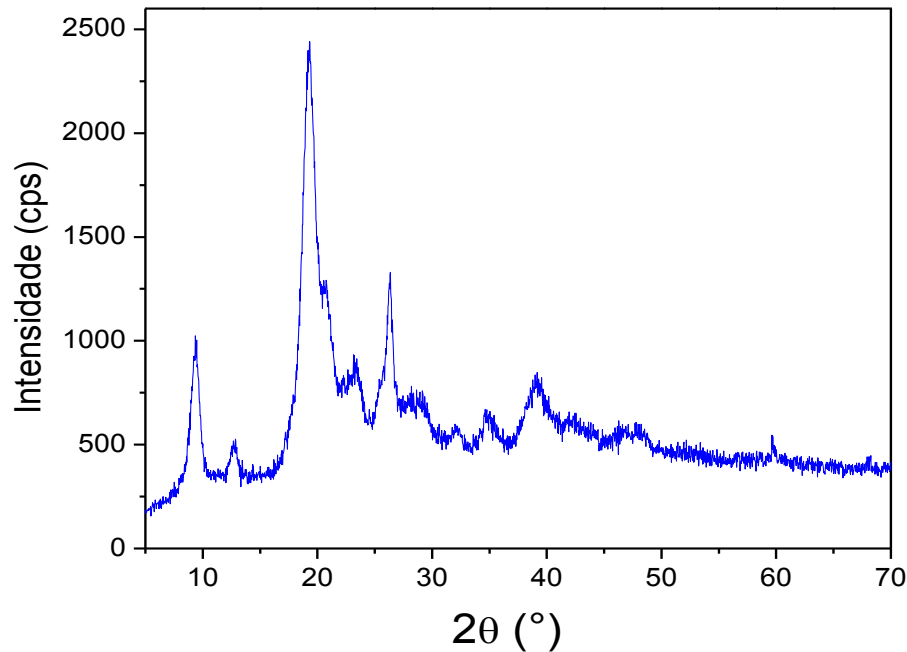


Figura 11 – Difratoograma da quitina extraída do caranguejo *D. pagei*.

Vários outros estudos empregam a técnica de XRD para determinar a estrutura cristalina de  $\alpha$ -quitina obtida de outras fontes. Cárdenas *et al.* (2004) reportaram que os padrões de difração de raios X de  $\alpha$ -quitina extraída de camarão, lagosta, e caranguejo rei e  $\beta$ -quitina obtida a partir de concha de lula, apresentaram seus picos característicos principais em posições ligeiramente diferentes, em ( $2\theta$ ) 9,22 °, 12,76 °, 19,18 °, 22,98 ° e 26,18 °; ( $2\theta$ ) 9,32 °, 12,62 ° 19,26 °, 23,16 ° e 26,22 °; ( $2\theta$ ) 9,34 °, 12,66 °, 19,20 °, 23,12 ° e 26,28 °, ( $2\theta$ ) 8,64 °, 10,42 °, 12,55 °, 18,78 °, 23,94 ° e 26,24 °, respectivamente.

#### 4.9 Análise termogravimétrica da quitina

A estabilidade térmica é um fator importante para determinar as potenciais aplicações da quitina e seus derivados (VILLETTI *et al.*, 2002). Na Figura 12 está registrada a curva TGA da amostra despigmentada, bem como o sinal de espectrometria de massas associados aos fragmentos  $m/z = 18$  ( $H_2O$ ),  $m/z = 30$  ( $NO$ ),  $m/z = 44$  ( $CO_2$ ) e  $m/z = 46$  ( $NO_2$ ). O perfil da decomposição térmica da quitina despigmentada exibe três etapas distintas, sendo que o primeiro evento de massa, que ocorre desde a temperatura ambiente até 120 °C refere-se à liberação de moléculas de água adsorvidas na estrutura polimérica, conforme também pode ser observado pelo pequeno sinal inicialmente presente no início da curva 12b com variação de massa registrada 1,6 %.

O segundo evento de perda de massa, que ocorre entre 215 °C e 350 °C está relacionado com o processo de decomposição térmica não oxidativo da cadeia polimérica. Nesse processo há a decomposição das unidades glucopiranosídicas da macromolécula, incluindo a desidratação da estrutura via condensação dos grupos hidroxila e fragmentação das ligações C-C e C-O, além da liberação de átomos de nitrogênio na forma de óxidos de nitrogênio ( $NO$  e  $NO_2$ ) (TANODEKAEW *et al.*, 2004; PAULINO *et al.*, 2006; ANDRADE *et al.*, 2012). Portanto, neste evento se observa a perda de, além das moléculas de água, óxidos de carbono ( $CO$  e  $CO_2$ ) e óxidos de nitrogênio com perda de massa de 61,4 %.

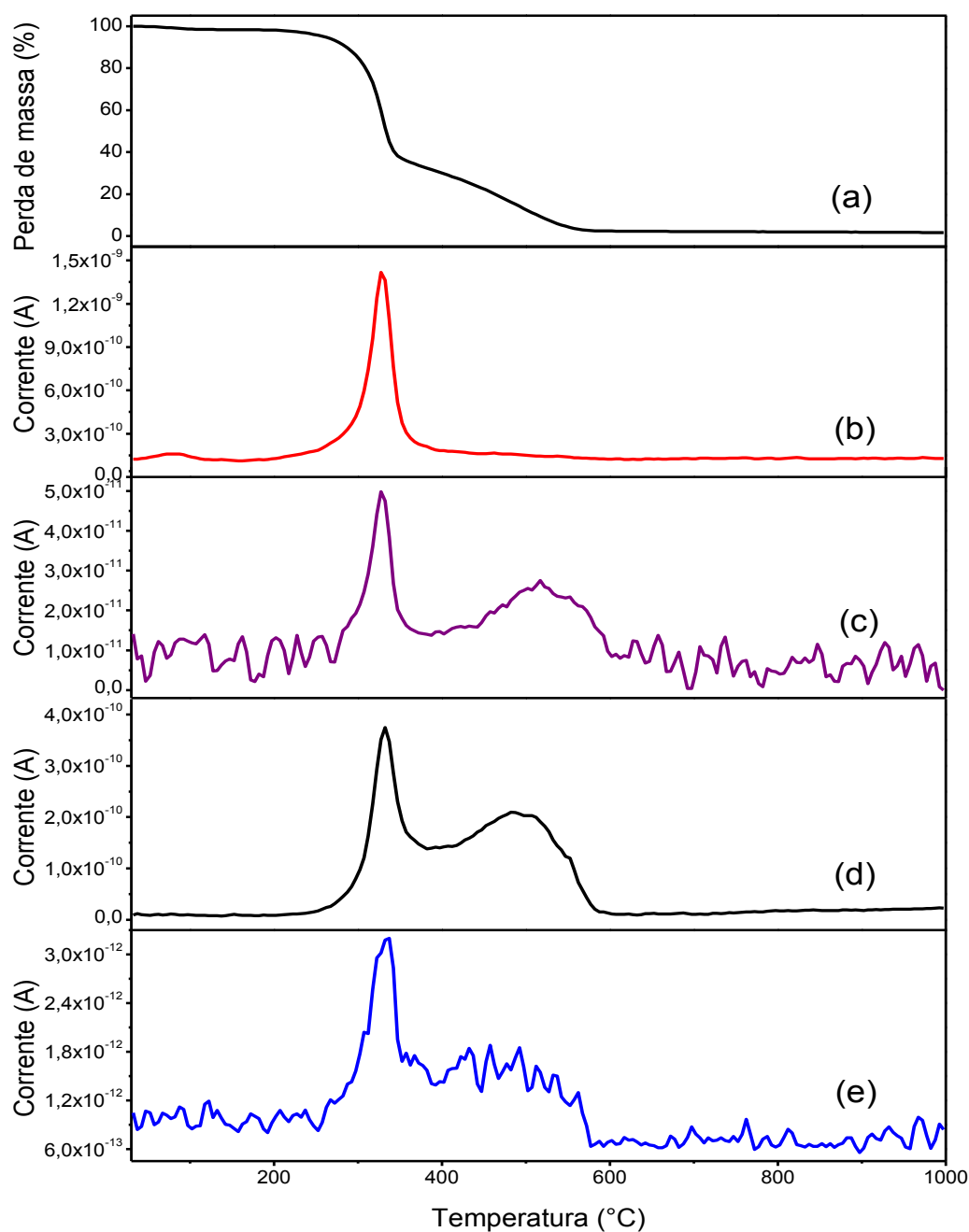


Figura 12 – Curva TGA (a) do material despigmentado e fragmentos MS obtidos para (b)  $m/z = 18$  (água), (c)  $m/z = 30$  (óxido de nitrogênio), (d)  $m/z = 44$  (dióxido de carbono) e (e)  $m/z = 46$  (dióxido de nitrogênio).

Ao final do evento não oxidativo, o conteúdo remanescente é formado por um grande quantitativo de átomos de carbono e por essa razão é denominado de resíduo carbonáceo. No



intervalo de temperatura entre 350 °C e 580 °C há uma redução de massa de 34,7 %, sendo que esse remanescente rico em carbono sofre decomposição na forma de um evento oxidativo, onde se combina com gás oxigênio, liberando principalmente CO e CO<sub>2</sub> (IQBAL *et al.*, 2011). Após a fragmentação das ligações C-C, ocorre concomitantemente a fragmentação das ligações C-N existentes no material despigmentado, com a liberação de óxidos voláteis de nitrogênio, conforme pode ser observado nas Figuras 12c e 12e. Após o terceiro evento de perda de massa, observa-se a presença de uma massa residual de 2,3 %, constituída principalmente de óxido de cálcio proveniente da decomposição térmica do carbonato de cálcio presente na amostra 2c antes do processo de despigmentação. Através desse valor, foi determinado que a quantidade presente de CaCO<sub>3</sub> na amostra desmineralizada é de 4,10 %. Esse valor é menor que aquele inicialmente encontrado para a amostra desmineralizada (1b = 7,15 %), indicando que as sucessivas etapas para obtenção de uma fase rica em  $\alpha$ -quitina são capazes de reduzir o conteúdo inorgânico que não foi removido por tratamento ácido.

#### 4.10 Desacetilação da quitina e obtenção da quitosana

Após a obtenção da quitina despigmentada, realizou-se os procedimentos para convertê-la em quitosana, gerando as amostras visualizadas na Figura 13. Nesta etapa colocou-se a quitina em contato com solução de NaOH, conforme representado na equação 5 (EL FARGANI *et al.*, 2016), que representa o processo de hidrólise dos grupos acetamida para a geração de aminas livres:



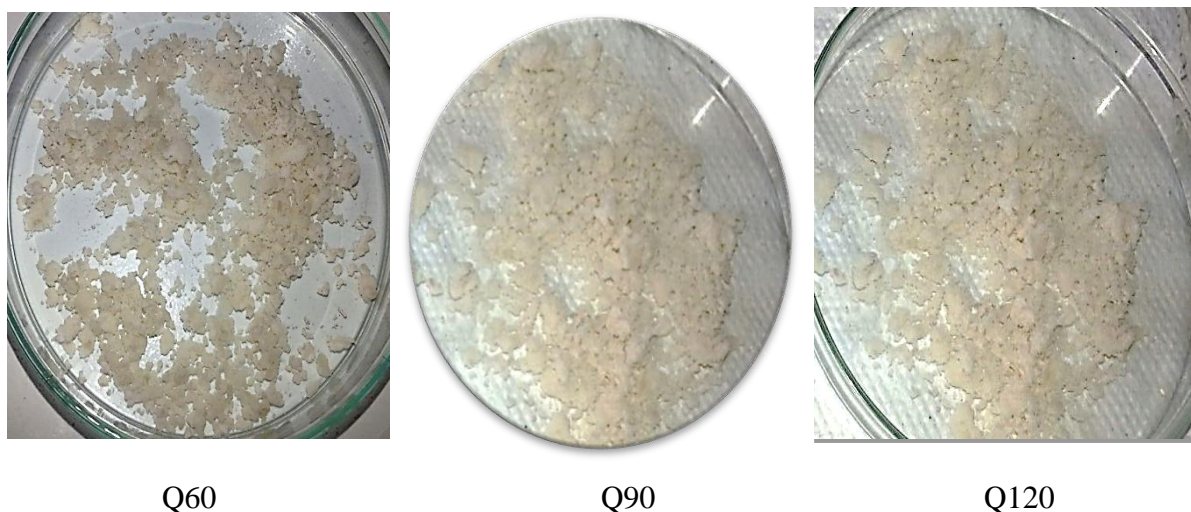


Figura 13 – Amostras das quitosanas obtidas através de diferentes tempos de reação.

Os rendimentos das quitosanas obtidas foram em torno de 61,0-63,0 % a partir da massa inicial (quitina), como consta na Tabela 7. Após análise estatística dos dados verificou-se que não existem diferenças significativas entre os rendimentos das quitosanas obtidas em diferentes tempos de reação ( $F= 3,5182$ ;  $GL=2$ ;  $P>0,05$ ).

O rendimento de quitina e quitosana varia em diferentes organismos. Oduor-Odote, Struszczyk e Peter (2005) relataram que o rendimento de quitina e quitosana obtidos a partir de exoesqueleto do siri *S. serrata*, lagosta *P. ornatus*, camarão *P. indicus* foi de 23,0 %, 15,7 % e 28,0 %, enquanto que o rendimento de quitosana foi de 74,6 %, 74,3 % e 75,0 % a partir da quitina. Demir *et al.* (2016) reportaram que o rendimento de quitina obtida a partir do exoesqueleto do siri azul *Callinectes sapidus* foi de 11,73 % e o rendimento de quitosana foi em torno de 77,78 % a partir da quitina seca. Resultado foi similar foi obtido por Kaya *et al.* (2016b) para a mesma espécie, onde o rendimento de quitosana foi em torno de 76,00 %. Em outro estudo Yen, Yang e Mau (2009) reportaram que o percentual de quitina a partir do caranguejo

*Chionoecetes opilio* foi cerca 63,3 % e após a desacetilação, os rendimentos das quitosanas foram em torno de 30,0-32,2 %.

Tabela 7 – Rendimentos das quitosanas obtidas em diferentes tempos de reação.

Massa de quitina (g)	[NaOH] (mol L <sup>-1</sup> )	Tempo de reação (min)	Rendimento de quitosana (g)	Média ± Desvio padrão (g)	Denominação das amostras
1,0	10,0	60	0,657	0,630 ± 0,010	Q60
			0,620		
			0,635		
1,0	10,0	90	0,626	0,620 ± 0,007	Q90
			0,625		
			0,613		
1,0	10,0	120	0,604	0,610 ± 0,006	Q120
			0,616		
			0,614		

Portanto, os resíduos do caranguejo *D. pagei* apresentaram em torno de 8,03 % de quitina e que após desacetilação geraram 5,04 % de quitosana a partir da massa inicial. Ressalta-se que o conteúdo de quitina no exoesqueleto do caranguejo pode ser maior, uma vez que nos resíduos também continham restos de carne e dessa forma, acaba reduzindo a quantidade final de polímero mensurada.

O rendimento de quitina obtido neste estudo é inferior àquele encontrado por Shahidi e Synowiecki (1991) para o caranguejo *Chifroceles opilio* e camarão *Pandalus borealis* nos quais o percentual de quitina encontrada nessas espécies foram de 17,0 e 32,2 %, respectivamente. Tharanathan e Kittur (2003) reportaram que o conteúdo de quitina a partir do exoesqueleto do siri azul *C. sapidus* foi de 14,0 %.

Em contrapartida, valores menores de percentual de quitina e quitosana também são reportados na literatura como aqueles estudados por Bolat *et al.* (2010) para caranguejo de água doce *Potamon potamios*, no qual foi encontrado os valores médios de 6,83 e 4,65 %, respectivamente. Em outro estudo, Bilgin e Fidanba (2011) verificaram que o percentual de quitina e posterior conversão em quitosana para as fêmeas do caranguejo *P. potamios* ficou em torno de 7,80 % e 5,86 %, respectivamente. Estes resultados são inferiores ao reportado por Sakthivel, Vijayakumar e Anandan, (2015), os quais determinaram que o rendimento de quitina e quitosana a partir do caranguejo *Sesarma plicatum*, o valor encontrado para a quitina foi de 18,46 %, enquanto para a quitosana o valor encontrado foi de 41,37 % a partir da quitina.

Em comparação com outras espécies de crustáceos, encontraram-se diferentes relatos do percentual de quitina e quitosana presente na composição desses animais. Um desses estudos reporta a quantidade desse polímero para o camarão marinho *Penaeus brasiliensis*, onde foi encontrado um total 5,3 % da massa inicial do exoesqueleto na forma de quitina que posteriormente foi convertida em quitosana, cuja massa correspondeu à 2,5 % da massa inicial (HENNIG, 2009).

Em outro estudo envolvendo camarão de água doce *Macrobrachium jelskii*, Santos, Cirilo e Nunes, (2011) determinaram que os valores de rendimentos de quitina e quitosana foram de 5,9 e 5,06 %, respectivamente. Portanto, total de quitina e quitosana encontrada no exoesqueleto do caranguejo de água doce *D. pagei* possui valores próximos àqueles encontrados para uma grande quantidade de crustáceos. Vale ressaltar que as diferenças no rendimento de obtenção de quitina e quitosana entre diferentes crustáceos podem variar de acordo com a espécie e efeitos sazonais (GREEN; MATTICK, 1979; CHO; NO; MEYERS, 1998). O caranguejo *D. pagei*, por se encontrar em uma área de várzea Amazônica, está sob influência dos períodos de

cheia e seca (MARENGO; ESPINOZA, 2016) e com as alterações do nível do rio ocorrem alteração e disposição da quantidade de alimento. Dessa forma, a exposição a esse tipo de condição ambiental pode alterar composição dos animais.

#### **4.11 Padrões de Difração de raios X da quitosana**

Na Figura 14 estão representados os padrões de XRD das amostras das quitosanas Q60, Q90 e Q120 de caranguejo, as quais apresentaram picos nos valores de  $(2\theta)$  9,8 - 10,3 ° e 20,0 - 20,4 °, respectivamente. Nota-se que os picos de difração nas amostras Q90 e Q120 se posicionaram em valores mais elevados de  $(2\theta)$ , 10,2 ° e 20,3 °. Observa-se adicionalmente que a quantidade de picos foram inferiores aos encontrados para  $\alpha$ -quitina obtida, indicando um menor nível de cristalinidade após a realização do tratamento químico para obtenção da quitosana. Outro parâmetro observado é o alargamento dos picos da quitosana em relação à  $\alpha$ -quitina, atestando a menor cristalinidade do sólido obtido.

Além disso, os grupos aminos terminais da estrutura de quitosana também podem contribuir para a sua estrutura amorfa, uma vez que as ligações de Hidrogênio atuam como elos secundários e contribuem com a mudança no ângulo da ligação entre as moléculas de quitosana. De fato, quitosana possui uma estrutura semicristalina e sua cristalinidade é reduzida durante o processo de desacetilação da quitina.

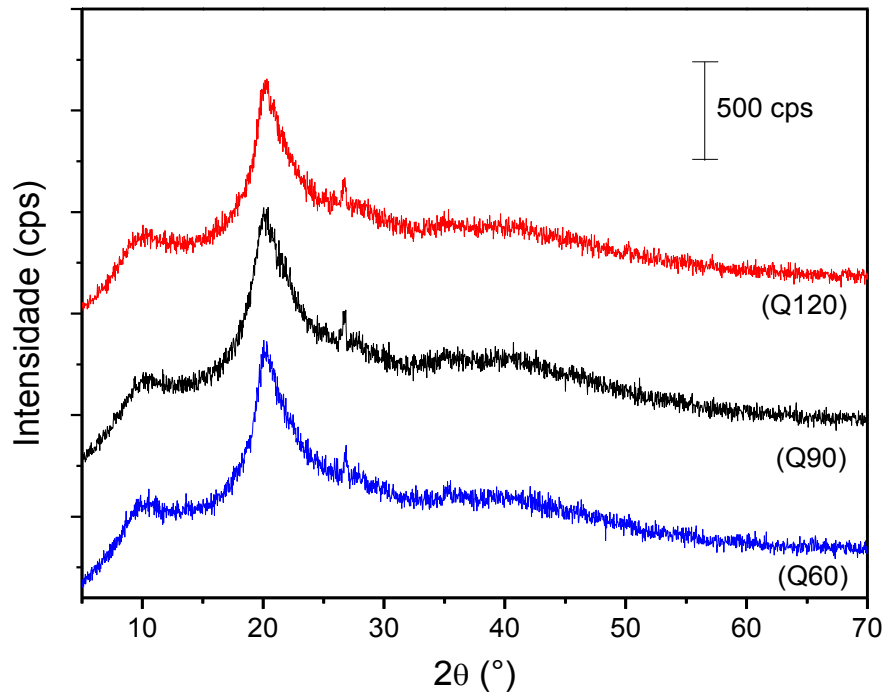


Figura 14 – Difratoogramas de raios X das quitosanas obtidas a partir da quitina extraída do exoesqueleto do caranguejo *D. pagei*, as quais foram produzidas em diferentes tempos de reação: Q60 (azul), Q90 (preto) e Q120 (vermelho), as quais foram produzidas em diferentes tempos de reação.

Islam *et al.* (2011) também investigaram o padrão XRD de quitosana a partir do exoesqueleto de camarão (sem identificação da espécie) e encontraram picos de difração em  $(2\theta)$   $10^\circ$  e  $21^\circ$  que também foram atribuídos a uma estrutura semicristalina. Os sinais de difração encontrados neste trabalho estão em regiões muito próximas aos valores reportados por Yen, Yang e Mau, (2009) para quitosanas obtidas a partir da quitina purificada extraída do caranguejo *C. opilio*. Os mesmos reportaram que os padrões XRD das quitosanas obtidas exibem duas reflexões em  $(2\theta)$   $8,8-9,0^\circ$  e  $18,9-19,1^\circ$  e que os valores de  $(2\theta)$  foram mais acentuados com o maior tempo de reação. Zhetcheva e Pavlova (2011) reportaram que a quitosana de caranguejo (não informado a espécie) apresentou picos nos valores de  $(2\theta)$   $10^\circ$  e  $20^\circ$ , os mesmos valores foram reportados por Ameh *et al.* (2013) para a quitosana extraída de uma espécie de camarão

não identificada. El Fargani *et al.* (2017) também reportaram posições dos picos de difração similares para as quitosanas obtidas a partir camarão *P. borealis* e caranguejo *C. crangon*.

#### **4.12 Análise termogravimétrica da quitosana**

Na Figura 15 estão registradas as curvas TGA das amostras de quitosanas obtidas. As amostras das Q60, Q90 e Q120 apresentaram perfis de decomposição térmica semelhantes entre si, as quais exibem em três estágios de perda de massa. O primeiro estágio refere-se à perda de moléculas de água adsorvidas (PEREIRA *et al.*, 2013) ocorrendo desde a temperatura ambiente até a temperatura de 130 °C, com variação de massa registrada de 7,7 %. O segundo estágio refere-se a um evento não oxidativo de perda de massa, ocorrendo em um intervalo de temperatura de 213 a 303 °C, com perda de massa registrada de 39,8 %. Esse evento não oxidativo é atribuído à despolimerização das cadeias das quitosanas, decomposição dos anéis de piranose por desidratação e finalmente a reação de abertura do anel (PAWLAK; MUCHA, 2003; WANJUN; CUNXIN; DONGHUA, 2005). Já o terceiro estágio de perda de massa se refere ao material inorgânico carbonizado que sofre reação em temperaturas entre 303 a 663 °C na presença de atmosfera oxidante, sendo registrada uma perda de massa de 53,7 %.

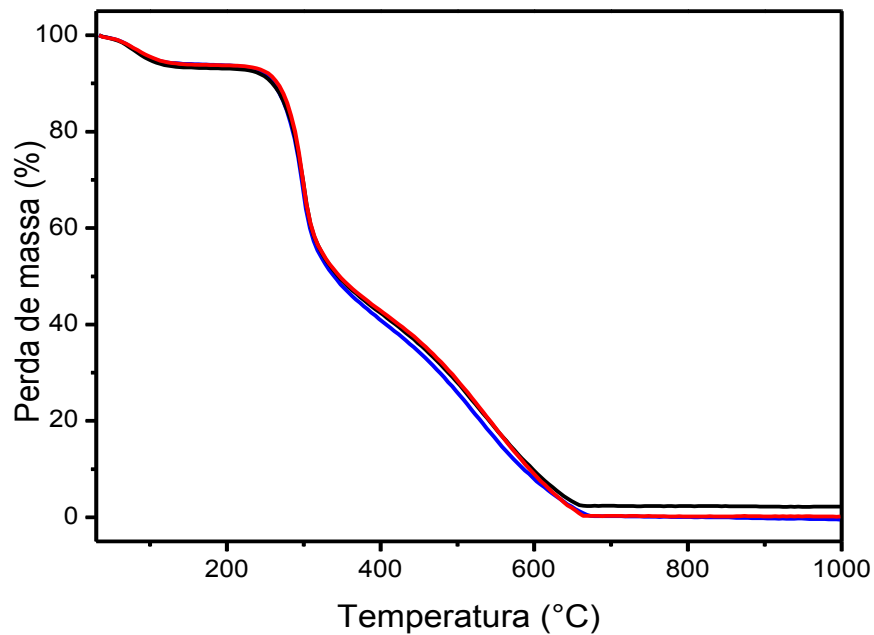


Figura 15 - Curvas TGA dos quitosanas obtidas em diferentes tempos: Q60 (preta), Q90 (vermelha) e Q120 (azul).

Após os eventos de perda de massa, observou-se uma massa residual de 2,3 % para a amostra Q60 e para as amostras Q90 e Q120 foram encontradas uma massa residual de 0,29 %. A massa residual é provavelmente constituída de óxido de cálcio proveniente da decomposição térmica do carbonato de cálcio ainda remanescente, uma vez que as amostras de quitosanas obtidas não foram submetidas a um processo de purificação. Contudo, percebe-se que o tempo de reação na etapa de desacetilação influenciou positivamente na remoção de material inorgânico das amostras.

#### 4.13 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho por transformada de Fourier

Após análise da estrutura cristalina e determinação perfil de decomposição térmica verificou-se o grau de desacetilação (GD) das quitosanas obtidas em diferentes tempos. O GD é definido como a quantidade de grupos amino em relação aos grupos amida presentes da cadeia



polimérica (JANEGITZ *et al.*, 2007). As Figuras 16 e 17 mostram os espectros FTIR correspondentes à quitina (material desproteínizado) e as amostras de quitosanas, respectivamente.

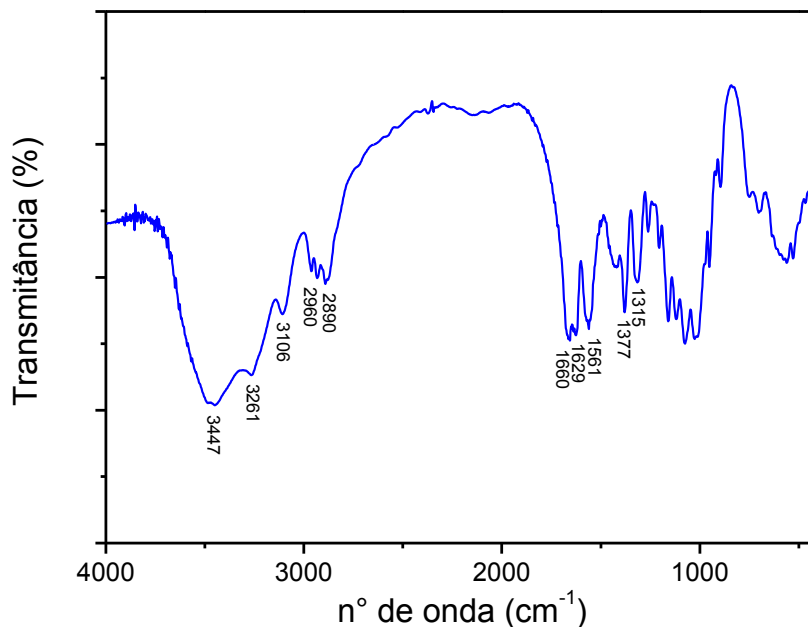


Figura 16 – Espectro vibracional na região do Infravermelho da  $\alpha$ -quitina de caranguejo.

O espectro de absorção da quitina apresenta bandas de absorção características da amida, nas regiões de  $1660\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C=O) conhecida como banda de amida I;  $1561\text{ cm}^{-1}$  (deformação N-H) banda de amida II e  $1315\text{ cm}^{-1}$  (deformação angular das ligações CO-NH e ao grupo  $\text{CH}_2$  que ocorrem na mesma região) denominada banda de amida III, devido à deformação do grupo CO-NH (CANELLA; GARCIA, 2001; LIU *et al.*, 2012; KAYA *et al.*, 2013).

A banda a  $1377\text{ cm}^{-1}$  é atribuída à deformação angular do grupo  $\text{CH}_3$ . A banda em  $3261\text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento da ligação N-H e a observada a  $3454\text{ cm}^{-1}$  ao estiramento da ligação O-H. Observa-se que a banda amida I de  $\alpha$ -quitina se divide em  $1660$  e  $1629\text{ cm}^{-1}$ , o que

está associado a dois tipos de ligações de Hidrogênio formadas por grupos amida no alinhamento antiparalelo presentes nas ligações cristalinas neste biopolímero (AL SAGHEER, 2009; LIU *et al.*, 2012; ERDOGAN; KAYA, 2016). A presença das referidas bandas no espectro vibracional registrado corrobora com os resultados mostrados das técnicas analíticas mostradas anteriormente de que amostra analisada se trata da  $\alpha$ -quitina.

Através da técnica de FTIR pode-se comprovar a hidrólise dos grupamentos acetila da estrutura da  $\alpha$ -quitina, através do monitoramento da redução da banda de estiramento da carbonila da amida (CANELLA; GARCIA, 2001). A Figura 17 mostra os espectros vibracionais das quitosanas obtidas em diferentes tempos de reação.

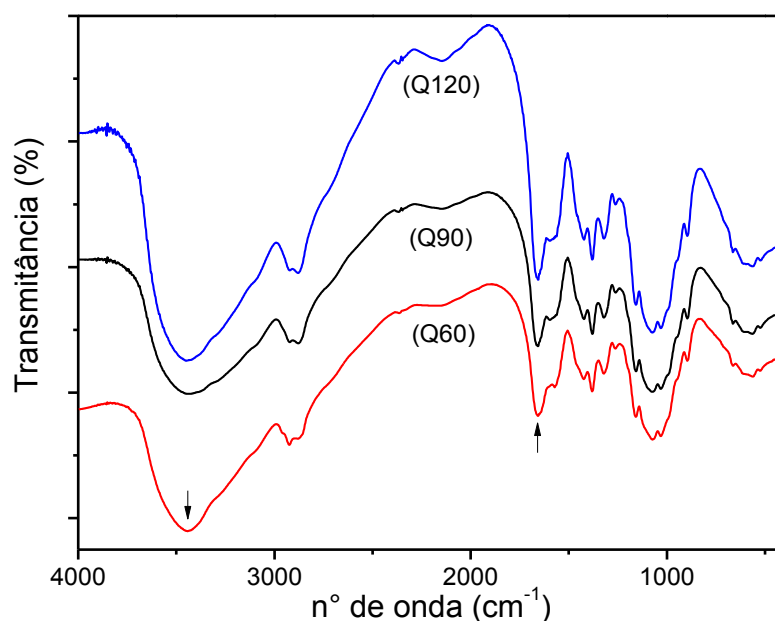


Figura 17 - Espectros vibracionais na região do Infravermelho das quitosanas obtidas em tempos de reação de 60 (Q60), 90 (Q90) e 120 (Q120) minutos.

Observa-se a presença da banda  $1652\text{ cm}^{-1}$  correspondente a deformação axial de  $\text{-C=O}$  que refere-se a amida I e os picos em  $1079\text{ cm}^{-1}$  e  $1034\text{ cm}^{-1}$  se referem ao deformação angular C-

O (WANULE *et al.*, 2014). Os sinais em  $1317\text{ cm}^{-1}$  e  $1360\text{ cm}^{-1}$  correspondem à deformação axial da ligação -N-H e a banda em  $1379\text{ cm}^{-1}$  se refere à deformação angular do grupo -CH<sub>3</sub>, conforme reportado por (SOUZA; ZAMORA; ZAWADZKI, 2010).

O pico  $1590\text{ cm}^{-1}$  corresponde à deformação da ligação do grupo -NH, enquanto as bandas observadas entre  $1600\text{-}1670\text{ cm}^{-1}$  estão associados à deformação angular da ligação presente na amida. Em  $1569\text{ cm}^{-1}$  observa-se a banda referente à deformação do grupo -NH<sub>2</sub> e a região próximo de  $1153\text{ cm}^{-1}$  corresponde à deformação angular da ligação -COC. A banda em  $2926\text{ cm}^{-1}$  está associada ao estiramento da ligação -C-H e a banda em  $3458\text{ cm}^{-1}$  refere-se ao estiramento da ligação -OH (SILVA *et al.*, 2016; DEMIR *et al.*, 2016; EL FARGANI *et al.*, 2016). Além disso, observa-se ainda a alteração da intensidade das bandas em  $1658\text{ cm}^{-1}$  e  $1590\text{ cm}^{-1}$  nas diferentes amostras. Esse resultado está intimamente ligado com a quantidade de quitina que foi transformada em quitosana através do processo de desacetilação, uma vez que esse processo reduz o total de ligações amida presentes e como consequência, há a redução da intensidade da banda em  $1658\text{ cm}^{-1}$  à medida que se converte mais quitina em quitosana (YAGHOBI; HORMOZI, 2010). Assim, percebe-se que com o aumento no tempo de reação das amostras a banda  $1590\text{ cm}^{-1}$  cresce discretamente, na mesma proporção em que a banda  $1658\text{ cm}^{-1}$  decresce, indicando que as quitosanas obtidas apresentaram diferentes graus de desacetilação (PAULINO *et al.*, 2006). Além disso, observa-se uma diferença em algumas faixas de absorção entre quitina e quitosana: a banda principal, que corresponde ao estiramento da ligação -OH na quitosana ocorre em  $3458\text{ cm}^{-1}$ . A banda em  $1658\text{ cm}^{-1}$  (amida I) que aparece para a quitosana é mais fraca do que para a quitina, que aparece em  $1660\text{ cm}^{-1}$  e isto explica por que a desacetilação está sempre associada com um enfraquecimento da banda amida I. Essas bandas encontradas nos espectros FTIR de quitosanas obtidas à partir dos resíduos do caranguejo

*D. pagei* foram similares às bandas de quitosana reportadas na literatura (BRUGNEROTTO *et al.*, 2001; PAULINNO *et al.*, 2006; ANDRADE *et al.*, 2012; RAMYA; SUDHA; MAHALAKSHMI, 2012; SILVA *et al.*, 2016; EL FARGANI *et al.*, 2016).

A partir dos valores obtidos nos espectros vibracionais no infravermelho pôde-se calcular o GD das amostras de quitosana. A amostra Q60 teve o GD de 68,45 %, enquanto que a amostra Q90 apresentou o GD em torno de 81,92 %. Por último, a amostra Q120 obteve o GD de 77,65 %. O que se observa é uma tendência crescente no GD com o aumento do tempo de reação. Entretanto, não foi observado um aumento do GD de Q90 para Q120, mesmo que a análise estatística da massa de quitosanas obtidas não sejam diferentes entre si. Uma explicação para tal fato se deve que a banda utilizada para a realização dos cálculos é muito sensível à presença de umidade na amostra, o que pode ter contribuído para que o valor utilizado na equação não seja o valor apropriado, levando a essa distorção no resultado.

Neste processo, os experimentos foram realizados a temperatura constante de 105 °C e em solução de NaOH a 10 mol L<sup>-1</sup>. Geralmente, há uma tendência a se obter porcentagem de NH<sub>2</sub> em torno de 70 % na primeira hora de reação quando a reação ocorre entre 100 e 120 °C e em concentração de NaOH de 10 mol L<sup>-1</sup> a 12,5 mol L<sup>-1</sup>, sendo que após uma hora de reação, a desacetilação ocorre de forma mais lenta (CANELLA; GARCIA, 2001). Os resultados obtidos neste processo estão próximos aos reportados por Yen, Yang e Mau (2009), os quais aplicaram as mesmas condições experimentais no processo de desacetilação da quitina do caranguejo marinho *C. opilio*. O GD afeta as propriedades físicas e químicas, como reatividade, solubilidade, biodegradabilidade e por consequência suas aplicações (ABDEL-MOHSEN *et al.*, 2011; ABDEL-MOHSEN *et al.*, 2012; ACHARYULU; GOMATHI; SUDHA, 2013; WANULE *et al.*, 2014).

## 5 CONCLUSÃO

A partir dos parâmetros experimentais empregados para a obtenção da quitina foi possível concluir que a remoção dos compostos inorgânicos, realizada através da etapa de desmineralização, utilizando concentrações mais elevadas de ácido clorídrico produziu resultados semelhantes entre si. Através da análise desses resultados pôde-se constatar que a composição estrutural dos resíduos do caranguejo *D. pagei* apresenta um elevado percentual de conteúdo mineral na forma de carbonato.

Na etapa de desproteínização, foi observado que a cinética da reação é muito mais lenta que a etapa de desmineralização, requisitando períodos de tempo superiores a 12 horas para remoção do conteúdo lipoproteico da estrutura, além de resultar em menor percentual de massa extraída que foi atribuída à um conteúdo orgânico não polimérico quando comparado à massa extraída do conteúdo mineral pelo processo de desmineralização. Contudo, a etapa de desproteínização não é suficiente para a remoção de todas as impurezas existentes na fração rica em quitina, sendo necessário a exposição dessa fração à solução oxidante para retirada dos pigmentos.

A caracterização dos materiais produzidos por técnicas de difração de raios X e análise termogravimétrica permitiram não somente a identificação adequada das fases obtidas, mas também auxiliaram na determinação mais precisa da composição das amostras do caranguejo amazônico. Observou-se pela análise de difração de raios X a predominância da fase cristalográfica  $\alpha$ -quitina no material polimérico obtido após a série de reações química. Esta análise mostrou que a quitosana tem uma estrutura semicristalina em comparação com a quitina. Os espectros vibracionais na região do infravermelho permite de maneira simples e rápida a

determinação do GD da quitosana. Os resultados revelaram ainda que o conteúdo polimérico presente na carapaça dessa espécie de caranguejo possui valores similares ao de outras espécies de crustáceos. Dessa forma, conclui-se que o caranguejo *D. Pagei* pode ser considerado como uma fonte viável de quitina para a produção de quitosanas com diferentes graus de desacetilação.

## REFERÊNCIAS

- ABRAM, A. P., HIGUERA, I. Em Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones, Abram, A. P., ed., Programa Cyted 2004, - Pontificia Universidad Catolica del Peru/Fondo Editorial: Lima, 2004.
- ABREU, F. R.; CAMPANA-FILHO, S. P. Preparation and Characterization of Carboxymethylchitosan. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 15, p. 79-83, 2005.
- ABDEL-MOHSEN, A. M., *et al.* Eco-Synthesis of PVA/Chitosan Hydrogels for Biomedical Application. *Journal of Polymers and the Environment*, v. 19, p. 1005-1012, 2011.
- ABDEL-MOHSEN, A. M., *et al.* A novel method for the preparation of silver/chitosan-O-methoxy polyethylene glycol core shell nanoparticles. *Journal of Polymers and the Environment*, v. 20, p 459-468, 2012.
- ABDEL-RAHMAN, R. M., *et al.* Chitin and chitosan from Brazilian Atlantic Coast: Isolation, characterization and antibacterial activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 80, p. 107-120, 2015.
- ABDOU, E. S., NAGY, K. S. A., ELSABEE, M. Z. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 1359-1367, 2008.
- ACHARYULU, R. S.; GOMATHI, T.; SUDHA, P. N. Physico-chemical characterization of cross linked chitosan-polyacrylonitrile polymer blends. *Der Pharmacia Lettre*, v. 5, p. 354-363, 2013.
- AHN, C-B.; LEE, E-R. Utilization of Chitin Prepared from the Shellfish Crust 1. Functional Properties of Chitin, Chitosan, and Microcrystalline Chitin. *Bulletin of the Korean Fisheries Society*, v. 25, p. 45-50, 1992.
- AKILA, R. M. Fermentative production of fungal Chitosan, a versatile biopolymer (perspectives and its applications). *Advances in Applied Science Research*, p. 5, p. 157-170, 2014.
- AL SAGHEER, F. A., *et al.* Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. *Carbohydrate Polymers*, v. 77, p. 410-419, 2009.
- ALVES, K. S. Obtenção de polímeros graftizados de quitosana e estudo das propriedades físico-químicas para aplicação na indústria de petróleo. 2013. 146f. Tese de Doutorado em Química, Centro de Ciências exatas e Terra, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFGN, Natal.
- AMEH, A. O., *et al.* Kinetics of demineralization of shrimp exoskeleton in chitin and chitosan synthesis. *Journal of Chemical Engineering and Materials Science*, v 4, p. 32-37, 2013.

ANAYA, P., *et al.* Chitosan gel film bandages: correlating structure, composition, and antimicrobial properties. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 121, p. 3939-3948, 2013.

ANDRADE, S. M. B., *et al.* The use of exoskeletons of shrimp (*Litopenaeus vanammei*) and crab (*Ucides cordatus*) for the extraction of chitosan and production of nanomembrane. *Materials Sciences and Applications*, v. 3, p. 495-508, 2012.

ANITHA, A., *et al.* Chitin and chitosan in selected biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, v. 39, p. 1644-1667, 2014.

ANTONINO, N. A. Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundos da indústria pesqueira Paraibana. 2007. 89f. Dissertação de Mestrado em Química (Química inorgânica), Universidade Federal da Paraíba – UFPB, João Pessoa.

ARANAZ, I., *et al.* Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current Chemical Biology*, Madri, v. 3, p. 203-230, 2009.

ARBIA, W., *et al.* Chitin extraction from crustacean shells using biological methods-a review. *Food Technology and Biotechnology*, v. 51, p. 12-25, 2013.

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

AUSTIN, P. R., *et al.* Chitin: New facets of research. *Science*, v. 212, p. 749-753, 1981.

AZEVEDO, V. C., *et al.* Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v. 2, p. 27-34, 2007.

BENHABILES, M. S., *et al.* Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. *Food Hydrocolloids*, v. 29, p. 48-56, 2012.

BILGIN, S.; FIDANBA, Z. U. C. Nutritional Properties of Crab (*Potamon potamios* Olivier, 1804) in the Lake of Egirdir (Turkey). *Pakistan Veterinary Journal*. v. 31, p. 239-243, 2011.

BOLAT, Y., *et al.* Chitin-Chitosan yield of freshwater crab (*Potamon potamios*, Olivier 1804) shell. *Pakistan Veterinary Journal*, v. 30, p. 227-231, 2010.

BORGOGNONI, C. F.; POLAKIEWICZ B.; PITOMBO. R. N. M. Estabilidade de emulsões de d-limoneno em quitosana modificada. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26. p. 502-508, 2006.

BRUGNEROTTO, J., *et al.* An Infrared Investigation in Relation with Chitin and Chitosan Characterization, *Polymer*, v. 42, p. 35-69, 2001.



CAHÚ, T. B., *et al.* Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste. *Process Biochemistry*, v.7, p. 570-577, 2012.

CAMPANA-FILHO, S. P., *et al.* Extração, Estruturas e Propriedades de  $\alpha$ -quitina e  $\beta$ -quitina. *Química Nova*, v. 30, p. 644-650, 2007.

CANELLA, K. M. N. C.; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por Cromatografia de Permeação em Gel - Influência do método de preparação e do solvente. *Química Nova*, v. 24, p. 13-17. 2001.

CÁRDENAS, G., *et al.* Chitin Characterization by SEM, FTIR, XRD, and  $^{13}\text{C}$  Cross Polarization/Mass Angle Spinning NMR. *Journal of Applied. Polymer. Science*, v. 93, p. 1876-1885, 2004.

CARLSTRÖM D. The crystal structure of  $\beta$ -chitin (poly-N-acetyl-dglucosamine). *Journal Biophys Biochem Cytol*, v. 3, p. 669-683, 1957.

CHANDUMPAIA, A., *et al.* Preparation and physico-chemical characterization of chitin and chitosan from the pens of the squid species, *Loligo lessoniana* and *Loligo formosana*. *Carbohydrate Polymers*, v. 58, p. 467-474, 2004.

CHAROENVUTTITHAM, P.; SHI, J.; GAURI, S. Mittal a Chitin Extraction from Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) Waste using Organic Acids. *Separation Science and Technology*, v. 41, p. 1135-1153, 2006.

CHEN, W. Y., *et al.* Effect of the ionic strength of the media on the aggregation behaviors of high molecule weight chitosan. *Journal of Polymer Research*, v. 18, p 1385-1395, 2011.

CHIAPPISI, L.; GRADZIELSKI, M. Co-assembly in chitosan-surfactant mixtures: Thermodynamics, structures, interfacial properties and applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 220, p. 92-107, 2015.

CLARK, G. L.; SMITH A. F. X-ray diffraction studies of chitin, chitosan, and derivatives. *Journal Physical Chemistry*, v. 40, p. 863-879, 1936.

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

COSTA, E. S. Rendimento e características físico-químicas da carne do camarão *Macrobrachium amazonicum* (HELLER, 1862) e do caranguejo *Dilocarcinus pagei* (STIMPSON, 1861). 2015. 83f. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia para recursos amazônicos. Universidade Federal do Amazonas -Instituto de Ciências Exatas e Tecnologias, Itacoatiara, AM.

DEMIR, D., *et al.* Extraction and Characterization of Chitin and Chitosan from Blue Crab and Synthesis of Chitosan Cryogel Scaffolds. *Journal of the Turkish Chemical Society: A Chemistry*, v. 3, p. 131-144, 2016.

ELIEH-ALI-KOMI, D.; HAMBLIN, M. R. Chitin and Chitosan: Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials. *International Journal of Advanced Research*, v. 4, p. 411-427, 2016.

EL FARGANI, H., *et al.* Valorization of shrimp co-products “*Pandalus borealis*”: Chitosan production and its use in adsorption of industrial dyes. *Journal of Materials and Environmental Science*, v. 7, p. 1334-1346, 2016.

EL FARGANI, H., *et al.* Removal of anionic dyes by silica-chitosan composite in single and binary systems: Valorization of shrimp co-product “*Crangon crangon*” and “*Pandalus borealis*”. *Journal of Materials and Environmental Sciences*, v. 8, p. 724-739, 2017.

ERDOGAN, S.; KAYA, M. High similarity in physicochemical properties of chitin and chitosan from nymphs and adults of a grasshopper. *International Journal of Biological Macromolecules*, 89, p. 118-126, 2016.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Rome, 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture Opportunities and challenges. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf>>. Acesso em: 13 de outubro de 2015.

FOSTER, L., *et al.* Chitosan as a Biomaterial: Influence of Degree of Deacetylation on Its Physiochemical, Material and Biological Properties. *PLOS ONE*, v. 10, p. 1-22, 2015.

GALED, G., *et al.* N-Deacetylation and depolymerization of chitin/chitosan: Influence of the source of chitin. *Carbohydrate Polymers*, v. 62, p. 316-320, 2005.

GREEN, J. H.; MATTICK, J. F. Fishery waste management. In *Food Processing Waste Management*; Green, J. H., Kramer, A., Eds.; AVI Publishing: Westport, CT, 1979, p. 202-227.

HAJJI, S., *et al.* Structural differences between chitin and chitosan extracted from three different marine sources. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 65, p. 298-306, 2014.

HAMED, I.; OZOGUL, F.; REGENSTEIN, J. M. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 48, p. 40-50, 2016.

HAMODRAKAS, S. J.; WILIS, J. H.; ICONOMIDOU, V. A. A structural model of the chitin-binding domain of cuticle proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 32, p. 1577-1583, 2002.

HENNIG, E. L. Utilização de quitosana obtida de resíduos de camarão para avaliar a capacidade de adsorção de íons  $Fe^{3+}$ . 2009. 73f. Dissertação de Mestrado, Química Tecnológica e Ambiental, Rio Grande-RS.

HEU, M. S.; KIM, J. S.; SHAHIDI, F. Componentes and nutritional quality of shrimp processing byproducts, *Food Chemistry*, v. 82, p. 235, 2003.

HIGUERA-CIAPARA, I.; FELIX-VALENZUELA L.; GOYCOOLEA, F. M. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 46, p. 185-196, 2006.

HU, L.; SUN, Y.; WU, Y. Advances in chitosan-based drug delivery vehicles. *Nanoscale*, v. 5, p. 3103-3111, 2013.

HUGGINS, M. L. The Viscosity of Dilute Solutions of Long-Chain Molecules, iv. Dependence on Concentration. *Journal of the American Chemical Society*, v. 64, p. 2716-2718, 1942.

IFUKU, S., *et al.* Preparation of chitin nano fibers from mushrooms. *Materials*, v. 4, p. 1417-1425, 2011.

ILNICKA, A.; WALCZYK, M.; LUKASZEWICZ, J. P. The fungicidal properties of the carbon materials obtained from chitin and chitosan promoted by copper salts. *Materials Science and Engineering C*, v. 52, p. 31-36 2015.

IQBAL, M. S., *et al.* Thermal studies of plant carbohydrate polymer hydrogels. *Carbohydrate Polymers*, v. 86, p. 1775-1783, 2011.

ISLAM, M. M., *et al.* Preparation of Chitosan from Shrimp Shell and Investigation of Its Properties. *International Journal of Basic & Applied Sciences*, v. 11, p. 116-130, 2011.

JANEGITZ, B. C., *et al.* Desenvolvimento de um Método Empregando Quitosana Para Remoção de Íons Metálicos de Águas Residuárias. *Química Nova*, v. 30, p. 879-884, 2007.

JANG, M. K., *et al.* Physicochemical characterization of  $\alpha$ -chitin,  $\beta$ -chitin, and  $\gamma$ -chitin separated from natural resources. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, vol. 42, p. 3423-3432, 2004.

JEUNIAUX, C. La Chitine dans la regne animal. *Bulletin de la Société Zoologique de France*, 107, p. 363-386, 1982.

JUÁREZ-DE LA ROSA, B. A., *et al.* Effects of thermal treatments on the structure of two black coral species chitinous exoskeleton. *Journal of Materials Science Letters*, v. 47, p. 990-998, 2012.

LERTSUTTHIWONG, P., *et al.* Effect of Chemical Treatment on the Characteristics of Shrimp Chitosan. *Journal of Metals, Materials and Minerals*. v. 12, p. 11-18, 2002.

LIM, L. Y.; WAN, L. S. C. Heat treatment of chitosan films. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 21, p. 839-846, 1995.

LIU X, OSAWA T. Cis astaxanthin and especially 9-cis astaxanthin exhibits a higher antioxidant activity in vitro compared to the all-trans isomer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 357, p. 187-193, 2007.

LIU, S., *et al.* Extraction and characterization of chitin from the beetle *Holotrichia parallela* Motschulsky. *Molecules*, v. 17, p. 4604-4611, 2012.

KAYA, M., *et al.* Chitin extraction and characterization from *Daphnia magna* resting eggs. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.61, p. 459-464, 2013.

KAYA, M., *et al.* New Chitin, Chitosan, and O-Carboxymethyl Chitosan Sources from Resting Eggs of *Daphnia longispina* (Crustacea); with Physicochemical Characterization, and Antimicrobial and Antioxidant Activities. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 19, p. 58-69, 2014a.

KAYA, M., *et al.* A physicochemical characterization of fully acetylated chitin structure isolated from two spider species: With new surface morphology. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 65, p. 553-558, 2014b.

KAYA, M., *et al.* Fluctuation in physicochemical properties of chitins extracted from different body parts of honeybee. *Carbohydrate Polymers*, v. 132, p. 9-16, 2015a.

KAYA, M., *et al.* Surface morphology of chitin highly related with the isolated body part of butterfly (*Argynnis pandora*). *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 81, p. 443-449, 2015b.

KAYA, M., *et al.* Comparison of chitin structures isolated from seven Orthoptera species. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 72, p. 797-805, 2015c.

KAYA, M., *et al.* Differentiations of Chitin Content and Surface Morphologies of Chitins Extracted from Male and Female Grasshopper Species. *PLOS ONE*, v. 10, 0115531, 2015d. . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115531>.

KAYA, M., *et al.* Chitosan nanofiber production from *Drosophila* by electrospinning. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 92, p. 49-55, 2016a.

KAYA, M., *et al.* Porous and nanofiber  $\alpha$ -chitosan obtained from blue crab (*Callinectes sapidus*) tested for antimicrobial and antioxidant activities. *LWT - Food Science and Technology*, v. 65, p. 1109-1117, 2016b.

KHANAFARI, A.; MARANDI, R.; SANATEI, S. Recovery of chitin and chitosan from shrimp waste by chemical and microbial methods. *Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering*, v. 5, p. 19-24, 2008.

KHOR, E.; LIM, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, v. 24, 2339-2349, 2003.

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

KUMARI, S.; RATH, K. P. Extraction and Characterization of Chitin and Chitosan from (Labeorohit) Fish Scales. *Procedia Materials Science*, v. 6, p. 482-489, 2014.

KUMARI, S., *et al.* Extraction and characterization of chitin and chitosan from fishery waste by chemical method. *Environmental Technology & Innovation*, v. 3, p. 77-85, 2015.

MAGALHÃES, C. Familias Pseudothelphusidae e Trichodactylidae. In: *MANUAL DE IDENTIFICAÇÃO DOS CRUSTÁCEOS DECAPODOS DE ÁGUA DOCE DO BRASIL*. Melo, G. A. S. Edições Loyola. São Paulo, 2003, p. 143-297.

MAGALHÃES, C., *et al.* Diversity, distribution and conservation of the freshwater crabs and shrimps in South America. In *A GLOBAL OVERVIEW OF THE FRESHWATER DECAPOD CRUSTACEANS*. Kawai, T; Cumleridge, N., eds.; Springer International Publishing. 2016, p. 304-322.

MAHDAVI, B.; RAHIMI, A. Seed priming with chitosan improves the germination and growth performance of ajowan (*Carum copticum*) under salt stress. *Eurasian Journal of Biosciences*, v. 7, p. 69-76, 2013.

MARENGO, J. A; ESPINOZA, J. C. Extreme seasonal droughts and floods in Amazonia: causes, trends and impacts *International Journal of Climatology*, v. 36, p. 1033-1050, 2016.

MATO GROSSO DO SUL, Lei Estadual N° 2.898 de 29 de outubro de 2004.

MATOS, S. R. M. Caracterização dos resíduos do camarão *Litopenaeus vannamei* e avaliação de suas potencialidades como flavorizante. 2005. 68f. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Pesca - Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza.

MATHUR, N. K.; NARANG, K. C. Chitin and Chitosan, Versatile Polysaccharides from Marine Animals. *Journal of Chemical Education*, v. 67, p. 938-932, 1990.

MOHAMMED, M. H., WILLIAMS, P. A.; TVEREZOVSKAYA, O. Extraction of chitin from prawn shells and conversion to low molecular mass chitosan. *Food Hydrocolloids*, v. 31, p. 166-171, 2013.

MOHANASRINIVASAN, V.; MISHRA, M.; PALIWAL, J. S. Studies on heavy metal removal efficiency and antibacterial activity of chitosan prepared from shrimp shell waste. *3 Biotech*, v. 4, p. 167-175, 2013.

MUZZARELLI, R. A. A. Chitin; Pergamon Press: Oxford, UK, 1977, 309 p.

MUZZARELLI, R. A. A., *et al.* Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the

carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial. *Carbohydrate Polymers*, v. 87, p. 995-1012, 2012.

NAKAGAWA, Y. S., *et al.* A small lytic polysaccharide monoxygenase from *Streptomyces griseus* targeting  $\alpha$ - and  $\beta$ -chitin. *FEBS Journal*, v. 282, p. 1065-1079, 2015.

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

ODUOR-ODOTE, P. M.; STRUSZCZYK, M. H.; PETER, M. G. Characterisation of Chitosan from Blowfly Larvae and Some Crustacean Species from Kenyan Marine Waters Prepared Under Different Conditions. *Western Indian Ocean Journal Marine Science*, v. 4, p. 99-107, 2005.

OGAWA, M., *et al.* Resíduos do beneficiamento do camarão cultivado: Obtenção de pigmentos carotenoides. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, p. 333-337, 2007.

OLIVEIRA, B. S.; NUNES M. L. Avaliação de quitosana de caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*) como biofilme protetor em caju. *Scientia Plena*, v. 7, p. 1-6, 2011.

OLORUNSOLA, E. O., *et al.* Extraction and physicochemical characterization of a potential multifunctional pharma-excipient from crab shell wastes. *African Journal of Biotechnology*, v. 14, p. 2856-2861, 2015.

OKAMOTO, Y., *et al.* Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. *Carbohydrate Polymers*, v. 53, p. 337-342, 2003.

ORREGO, C. E., *et al.* Novel chitosan membranes as support for lipases immobilization: Characterization aspects. *Carbohydrate Polymers*, v. 79, p. 9-16, 2010.

PARK, B. K.; KIM, M. M. Applications of chitin and its derivatives in biological medicine. *International Journal of Molecular sciences*, v. 11, p. 5152-5164, 2010.

PAULINO, A. T., *et al.* Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides, *Carbohydrate Polymers*, v. 64, p. 98-103, 2006.

PAWADEE, M., *et al.* Hetrogeneous Ndeacetylation of squid chitin in alkaline solution. *Carbohydrate Polymers*, v. 52, p. 119-123, 2003.

PAWLAK, A.; MUCHA, M. Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends. *Thermochimica Acta*, v. 396, p. 153-166, 2003.

PENICHE-COVAS, C.; JIMÉNEZ, M. S. Characterization of silver-binding chitosan by thermal analysis and electron impact mass spectrometry. *Carbohydrate Polymers*, v. 9, p. 249-256, 1988.

PERCOT, A.; VITON, C.; DOMARD, A. Optimization of Chitin Extraction from Shrimp Shells. *Biomacromolecules*, v. 4, p. 12-18, 2003.

PEREIRA, F. S. *et al.* Thermal studies of chitin–chitosan derivatives. *Journal of Thermal Analyses and Calorimetry*, v. 114, p. 321-327, 2013.

PHILIPPOVA, O. E., *et al.* Aggregation of some water-soluble derivatives of chitin in aqueous solutions: Role of the degree of acetylation and effect of hydrogen bond breaker. *Carbohydrate Polymers*, v. 87, p. 687-694, 2012.

PILLAI, C. K. S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, v. 34, p. 641-678, 2009.

PUVVADA, Y. S.; VANKAYALAPATI, S.; SUKHAVASI, S. Extraction of chitin from chitosan from exoskeleton of shrimp for application in the pharmaceutical industry. *International Current Pharmaceutical Journal*, v. 1, p. 258-263, 2012.

PRASHANTH, K. V. H.; THARANATHAN, R. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential – an overview. *Trends in Food Science & Technology*, v. 18, p. 117-131, 2007.

RAABE, D., *et al.* Preferred crystallographic texture of  $\alpha$ -chitin as amicroscopic and macroscopic design principle of the exoskeleton of the lobster *Homarus americanus*. *Acta Biomaterialia*, v. 3, p. 882-895, 2007.

RABEA, E. I., *et al.* Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules*, v.4, p. 1457-1465, 2003.

RAHMAN, M. A.; HALFAR, J.; SHINJO, R. X-Ray Diffraction Is a Promising Tool to Characterize Coral Skeletons. *Advances in Materials Physics and Chemistry*, v. 3, 120-125, 2013.

RAMÍREZ, M. A., *et al.* Chitin and its derivatives as biopolymers with potential agricultural applications. *Biotechnology Aplicada*, v. 27, p. 270-276, 2010.

RAMYA, R.; SUDHA, P. N.; MAHALAKSHMI, J. Preparation and characterization of chitosan binary blend. *International journal of Scientific and Research Publications*, v. 2, p. 1-9, 2012.

RINAUDO, M. Main properties and applications of some polysaccharide as biomaterials. *Polymer International*, v. 57, p. 397-430, 2008.

RINAUDO, M. Chitin and Chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, v. 31, p. 603-632, 2006.

RHAZI, M., *et al.* Investigation of different natural sources of chitin: influence of the source and deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan. *Polymer International*, v. 49, p. 337-344, 2000.

ROBERTS, G. A. F. Structure of chitin and chitosan, in: G. A. F. Roberts, (Ed.), Chitin Chemistry, Palgrave Macmillan, London, UK, 1992, p. 85-91.

ROBERTS, A. F.; DOMSZY, J. G. Determination of the viscosimetric constants for chitosan. International Journal of Biological Macromolecules, v. 4, p. 374-377, 1982.

SAKTHIVEL, D.; VIJAYAKUMAR, N.; ANANDAN, V. Extraction of Chitin and Chitosan from Mangrove Crab *Sesarma plicatum* from Thengaithittu Estuary Pondicherry Southeast Coast of India. International Journal of Pharmacy e Pharmaceutical Research, v. 4, p. 12-24, 2015.

SANTOS, J. E., *et al.* Caracterização de Quitosanas Comerciais de Diferentes Origens. Polímeros: Ciência e Tecnologia, v. 13, p. 242-249, 2003.

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

SEABRA, L. M. J.; PEDROSA, L. F. C. Astaxanthin: structural and functional aspects. Revista de Nutrição, v. 23, p. 1041-1050, 2010.

SENEL, S., *et al.* Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery. International Journal of Pharmaceutics, v. 193, p.197-203, 2000.

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

SHEN, X., *et al.* Hydrogels based on cellulose and chitin: fabrication, properties, and applications. Green Chemistry, v. 18, p. 53-75, 2016.

SILVA, M. C., *et al.* Avaliação do método de obtenção de scaffolds quitosana/curcumina sobre a estrutura, morfologia e propriedades térmicas. Revista Matéria, v. 21, p. 560-568, 2016

SOLOMONS, T. W. G.; FRIHLE, C. B. Química Orgânica. 9. ed., Rio de Janeiro: LTC, 2009. 494 p.

SOUZA, K. V.; ZAMORA, P. G. P.; ZAWADZKI, S. F. Esferas de quitosana/Fe na degradação do corante Azul QR-19 por processos foto-Fenton utilizando luz artificial ou solar. Polímeros, v. 20, p. 210-214, 2010.

SPIN-NETO, R.; PAVONE, C.; FREITAS, R. M. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. Revista de Odontologia da UNESP, v. 37, p. 155-161, 2008.

SU, C-H., *et al.* Fungal mycelia as the source of chitin and polysaccharides and their applications as skin substitutes. Biomaterials, v. 16, p. 1169-1174, 1997.



SYNOWIECKI, J.; AL-KHATEEB, N. A. The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp *Crangon crangon* processing discards. *Food Chemistry*, v. 68, p. 147-152, 2000.

TANODEKAEW, S., *et al.* Preparation of acrylic grafted chitin for wound dressing application. *Biomaterials*, v. 25, p. 1453-1460, 2004.

TENG, D. From chitin to chitosan. In Yao, K.; Li, J.; Yao, F.; Yin, Y. (Eds.), *Chitosan based hydrogels: functions and application*, Boca Raton, Florida: CRC Press, 2011, p. 2-33.

TELI, M. D.; SHEIKH, J. Extraction of chitosan from shrimp shells waste and application in antibacterial finishing of bamboo rayon. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 50, p. 1195-1200, 2012.

THARANATHAN, R. N.; KITTUR, F. S. Chitin — The Undisputed Biomolecule of Great Potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 43, p. 61-87, 2003.

TOLAIMATE, A., *et al.* On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin. *Polymer*, v. 41, p. 2463-2469, 2000.

TOLAIMATE, A., *et al.* Contribution to the preparation of chitin and chitosan with controlled physicochemical properties. *Polymer*, v. 44, p. 7939-7952, 2003.

TRIVEDI, V R., *et al.* Single-blind placebo controlled randomised clinical study of chitosan for body weight reduction. *Nutrition Journal*, v. 15, 2-12, 2016.

VARUM, K. M.; OTTOY, M, H.; SMIDIROD, O. Acid hydrolysis of Chitosans. *Carbohydrate Polymers*, v. 46, p. 89-98, 2001.

VILLETTI, M. A., *et al.* Thermal degradation of natural polymers. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 67, p. 295-303, 2002.

WANG, Y., *et al.* Crystalline structure and thermal property characterization of chitin from Antarctic krill (*Euphausia superba*). *Carbohydrate Polymers* v. 92, p. 90-97, 2013

WANJUN, T.; CUNXIN, W.; DONGHUA, C. Kinetic studies on the pyrolysis of chitin and chitosan. *Polymer Degradation and Stability*, v. 87, p. 389-394, 2005.

WANULE, D., *et al.* Extraction and FTIR Analysis of Chitosan from American cockroach, *Periplaneta americana*. *International Journal of Engineering Science and Innovative Technology*, v. 3, p. 299-304, 2014.

WESKA, R. F., *et al.* Optimization of deacetylation in the production of chitosan from shrimp wastes: use of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, v. 80, p. 749-753, 2007.

WU, T., *et al.* Physicochemical Properties and Bioactivity of Fungal Chitin and Chitosan. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v. 53, p. 3888-3894, 2005.

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

YEN, M. T.; YANG, J-H.; MAU, J-L. Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers*, v. 75, p. 15-21, 2009.

YOGESHKUMAR, G. N.; ATUL, G. S.; ADHIKRAO, Y. V Chitosan and its applications: A review of literature. In *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, v. 4, n. 1, p. 312-331, 2013.

YOUNES, I., *et al.* Chitin and chitosan preparation from shrimp shells using optimized enzymatic deproteinization. *Process Biochemistry*, v. 47, p. 2032-2039, 2012.

YOUNES, I. *et al.* Chitin extraction from shrimp shell using enzymatic treatment. Antitumor, antioxidant and antimicrobial activities of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 69, p. 489-498, 2014.

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

YUAN, Y., *et al.* Deacetylation of chitosan: material characterization and *in vitro* evaluation via albumin adsorption and pre-osteoblastic cell cultures. *Materials*, v. 4, p. 1399-1416, 2011.

ZAHORSKA-MARKIEWICZ, B., *et al.* Effect of chitosan in complex management of obesity. *Polski Merkuriusz Lekarski*, v. 13, p.129-132, 2002.

ZELENCOVA, L., *et al.* Chitin Extraction and Chitosan Production from Chilopoda (*Scolopendra cingulata*) with Identification of Physicochemical Properties. *Polymer Science*, v. 57, p. 437-444, 2015.

ZENG, D.; MEI, X.; WU, J. Effects of an environmentally friendly seed coating agent on combating head smut of corn caused by *Sphacelotheca reiliana* and corn growth. *Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development*, v. 2, p. 108-112, 2010.

ZENG, D.; LUO, X.; TU, R. Application of bioactive coatings based on chitosan for soybean seed protection. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 1-5, 2012.

ZHANG, H., *et al.* Preparation of chitooligosaccharides from chitosan by a complex enzyme. *Carbohydrate Research*, v. 320, p. 257-260, 1999.

ZHETCHEVA, V. D. K.; PAVLOVA L. P. Synthesis and characterization of a decavanadate/chitosan complex. *Turkish Journal of Chemistry*, v. 35, p. 221-223, 2011.