UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Otimização e padronização de processos para obtenção de quitosana purificada para uso farmacêutico e alimentício

Bruna Aparecida Coutinho Fogaça de Lacerda

São Paulo

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Otimização e padronização de processos para obtenção de quitosana purificada para uso farmacêutico e alimentício

Bruna Aparecida Coutinho Fogaça de Lacerda

Versão Original

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientador: Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço

São Paulo
2019

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Lo

Lacerda, Bruna Aparecida Coutinho Fogaça de Lacerda
Otimização e padronização de processos para obtenção de quitosana purificada para uso farmacêutico e alimentício / Bruna Aparecida Coutinho Fogaça de Lacerda Lacerda. - São Paulo, 2019.
105 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Louren?o, Felipe Rebello Louren?o

1. Quitosana. 2. Quitina. 3. Planejamento de experimentos. 4. Qualidade por design. I. T. II. Lourenço, Felipe Rebello Lourenço, orientador.

Bruna Aparecida Coutinho Fogaça de Lacerda

Otimização e padronização de processos para obtenção de quitosana purificada para uso farmacêutico e alimentício

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço
Orientador/presidente

_____
1º examinador

_____
2º examinador

_____
3º examinador

São Paulo, _____de _____de 2019.

Agradeço a Deus e a minha família pela oportunidade de concluir esse estudo que foi para mim um grande aprendizado.

AGRADECIMENTOS

Ao meu amado esposo Victor por toda paciência, torcida, força e companheirismo que representou para eu conseguir realizar o curso de pós-graduação. Por toda a motivação, amor e segurança que me deu para eu alcançar o objetivo de finalizar o curso de mestrado através do meu conhecimento.

Aos meu pais, Nivaldo e Clara por sempre terem acreditado nos meus sonhos, por terem feito de mim uma mulher corajosa e determinada, por toda dedicação, confiança e orações para eu conseguir realizar mais esse objetivo.

Aos meus irmãos Otavio, Leandro e Renan que são a minha motivação para estudar, aprender e querer ser alguém melhor a cada dia.

Ao professor Felipe por ter me aceitado como aluna e ter me ensinado tanto, por todas as correções, aulas e conversas, pela dedicação e por todos os conselhos que me fizeram chegar ao final dos experimentos com sucesso.

Ao Sr Antonio Bettega pela doação da quitina e por toda torcida.

RESUMO

FOGAÇA, B.A.C.L. **Otimização e padronização de processos para obtenção de quitosana purificada para uso farmacêutico e alimentício.** 2019. 105p. Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Quitosana é um biopolímero encontrado principalmente na parede celular de crustáceos e é obtida pela desacetilação da quitina. Como biopolímero a quitosana é utilizada como excipiente para medicamentos e composição de alimentos. No entanto a quitosana devidamente purificada para uso farmacêutico ou alimentício tem custo financeiro elevado. Outro fator que contribui para o uso limitado é a falta de procedimento padronizado para desacetilação, o que resulta em materiais com diferentes graus de qualidade, dificultando suas aplicações e controle de qualidade de matéria prima e produto. Este trabalho tem como principal objetivo estabelecer procedimento reprodutível para a extração da quitina e da quitosana, por meio da aplicação dos conceitos de *Quality by Design* e planejamento de experimentos. A quitosana foi obtida pela desacetilação da quitina de crustáceos pelas etapas de desmineralização, desproteinização e despigmentação. O procedimento técnico para purificação da quitosana foi definido a partir de planejamento fatorial com ponto central para as etapas otimizadas, por meio da aplicação dos conceitos de *Quality by Design* e planejamento de experimentos. O projeto definiu um procedimento padronizado para purificação da quitosana que pode ser empregado em escala industrial, e financeiramente vantajoso para produção de medicamentos ou alimentos.

Palavras chave: Quitosana, quitina, planejamento de experimentos, qualidade por *design*

ABSTRACT

FOGAÇA, B.A.C.L. **Optimization and standardization of processes to obtain purified chitosan for pharmaceutical and food use.** 2019. 105p. Department of Pharmacy, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2019.

Chitosan is a biopolymer found mainly in the cell wall of crustaceans and is obtained by the deacetylation of chitin. As biopolymer chitosan is used as excipient for medicaments and food composition. However, chitosan duly purified for pharmaceutical or food use has a high financial cost. Another factor that contributes to the limited use is the lack of standardized procedure for deacetylation, which results in materials with different grades of quality, hindering their applications and quality control of raw material and product. This work has as main objective to establish a reproducible procedure for the extraction of chitin and chitosan, through the application of the concepts of Quality by Design and planning of experiments. Chitosan was obtained by the deacetylation of chitin from crustaceans through the demineralization, deproteinization and depigmentation stages. The technical procedure for purification of chitosan was defined from a factorial planning with a central point for the optimized steps, through the application of the concepts of Quality by Design and planning of experiments. The project defined a standard procedure for the purification of chitosan that can be used on industrial scale and financially advantageous for the production of medicines or foods.

Keywords: chitosan, chitin, design of experiments, quality by design

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 23

2. REVISÃO DE LITERATURA 27

2.1. Quitina 27

2.2. Quitosana 29

2.2.1. Fontes de quitina e quitosana 31

2.3. Propriedades da quitosana 34

2.4. Isolamento da quitina e preparação da quitosana 37

2.5. Principais aplicações 39

3. OBJETIVOS 45

3.1. Geral 45

3.2. Específicos 45

4. JUSTIFICATIVA 49

5. MATERIAIS E MÉTODOS 53

5.1. Obtenção e armazenamento da matéria prima 53

5.2. Obtenção da quitina 53

5.3. Desmineralização 53

5.3.1. Teor de cinzas 55

5.4. Desproteinização 55

5.4.1. Analise elementar (C, H e N) 56

5.5. Obtenção de Quitosana 57

5.5.1. Titulação potenciométrica 58

5.6. Caracterização Físico Química de Quitina 58

5.6.1. Determinação do grau de desacetilação da quitina 58

5.7. Simulações de Monte Carlo para avaliação da capacidade do processo 60

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO 63

6.1. Otimização da Desmineralização 63

6.2. Otimização da Desproteinização 70

6.3. Otimização da Desacetilação 79

6.4. Simulações de Monte Carlo para avaliação da capacidade do processo 85

2. CONCLUSÕES 93

3. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA 97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Principais técnicas utilizadas na determinação do grau de desacetilação e suas respectivas referências..... 36

Tabela 2 Planejamento fatorial com ponto central para a otimização da etapa de desmineralização..... 54

Tabela 3 Planejamento fatorial com ponto central para a otimização da etapa de desproteinização..... 56

Tabela 4 Planejamento fatorial com ponto central para a otimização da etapa de desacetilação (método 1)..... 57

Tabela 5 Parâmetros de entrara para as simulações de Monte Carlo com a finalidade de avaliar a capacidade do processo. 60

Tabela 6 Determinação do teor de cinzas das amostras após o processo de desmineralização sob diferentes condições de massa (g/mL), concentração de ácido clorídrico (M) e tempo (h)..... 64

Tabela 7 Determinação do rendimento e aspectos macroscópicos do exoesqueleto de camarão após o processo de desmineralização..... 65

Tabela 8 Determinação do teor de cinzas das amostras após o processo de desmineralização sob diferentes condições de massa (g/mL), concentração de ácido clorídrico (M) e tempo (h)..... 66

Tabela 9 Determinação do rendimento e aspectos macroscópicos do exoesqueleto de camarão após o processo de desmineralização..... 66

Tabela 10 Determinação do teor de cinzas das amostras após o processo de desmineralização sob diferentes condições de massa (g/mL), concentração de ácido clorídrico (M) e tempo (h)..... 67

Tabela 11 Determinação do rendimento e aspectos macroscópicos do exoesqueleto de camarão após o processo de desmineralização..... 67

Tabela 12 Análise de variância (ANOVA) do teor de cinzas (Y1) em função da massa de amostra (X1), da concentração de solução de ácido clorídrico (X2), e do tempo de desmineralização (X3)..... 68

Tabela 13 Determinação do teor de nitrogênio das amostras após o processo de desproteinização sob diferentes condições de concentração de hidróxido de sódio (M), tempo (h) e temperatura (ºC)..... 71

Tabela 14 Determinação do rendimento e aspectos macroscópicos do exoesqueleto de camarão após o processo de desproteinização..... 72

Tabela 15 Análise de variância (ANOVA) do teor de nitrogênio (Y2) em função da concentração de solução de hidróxido de sódio (X4), do tempo de desproteinização (X5) e da temperatura (X6)..... 73

Tabela 16 Resultados da titulação potenciométrica da quitina obtida após os processos de desmineralização e desproteinização otimizados, empregando-se solução de hidróxido de sódio 0,1 M..... 77

Tabela 17 Resultados das medidas de pH obtidos durante a titulação potenciométrica da QTS purificada nos ensaios 1 a 8..... 80

Tabela 18 Determinação do grau de desacetilação das amostras após o processo de desacetilação sob diferentes condições de concentração de hidróxido de sódio (%), tempo (h) e temperatura (ºC)..... 83

Tabela 19 Análise de variância (ANOVA) do grau de desacetilação em função do tempo (h), temperatura (ºC) e concentração de NaOH (%)..... 84

Tabela 20 Resultados das simulações de Monte Carlo para o teor de cinzas (Y1), teor de nitrogênio (Y2) e grau de desacetilação (Y3) obtidos nas condições otimizadas..... 89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura molecular da quitina..... 27

Figura 2 Representação esquemática das estruturas polimórficas de α-quitina , β-quitina e γ-quitina..... 28

Figura 3 Representação esquemática da desacetilação da quitina para obtenção de quitosana..... 30

Figura 4 Estrutura molecular da quitosana..... 30

Figura 5 Quitina (%) presente em diferentes organismos (sobrescrito: X a = peso da cutícula orgânica; X b= no DW do corpo; X c= peso fresco do corpo; Xd = peso total da cutícula; X e= DW da parede celular)..... 32

Figura 6 Isolamento de quitina e preparação de quitosana..... 38

Figura 7 Representação esquemática da titulação potenciométria para determinação da desacetilação da quitina..... 59

Figura 8 Aspecto microscópico do processo de desmineralização..... 65

Figura 9 Gráfico de superfície resposta do teor de cinzas em função da concentração da solução de ácido clorídrico (HCl) e massa da amostra (Massa)..... 69

Figura 10 Aspecto microscópico do processo de desproteinização..... 72

Figura 11 Gráfico de superfície resposta do teor de nitrogênio em função da concentração da solução de hidróxido de sódio (HCl) e temperatura (ºC), considerando-se o tempo de desproteinização fixado em 150 min..... 74

Figura 12 Gráfico de superfície resposta do teor de nitrogênio em função da concentração da solução de hidróxido de sódio (HCl) e tempo (min) de desproteinização, considerando-se temperatura fixada em 64ºC..... 75

Figura 13 Gráfico de superfície resposta do teor de nitrogênio em função do tempo (min) de desproteinização e da temperatura (ºC), considerando-se a concentração de hidróxido de sódio fixada em 2,0 M..... 76

Figura 14 Gráfico de pH em função do volume de solução de hidróxido de sódio adicionado durante a titulação potenciométrica da quitina obtida após os processos de desmineralização e desproteinização..... 78

Figura 15 Pontos de inflexão da curva referentes à massa de NaOH necessária para neutralizar H+ livre e o H+ dos grupamentos amino protonados para os ensaios 1 a 4..... 81

Figura 16 Pontos de inflexão da curva referentes à massa de NaOH necessária para neutralizar H+ livre e o H+ dos grupamentos amino protonados para os ensaios 5 a 8..... 82

Figura 17 Gráfico de superfície resposta do grau de desacetilação (%GD) em função do tempo (h) e da concentração de NaOH (%)..... 85

Figura 18 Histograma do teor de cinzas (Y1) obtido a partir de simulações de Monte Carlo em condições otimizadas para o processo de desmineralização..... 86

Figura 19 Histograma do teor de nitrogênio (Y2) obtido a partir de simulações de Monte Carlo em condições otimizadas para o processo de desproteinização..... 87

Figura 20 Histograma do grau de desacetilação (Y3) obtido a partir de simulações de Monte Carlo em condições otimizadas para o processo de desacetilação..... 88

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A quitosana (Qt) é um polissacarídeo linear encontrado em abundancia da natureza, obtido pela desacetilação alcalina da quitina, um polímero encontrado no exoesqueleto de crustáceos como camarão caranguejo e lagostas, moluscos, insetos e na parede celular dos fungos, possui estrutura química composta de unidades de D-glucosamina e N-acetil-glicosamina unidas através de ligações glicosídicas β(1-4) (RIBEIRO et al, 2017) .

A extração da quitina pode ser realizada de diversas formas, dependendo da composição da fonte, que varia de uma espécie para outra, geralmente realizada pela desmineralização, seguida da desproteinização e despigmentação. A desmineralização é responsável pela remoção ácida do carbonato de cálcio, a desproteinização tem a função de eliminar o nitrogênio proteico e a despigmentação remove os pigmentos (ANTONINO et al, 2017)

A Qt exibe propriedades estruturais e funcionais que oferece diversas aplicações industriais na resolução de problemas e evolução tecnológica no campo ambiental, agrícola, cosmético, farmacêutico e principalmente em aplicações alimentares devido à sua atividade antimicrobiana, más até hoje os únicos estudos para purificação da quitina para obtenção de quitosana em escala industrial são patentes, relatórios concisos sobre otimização da produção de quitosana são praticamente inexistentes. (VASQUEZ, et al 2017)

A Qt possui aplicação reconhecida na área farmacêutica, alimentícia, biomédica e cosmética devido a suas propriedades favoráveis como baixa toxicidade, alta biodegradabilidade e biocompatibilidade, graças a sua

versatilidade, a quitosana alcançou o reconhecimento geral como Safe (GRAS) da Food and Drug Administration (FDA) tornando-se um biopolímero atraente para aplicações farmacêuticas. (PERINELLI, et al 2018)

A Qt vem sendo amplamente utilizada no setor alimentício em países desenvolvidos, como Estados Unidos, Alemanha e Japão, como agente conservante em macarrão, molho de soja, sardinha, entre outros; contudo, dados quanto às condições de processamento/formulação, todavia são escassas (FAI et al., 2008).

Uma das características mais importantes da quitosana é o seu grau de desacetilação (GD) que é definido como o percentual médio de grupos $–NH_2$ remanescentes ao longo da cadeia da Qt após a desacetilação da quitina (BARROS; BRANT; CATALANI, 2011). Para a determinação do GD muitos métodos têm sido propostos, tais como; espectroscopia de raios-X, espectroscopia infravermelho (IR), espectroscopia UV-Vis, espectrometria de massa (MS), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e titulação potenciométrica (KUMBAR et al 2000; HIDALGO, SUÁREZ; FERNÁNDEZ, 2008; WU; ZIVANOVID, 2008; ZHANG et al, 2010).

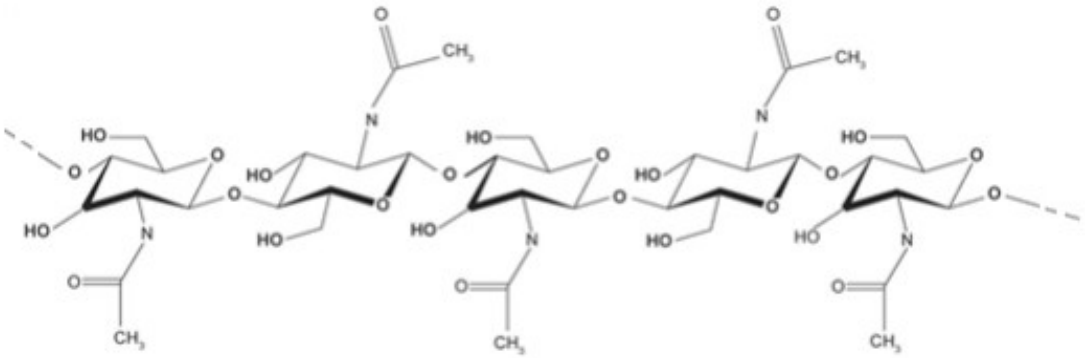
REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Quitina

A quitina é o polímero mais difundido na natureza, é componente estrutural responsável por fornecer força ao exoesqueleto de crustáceos e o principal componente da parede celular de insetos e fungos, possui estrutura linear de N-acetil- β-dglucosamina ligada a β-1-1 (GlcNac) e massa molecular variável. (KIDIBULE, et al 2018) cuja a estrutura está representada pela **Figura 1**.

Figura 1. Estrutura molecular da quitina (Fonte: ARANAZ et al, 2009).



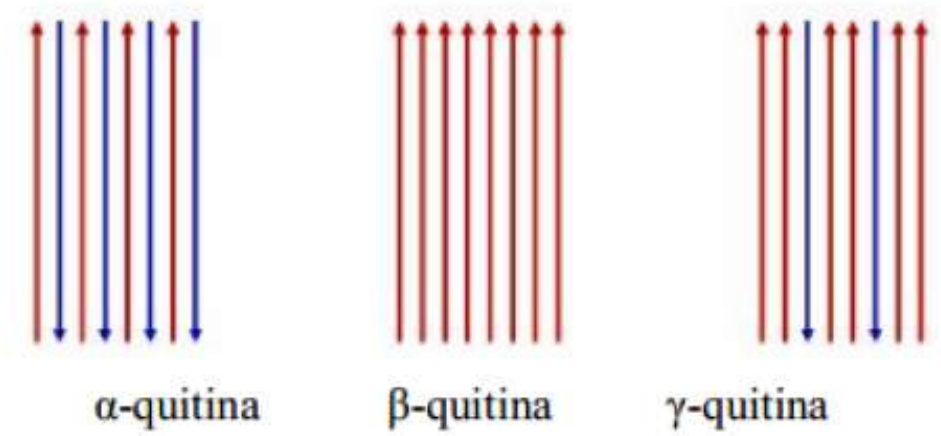
A quitina é um importante e abundante recurso de biomassa natural e renovável juntamente com a celulose, os dois polímeros tem estrutura molecular semelhante na qual a única diferença é a substituição do grupo hidroxila no carbono C-2 do anel piranosídico por um grupo acetamido, a quitina e a celulose são moléculas de estrutura rígida devido as ligações de hidrogênio inter e

intramoleculares, e isso justifica a insolubilidade em água e na maioria dos solventes orgânicos. (DUAN, et al 2018).

A quitina usada comercialmente é extraída principalmente do exoesqueleto de camarões, tem cerca de 20 a 30% de quitina que está intimamente ligada a proteínas, minerais e pigmentos. O isolamento e purificação do material é feito pelos processos de desmineralização seguido de desproteinização e despigmentação. (RAHMAN et al, 2015; YOUNES et al, 2014)

Na natureza a quitina pode ser encontrada de três diferentes formas de arranjos poliméricos, denominados quitina α, β e γ conforme mostra a **Figura 2**. A α-quitina é constituída por cadeias antiparalelas com fortes ligações intermoleculares, a β-quitina tem cadeias paralelas e por isso tem ligações intermoleculares mais fracas, e a γ-quitina tem duas cadeias indo para mesma direção, enquanto a terceira cadeia é antiparalela a elas. (ALVAREZ, 2014).

Figura 2. Representação esquemática das estruturas polimórficas de α-quitina , β-quitina e γ-quitina (Fonte: ARANAZ, et al 2009).



A α-quitina tem sido usada em muitos estudos devido ser a forma polimorfica mais abundante e que tem maior estabilidade termodinamica graças a forte interações de hidrogenio entre as cadeias, já a forma β-quitina possui interações mais fracas, a forma polimorfica y-quitina é pouco explorada devido ser muito raro (FARIA, et al 2016).

2.2. Quitosana

A quitosana é um polímero obtido através da desacetilação da quitina pelo processo de hidrolise dos grupos acetamido, como mostra a **Figura 3**. A molécula de quitosana tem estrutura linear de β-(1-4)-acetamido-2-desoxi- glicopiranose com diferentes graus de acetilação ou desacetilação, e massas moleculares variadas, (CHOKRADJAROEN, et al 2017) cuja a estrutura está representada pela **Figura 4**.

Figura 3. Representação esquemática da desacetilação da quitina para obtenção de quitosana (Fonte: KAUR, DHILLON, 2015).

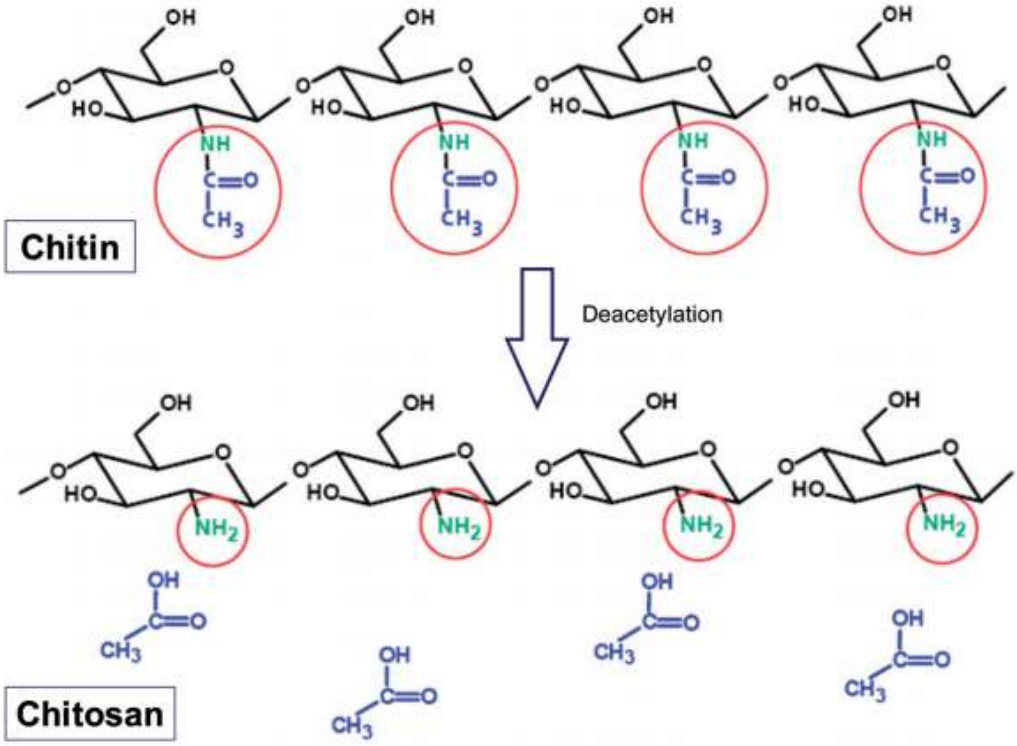
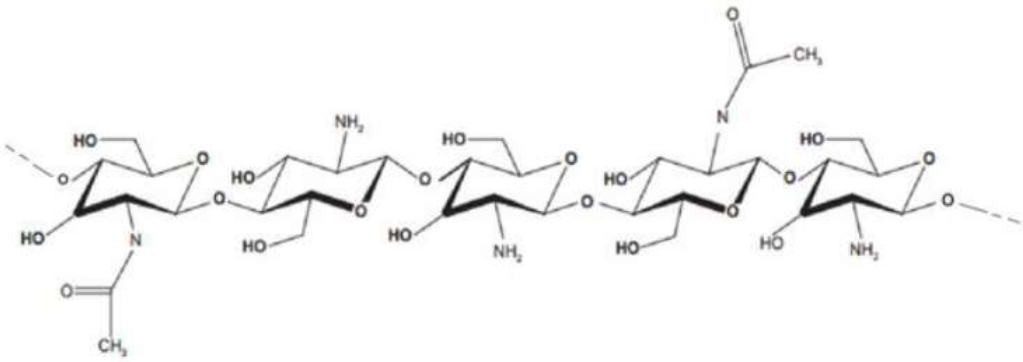


Figura 4. Estrutura molecular da quitosana (Fonte: ARANAZ et al, 2009).



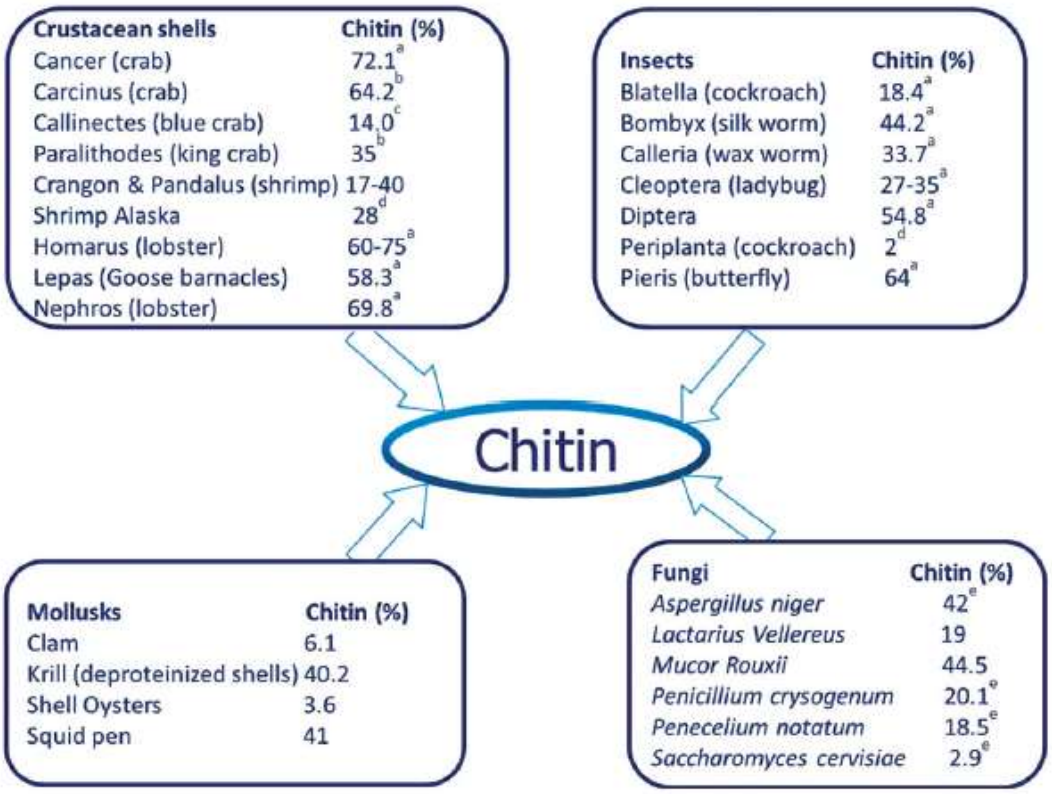
A quitosana se diferencia da quitina pelo grau de desacetilação, quando o grau de desacetilação é maior que 50% o polímero é considerado quitosana e não mais quitina, os métodos para desacetilação mais usuais são o tratamento alcalino e desacetilação enzimática. (ANWAR; ANGGRAENI; AL MIN, 2017) . Outro fator é a massa molar média, a quitina nativa tem massa molar maior do que 10^6 Daltons, enquanto a quitosana comercial tem uma massa molar média na faixa de $1,0 \times 10^5 – 1,2 \times 10^6$ Daltons (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009).

A quitosana pode ser modificada para atingir graus específicos de desacetilação e pesos moleculares médios para determinadas aplicações, a quitosana altamente desacetilada fornece o equilíbrio ideal entre o desempenho biológico e a toxicidade, relatos avaliando parâmetros físico-químicos mostram que a desacetilação é eficiente quando a quitosana apresenta grau de desacetilação de 80 -95%. (ALAMEH, et al 2018)

2.2.1. Fontes de quitina e quitosana

A quitina e seu derivado quitosana é encontrado nos exoesqueletos de insetos e crustáceos, como camarão e caranguejo, nos endosqueletos de moluscos como a lula, em muitos invertebrados, como nas cascas de ovos dos nematóides, nas paredes celulares dos fungos e algumas algas diatomáceas. (MUÑOZ, et al 2018) como mostra a **Figura 5**.

Figura 5. Quitina (%) presente em diferentes organismos (sobrescrito: X [a] = peso da cutícula orgânica; X [b]= no DW do corpo; X [c]= peso fresco do corpo; X[d] = peso total da cutícula; X [e]= DW da parede celular) (Fonte: KAUR, DHILLON, 2015).



A quitina e seu copolímero quitosana é encontrado em mais de 70% de todos os organismos vivos no mundo, é o segundo polímero hidratado de carbono renovável mais abundante na natureza, perdendo apenas para celulose e em grande parte é retirado dos processamentos de produtos alimentares marinhos. (MI, et al 2014).

A quitina encontrada em insetos, denominada α-quitina, está contida principalmente na prótese de tegumento, na membrana peritrófica e nos tecidos

traqueais, essa forma polimórfica desempenha um papel crítico na manutenção da forma e tamanho do exoesqueleto e dos tecidos (YAN, et al 2018).

Arranjos de α-quitina são encontrados principalmente em estruturas duras e rígidas de artrópodes como camarão, caranguejo, aranhas, escorpiões e insetos, uma pequena quantidade também pode ser encontrada na parede celular de fungos (JANG et al, 2004).

A β-quitosana é subproduto da β-quitina após o processo de desacetilação, é encontrado em estruturas flexíveis e na parede celular das diatomáceas e estruturas esqueléticas dos cefafopodes como as lulas, a β-quitosana é mais reativa que a α-quitosana devido a fracas ligações de hidrogênio intermoleculares. (ZHANG; JUNG; ZHAO, 2017).

A quitosana isolada a partir da casca de lula possui estrutura β-cristalografica (chamada β-quitosana), e tem atraído atenção no ramo de engenharia de tecido por sua funcionalidade única de maior solubilidade reatividade, capacidade de dilatação em solventes e menor cristalinidade quando comparado a α-quitosana que é encontrada a partir de casca de camarão e caranguejo. (BEGUM et al, 2017).

Existem poucos estudos sobre a γ- quitina, devido ser a forma polimórfica mais rara, estudos confirmam a presença de γ- quitina em fibras de casulo de besouro Ptinus e no estômago de Loligo sp (lula), γ-quitina ainda não foi utilizada em nenhuma aplicação devido a necessidade de obter mais informações sobre fontes e caracterização química. (KAYLA et al, 2017)

2.3. Propriedades da quitosana

A quitosana é o único polissacarídeo catiônico que ocorre naturalmente e tem importantes propriedades funcionais e estruturais como biodegradabilidade, não toxicidade, biocompatibilidade e atividade antibacteriana, é solúvel em meio ácido devido à presença de grupos aminos livres não protonados (DAMMAK, SOBRAL, 2018 ; GUPTA et al, 2018).

A quitosana tem propriedades promissoras para a bioengenharia tecidual graças a sua característica não alergênica, não tóxico e mucoadesiva, e também por sua propriedade de acelerar a proliferação celular e protege os genes da degradação pelas nucleases (ROLIM, et al 2018).

A presença dos grupos amino / acetamido na posição C2 no anel de piranosa da molécula de quitosana é responsavel pelo caráter positivamente carregado e por suas propriedades versáteis, incluindo floculação, quelação de metal e excelentes propriedades biológicas no campo de ciências farmacêuticas e medicina (CHAYANAPHAT, et al 2018).

Devidos suas características e propriedades únicas, a quitosana é o polímero catiônico com o maior número de aplicações. Além das propriedades biomédicas como atividade antibacteriana e antioxidante a quitosana tem propriedades policatiônicas, não-tóxicas, antitumorais e bio-reabsorvíveis que podem ser aplicadas em indústrias farmacêuticas, como administração controlada de drogas / vacinas / enzimas (SHARIATINIA, JALALI, 2018).

A quitosana tem propriedades físico-quimicas como estabilidade térmica, transparência e hidrofobicidade, propriedades biológicas como antioxidante e

absorção de óleo que pode ser aplicada em suplementos alimentares, uma vez que o biopolímero se liga aos ácidos graxos incluindo os ácidos oléico, linoleico, palmítico, esteárico e linolênico (AKYUZ, et al 2018).

O grau de desacetilação tem grande efeito nas propriedades físico-química, biológica e mecânica da quitina e quitosana, e descreve a extensão da transformação de N-acetil-D-glucosamina em D-glucosamina e é geralmente expressa como uma percentagem molar da D-glucosamina em relação ao total de D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina (DIMZON, KNEPPER, 2015).

O grau de desacetilação pode ser controlado durante um processo de hidrólise alcalina relativamente agressivo aplicado à quitina, através de uma combinação de duração de exposição e temperatura, quando o material atinge a porcentagem de 60 de grau de desacetilação ele já pode ser considerado quitosana e não mais quitina (FOSTER et al, 2015).

O grau de desacetilação é classificado como método chave para identificação da qualidade da quitosana, devido a influência nas propriedades físico-químicas como solubilidade, floculação, capacidade quelante e mucoadesão, a determinação do grau de desacetilação pode ser determinado por métodos convencionais como titulação alcalina ou potenciométrica, os métodos convencionais oferecem a vantagem de serem realizados com instrumentos disponíveis em laboratórios comuns e a desvantagem é o tempo longo de reação experimental. (WANG et al, 2014)

Existem vários métodos para a quantificação e determinação do grau de desacetilação de amostras de quitina e quitosana, alguns deles estão representados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Principais técnicas utilizadas na determinação do grau de desacetilação e suas respectivas referências (Fonte: Hussian, et al, 2013).

Método	Referência
Espectroscopia no Infravermelho (IV)	Domsze & Roberts, 1985; Sabnis & Block, 1997; Brugnerotto et al. 2001.
Espectroscopia de Dicroismo Circular	Domard, 1987.
Espectroscopia no Ultravioleta (UV)	Muzzarelli, 1985; Tane I al., 1998.
Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	Shigemassa et al., 1998; Lavertu et al., 2003; Zhang et al., 2005.
Titulação Potenciométrica Linear (TPL)	Ke & Chen, 1990; Jiang et al., 2003; Balázs & Sipos, 2007.
Teste com Ninidrina	Curotto & Aros, 1993.
Determinação Enzimática	Nanjo et al., 1991.
Análise Elementar	Shigehiro et al., 1981; Kasaai et al., 2000; Gong et al., 2003; Gupta & Jabrail, 2006.
Cromatografia Gasosa (CG)	Aiba, 1986.
Titulação ácido-base	Domszy & Roberts, 1985; Baxter et al., 1992.

2.4. Isolamento da quitina e preparação da quitosana

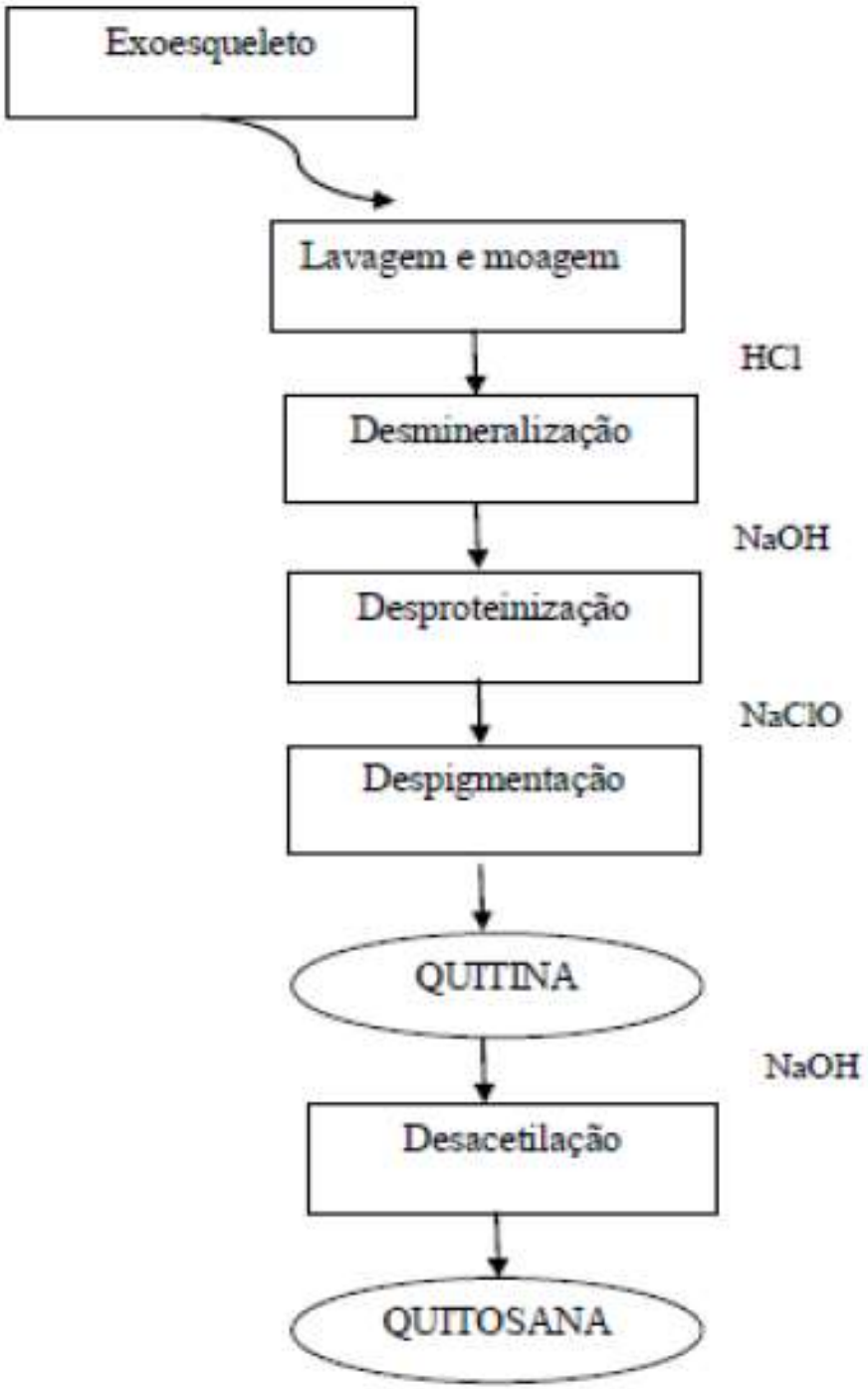
A quitina pode ser isolada por métodos químicos ou biológicos como a fermentação microbiana ou reações enzimáticas, o método químico consiste na dispersão do material em soluções acidas seguidas de tratamento alcalino, os métodos químicos são mais utilizado em produções de escala industrial devido ser economicamente mais viável (RIBEIRO, 2017).

Embora a produção de quitina e quitosana seja comercialmente produzida á décadas, ainda não foi criado protocolo com procedimento padronizado para o isolamento da quitina de subprodutos de crustáceos e isso se deve a constituição biológica de diferentes espécies usadas para a produção de quitina (NIDHEESH, SURESH, 2014).

A quitina está associada com proteínas, material orgânicos, pigmentos e lipídios e para purificação e isolamento da quitina proveniente do exoesqueleto de crustáceos é necessários processos químicos para remoção de minerais, proteínas e pigmentos, essas etapas são realizadas consecutivamente pelas técnicas de desmineralização, seguida desproteinização e despigmentação. (SOUZA, FERREIRA, BARBOSA, 2015)

O exoesqueleto deve ser primeiramente lavado para remoção de resíduos como ovas, carnes e sujidades, após a etapa de lavagem o exoesqueleto é moído e tratado com reagentes químicos pelas etapas de desmineralização, desproteinização e despigmentação. A **Figura 6** mostra o esquema para a purificação da quitina. (ESQUERDO et al, 2015)

Figura 6. Isolamento de quitina e preparação de quitosana (Fonte: Sagheer at al, 2002).



2.5. Principais aplicações

Atualmente, a quitosana tem recebido grande atenção em diversas aplicações devido à sua alta versatilidade em diferentes áreas como limpeza de aguas residuais, curativos, fungicidas, além de demonstrar ótimo desenvolvimento como polímero no campo de ciências dos alimentos através de agente antimicrobiano. Na área de ciências farmacêuticas a quitosana pode ser aplicada para encapsulamento e liberação controlada de fármacos. (GOYA; MORAIS, ASSIS, 2016; DAVIS, et al. 2012)

A quitosana pode ser facilmente processada para a incorporação de diferentes formas, tais como géis, microesferas, scaffolds, filmes, membranas de implantes e misturas de polímeros, a versatilidade no processamento aumenta as aplicações na área biomédicas, química e farmacêutica para o campo de sistema de liberação de medicamentos ou substancias. (PATIL; SAWANT, 2011; SOHRABI, et al. 2016).

Durante a última década, cresceu a demanda por desenvolvimento de materiais a base de polissacarídeo, a quitosana em especial é um polissacarídeo que tem atraído interesse por ser usado como encapsulante de drogas antimicrobianas devido às suas excelentes propriedades biocompatíveis, biodegradáveis, não tóxicas, curativas e hemostáticas (BARATA, et al. 2016).

A quitosana tem sido amplamente utilizada na engenharia de alimentos para o desenvolvimento de embalagens seguras à base de filmes e revestimentos de quitosana, devidos as propriedades antibacteriana e fungicida, a quitosana pode ser aplicada em filmes comestíveis (MEDINA, et al. 2018).

Devido a capacidade de formação de filme, atividade antimicrobiana e segurança para o consumo humano, a quitosana juntamente com revestimento de nano-SiOx aumenta a vida útil das cerejas chinesas durante o armazenamento pós-colheita mantendo ás propriedades de textura do fruto (Xin et al., 2017).

A quitosana foi comparada com outros materiais biodegradáveis para o transporte de medicamentos por polímeros naturais ou sintéticos e apresentou melhor desempenho em relação a biocompatibilidade, o que contribui para a adesão, proliferação e diferenciação celular (LI et al ,2015).

Os revestimentos comestíveis de quitosana são considerados uma das tecnologias potenciais para garantir a segurança microbiológica dos alimentos, foi relatado que o uso de revestimentos comestíveis contendo quitosana obtidos por gelificação iônica é eficaz em retardar o processo de amadurecimento das uvas. (MELO et al., 2018).

A quitosana apresenta propriedades hipocolesterolêmicas que ajudam a diminuir o risco de aterosclerose e outras disfunções cardiovasculares comuns na população idosa, através da habilidade em diminuir os níveis séricos de colesterol total e colesterol LDL,a quitosana tem o potencial de prevenir doenças conformacionais de proteínas que também estão relacionadas com envelhecimento avançado (KERCH, 2015).

Como polímero biocompatível e mucoadesivo a quitosana pode ser usada para melhorar a mucoadesão e a entrega de nanoparticulas à mucosa pulmonar e para liberação de fármacos para os macrófagos alveolares, esse avanço tem explorado diferentes vias de administração de medicamentos, que é uma área promissora de pesquisa para o tratamento da tuberculose (VIEIRA, et al. 2018).

Em ciências dos alimentos, a quitosana pode ser usada como um agente coagulante efetivo, causando a separação das partículas suspensas dos sucos e isso melhora as condições visuais e de textura do alimento, esse fato é por conta da quitosana ter carga eletrostática negativa que absorve proteínas e colóides carregados positivamente (TASTAN; BAYSAL, 2017).

No campo de entrega de genes, a quitosana pode ser utilizada como um vetor não viral policatiônico para entrega de genes, isso é graças a vantagem da quitosana ser um polímero biocompatível e biodegradável, através técnica de gelificação iônica é possível encapsular nanopartículas de quitosana catiônica dentro de lipossomas (BAGHDAN, et al. 2018).

A quitosana tem sido amplamente utilizada como agente hemostático e curativo de múltiplas formas, como filme, hidrogel, esponja e fibra para o controle da hemorragia, a propriedade hemostática da quitosana é devido à interação eletrostática com membranas celulares de eritrócitos e plaquetas carregadas negativamente, que se distingue do mecanismo de coagulação natural do corpo (YAN, et al. 2018).

Nanoparticulas de quitosana podem ser preparadas sob condições excepcionalmente suaves devido à sua natureza hidrofílica e biocompatível, tornando-as particularmente atraentes para o carregamento de compostos delicados, como peptídeos e macromoléculas funcionais, além de ser um polímero que não causa reações alérgicas (YEMISCI, et al. 2018).

Chitlac ((1-desoxilactit-1-il) quitosana) é um derivado de quitosana obtido através de uma N-alquilação redutiva de aminas primárias por meio de frações de lactose e pode ser aplicado no desenvolvimento de biomaterias para regeneração

tecidual devido sua versatilidade, solubilidade e propriedades estimulante para a produção de colágeno. (COK, et al. 2018)

A quitosana é um polímero biocompativel que melhora a propriedade adesiva da pele através da conjugação com diferentes materiais, a conjugação química leva à ação da liberação sustentada e aumenta a biodisponibilidade, estudos recentes mostram que a quitosana pode ser conjugada com curcumina biocompatível para aplicações biomédicas. (SARANYA, et al. 2018)

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Otimizar as etapas de extração da quitina para obtenção de quitosana com alto grau de pureza, por meio da aplicação dos conceitos de *quality by design* e planejamento de experimentos.

3.2. Específicos

- Desenvolver procedimentos para melhorar o processo de obtenção da quitosana.
- Otimizar o processo de desmineralização e desproteinização para obtenção da quitina.
- Otimizar o processo de desacetilação para a obtenção de quitosana de alta pureza.

JUSTIFICATIVA

4. JUSTIFICATIVA

A quitosana é um polissacarídeo biodegradável e catiônico derivado da quitina, um dos biopolimeros mais abundantes na terra depois da celulose, a estimativa global da produção de quitina é de ~ 10^{10} a 10^{11} toneladas. (AUNKHAM, et al 2018). A quitosana é um polímero natural de N-acetil glucosamina, encontrado principalmente no exoesqueleto de crustáceos, insetos e em paredes celulares de fungos e apresenta importantes propriedades como mucoadesão, atividade antibacteriana e não-toxicidade. (SINGH, et al 2018).

Quimicamente, a quitosana é uma macromolécula semi-cristalina linear tipicamente composta por unidades repetidas de D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina, o grau de desacetilação que pode variar de 30% a 95%. (ALI; AHMAED, 2018). O grau de desacetilação é um dos principais parâmetros para determinação das propriedades da quitosana e para os parâmetros estruturais que influenciam a carga global, reatividade, propriedades biológicas e físico-químicas. (KOSOWASKA, et al 2018; HAMDI, et al 2018).

Atualmente, a quitosana tem alcançado grande número de publicações devido à sua alta versatilidade em ser processada em diferentes formas como como géis, microesferas, scaffolds, filmes, membranas de implantes e misturas de polímeros. (CHEN, et al 2018; PATRULEA, et al 2015). As propriedades químicas, físicas e biológicas da quitosana favorece a aplicação em diferentes campos, incluindo biologia, química, produtos farmacêuticos, medicina, agricultura, alimentos e meio ambiente. (CAMPOS, OLIVEIRA, FRACETO, 2017).

A quitosana é o único polissacarídeo alcalino existente na natureza que é caracterizado como não-toxico, biocompativel e com atividade supressora de tumor (YE, et al 2018). A quitosana é amplamente utilizado em ciências farmacêuticas, biomedicina e outros campos industriais devido às suas propriedades multidimensionais como excipiente de liberação controlada devido às suas excelentes propriedade como a formação de membranas, degradação e biocompatibilidade e mucoadesão. (MA, XIN, TAN, 2015; AHASAN, et al 2018).

A quitosana é altamente utilizada no campo de conservação de alimentos graças sua boa capacidade de formação de filme, propriedades antibacterianas e antifúngica, na indústria de embalagens alimentícias a quitosana é ultilizada como filmes ou revestimentos comestíveis, para melhorar a conservação e a qualidade dos alimentos através da criação de uma barreira contra umidade e oxigênio. (KUNTZLER, COSTA, MORAES, et al 2018; SANCHEZ, et al 2018). Infelizmente, até hoje os únicos estudos para purificação da quitina para obtenção de quitosana em escala industrial são patentes, relatórios concisos sobre otimização da produção de quitosana são praticamente inexistentes. (VASQUEZ, et al 2017)

Este trabalho tem como principal objetivo estabelecer procedimento reprodutível para a extração da quitina e da quitosana, por meio da aplicação dos conceitos de *Quality by Design* e planejamento de experimentos.

MATERIAIS E MÉTODOS

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Obtenção e armazenamento da matéria prima

O exoesqueleto de camarão em pó foi doado pela empresa Tríade® Soluções em Resíduo Ltda., localizada em Cananéia-SP, Brasil, onde foi mantida em dessecador para evitar ocorrência de reidratação do produto.

5.2. Obtenção da quitina

A quitina foi obtida pelos processos de desmineralização e desproteinização. As 3 etapas foram executas de acordo com uma abordagem de planejamento de experimentos (DoE).

5.3. Desmineralização

O exoesqueleto em pó foi disperso em solução de ácido clorídrico (HCl), sendo que os valores de massa, concentrações da solução de ácido clorídrico e tempo de reação foram definidas pelo planejamento de experimentos, conforme descrito na **Tabela 2**.

O produto obtido da reação foi lavado com água destilada até atingir o pH próximo da neutralidade, filtrado à vácuo e seco a temperatura ambiente de 25°C por 24h. O material seco foi pesado e o cálculo do rendimento realizado por gravimetria. Para avaliar a efetividade da desmineralização, foi realizado análise de teor de cinzas em todos os ensaios. Os ensaios realizados passaram por análise estatística, predição dos pontos de melhores resultados e validação do ponto ótimo. Após a avaliação dos resultados do processo de desmineralização será iniciado o processo de desproteinização.

Tabela 2. Planejamento fatorial com ponto central para a otimização da etapa de desmineralização.

Ensaio	Concentração de HCl	Tempo	Massa
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1
4	-1	+1	+1
5	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1
7	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1
9	0	0	0

Legenda: -1 = nível baixo, 0 = nível médio, +1 = nível alto.

5.3.1. Teor de cinzas

Para avaliação do processo de desmineralização foi realizado teste de teor de cinzas em todas as amostras. O ensaio foi realizado primeiramente pelo processo de carbonização com ácido sulfúrico em chapa de aquecimento a 300°C pelo período de 4h, logo após a carbonização a amostra seguiu para Mufla a 800 °C pelo período de 3h.

5.4. Desproteinização

O processo de desproteinização foi realizado de acordo com o planejamento experimental proposto na tabela 2. Para esta etapa a razão g/mL foi estabelecida em um valor fixo de 0,08g de material desmineralizado para cada 8 ml de solução básica de hidróxido de sódio (NaOH) em diferentes concentrações, temperaturas e tempo de reação (**Tabela 3**). Após os tempos de desproteinização estabelecidos no planejamento (**Tabela 3**), as amostras foram filtradas, lavadas em água destilada até a neutralidade do filtrado e secas nas mesmas condições da desmineralização. A variável de resposta para esta etapa foi a porcentagem de nitrogênio (%N) do material tratado.

Tabela 3. Planejamento fatorial com ponto central para a otimização da etapa de desproteinização.

Ensaio	Concentração de NaOH	Temperatura	Tempo
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1
4	-1	+1	+1
5	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1
7	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1
9	0 (50%)	0 (100ºC)	0 (10 h)

Legenda: -1 = nível baixo, 0 = nível médio, +1 = nível alto.

5.4.1. Analise elementar (C, H e N)

Para avaliação do processo de desproteinização, foram realizados analises elementares para verificação do teor de nitrogênio das amostras. O nitrogênio está envolvido na cadeia de formação das proteínas, que são constituídas por unidades menores chamadas de aminoácidos, logo quanto menor a quantidade de nitrogênio na amostra mais eficiente o processo.

5.5. Obtenção de Quitosana

Para a obtenção da Quitosana, foi empregado o método de desacetilação de quitina descrito a seguir. O material desproteinizado foi disperso em solução concentrada de hidróxido de sódio (NaOH), a temperatura, tempo de reação e concentração da solução foi definida de acordo com planejamento experimental, conforme descrito na **Tabela 4**.

Tabela 4. Planejamento fatorial com ponto central para a otimização da etapa de desacetilação (método 1).

Ensaio	Concentração de NaOH	Temperatura	Tempo
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1
4	-1	+1	+1
5	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1
7	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1
9	0 (50%)	0 (100ºC)	0 (10 h)

Legenda: -1 = nível baixo, 0 = nível médio, +1 = nível alto.

5.5.1. Titulação potenciométrica

Para avaliação do processo de desacetilação, foram realizados analises de titulação potenciométrica em todas as amostras desacetiladas com NaOH. A titulação potenciométrica é responsável por quantificar os grupamentos aminos livre e consequentemente o grau de desacetilação, se destaca por ser um método eficiente, rapido e que pode ser realizado com materiais comuns de laboratório.

5.6. Caracterização Físico Química de Quitina

5.6.1. Determinação do grau de desacetilação da quitina

A massa de 0,02 g de QTS foi dispersa em 2 mL de ácido acético 1 % *(v/v)* e mantida sob agitação mecânica durante 5 min (25 ± 1ºC). A titulação potenciométrica foi feita com solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1 mol/L. A solução de NaOH 0,1 mol/L foi adicionada até que o pH da dispersão de QTS permanecesse constante. Para efeito de comparação, foi realizada a titulação potenciométria em amostra desproteinizada, porém não submetida ao processo de desacetilação (controle). A Figura 4 mostra esquematicamente a técnica de determinação do GD da QTS. O GD foi calculado utilizando a **Equação 1**.

$$\%GD = \mathbf{161\ x\ [NaOH]\ x\ (P2 - P1)}\ \text{(equação 1)}$$

Onde,

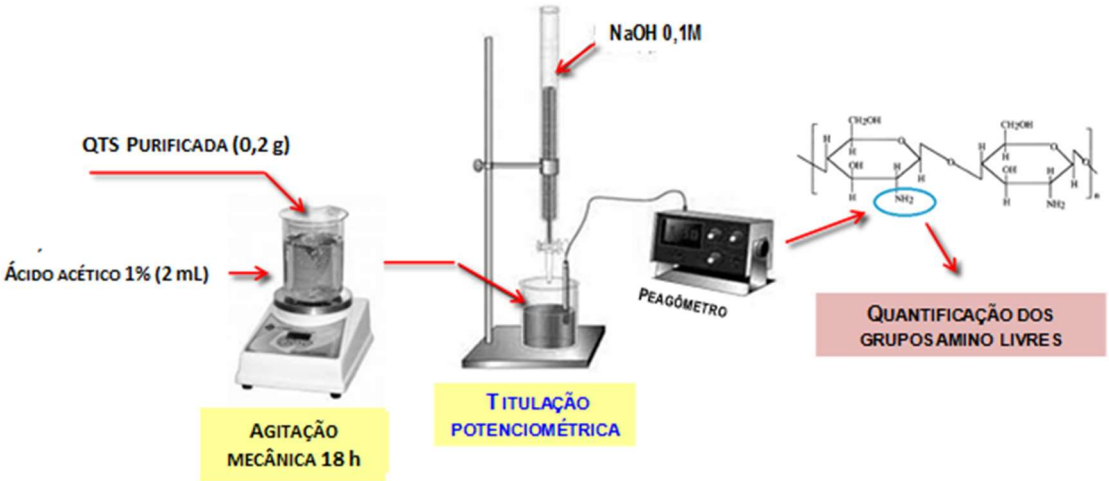
161 = Massa molar da unidade N-glucosamina em g/mol $^{-1}$

P1 = Correspondente ao pH do primeiro ponto de inflexão da curva

P2 = Correspondente ao pH do segundo ponto de inflexão da curva.

[NaOH] = Concentração da solução de NaOH 0,1 mol/L padronizada

Figura 7. Representação esquemática da titulação potenciométria para determinação da desacetilação da quitina.



5.7. Simulações de Monte Carlo para avaliação da capacidade do processo

Após a obtenção dos modelos matemáticos que explicam as respostas (teor de cinzas, teor de nitrogênio e grau de desacetilação) em função dos fatores de entrada (concentração de HCl, concentração de NaOH, tempo, temperatura e massa) para cada uma das etapas de obtenção (desmineralização, desproteinização e desacetilação), foram realizadas simulações de Monte Carlo com a finalidade de avaliar a capacidade do processo empregando as condições otimizadas. Considerou-se as seguintes especificações: teor de cinzas menor ou igual a 25%, teor de nitrogênio menor ou igual a 1,7% e grau de desacetilação maior ou igual a 93%. Os parâmetros de entrada para as simulações de Monte Carlo estão apresentadas na **Tabela 5**.

Tabela 5. Parâmetros de entrara para as simulações de Monte Carlo com a finalidade de avaliar a capacidade do processo.

Resposta	Fator	Distribuição	Média	Desvio padrão
Teor de cinzas	[HCl]	Normal	0,3 M	0,1 M
	Massa	Normal	9,0 g/mL	0,1 g/mL
Teor de nitrogênio	[NaOH]	Normal	2,0 M	0,1 M
	Temperatura	Normal	64 ºC	1 ºC
	Tempo	Normal	150 minutos	2 minutos
Grau de desacetilação	[NaOH]	Normal	45%	1%
	Tempo	Normal	3 horas	0,1 horas

RESULTADOS E DISCUSSÃO

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Otimização da Desmineralização

A desmineralização deve ser a primeira etapa do processo de obtenção da quitina, devido o processo ter maior rendimento quando comparado a desproteinização. Em estudos análogos a este, a literatura destaca que existe diferença entre a porcentagem de minerais do exoesqueleto, essa diferença está relacionada a espécie do crustáceo. O planejamento experimental foi elaborado no programa Minitab, com a finalidade de otimizar as condições da etapa de desmineralização. Nesta etapa, as porcentagens de cinzas remanescentes foi a variável dependente a ser otimizada e as independentes foram: tempo (horas), concentração de HCl (M) e a massa de exoesqueleto (g/mL). Segundo PINTO (2014), as melhores condições para o processo de desmineralização empregaram-se concentração de solução de ácido clorídrico de 0,9 M, por 5 h, e quantidade de amostra de 0,088 g/mL.

A partir das condições citadas por PINTO (2014) foram codificados valores para massa, tempo de reação e concentração de reagente com objetivo de remover os minerais usando condição otimizada. A **Tabela 6** mostra os resultados do teor de cinzas para as amostras obtidas com diferentes condições de desmineralização testadas, empregando planejamento fatorial (2^3).

Tabela 6. Determinação do teor de cinzas das amostras após o processo de desmineralização sob diferentes condições de massa (g/mL), concentração de ácido clorídrico (M) e tempo (h).

Ensaio	Massa (g)	[HCl] (M)	Tempo (h)	Massa inicial do cadinho vazio (g)	Massa da amostra (g)	Massa do cadinho incinerado (g)	Teor de cinzas (%)
1	2	0,6	3	32,7404	0,5072	32,8749	37,23
2	6	0,6	3	33,4567	0,5250	33,7249	25,68
3	2	0,6	7	33,2151	0,5091	33,3407	38,35
4	6	0,6	7	33,3557	0,5264	33,6409	24,12
5	2	1,2	3	32,7507	0,5166	32,7725	49,48
6	6	1,2	3	33,4857	0,4341	33,7037	31,61
7	2	1,2	7	33,3712	0,5292	33,4466	45,38
8	6	1,2	7	33,2171	0,5182	33,3999	33,54

Após todos os ensaios de desmineralização do exoesqueleto de camarão, realizou-se a determinação do percentual de cinzas remanescentes (%CR) de todas amostras obtidas para validação do ponto ótimo para o processo de desmineralização. Os primeiros resultados variaram entre 24,12% a 49,48%.

Depois do processo de desmineralização, as amostras foram secas em temperatura ambiente pelo período de 24h e foi calculado a massa para avaliação do rendimento, conforme mostra a **Tabela 7**. A **Figura 8** mostra os diferentes aspectos macroscópicos observados após processo de desmineralização.

Tabela 7. Determinação do rendimento e aspectos macroscópicos do exoesqueleto de camarão após o processo de desmineralização.

Ensaio	Massa inicial (g)	Massa desmineralizada (g)	Rendimento (%)	Aspecto Macroscópico
1	2,0	0,5782	28,91	Pó acinzentado
2	6,0	3,0364	50,60	Pó amarelado
3	2,0	0,5245	26,22	Pó amarelado
4	6,0	3,2121	53,53	Pó acinzentado
5	2,0	0,5485	27,42	Pó amarelado
6	6,0	3,0077	50,12	Pó acinzentado
7	2,0	0,5392	26,96	Pó amarelado
8	6,0	3,2134	53,55	Pó amarelado

Figura 8. Aspecto microscópico do processo de desmineralização (Fonte: Elaboração própria).

Considerando-se os altos valores obtidos de cinzas residual, planejou-se um novo conjunto de experimentos com a finalidade de reduzir a quantidade de cinzas após o processo de desmineralização. Os resultados de cinzas destes novos experimentos estão apresentados na **Tabela 8**. Os rendimentos e aspectos macroscópicos estão mostrados na **Tabela 9**.

Tabela 7. Determinação do teor de cinzas das amostras após o processo de desmineralização sob diferentes condições de massa (g/mL), concentração de ácido clorídrico (M) e tempo (h).

Ensaio	Massa (g)	[HCl] (M)	Tempo (h)	Massa inicial do cadinho vazio (g)	Massa da amostra (g)	Massa do cadinho incinerado (g)	Teor de cinzas (%)
9	9	0,6	3	34,8870	0,5109	35,1393	25,86
10	6	0,3	3	33,3544	0,5070	33,6172	24,42
11	9	0,3	3	33,4379	0,5078	33,7332	23,25

Tabela 8. Determinação do rendimento e aspectos macroscópicos do exoesqueleto de camarão após o processo de desmineralização.

Ensaio	Massa inicial (g)	Massa desmineralizada (g)	Rendimento (%)	Aspecto Macroscópico
9	9,0	6,2222	69,13	Pó acinzentado
10	6,0	4,3139	71,89	Pó acinzentado
11	9,0	6,8502	76,11	Pó acinzentado

Após o segundo procedimento de desmineralização, foi realizado carbonização seguida de incineração em mufla para verificação do teor de cinzas em todas as amostras. O experimento 11 mostrou-se o mais eficiente.

Porém, com o objetivo de diminuir ainda mais os minerais da amostra, foram necessários 3 ensaios adicionais. Os resultados de cinzas estão apresentados na **Tabela 10** e os rendimentos e aspectos macroscópicos na **Tabela 11**.

Tabela 10. Determinação do teor de cinzas das amostras após o processo de desmineralização sob diferentes condições de massa (g/mL), concentração de ácido clorídrico (M) e tempo (h).

Ensaio	Massa (g)	[HCl] (M)	Tempo (h)	Massa inicial do cadinho vazio (g)	Massa da amostra (g)	Massa do cadinho incinerado (g)	Teor de cinzas (%)
12	9	1,2	3	33,3576	0,5022	33,5924	26,74
13	9	1,5	3	34,8763	0,5089	35,1121	27,31
14	6	1,5	3	32,7425	0,5021	32,9185	31,62

Tabela 11. Determinação do rendimento e aspectos macroscópicos do exoesqueleto de camarão após o processo de desmineralização.

Ensaio	Massa inicial (g)	Massa desmineralizada (g)	Rendimento (%)	Aspecto Macroscópico
12	9,0	5,3446	59,38	Pó amarelado
13	6,0	4,8965	54,40	Pó amarelado
14	9,0	3,2396	53,99	Pó amarelado

Após o terceiro procedimento de desmineralização, foi realizado carbonização seguida de incineração em mufla para verificação do teor de cinzas em todas as amostras. Foi possível observar que o máximo de remoção de minerais foi de 76,75% (experimento 11).

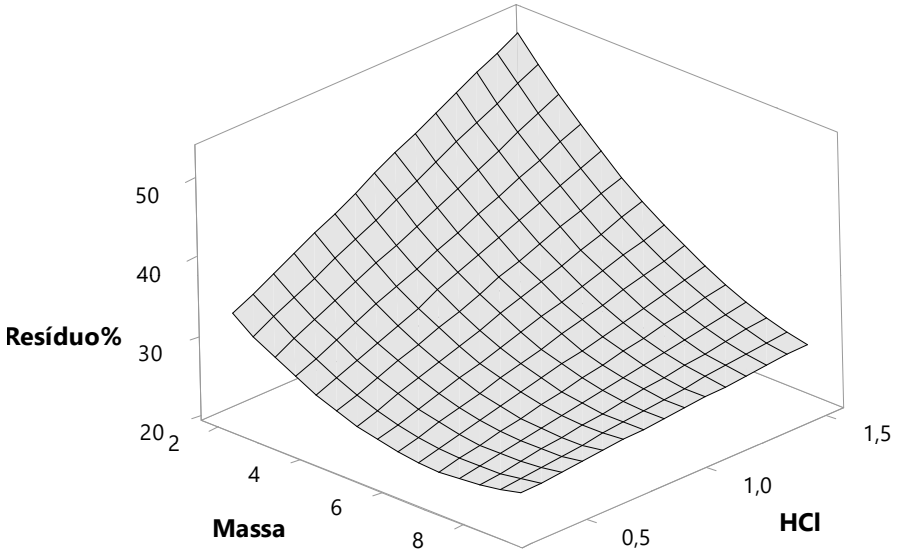
Com base nos resultados de cinzas obtidos com os ensaios de 1 a 14, estabeleceu-se um modelo matemático que explica o teor de cinzas (Y1) em função da massa de amostra (X1), da concentração da solução de ácido clorídrico (X2), e do tempo de desmineralização (X3). A **Tabela 12** apresenta os resultados da análise de variância (ANOVA) para o modelo ajustado. O modelo obtido apresentou ajuste adequado, com coeficientes de determinação (R^2), coeficiente ajustado (R^2-aj) e coeficiente de predição (R^2-pred) de 97,52%, 96,42% e 94,27%, respectivamente.

Tabela 12. Análise de variância (ANOVA) do teor de cinzas (Y1) em função da massa de amostra (X1), da concentração de solução de ácido clorídrico (X2), e do tempo de desmineralização (X3).

Fonte	g.l.	SQ	QM	Valor F	p-valor
Regressão	4	840,60	210,150	88,65	0,000
Massa	1	70,79	70,791	29,86	0,000
HCl	1	113,83	113,829	48,02	0,000
Massa*Massa	1	68,11	68,107	28,73	0,000
Massa*HCl	1	52,12	52,116	21,98	0,001
Erro	9	21,33	2,371		
Total	13	861,94			

O gráfico de superfície resposta do teor de cinzas em função da concentração da solução de ácido clorídrico (HCl) e massa da amostra (Massa) está apresentado na **Figura 9**. Vale destacar que, de acordo com o modelo obtido, o tempo de desmineralização não tem impacto no teor de cinzas. Com base na equação do modelo, as condições otimizadas foram de 9 g/mL de massa de amostra, solução de ácido clorídrico 0,3 M, e 3 horas de desmineralização.

Figura 9. Gráfico de superfície resposta do teor de cinzas em função da concentração da solução de ácido clorídrico (HCl) e massa da amostra (Massa).



Y1 = 35,66 – 4,681 Massa + 20,44 HCl + 0,3730 Massa*Massa – 1,988 Massa*HCl

6.2. Otimização da Desproteinização

Após a otimização da etapa de desmineralização o material passou pelo processo de desproteinização, de acordo com o planejamento experimental proposto. Para esta etapa foi estabelecida a relação de 0,4g de material desmineralizado para 40ml de solução de NaOH. A condição experimental de partida para essa etapa foi definida de acordo com a literatura (PINTO,2014), utilizando-se concentração de hidróxido de sódio (NaOH) 1,5 M, por 5 horas a 74ºC.

A partir das condições citadas por PINTO (2014), foram codificados valores para concentração de reagente, tempo de reação e temperatura, com objetivo de remover as proteínas usando a menor quantidade de reagente, menor tempo e temperatura.

Após a etapa de desproteinização foi realizada teste de teor de nitrogênio em analisador elementar em todas as amostras para avaliação do processo de desproteinização. A **Tabela 13** mostra os resultados do teor de nitrogênio para todos os ensaios realizados durante a etapa de desproteinização.

Tabela 13. Determinação do teor de nitrogênio das amostras após o processo de desproteinização sob diferentes condições de concentração de hidróxido de sódio (M), tempo (h) e temperatura (ºC).

Ensaio	[NaOH] (M)	Tempo (min)	Temperatura (ºC)	Teor de nitrogênio
1	1	150	64	2,30
2	2	150	64	1,31
3	1	150	84	2,28
4	2	150	84	1,65
5	1	270	64	2,04
6	2	270	64	1,37
7	1	270	84	2,12
8	2	270	84	1,74

Depois do processo de desproteinização, as amostras foram secas em temperatura ambiente pelo período de 24h e foi calculado a massa para avaliação do rendimento, conforme mostra a **Tabela 14**. A **Figura 10** mostra o aspecto microscópico da etapa de desproteinização

Tabela 14. Determinação do rendimento e aspectos macroscópicos do exoesqueleto de camarão após o processo de desproteinização.

Ensaio	Massa inicial (g)	Massa desproteinizada (g)	Rendimento (%)	Aspecto Macroscópico
1	0,4	0,2656	66,40	Pó branco
2	0,4	0,2768	69,20	Pó branco
3	0,4	0,2491	62,27	Pó branco
4	0,4	0,2921	73,02	Pó branco
5	0,4	0,2856	71,40	Pó branco
6	0,4	0,2824	70,60	Pó branco
7	0,4	0,2418	60,45	Pó branco
8	0,4	0,2852	71,30	Pó branco

Figura 10. Aspecto microscópico do processo de desproteinização (Fonte: Elaboração própria).

Com base nos resultados de teor de nitrogênio obtidos com os ensaios de 1 a 8, estabeleceu-se um modelo matemático que explica o teor de nitrogênio (Y2) em função da concentração da solução de hidróxido de sódio (X4), do tempo de desproteinização (X5) e da temperatura (X6). A **Tabela 15** apresenta os resultados da análise de variância (ANOVA) para o modelo ajustado. O modelo obtido apresentou ajuste adequado, com coeficientes de determinação (R^2), coeficiente ajustado (R^2-aj) e coeficiente de predição (R^2-pred) de 99,49%, 99,24% e 98,70%, respectivamente.

Tabela 15. Análise de variância (ANOVA) do teor de nitrogênio (Y2) em função da concentração de solução de hidróxido de sódio (X4), do tempo de desproteinização (X5) e da temperatura (X6).

Fonte	g.l.	SQ	QM	Valor F	p-valor
Regressão	5	2,23528	0,447056	391,73	0,000
NaOH	1	0,33116	0,331159	290,17	0,000
Temperatura	1	0,03364	0,33640	29,48	0,000
Tempo	1	0,10816	0,108160	94,77	0,000
NaOH*Temperatura	1	0,10081	0,100806	88,33	0,000
NaOH*Agitação	1	0,08556	0,085556	74,97	0,000
Erro	10	0,01141	0,001141		
Falta de ajuste	2	0,00146	0,000731	0,59	0,578
Erro puro	8	0,00995	0,001244	*	*
Total	15	2,24669			

Os gráficos de superfície resposta do teor de nitrogênio em função da concentração da solução de hidróxido de sódio (NaOH), do tempo de desproteinização (min), e da temperatura (ºC) estão apresentados nas **Figura 11**, **12** e **13**. Vale destacar que, de acordo com o modelo obtido, existe interação entre a concentração de hidróxido de sódio e o tempo de desproteinização e entre a concentração de hidróxido de sódio e a temperatura. Com base na equação do modelo, as condições otimizadas foram obtidas empregando-se solução de hidróxido de sódio 2,0 M, a 64ºC por 150 minutos de desproteinização.

Figura 11. Gráfico de superfície resposta do teor de nitrogênio em função da concentração da solução de hidróxido de sódio (NaOH) e temperatura (ºC), considerando-se o tempo de desproteinização fixado em 150 min.

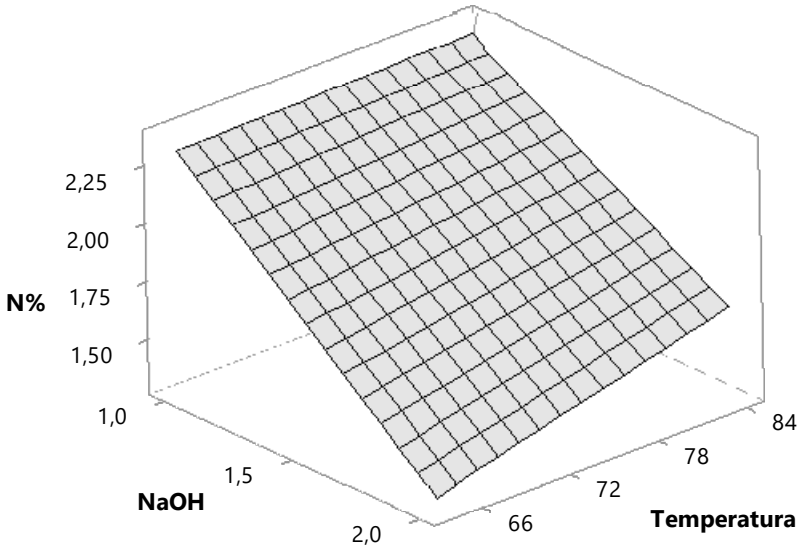


Figura 12. Gráfico de superfície resposta do teor de nitrogênio em função da concentração da solução de hidróxido de sódio (NaOH) e tempo (min) de desproteinização, considerando-se temperatura fixada em 64ºC.

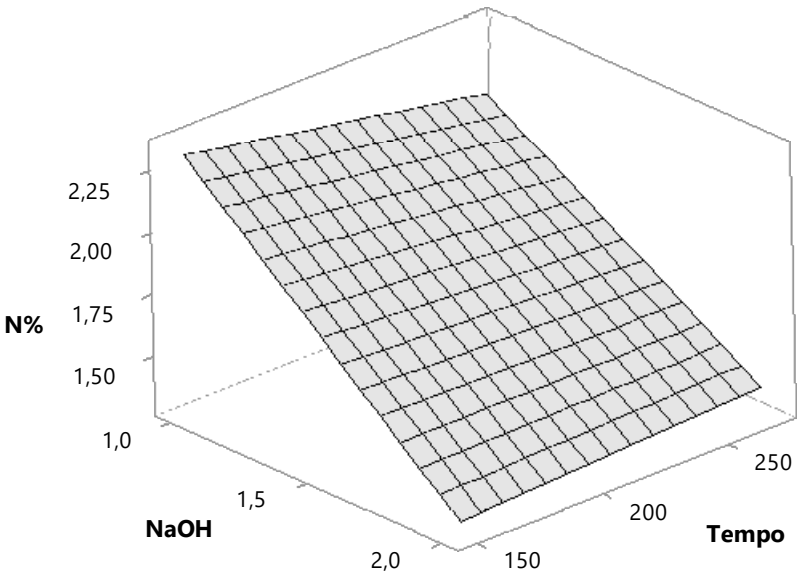
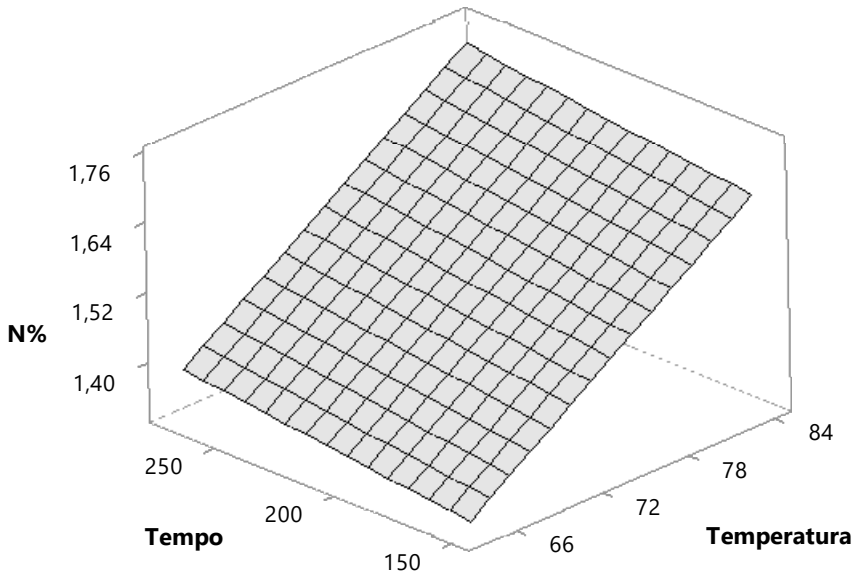


Figura 13. Gráfico de superfície resposta do teor de nitrogênio em função do tempo (min) de desproteinização e da temperatura (ºC), considerando-se a concentração de hidróxido de sódio fixada em 2,0 M.



Y2 = 4,883 – 2,373 NaOH – 0,01450 Temperatura – 0,004333 Tempo + 0,01588 NaOH*Temperatura + 0,002437 NaOH*Tempo

A etapa de despigmentação não foi necessária, uma vez que após as etapas de desmineralização e desproteinização os materiais apresentaram-se livres de pigmentos, conforme pode ser observado nas **Figuras 8** e **10**.

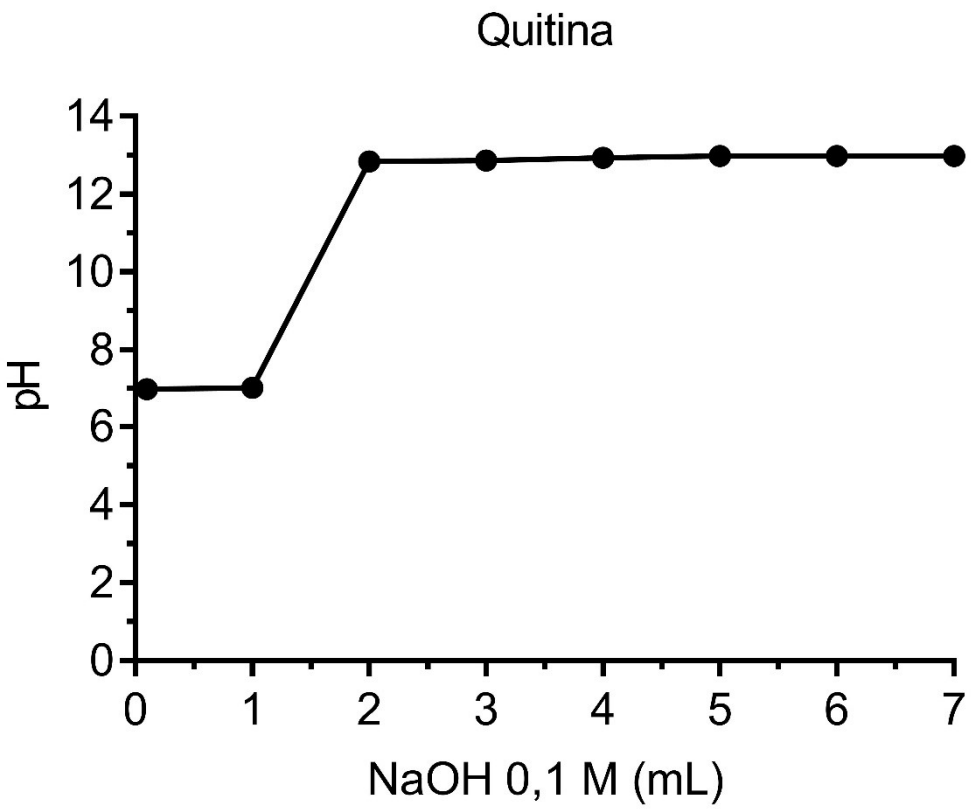
Após a otimização das etapas de desmineralização e desproteinização, o material foi desmineralizado e desproteinizado empregando-se condições otimizadas e, posteriormente, submetida a titulação potenciométrica para

verificação do grau de desacetilação. Um resumo dos resultados da titulação potenciométrica estão apresentados na **Tabela 16** e **Figura 14**.

Tabela 16. Resultados da titulação potenciométrica da quitina obtida após os processos de desmineralização e desproteinização otimizados, empregando-se solução de hidróxido de sódio 0,1 M.

QUITINA						
NaOH 0,1 M (mL)	pH			Média	DP	CV (%)
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3			
0	6,99	6,98	6,99	6,99	0,0058	0,0826
1	7,04	7,01	7,01	7,02	0,0173	0,2471
2	12,86	12,85	12,82	12,84	0,0208	0,1620
3	12,86	12,85	12,86	12,86	0,0058	0,0449
4	12,93	12,94	12,91	12,93	0,0153	0,1181
5	12,97	12,97	12,98	12,97	0,0058	0,0445
6	12,97	12,98	12,98	12,98	0,0058	0,0445
7	12,99	12,98	12,98	12,98	0,0058	0,0445

Figura 15. Gráfico de pH em função do volume de solução de hidróxido de sódio adicionado durante a titulação potenciométrica da quitina obtida após os processos de desmineralização e desproteinização.



O grau de desacetilação foi calculado empregando-se a equação abaixo:

$$\%\boldsymbol{GD} = \mathbf{161\ x\ 0,0911\ x\ (12,84 - 7,02) = 85,36}\% \text{ (equação 2)}$$

A quitina apresentou grau de desacetilação de 85,36% que confirmou material totalmente livre de minerais, proteínas e pigmentos, além de já ser classificado como quitosana. Quando a desacetilação é maior que 50% o polímero

torna-se solúvel em soluções acidas e tal característica identifica este material como quitosana e não mais quitina, segundo NEVES 2013.

6.3. Otimização da Desacetilação

Após a otimização das etapas de desmineralização e desproteinização o material passou pelo processo de desacetilação, de acordo com o planejamento experimental proposto. Para esta etapa foi estabelecida a relação de 5,0 g de material desproteinizado para 200 mL de solução de NaOH (50%v/v) mantido sob agitação constante por 5h a 100°C. A condição experimental de partida foi definida de acordo com a literatura (NILTON, 2007).

A partir das condições citadas por NILTON (2007), foram calculados valores para concentração (%v/v) de reagente, tempo de reação e temperatura, com objetivo de transformar a quitina em quitosana através do processo de desacetilação usando a menor quantidade de reagente, temperatura e tempo possível para obtenção da quitosana.

A **Tabela 17** mostra os resultados obtidos da titulação potenciométrica da quitosana purificada por diferentes concentrações de NaOH, tempo e temperatura. As **Figura 15** e **16** destacam os pontos de inflexão da curva referentes à massa de NaOH necessária para neutralizar H^+ livre (P1) e o H^+ dos grupamentos amino protonados (P2), para os ensaios 1 a 4 e ensaios 5 a 8, respectivamente.

Tabela 17. Resultados das medidas de pH obtidos durante a titulação potenciométrica da QTS purificada nos ensaios 1 a 8.

NaOH 0,1M (mL)	Medidas de pH obtidas para o ensaio:							
	1	2	3	4	5	6	7	8
0	5,93	6,23	6,54	6,75	6,91	6,33	6,39	6,42
1	12,42	12,42	12,52	12,61	13,25	12,61	12,49	12,55
2	12,61	12,63	12,61	12,78	13,28	13,03	12,54	12,54
3	12,65	12,64	12,77	12,88	13,3	13,11	12,60	12,61
4	12,58	12,65	12,86	12,87	13,33	13,21	12,64	12,64
5	12,66	12,66	12,87	12,91	13,35	13,20	12,64	12,64
6	12,70	12,68	12,90	12,91	13,36	13,20	12,66	12,67
7	12,71	12,68	12,91	12,92	13,37	13,22	12,67	12,71

Figura 15. Pontos de inflexão da curva referentes à massa de NaOH necessária para neutralizar H^+ livre e o H^+ dos grupamentos amino protonados para os ensaios 1 a 4.

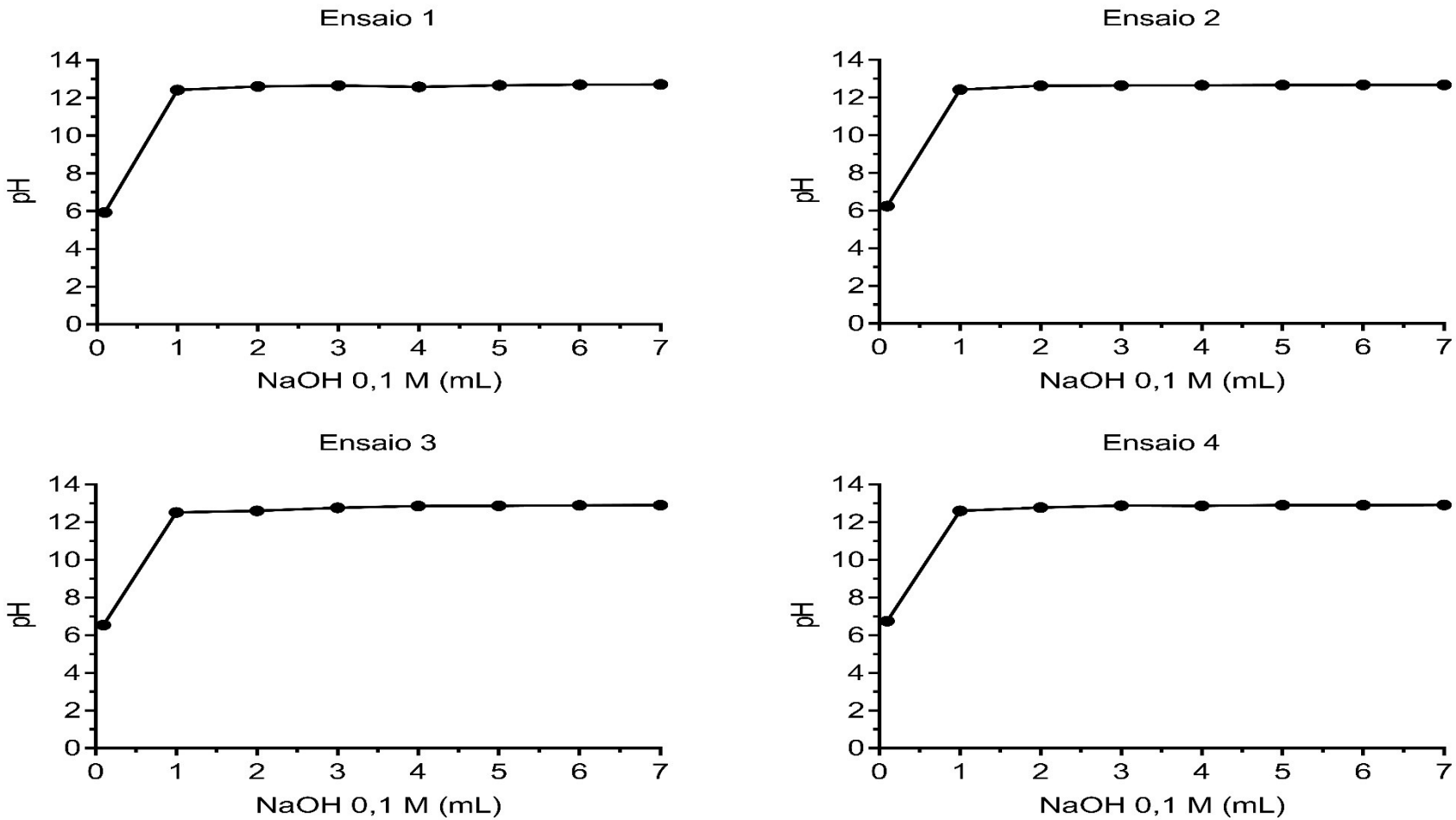
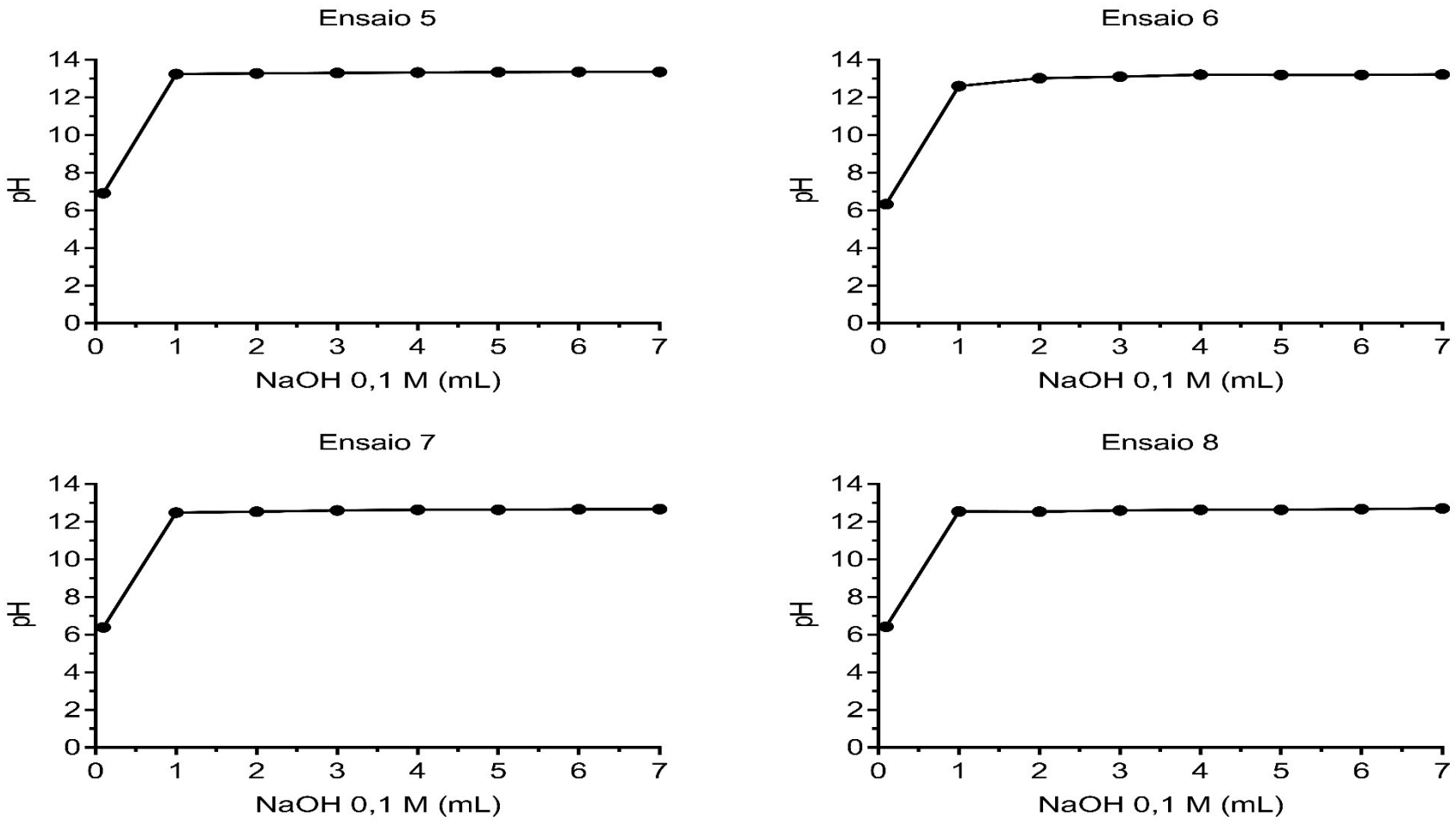


Figura 16. Pontos de inflexão da curva referentes à massa de NaOH necessária para neutralizar H+ livre e o H+ dos grupamentos amino protonados para os ensaios 5 a 8.



Ao fim da etapa de desacetilação foi realizado teste de titulação potenciométrica em todas as amostras para avaliação do processo de desacetilação. A **Tabela 18** mostra os resultados da titulação potenciométrica expressos através do grau de desacetilação para todos os ensaios realizados durante essa etapa.

Tabela 18. Determinação do grau de desacetilação das amostras após o processo de desacetilação sob diferentes condições de concentração de hidróxido de sódio (%), tempo (h) e temperatura (ºC).

Ensaio	[NaOH] (%)	Tempo (h)	Temperatura (ºC)	Grau de desacetilação (%)
1	45	3	70	95,18
2	55	3	70	90,78
3	45	7	70	87,70
4	55	7	70	85,94
5	45	3	130	92,98
6	55	3	130	92,10
7	45	7	130	89,46
8	55	7	130	89,90

Com base nos resultados do grau de desacetilação obtidos através da titulação potenciomentrica, os ensaios 1-8 foram inseridos em um modelo matemático que explica o grau de desacetilação em função do tempo, temperatura e concentração de reagente. A **Tabela 19** apresenta os resultados da análise de variância (ANOVA) para o modelo ajustado. O modelo obtido apresentou ajuste

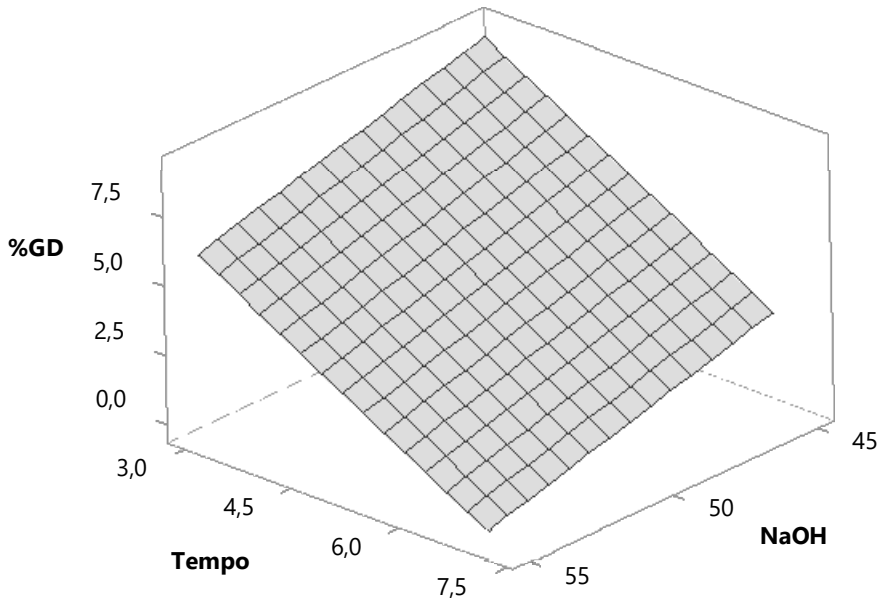
adequado, com coeficientes de determinação (R^2), coeficiente ajustado (R^2-aj) e coeficiente de predição (R^2-pred) de 96.46%, 95.04% e 90.93%, respectivamente.

Tabela 19. Análise de variância (ANOVA) do grau de desacetilação em função do tempo (h), temperatura (ºC) e concentração de NaOH (%).

Fonte	g.l.	SQ	QM	Valor F	p-valor
Regressão	2	94,8640	47,4320	68,06	0,000
NaOH	1	18,9728	18,9728	27,22	0,003
Tempo	1	75,8912	75,8912	108,89	0,000
Temperatura	-	-	-		
Erro	5	3,4848	0,6970		
Total	7	98,3488			

O gráfico de superfície resposta do grau de desacetilação (%GD) em função do tempo (h) e da concentração de NaOH (%) está apresentado na **Figura 17**. Vale destacar que, o modelo matemático foi obtido considerando-se apenas os resultados do grau de desacetilação obtidos com os ensaios realizados a 70ºC. Os resultados do grau de desacetilação obtidos com os ensaios realizados a 130ºC foram desconsiderados devido as amostras mudarem de estado físico, com possível degradação química, tornando-se impossível a continuação do experimento. Com base na equação do modelo, as condições otimizadas foram de 3h de tempo de desacetilação, empregando NaOH com concentração de 45%.

Figura 17. Gráfico de superfície resposta do grau de desacetilação (%GD) em função do tempo (h) e da concentração de NaOH (%).



Y3 = 86,36 + (27,64 – 0,3080 NaOH – 1,540 Tempo)

6.4. Simulações de Monte Carlo para avaliação da capacidade do processo

Os histogramas obtidos para o teor de cinzas (Y1), teor de nitrogênio (Y2) e grau de desacetilação (Y3) estão apresentados nas **Figuras 18**, **19** e **20**. Na **Tabela 20** são apresentadas as médias, desvios padrão, especificações e índices de capacidade de processo para cada resposta estudada.

Figura 18. Histograma do teor de cinzas (Y1) obtido a partir de simulações de Monte Carlo em condições otimizadas para o processo de desmineralização.

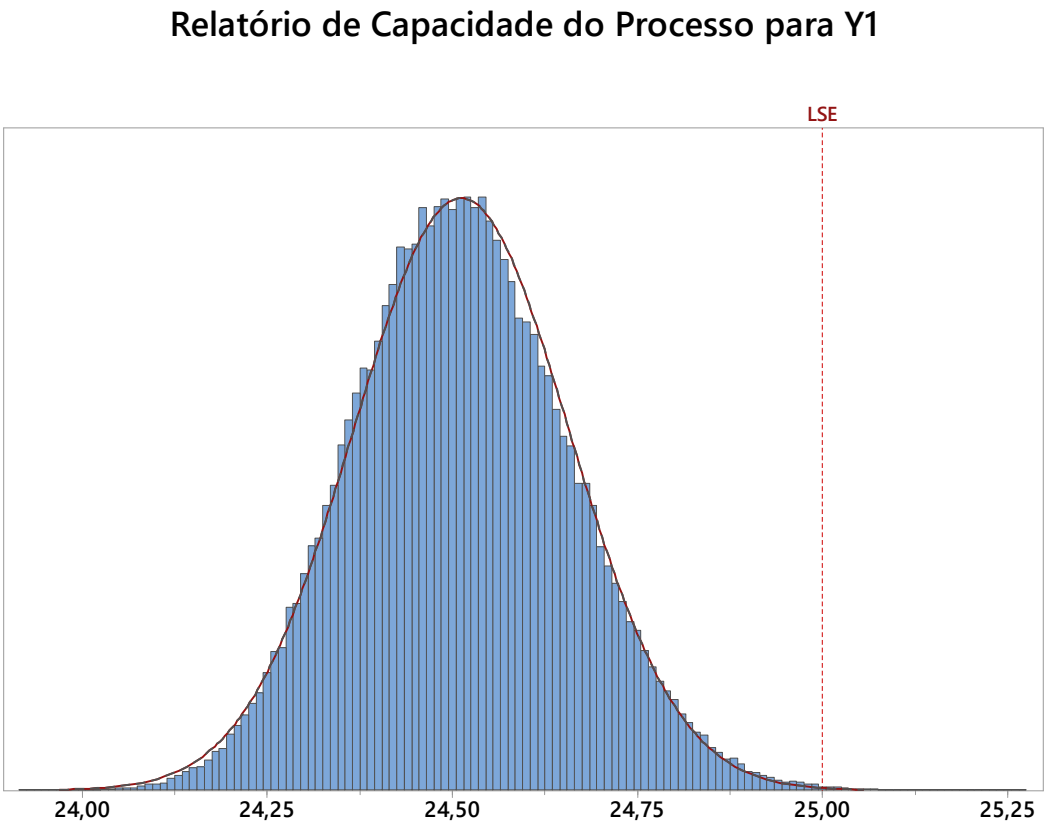


Figura 19. Histograma do teor de nitrogênio (Y2) obtido a partir de simulações de Monte Carlo em condições otimizadas para o processo de desproteinização.

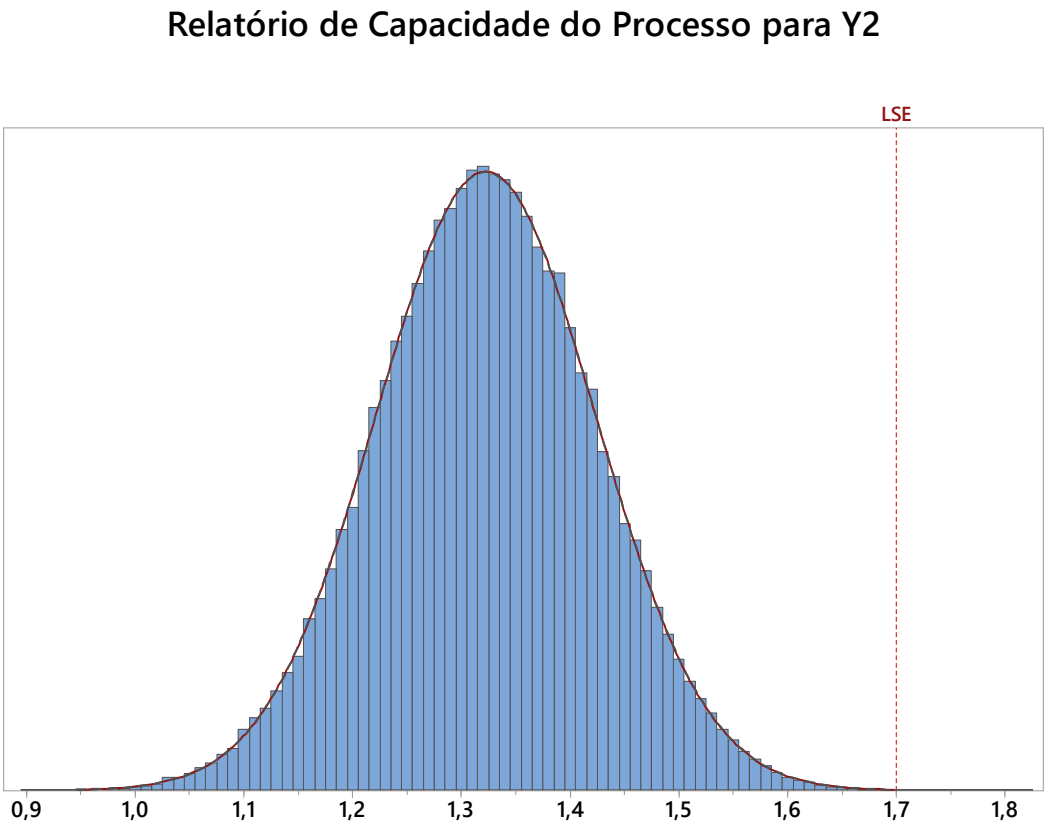


Figura 20. Histograma do grau de desacetilação (Y3) obtido a partir de simulações de Monte Carlo em condições otimizadas para o processo de desacetilação.

Tabela 20. Resultados das simulações de Monte Carlo para o teor de cinzas (Y1), teor de nitrogênio (Y2) e grau de desacetilação (Y3) obtidos nas condições otimizadas.

Resposta	Especificação	Média	Desvio padrão	Índice Cpk
Teor de cinzas	$\leq$ 25%	24,51%	0,15%	1,11
Teor de nitrogênio	$\leq$ 1,7%	1,32%	0,10%	1,25
Grau de desacetilação	$\geq$ 93%	94,52%	0,34%	1,47

As simulações de Monte Carlo permitiram avaliar que os processos de desmineralização, desproteinização e desacetilação, nas condições otimizadas, são capazes de gerar resultados dentro das especificações definidas.

CONCLUSÕES

2. CONCLUSÕES

- As etapas de desmineralização, desproteinização e desacetilação foram otimizadas empregando-se uma estratégia de planejamento de experimentos, análise de superfície resposta e regressão múltipla.
- As condições otimizadas para a desmineralização foram obtidas empregando-se 9 g/mL de massa de exoesqueleto, solução de ácido clorídrico 0,3 M, e 3 horas de desmineralização, obtendo-se teor de cinzas de 23,25%.
- As condições otimizadas para a desproteinização foram obtidas empregando-se solução de hidróxido de sódio 2,0 M, a 64ºC por 150 minutos de desproteinização, obtendo-se teor de nitrogênio de 1,31%.
- As condições otimizadas para a desacetilação foram obtidas empregando-se 3 horas de desacetilação e concentração de hidróxido de sódio de 45%.
- A etapa de despigmentação não foi necessária, uma vez que após as etapas de desmineralização e desproteinização os materiais apresentaram-se livres de pigmentos.
- A quitosana obtida após os processos de desmineralização e desproteinização apresentou grau de desacetilação de 85,36%.
- Após o processo de desacetilação, a quitosa obtida apresentou grau de desacetilação de até 95,18%.

REFERÊNCIAS

3. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

AHASAN, S. M. et al. Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules** v. 110, p. 97-109, 2018.

AKYUZ, L. et al. Supplementing capsaicin with chitosan-based films enhanced the anti-quorum sensing, antimicrobial, antioxidant, transparency, elasticity and hydrophobicity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 438-446, 2018.

ALAMEH, M. et al. siRNA Delivery with Chitosan: Influence of Chitosan Molecular Weight, Degree of Deacetylation, and Amine to Phosphate Ratio on in Vitro Silencing Efficiency, Hemocompatibility, Biodistribution, and in Vivo Efficacy. **Bio Macromoleculares**, v. 19, n. 1, p. 112-131, 2018.

ALI, A. AHAMED, S. A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v 109, p. 273-286, 2018.

ALVAREZ, F. A. The Effect of Chitin Size, Shape, Source and Purification

ANTONINO, R. S .C. M. Q. et al. Preparation and Characterization of Chitosan Obtained from Shells of Shrimp (Litopenaeus vannamei Boone). **Journal Mar Drugs** , v.15 n.141 , p.12, 2017.

ANWAR, M., ANGGRAENI, A. S, AMIN, M. H. A, Comparison of green method for chitin deacetylation. **International Conference on Chemistry, Chemical Process and Engineering**, v. 1821, p. 020071-1 - 020071-6, 2017.

ARAÚJO, V. R. **Aplicação de revestimento comestível a base de quitosana em brócolis minimamente processado**. 35 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2015.

AUNKHAM, A. et al. Structural basis for chitin acquisition by marine Vibrio species. **Nature Communications**, v. 9, n. 220, p. 13, 2018.

BAGHDAN, E. et al, Lipid coated chitosan-DNA nanoparticles for enhanced gene delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 535, n. 2, p. 473-479, 2018.

BARATA, J. F. et al. Fluorescent Bioactive Corrole Grafted-Chitosan Films. **Biomacromolecules**, v. 17, p. 1395−1403, 2016.

BARROS, J.A.G.; BRANT, A. J. C.; CATALANI, L. H. Hydrogels from Chitosan and a Novel Copolymer Poly (*N*-Vinyl-2-Pyrrolidone-*Co*-Acrolein). **Materials Sciences and Application,** v. 2, n. 8., p. 1058-1069, 2011.

BEGUM, E. R. A. et al. Evaluation of Extracted β-chitosan From *Loligo duvauceli* for the Preparation of Tissue Engineering Scaffolds**. Journal of Polymers and the Environment**, v. 26, n. 3, p. 1231-1238, 2017.

CAMPANA-FILHO, S. P.; DELEZUK, J. A. M.; CARDOSO, M. B. Desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade: Uma nova tecnologia para produção de quitosana. **Revista Processos Químicos**, v. jan/jun, 2002.

CAMPOS, E. V. R. OLIVEIRA, J. L. FRACETO, L. F. Poly(ethylene glycol) and Cyclodextrin-Grafted Chitosan: From Methodologies to Preparation and Potential Biotechnological Applications. **Frontiers in Chemistry**, 2017.

CHAYANAPHAT, C. et al. Cytotoxicity against cancer cells of chitosan oligosaccharides prepared from chitosan powder degraded by electrical discharge plasma. **Carbohydrate Polymers**, v. 201, p. 20-30, 2018.

CHEN, G. et al. Preparation, characterization and functional evaluation of chitosan-based films with zein coatings produced by cold plasma. **Carbohydrate Polymers**, v. 202, p. 39-46, 2018.

CHOKRADJAROEN, C. et al, Enhanced degradation of chitosan by applying plasma treatment in combination with oxidizing agents for potential use as an anticancer agent. **Carbohydrate Polymers**, v. 167, p. 11, 2017.

COK, M. et al. Mimicking mechanical response of natural tissues. Strain hardening induced by transient reticulation in lactose-modified chitosan (chitlac). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 656-660, 2018.

DAMMAK, I. SOBRAL P. J. A. Formulation optimization of lecithin-enhanced pickering emulsions stabilized by chitosan nanoparticles for hesperidin encapsulation, **Journal of Food Engineering**, v. 229, p. 2-11, 2018.

DAVIS, R. et al. Effectiveness of chitosan on the inactivation of enteric viral surrogates. **Food Microbiology**, v. 32, p. 57-62, 2012.

DIMZON, I. K. KNEPPER, T. P, Degree of deacetylation of chitosan by infrared spectroscopy and partial least squares. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 939–945, 2015.

DUAN, Y. et al. Cellulose and chitin composite materials from an ionic liquid and a green cosolvent. **Carbohydrate Polymers**, v. 192, p. 159-165, 2018.

ESQUERDO, V. M. et al. ELABORAÇÃO DE MICROESTRUTURAS POROSAS A BASE DE QUITOSANA E QUITINA PARA A ADSORÇÃO DO CORANTE AZUL BRILHANTE. **XXXVII ENEMP- Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados,** 2015.

FACCHINATTO, William Marcondes. Preparação e caracterização de nanosuspensões e hidrogéis de N,O-metoxipoli(etilenoglicol)-g-quitosana para aplicação em sistemas de liberação de fármacos antitumorais. **Dissertação (Mestrado em Físico-Química)** - Instituto de Química de São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 2016.

FAI, A. E. C; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. Revista iberoamericana de polímeros. v 9, n. 5, 2008.

FAI, A. E. C; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. Revista iberoamericana de polímeros. v 9, n. 5, 2008.

FARIA, R. R. et al, Computational study of polymorphic structures of alpha- and beta- chitin and chitosan in aqueous solution. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 63, p. 78-84, 2016.

FOSTER, L. J. et al, Chitosan as a Biomaterial: Influence of Degree of Deacetylation on Its Physiochemical, Material and Biological Properties. **PLoS One**, v. 10, n .8, p. 22, 2015.

GOYA, R. C, MORAIS, S. T. B, ASSIS, O. B. G. Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on E. coli and S. aureus growth, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, p. 122-127, 2016.

GUPTA, A. et al. Effects of Amphiphilic Chitosan on Stereocomplexation and Properties of Poly(lactic acid) Nano-biocomposite**. *Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p.* 43-51, 2018.

HAMDI, M. et al. Acetylation degree, a key parameter modulating chitosan rheological, thermal and film-forming properties. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 48-60, 2018.

HIDALGO, C.; SUÁREZ, Y.; FERNÁNDEZ, M. Validación de una técnica potenciométrica para determinar el grado de desacetilación de la quitosana. **Ars Pharmaceutica**, v. 49, n. 3, p. 245-257, 2008.

HUSSAIN, M. R.; IMAN, M.; MAJI, T. K. Determination of degree of deacetylation of chitosan and their effect on the release behavior of essential oil from chitosan and chitosan-gelatin complex microcapsules. **International Journal of Advanced Applications**, v. 2, n. 4, p. 4-12, 2013.

JANG, M. et al. Physicochemical characterization of α-chitin, β-chitin, and γ-chitin separated from natural resources. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v.42, n. 14, 2004.

KAYLA, M. et al. On chemistry of γ-chitin**. Carbohydrate Polymers**, v. 176, p. 177-186, 2017.

KERCH, G. et al. The Potential of Chitosan and Its Derivatives in Prevention and Treatment of Age-Related Diseases**. Marine Drugs,** v. 13, p. 2158-2182, 2015.

KIDIBULE, P. E. et al. Use of chitin and chitosan to produce new chitooligosaccharides by chitinase Chit42: enzymatic activity and structural basis of protein specificity. **Microbial Cell Factories,** p. 12, 2018.

KOSOWSKA, K. et al. Chitosan and graphene oxide/reduced graphene oxide hybrid nanocomposites – Evaluation of physicochemical properties. **Materials Chemistry and Physics,** v, 216, p. 28-36, 2018.

KUMBAR, S. G. et al. Electrospun poly(lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds for skin tissue engineering. **Biomaterials**, v. 29, n. 30, p. 4100-4107, 2000.

KUNTZLER, S. G., COSTA, J. A. V. , MORAES, M. G. Development of electrospun nanofibers containing chitosan/PEO blend and phenolic compounds with antibacterial activity. **International Journal of Biological Macromolecules,** v. 117, p. 800-806, 2018.

LARANJEIRA, M. C. M , FÁVERE, V. T. Quitosana: Biopolímero Funcional com Potencial Industrial Biomédico. **Química Nova,** Florianópolis-SC, n.3,p. 672-678, 2009.

LARANJEIRA, M. C. M. e FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. Química Nova. v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.

LI, Y. et al. Biodegradable Polymer Nanogels for Drug/Nucleic Acid Delivery. **Chemica Reviews**, v. 115, p. 8564−8608, 2015.

MA, J. XIN, C. TAN, C. Preparation, physicochemical and pharmaceutical characterization of chitosan from *Catharsius molossus*residue. **International Journal of Biological Macromolecules,** v. 80, p. 547-556, 2015.

MEDINA, E. et al. Chitosan thymol nanoparticles improve the antimicrobial effect and the water vapour barrier of chitosan-quinoa protein films. **Journal of Food Engineering**, v. 240, p. 191-198, 2018.

MELO, N. F. C. B. et al. Effects of fungal chitosan nanoparticles as eco-friendly edible coatings on he quality of postharvest table grapes. **Postharvest Biology and Technology,** v. 139, p. 56-66, 2018.

MESQUITA, A., MACHADO, K., SILVA FILHO, E., NUNES, L. Quitosana na Composição de Formas Mucoadesivas de liberação de Farmaco: Uma prospecção Tecnológica. **GEINTEC - Gestão, Inovação e Tecnologias**, 3, set. 2013.

Method on Immune Recognition, **Journal Molecules**, v. 19, p. 4433-4451, 2014.

MUÑOZ, I. et al. Life cycle assessment of chitosan production in India and Europe. **The International Journal of Life Cycle Assessment**, v. 23, n. 5 p. 1151-1160, 2018.

NEVES, A. C. et al. Otimização de processos de obtenção de quitosana a partir de resíduos da carcinicultura para aplicações ambientais. Revista Brasileira de Energias Renováveis, v.2 , p. 34-47, 2013.

NIDHEESH, T. SURESH, P. V. Optimization of conditions for isolation of high quality chitin from shrimp processing raw byproducts using response surface methodology and its characterization. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 6, p. 3812-3823, 2014.

PATIL, S. B, SAWANT, K. K. Chitosan microspheres as a delivery system for nasal insufflation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, p. 384-389, 2011.

PATRULEA, V. et al. Chitosan as a starting material for wound healing applications**. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 97, p. 417-426, 2018.

PERINELLI, D. R. et al. Chitosan-based nanosystems and their exploited antimicrobial activity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 117, p. 8-20, 2018.

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

PINTO, A. S. Otimização de processos de obtenção de quitina do exoesqueleto do camarão amazônico (*Macrobrachium amazonicum*, HELLER, 1863). **Dissertação de Mestrado.** Belém-PA, 2014.

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. 107-20, 2015.

RIBEIRO, A. G. O. Produção de Quitosana a partir dos Caranguejos Dilocarcinus pagei Stimpson, 1861, Capturados no Município de Itacoatiara (AM). 2017. 86 f**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos)** - Universidade Federal do Amazonas, Itacoatiara, 2017.

RIBEIRO, J. C. V. et al, Versatility of Chitosan-Based Biomaterials and Their Use as Scaffolds for Tissue Regeneration. **Scientific World Journal**, 2017.

ROLIM, A. E. H. et al. Arcabouços de Quitosana - Propriedades Físico-Químicas e Biológicas para o Reparo Ósseo. Revista Virtual de Quimica, v. 10, n. 2, p. 18, 2018.

SANCHEZ, A. G. et al. Natural deep eutectic solvents as green plasticizers for chitosan thermoplastic production with controlled/desired mechanical and barrier properties. **Food Hydrocolloids**, v. 82, p. 478-489, 2018.

SANTOS, J. A.; LIMA, D. R.; CARDOSO, A. O.; REIS, A. B. J. A. Comparativo entre diferentes solubilizadores usados na produção de filmes de quitosana, In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 20., 2015, Florianópolis, SC. **Caderno de Resumos**. Florianópolis, SC: Blucher, 2014., p. 1-8.

SARANYA, T. S. Synthesis, characterisation and biomedical applications of curcumin conjugated chitosan microspheres. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 110, p. 227-233, 2018.

SHARIATINIA, Z. JALALI, A. M. Chitosan-based hydrogels: Preparation, properties and applications, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 194-220, 2018.

SINGH, B. et al. Chitosan-based particulate systems for the delivery of mucosal vaccines against infectious diseases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 110, p. 54-64, 2018.

SOHRABI, S. et al. Chitosan gel-embedded moxifloxacin niosomes: An efficient antimicrobial hybrid system for burn infection. **International Journal of Biological Macromolecules,** v. 85, p. 625-633, 2016.

SOUZA, F. M. FERREIRA, R. M. S. BARBOSA, R. C. UTILIZAÇÃO DA CASCA DE CAMARÃO PARA PRODUÇÃO DE QUITINA. **Revista academico-cientifica**, v. 07, n. 01, p. 11, 2015.

TAStTAN, O. BAYSAL, T. Chitosan as a novel clarifying agent on clear apple juice production: Optimization of process conditions and changes on quality characteristics. **Food Chemistry**, v. 237, p. 818-824, 2017.

TAVARIA, F. K. et al. A quitosana como biomaterial odontológico: estado da arte. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v.29 n.1, p.112, 2013.

VASQUEZ, M. J. M. et al, Functionalization of chitosan by a free radical reaction: Characterization, antioxidant and antibacterial potential. **Carbohydrate Polymers,** v. 155, p. 117-127, 2017.

VASQUEZ, M. J. M. et al, Functionalization of chitosan by a free radical reaction: Characterization, antioxidant and antibacterial potential. **Carbohydrate Polymers,** v. 155, p. 117-127, 2017.

VIEIRA, A. C. C. et al. Mucoadhesive chitosan-coated solid lipid nanoparticles for better management of tuberculosis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 536, p. 478-485, 2018.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros: Ciencias e Tecnologia**, v. 20, p. 51-64, 2010.

WANG, C. et al, A novel method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan by coulometric titration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 70. p. 306–311, 2014.

WU, T.; ZIVANOVIC, S. Determination of the degree of acetylation (DA) of chitin and chitosan by an improved first derivative UV method. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, p. 248-253, 2008.

XIN, Y. et al, Influence of chitosan-based coatings on the physicochemical properties and pectin nanostructure of Chinese cherry. **Postharvest Biology and Technology**, v. 133, p. 64-71, 2017.

YAN, D. et al, Different chemical groups modification on the surface of chitosan nonwoven dressing and the hemostatic properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 463-469, 2018.

YAN, X, et al. Identification and characterization of chitin deacetylase2 from the American white moth, *Hyphantria cunea* (Drury)**. Gene**, v. 670, p. 98-105, 2018.

YE, B. et al. Chitosan-coated doxorubicin nano-particles drug delivery system inhibits cell growth of liver cancer via p53/PRC1 pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 495, p. 414-420, 2018.

YEMISCI M. et al. Preparation and Characterization of Biocompatible Chitosan Nanoparticles for Targeted Brain Delivery of Peptides. **Skaper S. (eds) Neurotrophic Factors. Methods in Molecular Biology**, v. 1727, n. 36, p. 444-454, 2018.

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. 489-98, 2014.

ZHANG, H. JUNG, J. ZHAO, Y. Preparation and characterization of cellulose nanocrystals films incorporated with essential oil loaded β-chitosan beads. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 164-172, 2017.

ZHANG, J. et al. Chitosan modification and pharmaceutical/biomedical applications. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1962-1987, 2010.