

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação**  
**Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos**  
**Programa de Pós-Graduação em Química**



**Tese de Doutorado**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE QUITOSANA COMO SUPORTE PARA  
O DESENVOLVIMENTO DE POLÍMEROS HÍBRIDOS CONTENDO  
NÍQUEL(II)**

**Helen Cristina dos Santos Hackbart**  
**(Msc. em Química e Dr<sup>a</sup>. em Eng e Ciências de Alimentos)**

**Pelotas, 2017**

Helen Cristina dos Santos Hackbart  
(Msc. em Química e Dr<sup>a</sup>. em Eng e Ciências de Alimentos)

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE QUITOSANA COMO SUPORTE PARA O  
DESENVOLVIMENTO DE POLÍMEROS HÍBRIDOS CONTENDO NÍQUEL(II)

Tese apresentada ao programa de Pós-  
Graduação em Química da  
Universidade Federal de Pelotas como  
requisito parcial a obtenção do título de  
Doutor em Química

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Aline Joana Rolina Wohlmuth Alves dos Santos  
Co-orientador: Prof. Dr. André Ricardo Fajardo

Pelotas, 2017

Ficha catalográfica

Helen Cristina dos Santos Hackbart  
(Msc. em Química e Dr<sup>a</sup>. em Eng e Ciências de Alimentos)

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE QUITOSANA COMO SUPORTE PARA O  
DESENVOLVIMENTO DE POLÍMEROS HÍBRIDOS CONTENDO NÍQUEL(II)

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em  
Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de  
Pelotas.

Pelotas, 16 de janeiro de 2017

Banca examinadora:

.....  
Aline Joana Rolina Wohlmuth Alves dos Santos (Orientadora)  
Dr<sup>a</sup>. em Química pela Universidade Federal de Santa Maria.  
Professora na Universidade Federal de Pelotas

.....  
Cesar Antonio Oropesa Avellaneda  
Dr. em Ciências e Engenharia de Materiais pela Universidade de São Paulo.  
Professor na Universidade Federal de Pelotas

.....  
Daiane Dias  
Dr. em Química Analítica pela Universidade Federal de Santa Maria.  
Professor na Universidade Federal de Rio Grande

.....  
Juliano Rosa de Menezes Vicente  
Dr. em Química pela Universidade Federal de Santa Maria.  
Professor na Universidade Federal de Rio Grande

*Ao meu esposo Ricardo.*

À minha família, especialmente meus pais, Enildo e Cleusa, sempre me incentivando e acreditando em mim. Aos meus irmãos Mauro, Vivian, Liege, Ana Maria e Marcos pelo apoio, aos meus cunhados, Simone e Guilherme e sobrinhas Fernanda e Juliana pela torcida.

Amo vocês.

## **Agradecimentos**

A Prof<sup>fa</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aline Joana Rolina Wohlmuth Alves dos Santos agradeço não só a orientação como a compreensão durante este período do doutorado. Jamais teria conseguido terminar este trabalho com outro orientador, obrigada Professora Aline pela amizade, paciência e disponibilidade.

Ao Prof. Dr. André Ricardo Fajardo pelo apoio e contribuições.

Aos membros da banca: Prof. Dr. Cesar Antonio Oropesa Avellaneda, Prof<sup>fa</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daiane Dias, Prof. Dr. Juliano Rosa de Menezes Vicente e ao membro suplente Prof<sup>fa</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriane Medeiros, pelas contribuições.

Aos colegas de laboratório Luiz, Gabriel, Fernanda, Carolina, Heloisa e Noemy, pela torcida.

As minhas amigas, Katiúcia, Lara e Roberta pelo incentivo e apoio.

A minha amiga Djanira, pela ajuda burocrática e por estar sempre disponível a ajudar.

A minha amiga Silvia por estar sempre disposta a ajudar, muito obrigada.

A minha amiga Tamara por me escutar e ser minha confidente, sempre me dando apoio e incentivo.

A minha grande amiga Gabriela Giacomini, pela ajuda incondicional, por todo o trabalho realizado, por horas e horas de análises. Sem a sua ajuda este trabalho não teria sido possível. Obrigada pelo apoio, torcida e palavras de incentivo.

As minhas amigas Luciana e Adriana, por fazer com que eu olhe as dificuldades por outro ponto de vista, por estarem disponíveis a ajudar em qualquer horário e dia da semana, agradeço ao Universo por ter colocado vocês duas no meu caminho.

Aos meus amigos, Alisson e Leonardo, pela amizade, torcida, apoio, palavras de incentivo e carinho.

As minhas amigas Ana Paula e Silvana obrigada pela torcida.

A minha sogra e sogro, Loiva e Lauro pelas orações, muito obrigada.

Aos meus familiares, obrigada pela torcida.

Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhas que estão longe Mauro, Simone, Fernanda e Juliana, Vivian e Guilherme, pela torcida e incentivo. Estou com saudades.

Aos meus irmãos e cunhados que estão por perto Liege, Marcos, Ana Maria e Lucas pelas jantas e fondues, pela paciência, torcida e pelo apoio.

Aos meus pais que me propiciaram a oportunidade de estudar, pelo apoio, carinho, dedicação, cuidado, paciência, compreensão, orações e amor incondicional, me suportando nos momentos mais difíceis, meus pilares, meus mestres, os melhores pais do mundo, amo vocês.

Ao meu esposo Ricardo, meu melhor amigo, pela paciência, incentivo, amor e carinho. Sempre acreditando em mim e não me deixando desistir nos momentos difíceis. Não imagino minha vida sem você. Te amo.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao projeto MCT/CNPq/MEC/CAPES/Brasil – Ação Transversal nº 06/2011 – Casadinho/Procad – Processo nº 552197/2011-4.



## Resumo

HACKBART, Helen Cristina dos Santos. Síntese e Caracterização de Quitosana como Suporte para o Desenvolvimento de Polímeros Híbridos Contendo Níquel(II). 197f. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

A quitina e a quitosana são obtidas através do processo de hidrólise alcalina. A quitosana é um biopolímero que pode ser funcionalizado através da imobilização de ligantes com propriedades quelantes que podem modificar suas propriedades físicas, químicas e biológicas. Os objetivos, deste trabalho, são a síntese de quitosana a partir de cascas de camarão e modificação de sua estrutura utilizando compostos orgânicos e inorgânicos para obtenção de materiais inéditos. O suporte de triazenos 1-óxido e seus complexos em quitosana é algo inédito, por isto, esta foi a classe de compostos escolhida para as reações de imobilização. A quitosana foi obtida por planejamentos fatorial completo em três etapas: desmineralização, desproteíntização e desacetilação. As melhores respostas foram: desmineralização (84,3 %), desproteíntização (98,30 %), desacetilação (66,1 %) e massa molecular média de 372 KDa. A quitosana comercial (Sigma Aldrich®) e a sintetizada foram modificadas por imobilização de 1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazeno 1-óxido (**1**) e *bis*[1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazenido 1-óxido]Ni<sup>II</sup> (**2**). Este processo de suporte resulta em materiais orgânicos (**3a**) e (**3b**) e materiais híbridos (**4a**) e (**4b**), respectivamente. Os resultados obtidos da espectroscopia de infravermelho (FTIR) mostraram a banda [νN=N] do composto (**1**) em 1420 cm<sup>-1</sup> e 1427 cm<sup>-1</sup>, nos espectros dos compostos (**3a**) e (**3b**), respectivamente. As bandas de quitosana [νC-O-C] foram observadas em 1102, 1024 cm<sup>-1</sup> para (**3a**) e 1097, 1048 cm<sup>-1</sup> para (**3b**). Uma alteração na banda [νO-H] nos compostos (**3a**) e (**3b**) em comparação ao composto (**1**) foi observada, isto ocorreu devido às vibrações de estiramento das ligações de hidrogênio (-N-H...O<sup>-</sup>), evidenciando a presença da interação entre o grupo carboxilato (-COO<sup>-</sup>) composto (**1**) e o grupo amino protonado (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) da quitosana. A banda [νNNN] observada em 1394 cm<sup>-1</sup> no espectro do complexo triazenido (**2**) apresentou um deslocamento nos compostos (**4a**) e (**4b**) sendo observada em 1378 e 1396 cm<sup>-1</sup>, respectivamente, demonstrando indícios da ligação do composto (**2**) à quitosana. As bandas [νC-O-C], características de quitosana, também foram observadas em 1079, 1042 cm<sup>-1</sup> para (**4a**) e 1072 cm<sup>-1</sup> para (**4b**). A calorimetria exploratória diferencial (DSC) evidenciou a perda de estabilidade térmica dos compostos (**3a**) e (**3b**) em relação à quitosana, também foram identificados picos exotérmicos, que sugerem a presença do composto (**1**) (214,47 °C) em (**3a**) 189,50 °C e (**3b**) 194,93 °C. Além disso, foram identificados picos exotérmicos em 242,37 °C (**4a**) e 237,87 °C (**4b**), sugerindo a presença do composto (**2**) (260,11 °C) na sua estrutura do material híbrido. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a espectroscopia de energia dispersiva (EDS) mostraram morfologia e análise qualitativa do composto (**1**) bem como para os compostos inéditos (**2**), (**3a**), (**3b**), (**4a**) e (**4b**).

Palavras-chave: quitosana, materiais híbridos, complexo de Ni<sup>II</sup>.

## Abstract

HACKBART, Helen Cristina dos Santos. Synthesis and Characterization of Chitosan as a Support for the Development of Hybrid Polymers Containing Nickel(II). 197f. PhD Thesis - Post-Graduation Program in Chemistry, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2017.

Chitin and chitosan are obtained by the alkaline hydrolysis process. Chitosan is a biopolymer that can be functionalized by immobilizing binders with chelating properties that can modify its physical, chemical and biological properties. This work has objectives as synthesis of chitosan from shrimp shells and modifies its structure using organic and inorganic compounds to obtain unpublished materials. The support of triazenes 1-oxide and their complexes in chitosan is unprecedented; because of this these compounds were chosen for the immobilization reactions. Chitosan was obtained by complete factorial planning in three stages: demineralization, deproteinization and deacetylation. The best responses were: demineralization (84.3 %), deproteinization (98.30 %), deacetylation (66.1%) and the medium molecular mass was 372 KDa. Commercial (Sigma Aldrich®) and synthesized chitosan were modified by immobilization of 1-methyl-3- (*p*-carboxyphenyl) triazene 1-oxide (**1**) and *bis* [1-methyl-3- (*p*-carboxyphenyl) triazene 1-oxide] Ni<sup>II</sup> (**2**). This support process results in organic materials (**3a**) and (**3b**) and hybrid materials (**4a**) and (**4b**), respectively. The results obtained from infrared spectroscopy (FTIR) showed the [νN=N] band of compound (**1**) at 1420 cm<sup>-1</sup> and 1427 cm<sup>-1</sup> in spectrum of compounds (**3a**) and (**3b**), respectively. Chitosan bands [νC-O-C] were observed in 1102 cm<sup>-1</sup>, 1024 cm<sup>-1</sup> for (**3a**) and 1097, 1048 cm<sup>-1</sup> for (**3b**). Change in the band [νO-H] in compounds (**3a**) and (**3b**) compared to compound (**1**) was observed due to the stretching vibrations of the hydrogen bonds (-NH...O<sup>-</sup>), this evidence shows the presence of interactions between the carboxylate group (-COO<sup>-</sup>) of compound (**1**) and the protonated amino group (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) of chitosan. The band [νNNN] observed at 1394 cm<sup>-1</sup> in the spectrum of the triazenide complex (**2**) showed a shift in the compounds (**4a**) and (**4b**) observed at 1378 and 1396 cm<sup>-1</sup>, respectively, showing the binding of compound (**2**) to chitosan. The bands [νC-O-C], characteristic of chitosan were observed in 1079, 1042 cm<sup>-1</sup> for (**4a**) and 1072 cm<sup>-1</sup> for (**4b**). Differential scanning calorimetry (DSC) evidenced the loss of thermal stability of compounds (**3a**) and (**3b**) as compared to chitosan. Exothermic peaks have been identified, suggesting the presence of compound (**1**) (214.47 °C) in (**3a**) 189.50 °C and (**3b**) 194.93 °C. In addition, exothermic peaks were identified at 242.37 °C (**4a**) and 237.87 °C (**4b**), suggesting the presence of compound (**2**) (260.11 °C) in the structure of these hybrid materials. Scanning electron microscopy (SEM) and dispersive energy spectroscopy (EDS) showed morphology and qualitative analysis of compound (**1**) and of unpublished compounds (**2**), (**3a**), (**3b**), (**4a**) and (**4b**).

Keywords: chitosan, hybrid materials, complex of Ni<sup>II</sup>.

## Lista de Figuras

|                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Estrutura química da quitina.....                                                                                                                                                                                   | 27 |
| <b>Figura 2.</b> Esquema da reação de desacetilação alcalina da quitina e formação de quitosana. Sendo (a) quitina e (b) quitosana. (Adaptado de SOLOMONS e FRYHLE 2006). ....                                                       | 33 |
| <b>Figura 3.</b> Derivados de quitina e quitosana. (Adaptado de CAMPANA-FILHO <sup>a</sup> et al., 2007). ....                                                                                                                       | 35 |
| <b>Figura 4.</b> Estrutura molecular de duas cadeias de quitina interagindo através de ligações de hidrogênio, envolvendo as amidas I (C=O), II (C-N e N-H sobrepostos) e III (N-H) (Adaptado de GHORBEL-BELLAAJ et al., 2012) ..... | 36 |
| <b>Figura 5.</b> Íons oxalato suportados em quitosana (adaptado de HAMDINE et al., 2006). ....                                                                                                                                       | 40 |
| <b>Figura 6.</b> Interações e ligações entre ácidos carboxílicos e quitosana (Adaptado de CHEN et al., 2008).....                                                                                                                    | 42 |
| <b>Figura 7.</b> Representação estrutural do composto sintetizado. A = ânion oxalato (Adaptado de YALÇINKAYA et al., 2010). ....                                                                                                     | 43 |
| <b>Figura 8.</b> Suporte de ácidos carboxílicos em quitosana. (a) Ligação iônica. (b) Ligação covalente (Adaptado de GHOSH e ALI, 2012). ....                                                                                        | 44 |
| <b>Figura 9.</b> Estrutura moléculas evidenciando ligações iônicas para o composto formado de ácido poliacrílico/quitosana tratado com ácido sulfúrico (Adaptado de GÜMÜSOGLU et al., 2011).....                                     | 46 |
| <b>Figura 10.</b> Ligação iônica entre o ácido oxálico e quitosana (Adaptado de FADZALLAH et al., 2014).....                                                                                                                         | 48 |
| <b>Figura 11.</b> Representação geral de triazeno monocatenado, sendo R'=R" = aquil, fenil. (ENDERS et al., 2004).....                                                                                                               | 51 |
| <b>Figura 12.</b> Triazeno 1-óxido monocatenado, sendo R'=R" = aquil, aril. (BURUIANA et al., 2002).....                                                                                                                             | 51 |
| <b>Figura 13.</b> Estrutura molecular do 3-fenil-metiltriazeno 1-óxido. Elipsóides térmicas com nível de probabilidade de 50%. (SANTOS et al., 2007).....                                                                            | 52 |
| <b>Figura 14.</b> Estrutura molecular evidenciando elipsóides térmicas a nível de probabilidade de 50% (SORIANO-GARCIA et al., 1996). ....                                                                                           | 52 |
| <b>Figura 15.</b> Estrutura molecular evidenciando elipsóides térmicas em nível de probabilidade de 50%. (SANTOS et al., 2014). ....                                                                                                 | 53 |
| <b>Figura 16.</b> Estrutura química da quitosana modificada com EDTA e DTPA. (Adaptado de NAGIB et al., 1999).....                                                                                                                   | 54 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 17.</b> Derivados de quitosana modificada. (Adaptado de BECKER et al., 2000).                                                                                                                                                                                                | 56 |
| <b>Figura 18.</b> Esquema de formação do bioissorvente, sendo que o ácido oxálico atua como ponte entre alumina e quitosana (Adaptado de BODDU et al., 2003).                                                                                                                          | 57 |
| <b>Figura 19.</b> Síntese do composto formado entre quitosana e $Ni^{II}$ , onde cada anel de seis membros representa um heterociclo (monômero) de quitosana (Adaptado de VIJAYA et al., 2008).                                                                                        | 60 |
| <b>Figura 20.</b> Síntese da quitosana modificada. (adaptado de BEKHEIT et al., 2011).                                                                                                                                                                                                 | 61 |
| <b>Figura 21.</b> Estrutura proposta para o complexo formado (Adaptado de LI et al., 2013).                                                                                                                                                                                            | 63 |
| <b>Figura 22.</b> Esquemas de complexação do $Cu^{II}$ (Adaptado de MI et al., 2015).                                                                                                                                                                                                  | 65 |
| <b>Figura 23.</b> Obtenção de quitosana modificada (Adaptado de LIAO et al., 2016).                                                                                                                                                                                                    | 66 |
| <b>Figura 24.</b> Complexo triazenido 1-óxido evidenciando anel quelato de cinco membros. Sendo $M = Ni^{II}$ , $R' =$ alquila, $R'' =$ arila. (Adaptado de BEHERA e CHAKRAVORTY, 1970).                                                                                               | 68 |
| <b>Figura 25.</b> Estrutura do complexo de $Ni^{II}$ com formação do anel quelato de 5 membros. (DWIVEDI e SRIVASTAVA, 1976).                                                                                                                                                          | 68 |
| <b>Figura 26.</b> Complexo de $Ni^{II}$ com elipsóides térmicas a nível de probabilidade de 50 %. Átomos de hidrogênio foram omitidos. (CIUNIK et al., 1991).                                                                                                                          | 69 |
| <b>Figura 27.</b> Complexo de $Ni^{II}$ evidenciando o efeito quelato do ligante. Átomos de hidrogênio foram omitidos. Elipsóides térmicas representadas a nível de 50 % de probabilidade. Acima, a figura ressalta o anel de 6 membros do tipo meia-cadeira. (KARMAKAR et al., 1993). | 69 |
| <b>Figura 28.</b> Estrutura molecular do complexo triazenido de $Ni^{II}$ . Átomos de hidrogênio foram omitidos. Elipsóides térmicas com nível de probabilidade de 50 %. (HÖENER et al., 2002).                                                                                        | 70 |
| <b>Figura 29.</b> Estrutura molecular do complexo $\{[(Ni^{II})(1\text{-metil-3-(p-carboxylatofenil)triazenido 1-óxido)}_2][(KI)_2(H_2O)_2(\text{dimetilsulfoxido})]\}$ . Elipsóides térmicas em nível de probabilidade de 50 %. (SANTOS et al., 2016).                                | 71 |
| <b>Figura 30.</b> Estrutura molecular do complexo $\{[(Ni^{II})(1\text{-metil-3-(p-carboxilatofenil)triazenido 1-óxido)}_2][Ni^{II}(H_2O)_6](H_2O)(\text{dimetilformamida})]\}$ . Elipsóides térmicas em nível de probabilidade de 50 %. (SANTOS et al., 2016).                        | 71 |
| <b>Figura 31.</b> Limpeza das cascas: catação (a); lavagem (b); cascas secas (c).                                                                                                                                                                                                      | 76 |
| <b>Figura 32.</b> Síntese do composto (1).                                                                                                                                                                                                                                             | 80 |
| <b>Figura 33.</b> Obtenção do composto (2) evidenciando a quelação do $Ni^{II}$ por duas moléculas de triazenido 1-óxido. Estrutura esperada e planejada através das quantidades estequiométricas de síntese 1:2 (metal:ligante).                                                      | 81 |

|                                                                                                                                                                                                                                                          |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 34.</b> Esquema de síntese dos compostos (3a) e (3b). .....                                                                                                                                                                                    | 82  |
| <b>Figura 35.</b> Esquema para obtenção dos compostos (4a) e (4b). .....                                                                                                                                                                                 | 83  |
| <b>Figura 36.</b> Viscosidade reduzida (■) e viscosidade inerente (●) <i>versus</i> concentração das soluções de quitosana comercial. ....                                                                                                               | 91  |
| <b>Figura 37.</b> Curva de potenciometria (preto) e derivativa (cinza) da titulação da quitosana comercial não purificada. Potencial (mV) <i>versus</i> Volume (mL) .....                                                                                | 92  |
| <b>Figura 38.</b> FTIR da quitosana purificada (preta) e não purificada (cinza). Transmitância (%) <i>versus</i> Número de onda (cm <sup>-1</sup> ). ....                                                                                                | 93  |
| <b>Figura 39.</b> Termograma da quitosana comercial não purificada. Fluxo de calor (mW mg <sup>-1</sup> ) <i>versus</i> temperatura (°C). ....                                                                                                           | 94  |
| <b>Figura 40.</b> Micrografia da quitosana comercial não purificada. ....                                                                                                                                                                                | 94  |
| <b>Figura 41.</b> Espectro de EDS para a quitosana comercial não purificada. ....                                                                                                                                                                        | 95  |
| <b>Figura 42.</b> FTIR da casca <i>in natura</i> do camarão e, no detalhe, a estrutura da quitina. Transmitância (%) <i>versus</i> Número de onda (cm <sup>-1</sup> ). ....                                                                              | 96  |
| <b>Figura 43.</b> Termograma de DSC da casca <i>in natura</i> . Fluxo de calor (mW g <sup>-1</sup> ) <i>versus</i> temperatura (°C). ....                                                                                                                | 97  |
| <b>Figura 44.</b> Micrografia em MEV da casca <i>in natura</i> . ....                                                                                                                                                                                    | 97  |
| <b>Figura 45.</b> Espectro de EDS para a casca <i>in natura</i> do camarão. Intensidade (cps eV <sup>-1</sup> ) <i>versus</i> energia (keV). ....                                                                                                        | 98  |
| <b>Figura 46.</b> Espectros FTIR dos experimentos 1-8 de desmineralização da quitina. Transmitância (%) <i>versus</i> Número de onda (cm <sup>-1</sup> ). ....                                                                                           | 101 |
| <b>Figura 47.</b> Histograma de normalidade para o processo de desmineralização (y <sub>1</sub> ). Número de observações <i>versus</i> y <sub>1</sub> . ....                                                                                             | 102 |
| <b>Figura 48.</b> Diagrama de Pareto para o processo de desmineralização (y <sub>1</sub> ). Fatores <i>versus</i> Efeitos. ....                                                                                                                          | 103 |
| <b>Figura 49.</b> Superfície de resposta e curva de contorno para a interação significativa entre as variáveis x <sub>1</sub> x <sub>2</sub> , ou seja, granulometria (x <sub>1</sub> ) e tempo de reação (x <sub>2</sub> ). ....                        | 105 |
| <b>Figura 50.</b> Superfície de resposta e curva de contorno para a interação significativa entre as variáveis x <sub>1</sub> x <sub>3</sub> , ou seja, granulometria (x <sub>1</sub> ) e acidificação molar do ácido clorídrico (x <sub>3</sub> ). .... | 106 |
| <b>Figura 51.</b> Superfície de resposta e curva de contorno para a interação significativa entre as variáveis x <sub>2</sub> x <sub>3</sub> , ou seja, tempo (x <sub>2</sub> ) e acidificação molar do ácido clorídrico (x <sub>3</sub> ). ....         | 107 |

|                                                                                                                                                                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 52.</b> Espectro de FTIR da quitina desmineralizada (Experimento 3) e, no detalhe, a estrutura da quitina. Transmitância (%) <i>versus</i> Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ). .....                   | 109 |
| <b>Figura 53.</b> Termograma de DSC da quitina desmineralizada (Experimento 3). Fluxo de calor ( $\text{mW mg}^{-1}$ ) <i>versus</i> Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ). .....                                    | 110 |
| <b>Figura 54.</b> Micrografias obtidas em MEV para a quitina desmineralizada (Experimento 3). .....                                                                                                               | 110 |
| <b>Figura 55.</b> Espectro de EDS para a quitina desmineralizada (Experimento 3). Intensidade ( $\text{cps eV}^{-1}$ ) <i>versus</i> energia ( $\text{keV}$ ). .....                                              | 111 |
| <b>Figura 56.</b> Espectro de FTIR da quitina desmineralizada (Experimento 3) e, no detalhe, a estrutura da quitina. Transmitância (%) <i>versus</i> Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ). .....                   | 113 |
| <b>Figura 57.</b> Espectros FTIR dos doze diferentes experimentos realizados para desproteinação da quitina desmineralizada. Transmitância (%) <i>versus</i> Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ). .....           | 115 |
| <b>Figura 58.</b> Histograma de normalidade para porcentagem de nitrogênio ( $y_2$ ). Número de observações <i>versus</i> $y_2$ . .....                                                                           | 115 |
| <b>Figura 59.</b> Diagrama de Pareto para o processo de desproteinação ( $y_2$ ). Fatores <i>versus</i> Efeitos. ....                                                                                             | 117 |
| <b>Figura 60.</b> Superfície de resposta e curva de contorno para a interação significativa entre as variáveis $x_5x_6$ , ou seja, temperatura ( $x_5$ ) e tempo ( $x_6$ ). .....                                 | 119 |
| <b>Figura 61.</b> Espectro de FTIR da quitina desmineralizada e desproteínizada (Experimento 6) e, no detalhe, a estrutura da quitina. Transmitância (%) <i>versus</i> Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ). ..... | 121 |
| <b>Figura 62.</b> Termograma de DSC da quitina desmineralizada e desproteínizada (Experimento 6). Fluxo de calor ( $\text{mW mg}^{-1}$ ) <i>versus</i> Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ). .....                  | 121 |
| <b>Figura 63.</b> Micrografias obtidas em MEV para quitina desmineralizada e desproteínizada (Experimento 6). .....                                                                                               | 122 |
| <b>Figura 64.</b> Espectro de EDS para a quitina desmineralizada e desproteínizada (Experimento 6). Intensidade ( $\text{cps eV}^{-1}$ ) <i>versus</i> energia ( $\text{keV}$ ). .....                            | 122 |
| <b>Figura 65.</b> Espectros FTIR dos doze diferentes experimentos realizados para obtenção de quitina desacetilada (quitosana). Transmitância (%) <i>versus</i> Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ). .....        | 126 |
| <b>Figura 66.</b> Histograma de normalidade para o processo de desacetilação ( $y_3$ ). Número de observações <i>versus</i> $y_3$ . .....                                                                         | 127 |
| <b>Figura 67.</b> Diagrama de Pareto para desacetilação ( $y_3$ ). Fatores <i>versus</i> Efeitos. ....                                                                                                            | 128 |
| <b>Figura 68.</b> Superfície de resposta e curva de contorno para a interação entre as variáveis $x_7x_8$ , ou seja, agitação magnética ( $x_7$ ) e tempo ( $x_8$ ). .....                                        | 131 |

|                                                                                                                                                                                                                                                         |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 69.</b> Superfície de resposta e curva de contorno para a interação significativa entre as variáveis $x_8x_9$ , ou seja, tempo ( $x_8$ ) e temperatura ( $x_9$ ).....                                                                         | 132 |
| <b>Figura 70.</b> Curva de potenciometria (preto) e derivativa (cinza) da titulação da quitosana sintetizada. Potencial (mV) <i>versus</i> Volume (mL).....                                                                                             | 133 |
| <b>Figura 71.</b> Gráfico da viscosidade reduzida (■) e viscosidade inerente (●) <i>versus</i> concentração das soluções de quitosana sintetizada.....                                                                                                  | 134 |
| <b>Figura 72.</b> Espectro FTIR da quitosana comercial (cinza) e quitosana sintetizada (preto) e quitina desmineralizada e desproteínizada (azul). Transmitância (%) <i>versus</i> Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).....                             | 137 |
| <b>Figura 73.</b> Espectro FTIR da quitosana sintetizada e, no detalhe, a estrutura da quitosana. Transmitância (%) <i>versus</i> Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).....                                                                              | 138 |
| <b>Figura 74.</b> Termograma de DSC da quitosana comercial (cinza), quitosana sintetizada (preto) e quitina desmineralizada e desproteínizada (azul). Fluxo de calor ( $\text{mW mg}^{-1}$ ) <i>versus</i> .....<br><i>versus</i> .....                 | 139 |
| <b>Figura 75.</b> Micrografias em MEV da quitosana sintetizada.....                                                                                                                                                                                     | 140 |
| <b>Figura 76.</b> Espectro de EDS para a quitosana sintetizada. Intensidade ( $\text{cps eV}^{-1}$ ) <i>versus</i> energia (keV). .....                                                                                                                 | 140 |
| <b>Figura 77.</b> Espectro FTIR da casca <i>in natura</i> (preto), quitina desmineralizada (azul) e quitina desmineralizada e desproteínizada (verde). Transmitância (%) <i>versus</i> Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).....                         | 142 |
| <b>Figura 78.</b> Termograma de DSC da casca <i>in natura</i> (preto), quitina desmineralizada (azul) e quitina desmineralizada e desproteínizada (verde). Fluxo de calor ( $\text{mW mg}^{-1}$ ) <i>versus</i> Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )..... | 143 |
| <b>Figura 79.</b> Espectro de FTIR do composto (1) e, no detalhe, a estrutura do composto (1). Transmitância (%) <i>versus</i> Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).....                                                                                 | 145 |
| <b>Figura 80.</b> Termograma de DSC do composto (1). Fluxo de calor ( $\text{mW mg}^{-1}$ ) <i>versus</i> Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ).....                                                                                                       | 146 |
| <b>Figura 81.</b> Micrografia em MEV do composto (1). .....                                                                                                                                                                                             | 146 |
| <b>Figura 82.</b> Espectro de EDS do composto (1). Intensidade ( $\text{cps eV}^{-1}$ ) <i>versus</i> energia (keV). .....                                                                                                                              | 146 |
| <b>Figura 83.</b> Espectro de FTIR do composto (2). Transmitância (%) <i>versus</i> Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ). .....                                                                                                                          | 147 |
| <b>Figura 84.</b> Termograma de DSC do composto (2). Fluxo de calor ( $\text{mW mg}^{-1}$ ) <i>versus</i> Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ).....                                                                                                       | 148 |
| <b>Figura 85.</b> Micrografia em MEV do composto (2). .....                                                                                                                                                                                             | 149 |

|                                                                                                                                                                                     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 86.</b> Espectro de EDS do composto <b>(2)</b> . Intensidade (cps eV <sup>-1</sup> ) <i>versus</i> energia (keV).....                                                     | 149 |
| <b>Figura 87.</b> Estrutura proposta para os compostos <b>(3a)</b> e <b>(3b)</b> , evidenciando o suporte do composto <b>(1)</b> em quitosana.....                                  | 150 |
| <b>Figura 88.</b> Espectro de FTIR da quitosana comercial (azul) e do composto <b>(3a)</b> (cinza). Transmitância (%) <i>versus</i> Número de onda (cm <sup>-1</sup> ). ....        | 151 |
| <b>Figura 89.</b> Espectro de FTIR da quitosana sintetizada (verde) e do composto <b>(3b)</b> (preto). Transmitância (%) <i>versus</i> Número de onda (cm <sup>-1</sup> ). ....     | 152 |
| <b>Figura 90.</b> Espectro de FTIR do composto <b>(3a)</b> (cinza) e <b>(3b)</b> (preto). Transmitância (%) <i>versus</i> Número de onda (cm <sup>-1</sup> ). ....                  | 153 |
| <b>Figura 91.</b> Termograma de DSC do composto <b>(3a)</b> (cinza) e da quitosana comercial (azul). Fluxo de calor (mW mg <sup>-1</sup> ) <i>versus</i> Temperatura (°C). ....     | 154 |
| <b>Figura 92.</b> Termograma de DSC do composto <b>(3b)</b> (preto) e da quitosana sintetizada (verde). Fluxo de calor (mW mg <sup>-1</sup> ) <i>versus</i> Temperatura (°C). ....  | 155 |
| <b>Figura 93.</b> Sobreposição dos espectros de DSC dos compostos <b>(3a)</b> cinza e <b>(3b)</b> preto. Fluxo de calor (mW mg <sup>-1</sup> ) <i>versus</i> temperatura (°C). .... | 156 |
| <b>Figura 95.</b> Micrografia em MEV do composto <b>(3a)</b> . ....                                                                                                                 | 157 |
| <b>Figura 95.</b> Micrografias do composto <b>(3b)</b> . ....                                                                                                                       | 157 |
| <b>Figura 96.</b> Espectro de EDS do composto <b>(3a)</b> . Intensidade (cps eV <sup>-1</sup> ) <i>versus</i> energia (keV). ....                                                   | 157 |
| <b>Figura 97.</b> Espectro de EDS do composto <b>(3b)</b> . Intensidade (cps eV <sup>-1</sup> ) <i>versus</i> energia (keV). ....                                                   | 158 |
| <b>Figura 98.</b> Estrutura proposta para os compostos <b>(4a)</b> e <b>(4b)</b> , evidenciando o suporte do composto <b>(2)</b> em quitosana.....                                  | 159 |
| <b>Figura 99.</b> Espectro de FTIR da quitosana comercial (azul) e do composto <b>(4a)</b> (cinza). Transmitância (%) <i>versus</i> Número de onda (cm <sup>-1</sup> ). ....        | 160 |
| <b>Figura 100.</b> Espectro de FTIR da quitosana sintetizada (verde) e do composto <b>(4b)</b> (preto). Transmitância (%) <i>versus</i> Número de onda (cm <sup>-1</sup> ). ....    | 161 |
| <b>Figura 101.</b> Espectro de FTIR dos compostos <b>(4a)</b> cinza e <b>(4b)</b> preto. Transmitância (%) <i>versus</i> Número de onda (cm <sup>-1</sup> ). ....                   | 162 |
| <b>Figura 102.</b> Termograma de DSC do composto <b>(4a)</b> (cinza) e da quitosana comercial (azul). Fluxo de calor (mW mg <sup>-1</sup> ) <i>versus</i> Temperatura (°C). ....    | 163 |
| <b>Figura 103.</b> Termograma de DSC do composto <b>(4b)</b> (preto) e da quitosana sintetizada (verde). Fluxo de calor (mW mg <sup>-1</sup> ) <i>versus</i> Temperatura (°C). .... | 164 |



|                                                                                                                                                                                                          |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 104.</b> Sobreposição dos espectros de DSC dos compostos <b>(4a)</b> cinza e <b>(4b)</b> preto. Fluxo de calor ( $\text{mW mg}^{-1}$ ) <i>versus</i> temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ). ..... | 165 |
| <b>Figura 105.</b> Micrografia do composto <b>(4a)</b> . .....                                                                                                                                           | 166 |
| <b>Figura 106.</b> Micrografias do composto <b>(4b)</b> . .....                                                                                                                                          | 166 |
| <b>Figura 107.</b> Espectro de EDS do composto <b>(4a)</b> . Intensidade ( $\text{cps eV}^{-1}$ ) <i>versus</i> energia (keV). .....                                                                     | 167 |
| <b>Figura 108.</b> Espectro de EDS do composto <b>(4b)</b> . Intensidade ( $\text{cps eV}^{-1}$ ) <i>versus</i> energia (keV). .....                                                                     | 167 |
| <b>Figura 110.</b> Gráfico da extrapolação da viscosidade reduzida e inerente para obtenção da viscosidade intrínseca. (MOURA et al., 2011). .....                                                       | 193 |
| <b>Figura 111.</b> Curvas de titulação do tipo sigmóide (Adaptado de SKOOG et al., 2006). .....                                                                                                          | 194 |

## Lista de Tabelas

|                                                                                                                                                   |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabela 1.</b> Valores utilizados no DCC para a desmineralização.....                                                                           | 77  |
| <b>Tabela 2.</b> Valores utilizados no DCC para a desproteínização. ....                                                                          | 78  |
| <b>Tabela 3.</b> Valores utilizados no DCC para a desacetilação.....                                                                              | 78  |
| <b>Tabela 4.</b> Tempos de escoamento em viscosímetro Ostwald e viscosidades para soluções de quitosana comercial. ....                           | 90  |
| <b>Tabela 5.</b> Valores decodificados e resposta $y_1$ (cinzas residuais). ....                                                                  | 99  |
| <b>Tabela 6.</b> Efeitos e coeficientes de regressão $y_1$ . ....                                                                                 | 102 |
| <b>Tabela 7.</b> Análise de variância (ANOVA). ....                                                                                               | 104 |
| <b>Tabela 8.</b> Resultados experimentais e preditos para o processo de desmineralização. ....                                                    | 104 |
| <b>Tabela 9.</b> Valores decodificados e respostas $y_2$ (proteínas totais) .....                                                                 | 113 |
| <b>Tabela 10.</b> Efeitos e coeficientes de regressão $y_2$ . ....                                                                                | 116 |
| <b>Tabela 11.</b> Análise de variância (ANOVA). ....                                                                                              | 118 |
| <b>Tabela 12.</b> Resultados experimentais e preditos para o processo de desproteínização. ....                                                   | 118 |
| <b>Tabela 13.</b> Valores decodificados e respostas de porcentagem de desacetilação..                                                             | 125 |
| <b>Tabela 14.</b> Efeitos e coeficientes de regressão $y_3$ . ....                                                                                | 127 |
| <b>Tabela 15.</b> Análise de variância (ANOVA). ....                                                                                              | 129 |
| <b>Tabela 16.</b> Resultados experimentais e preditos .....                                                                                       | 129 |
| <b>Tabela 17.</b> Tempos de escoamento em viscosímetro Ostwald e viscosidades calculadas para quitosana sintetizada. ....                         | 134 |
| <b>Tabela 18.</b> Comparação entre amostras de quitosana comercial e quitosana sintetizada em laboratório.....                                    | 135 |
| <b>Tabela 19.</b> Comparação das caracterizações para quitosana comercial, quitina desmineralizada e desproteínizada e quitosana sintetizada..... | 140 |
| <b>Tabela 20.</b> Comparação das caracterizações para casca de camarão, quitina desmineralizada e quitina desmineralizada e desproteínizada.....  | 141 |

## Lista de Abreviaturas e Siglas

|               |                                                                                                                              |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ANOVA         | Análise de Variância                                                                                                         |
| AOAC          | do inglês <i>Association of Official Analytical Chemists</i>                                                                 |
| CCQFA         | Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos                                                                    |
| CEME-SUL      | Centro de Microscopia Eletrônica da Zona Sul                                                                                 |
| Composto (1)  | 1-metil-3-( <i>p</i> -carboxifenil)triazeno 1-óxido)                                                                         |
| Composto (2)  | <i>bis</i> [1-metil-3-( <i>p</i> -carboxifenil)triazenido 1-óxido]Ni <sup>II</sup>                                           |
| Composto (4a) | <i>bis</i> [1-metil-3-( <i>p</i> -carboxilatofenil)triazenido 1-óxido]Ni <sup>II</sup><br>suportado em quitosana comercial   |
| Composto (4b) | <i>bis</i> [1-metil-3-( <i>p</i> -carboxilatofenil)triazenido 1-óxido]Ni <sup>II</sup><br>suportado em quitosana sintetizada |
| Composto (3a) | 1-metil-3-( <i>p</i> -carboxifenil)triazeno 1-óxido suportado em<br>quitosana comercial                                      |
| Composto (3b) | 1-metil-3-( <i>p</i> -carboxifenil)triazeno 1-óxido suportado em<br>quitosana sintetizada                                    |
| DCC           | Delineamento Composto Central                                                                                                |
| DCC (pc)      | Delineamento Composto Central com Pontos Centrais                                                                            |
| DSC           | Calorimetria Exploratória Diferencial                                                                                        |
| EDS           | Espectroscopia de Energia Dispersiva                                                                                         |
| EQA           | Escola de Química e Alimentos                                                                                                |
| FTIR          | Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de<br>Fourier                                                               |
| FURG          | Universidade Federal do Rio Grande                                                                                           |
| GD            | Grau de Desacetilação                                                                                                        |
| IV            | Infravermelho                                                                                                                |
| LABGRÃOS      | Laboratório de Grãos                                                                                                         |
| LASIR         | Laboratório de Sólidos Inorgânicos                                                                                           |
| MEV           | Microscopia Eletrônica de Varredura                                                                                          |
| UFPeI         | Universidade Federal de Pelotas                                                                                              |

## Lista de Símbolos

|                       |                                              |
|-----------------------|----------------------------------------------|
| $v$                   | Estiramento                                  |
| $\delta$              | Deformação                                   |
| $v_s$                 | Estiramento simétrico                        |
| $v_{as}$              | Estiramento assimétrico                      |
| $\delta_s$            | Deformação simétrica                         |
| $\delta_{as}$         | Deformação assimétrica                       |
| $x_1$                 | Codificação para Granulometria (mm)          |
| $x_2$ ; $x_6$ e $x_9$ | Codificação para Tempo (min)                 |
| $x_3$                 | Codificação para Acidez HCl (M)              |
| $x_4$ e $x_8$         | Codificação para Temperatura (°C)            |
| $x_5$                 | Codificação para Basicidade NaOH (M)         |
| $x_7$                 | Codificação para Agitação (rpm)              |
| $U$                   | Porcentagem de perda de água (%)             |
| $y_1$                 | Codificação para Desmineralização (%)        |
| $y_2$                 | Codificação para Desproteínização (%)        |
| $y_3$                 | Codificação para Grau de Desacetilação (%)   |
| $\eta_{rel}$          | Viscosidade relativa                         |
| $\eta_{esp}$          | Viscosidade específica                       |
| $\eta_{red}$          | Viscosidade reduzida (mL g <sup>-1</sup> )   |
| $\eta_{ine}$          | Viscosidade inerente (mL g <sup>-1</sup> )   |
| $[\eta]$              | Viscosidade intrínseca (mL g <sup>-1</sup> ) |
| $\Delta H$            | Entalpia (J g <sup>-1</sup> )                |

## Sumário

|                                                                                                                     |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Introdução .....</b>                                                                                          | <b>23</b> |
| <b>2. Objetivos .....</b>                                                                                           | <b>25</b> |
| 2.1 Objetivo Geral .....                                                                                            | 25        |
| 2.2 Objetivos Específicos .....                                                                                     | 25        |
| <b>3. Revisão Bibliográfica .....</b>                                                                               | <b>27</b> |
| 3.1 Quitina.....                                                                                                    | 27        |
| Figura 1. Estrutura química da quitina. ....                                                                        | 27        |
| 3.2 Quitosana.....                                                                                                  | 32        |
| 3.3 Suporte de Moléculas Orgânicas em Quitosana.....                                                                | 37        |
| 3.4 Suporte de Compostos Inorgânicos em Quitosana.....                                                              | 53        |
| <b>4. Materiais e Métodos.....</b>                                                                                  | <b>73</b> |
| 4.1 Solventes e Reagentes .....                                                                                     | 73        |
| 4.2 Equipamentos.....                                                                                               | 74        |
| 4.3 Preparo de Amostra – Quitosana Comercial .....                                                                  | 75        |
| 4.4 Procedimentos para Extração de Quitina e Síntese de Quitosana .....                                             | 75        |
| 4.4.1 Preparo de Amostra – Casca de Camarão-Rosa .....                                                              | 76        |
| 4.4.2 Extração e Desacetilação da Quitina .....                                                                     | 77        |
| 4.5 Procedimentos de Síntese dos Materiais .....                                                                    | 79        |
| 4.5.1 Síntese de 1-metil-3-(p-carboxifenil)triazeno 1-óxido (1) .....                                               | 79        |
| 4.5.2 Síntese de bis[1-metil-3-(p-carboxifenil)triazenido 1-óxido]Ni <sup>II</sup> (2).....                         | 80        |
| 4.5.3 Síntese dos Compostos (3a) e (3b) .....                                                                       | 81        |
| 4.5.4 Síntese dos compostos (4a) e (4b) .....                                                                       | 82        |
| 4.6 Procedimentos de Caracterização dos Materiais.....                                                              | 83        |
| 4.6.2 Determinação de Cinzas.....                                                                                   | 84        |
| 4.6.3 Determinação de Proteínas .....                                                                               | 85        |
| 4.6.4 Determinação da Viscosidade e Cálculo da Massa Molar Média .....                                              | 86        |
| 4.6.5 Titulação Potenciométrica e Cálculo do Grau de Desacetilação .....                                            | 87        |
| 4.6.6 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....                                      | 88        |
| 4.6.7 Calorimetria exploratória diferencial – DSC.....                                                              | 88        |
| 4.6.8 Microscopia Eletrônica de Varredura Acoplada a Sistema de Espectroscopia de Energia Dispersiva – MEV/EDS..... | 89        |
| <b>5. Resultados e Discussão.....</b>                                                                               | <b>90</b> |
| 5.1 Caracterização da Quitosana Comercial .....                                                                     | 90        |
| 5.2 Caracterização da Casca de Camarão .....                                                                        | 95        |

|                                                                                                                    |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>5.3 Extração da Quitina (Desmineralização e Desproteínização) e Síntese da Quitosana (Desacetilação).....</b>   | <b>98</b>  |
| 5.3.1 <i>Desmineralização da Casca de Camarão .....</i>                                                            | 98         |
| 5.3.1.1 <i>Caracterização da Quitina Desmineralizada .....</i>                                                     | 108        |
| 5.3.2 <i>Desproteínização da Quitina Desmineralizada.....</i>                                                      | 111        |
| 5.3.2.1 <i>Caracterização da Quitina Desmineralizada e Desproteínizada.....</i>                                    | 120        |
| 5.3.3 <i>Desacetilação da Quitina Desmineralizada e Desproteínizada.....</i>                                       | 123        |
| 5.3.3.1 <i>Caracterização da quitosana sintetizada .....</i>                                                       | 133        |
| <b>5.4 Etapas Padronizadas de Síntese de Quitosana .....</b>                                                       | <b>143</b> |
| <b>5.5 Caracterização do 1-metil-3-(<i>p</i>-carboxifenil)triazeno 1-óxido (1) .....</b>                           | <b>144</b> |
| <b>5.6. Caracterização <i>bis</i>[1-metil-3-(<i>p</i>-carboxifenil)triazenido 1-óxido]Ni<sup>II</sup> (2) ....</b> | <b>147</b> |
| <b>5.7 Caracterização dos Compostos (3a) e (3b) .....</b>                                                          | <b>149</b> |
| <b>5.8 Caracterização dos Compostos (4a) e (4b) .....</b>                                                          | <b>158</b> |
| <b>6. Considerações Finais.....</b>                                                                                | <b>168</b> |
| <b>7. Referências Bibliográficas .....</b>                                                                         | <b>170</b> |
| <b>ANEXOS .....</b>                                                                                                | <b>185</b> |
| <b>ANEXO A – ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....</b>                                                                       | <b>186</b> |
| <b>ANEXO B – TABELA DE FISHER 10 % .....</b>                                                                       | <b>189</b> |
| <b>ANEXO C – DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS .....</b>                                                                   | <b>190</b> |
| <b>ANEXO D – DETERMINAÇÃO VISCOSIDADE .....</b>                                                                    | <b>191</b> |
| <b>ANEXO E – TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA.....</b>                                                                    | <b>194</b> |

## 1. Introdução

A geração de resíduos durante o processamento de alimentos é inevitável e esse é um dos principais problemas para as indústrias e para a sociedade, especialmente se esses materiais forem descartados de forma incorreta, podendo causar impacto ambiental e com isso, riscos para a saúde humana e de animais (DAMASCENO et al., 2009; MOURA et al., 2011; MOURA et al., 2015). Estudos têm mostrado que alguns resíduos industriais podem conter substâncias úteis, podendo ser utilizados em diversas finalidades. Nesse sentido existe uma constante busca por alternativas que permitam o reaproveitamento de resíduos a fim de minimizar o descarte incorreto, bem como agregar valor ao subproduto (HAFSA et al., 2016; LIU et al., 2016; YUAN et al., 2016; BIONDO et al., 2015; KOUSHA et al., 2015; QU et al., 2015).

A indústria de processamento de alimentos oriundos do meio aquático produz uma quantidade de subprodutos dentre cabeças, caudas, peles e materiais de revestimento (exoesqueletos e cefalotórax). Estes materiais residuais podem ser uma excelente fonte de proteínas, lipídios e pigmentos (BARBER et al., 2013; ZHANG et al., 2014; BAJAJ et al., 2015). Os resíduos de revestimento como o exoesqueleto e cefalotórax dos camarões, podem ser uma fonte de materiais quitinosos. Tem havido um interesse no que diz respeito à utilização da quitina, que é o segundo polissacarídeo mais disponível depois da celulose, este composto é bastante ubíquo e está presente em diferentes organismos, estando na parede celular de fungos e algas, no exoesqueleto de insetos, moluscos, crustáceos e conchas (KAYA et al., 2014; HAJJI et al., 2015; KAYA et al., 2015; KOBAYASHI et al., 2015; TETREAU et al., 2015; CHADRAN et al., 2016; HAMED et al., 2016).

Os resíduos de fontes aquáticas são utilizados como principal matéria prima para obtenção de quitina, dentre estes resíduos, os exoesqueletos e cefalotórax dos camarões estão sendo amplamente utilizados para a extração de quitina a partir de procedimento de desmineralização e desproteíntização, por inúmeros procedimentos (MOURA et al., 2011; GHORBEL-BELLAAJ et al., 2012; BAJAJ et al., 2015; BARON et al., 2015; MOURA et al., 2015; YOUNES e RINAUDO, 2015; YOUNES et al., 2016). No entanto, a utilização deste

biopolímero possui limitações devido a sua insolubilidade, assim, derivados solúveis têm sido produzidos, a quitosana é o mais importante deles e é obtida a partir da desacetilação da quitina, sendo o único polissacarídeo catiônico natural conhecido (DU et al., 2014; HAMED et al., 2016).

A quitosana e outros derivados da quitina são compostos renováveis, biocompatíveis, biodegradáveis e atóxicos, por essas propriedades estão sendo utilizados como biomateriais para diversas aplicações (ARANCIBIA et al., 2015; HAFSA et al., 2016; HOSSAIN e IQBAL, 2016; YUAN et al., 2016) principalmente, na biotecnologia, química ambiental e ciência dos materiais devido a sua capacidade de complexação e adsorção com íons metálicos (BHATNAGAR e SILLANPÄÄ, 2009; KADOUCHE et al., 2012; ANTONY et al., 2013; PIVARCIOVÁ et al., 2014; YUDHASASMITA e NUGROHO, 2015; KYZAS e KOSTOGLU, 2015; NGUYEN et al., 2016). Ainda, é possível a inserção de moléculas de interesse na quitosana, aumentando e melhorando essa capacidade e ampliando suas aplicações (NARANG et al., 2013; SHANMUGAPRIYA et al., 2013; SINGH et al., 2013; ZAWISZA e SITKO, 2013; YANG et al., 2013).

Os resíduos produzidos pelas indústrias de carcinicultura representam mais da metade do peso total do camarão, com isso existe uma crescente preocupação com o meio ambiente, onde, na maioria das vezes, esse resíduo é descartado em aterros ou deixado no ambiente para se deteriorar (DAMASCENO et al., 2009; MOURA et al., 2011; XU et al., 2013; CHADRAN et al., 2016). Assim, a extração da quitina a partir do exoesqueleto do camarão e sua desacetilação para formação de quitosana tem sido um processo vastamente estudado para minimizar o descarte de resíduos ambientais. Além disso, há a possibilidade de modificação da estrutura da quitosana, com inserção de moléculas que potencializem sua capacidade de reação com metais, com potenciais propriedades biológicas, eletroquímicas e catalíticas entre outras (GUIBAL, 2005; ZHANG et al., 2009; MENDES et al., 2011; RIOS-CALOCH et al., 2012; SHANMUGAPRIYA et al., 2013; SOLANKI et al., 2015).



## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem por objetivo produzir quitosana como suporte para imobilização de 1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazeno 1-óxido e de *bis*[1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazenido 1-óxido] $\text{Ni}^{\text{II}}$ , na elaboração de biomateriais orgânicos e inorgânicos inéditos.

### 2.2 Objetivos Específicos

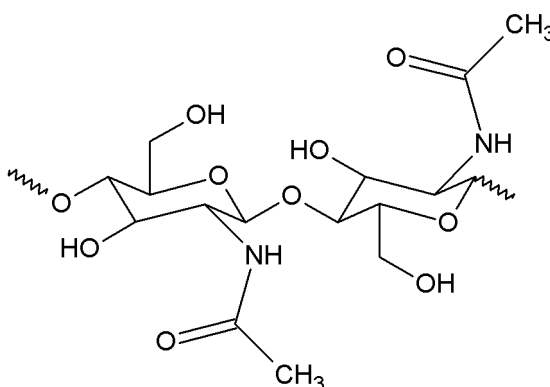
- Otimizar procedimento para síntese de quitosana a partir de cascas de camarão rosa, utilizando planejamento fatorial completo para as etapas de extração de quitina (desmineralização e desproteínização) e desacetilação da quitina (quitosana sintetizada).
- Caracterizar casca do camarão, quitina desmineralizada, quitina desmineralizada e desproteínizada, quitosana sintetizada e quitosana comercial da marca Sigma Aldrich® através das seguintes análises: teor de umidade e cinzas (Método nº 935.29 e nº 923.03, AOAC, 1995), análises químicas por determinação de nitrogênio total e porcentagem de proteína (Método nº 920.87, AOAC, 1995), análises morfológicas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), análises estruturais por espectroscopia de infravermelho (FTIR) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS), e calorimetria exploratória diferencial (DSC).
- Determinar grau de desacetilação pelo método de titulação potenciométrica, bem como massa molecular média, fazendo uso de viscosímetro capilar Cannon-Fenske (Ostwald), de amostras de quitosana sintetizada e quitosana comercial da marca Sigma Aldrich®.
- Sintetizar 1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazeno 1-óxido (**1**) e suportá-lo em quitosana comercial e quitosana sintetizada, na síntese dos compostos (**3a**) e (**3b**), respectivamente.

- Sintetizar *bis*[1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazenido 1-óxido]Ni<sup>II</sup> (**2**) e suportá-lo em quitosana comercial e quitosana sintetizada, na síntese dos compostos (**4a**) e (**4b**), respectivamente.
- Caracterizar comparativamente os compostos (**1**), (**2**), (**3a**), (**3b**), (**4a**) e (**4b**) por microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), espectroscopia de energia dispersiva (EDS) e calorimetria exploratória diferencial (DSC).
- Utilizar espectroscopia na região do infravermelho na determinação do tipo de interação presente entre quitosana e grupos carboxilatos nos compostos (**3a**), (**3b**), (**4a**) e (**4b**).
- Publicar dois artigos envolvendo os resultados desta tese, sendo um artigo sobre planejamento fatorial na síntese de quitosana juntamente com os compostos (**3a**), (**3b**) e (**4b**) e outro artigo, que já foi publicado (*Journal of Molecular Structure*, v.1125, p. 426-432, 2016), contendo os compostos (**2**) e (**4a**).

### 3. Revisão Bibliográfica

#### 3.1 Quitina

Quitina é a denominação usual do biopolímero cujas cadeias são constituídas por unidades de 2-acetamida-2-desoxi-D-glicopiranosose (n-acetilglicosamina) unidas por ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) (LARANJEIRA e FÁVERE, 2009). De origem natural, branco, duro (resistente) e cristalino (Figura 1), é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, ficando atrás da celulose, cuja diferença são os grupos hidroxilas localizadas na posição 2, que na quitina foram substituídos por grupos acetamida (RINAUDO, 2006; LARANJEIRA e FÁVERE, 2009; BAJAJ et al., 2015; MOURA et al., 2015; YOUNES et al., 2016).



**Figura 1.** Estrutura química da quitina.

Este composto de alto peso molecular e fórmula química  $(C_8H_{13}O_5N)_n$  é formado por cadeias lineares compostas de unidades de 2-acetamina-2-desoxi-D-glicose unidas entre elas por ligações glicosídicas  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4), as cadeias paralelas da quitina estão dispostas em “pilhas” ou “folhas” ligadas entre si por ligações de hidrogênio ( $NH\cdots O=C$ ), através dos grupos amida (YOUNES et al., 2015; YOUNES et al., 2016).

Pesquisas utilizando a técnica de difração de raios-X, comprovaram que esse polissacarídeo possui uma fase cristalina organizada onde são identificadas três formas polimórficas de quitina na natureza, denominadas como alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) e gama ( $\gamma$ ). Estas formas polimórficas diferem tanto pela sua

disposição na região cristalina quanto na sua origem biológica (GHORBEL-BELLAAJ et al., 2012; DU et al., 2014; ABDEL-RAHMAN et al., 2015).

As formas mais estudadas e mais comuns são a  $\alpha$ -quitina e  $\beta$ -quitina, enquanto que a  $\gamma$ -quitina ainda é pouco estudada. Estas três estruturas polimórficas estão, possivelmente, relacionadas a diferentes funções no organismo, a forma  $\alpha$  é encontrada onde é necessária uma extrema dureza (resistência), como em cutículas de artrópodes e, freqüentemente, é associada com proteínas e/ou materiais inorgânicos (YOUN et al., 2015; SHUSHIZADEH et al., 2015; CHADRAN et al., 2016).

As formas  $\beta$  e  $\gamma$  são encontradas onde são necessárias flexibilidade e dureza. A forma dominante,  $\alpha$ -quitina é mais estável que as forma  $\beta$  e  $\gamma$ , entretanto estas podem ser convertidas à forma  $\alpha$  por tratamentos adequados (EINBU et al., 2004; CAMPANA-FILHO<sup>a</sup> et al., 2007; CAMPANA-FILHO<sup>b</sup> et al., 2007; BATTISTI e CAMPANA-FILHO, 2008; SHUSHIZADEH et al., 2015).

A quitina pode ser extraída de diferentes fontes naturais, sendo encontrada no cefalotórax e exoesqueleto dos crustáceos, cutícula de diversos invertebrados e na parede celular de fungos e algas (MOURA et al., 2008; KUMARI et al., 2015; NIDHEESH e SURESH 2015; CHADRAN et al., 2016).

O camarão apresenta de 5 a 7 % do seu peso total composto por quitina, estando presente no cefalotórax e no exoesqueleto, enquanto que o siris apresenta de 15-20 %, estando presente no exoesqueleto. Nos insetos, em geral, a quitina apresenta 1,4 % do seu peso (KAYA et al., 2014; HAJJI et al., 2015; KAYA et al., 2015; KOBAE et al., 2015; TETREAU et al., 2015; CHANDRAN et al., 2016; HAMED et al., 2016). Este composto não é encontrado na natureza na forma pura estando associado a proteínas, pigmentos e lipídeos, sendo assim processos de purificação são necessários para remover compostos indesejados (MOURA et al., 2006; BATTISTI e CAMPANA-FILHO, 2008; BARBER et al., 2013; ZHANG et al., 2014; BAJAJ et al., 2015; YOUNES e RINAUDO, 2015).

Nos crustáceos a quitina é constituinte de uma rede complexa com proteínas e carbonato de cálcio para formação das carapaças, essa interação se faz entre o polissacarídeo e a proteína, além de outras interações com pequenas quantidades de pigmentos e lipídeos (MOURA et al., 2006; ZHANG et al., 2014).

Assim, o isolamento da quitina requer a remoção desses principais componentes e é realizada por desproteinização, para retirada das proteínas (BAJAJ et al., 2011; BAJAJ et al., 2015) e desmineralização para retirada do carbonato de cálcio (CHORIT et al., 2008; BARON et al., 2015; MOURA et al., 2015). Os pigmentos e lipídeos são retirados juntamente nesses dois processos, no entanto, quando isto não ocorre à despigmentação e a desodorização se faz necessárias (HAMED et al., 2016; YOUNES et al., 2016).

Muitos métodos têm sido propostos e utilizados ao longo dos anos para obtenção de quitina pura, no entanto, nenhum método padronizado foi adotado, uma vez que a constituição do material de partida é diversificada. Ambos processos, desproteinização e desmineralização, podem ser realizados utilizando-se tratamentos químicos ou enzimáticos. Independente do tratamento selecionado, a extração da quitina começa com a limpeza da matriz (subproduto residual) através de catação para retirada de materiais grosseiros e, então, são separadas granulometrias de tamanhos equivalentes (ASSIS et al., 2008; BAJAJ et al., 2011; MOURA et al., 2011; GHORBEL-BELLAAJ et al., 2012; BAJAJ et al., 2015; BARON et al., 2015; MOURA et al., 2015; YOUNES et al., 2016).

A etapa de desmineralização consiste na remoção de minerais, principalmente, o carbonato de cálcio e é realizada com a utilização de ácidos, os mais utilizados são o ácido clorídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido etanóico e ácido metanóico (BRUGNEROTTO et al., 2001; CHORIT et al., 2008; SAGHEER et al., 2009; BARON et al., 2015; SJAIFULLAH e SANTOSO, 2016). A desmineralização é alcançada a partir da decomposição do carbonato de cálcio em sais minerais solúveis em água e liberação de dióxido de carbono.

Os demais minerais presentes nas matrizes também tendem a reagir com o ácido e tornarem-se sais solúveis, os quais são facilmente separados da quitina por lavagem com água (RAMAPRASAD et al., 2008; SHUSHIZADEH et al., 2015).

O processo de desmineralização é realizado de diferentes maneiras, variando o tempo de extração, temperatura, tamanho da partícula e concentração do ácido clorídrico utilizado. O volume de ácido clorídrico depende da quantidade de amostra a ser desmineralizada, pois é necessário dois mols de ácido para converter um mol de carbonato de cálcio em cloreto de cálcio

(PERCOT et al., 2003; MOURA et al., 2011; MOURA et al., 2015; SHUSHIZADEH et al., 2015).

Convencionalmente, a desmineralização é realizada usando ácido clorídrico diluído em concentrações de até  $10 \text{ mol L}^{-1}$ , durante tempos de reação variando de 15 min a 48 h, sob agitação constante, quanto maior o tempo de desmineralização, menor o teor de cinzas, no entanto, pode ocorrer a degradação do biopolímero (TOLAIMATE et al., 2003; BARON et al., 2015; NIDHEESH e SURESH 2015). A temperatura da reação também deve ser avaliada, pois estudos mostram que o aumento da temperatura acelera a reação de desmineralização promovendo a penetração do solvente no interior da matriz de quitina, assim, algumas reações de desmineralização são realizadas a temperaturas que variam de 25 a  $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , no entanto, a temperatura elevada afeta as propriedades físico-químicas da quitina desmineralizada. Sendo assim, temperaturas mais brandas podem evitar os efeitos na diminuição do peso molecular do polímero e, ainda alcançar uma desmineralização eficaz (MOURA et al., 2011; MOURA et al., 2015; NIDHEESH e SURESH 2015; HAFSA et al., 2016; YOUNES et al., 2016).

A dificuldade na etapa de desproteínização está no rompimento das ligações químicas entre a quitina e a proteína (JIN et al., 2013). Este rompimento é realizado com a utilização de produtos químicos diversos que podem facilmente despolimerizar o biopolímero (SJAIFULLAH e SANTOSO 2016; WU et al., 2016). A remoção completa das proteínas é importante principalmente para as aplicações biomédicas do biopolímero, uma vez que as proteínas podem causar reações alérgicas (YANG et al., 2013; ABDEL-RAHMAN et al., 2015).

Os métodos químicos para a desproteínização geralmente utilizam hidróxido de sódio, carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, hidróxido de potássio, carbonato de potássio, hidróxido de cálcio, sulfito de sódio, bissulfito de sódio entre outros (BAJAJ et al., 2011; BARON et al., 2015; FARINHA et al., 2015; KUMARI et al., 2015). As condições das reações variam consideravelmente em cada estudo. O hidróxido de sódio é o mais comumente utilizado a uma concentração variável de 0,1 a  $5 \text{ mol L}^{-1}$ , temperatura de 25 a  $160 \text{ }^{\circ}\text{C}$  e tempo de reação de alguns minutos a dias. Além de realizar a desproteínização, esta etapa resulta na desacetilação parcial da quitina e

hidrólise do polímero reduzindo o seu peso molecular (PERCOT et al., 2003; TOLAIMATE et al., 2003; EINBU et al., 2004; SAGHEER et al., 2009; YOUNES et al., 2012; MOURA et al., 2011; MOURA et al., 2015).

PERCOT et al., (2003) avaliaram a desmineralização de resíduos de camarão utilizando uma concentração de  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$  de ácido clorídrico (1:40 p/v), a temperatura ambiente, por 15 min, alcançando aproximadamente 99 % de desmineralização. A desproteínização foi efetuada utilizando hidróxido de sódio  $1 \text{ mol L}^{-1}$ , a  $70^\circ\text{C}$ , durante 24 h, com 90 % de desproteínização.

TOLAIMATE et al., (2003) avaliaram sucessivos banhos de desmineralização, de resíduos de camarão, com ácido clorídrico  $0,55 \text{ mol L}^{-1}$  (1:10 p/v), o que mostrou uma boa eficácia, obtendo valores inferiores a 0,1 % de minerais residuais. A desproteínização foi realizada com hidróxido de sódio  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$  a uma temperatura de  $80 - 85^\circ\text{C}$ , durante 1 h, obtendo 85 % de desproteínização.

YOUNES et al., (2012) alcançaram 99 % de desmineralização dos resíduos de crustáceos utilizando ácido clorídrico  $1,5 \text{ mol L}^{-1}$  (1:10 p/v), a  $50^\circ\text{C}$ , durante 6 h, sob agitação de 150 rpm. Já a desproteínização foi realizada de forma enzimática, alcançando 90 % de desproteínização.

BARON et al., (2015) avaliaram a desmineralização de resíduos de camarão utilizando diferentes ácidos  $1 \text{ mol L}^{-1}$  (acético, fórmico, cítrico, fosfórico e clorídrico), durante 6 h de reação, tendo como melhor resultado 1,4 % de minerais residuais para o processo com ácido clorídrico.

SHUSHIZADEH et al., (2015) realizaram a extração da quitina a partir de moluscos, utilizando para o procedimento de desmineralização ácido clorídrico  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ , a uma temperatura de  $25^\circ\text{C}$ , por 24 h, sob agitação constante, alcançando o ponto ótimo de desmineralização citado. Em seguida, a desproteínização foi realizada com a utilização de hidróxido de sódio 10 %, a  $60^\circ\text{C}$ , por 24 h, alcançando uma desproteínização superior a 80 %.

NIDHEESH e SURESH (2015) realizaram a extração da quitina a partir de amostras de camarão utilizando no procedimento de desmineralização, ácido clorídrico  $1,5 \text{ mol L}^{-1}$  (1:5,5 p/v) para amostra úmida, e  $1,6 \text{ mol L}^{-1}$  (1:7,9 p/v) para amostra seca, um tempo reacional de 3 h para ambos os casos. Já a desproteínização foi realizada durante 2,5 h, a uma temperatura de  $69^\circ\text{C}$ ,

utilizando hidróxido de sódio 7,4 % com um ponto máximo de desproteinização de 98 %.

YOUNES et al., (2016) avaliaram condições de desmineralização e desproteinização de quitina proveniente de resíduos de camarão a partir de planejamento fatorial  $2^{5-1}$ , onde as condições ótimas de desmineralização foram alcançadas utilizando granulometria de 2-3 mm, concentração de ácido clorídrico  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  (1:10 p/v), numa reação de 30 min, a 4 °C, realizando três banhos sucessivos. A desproteinização foi realizada por meio de reação enzimática alcançando 98 % de desproteinização.

HAUSA et al., (2016) avaliaram a desmineralização e desproteinização de quitina proveniente de resíduos de camarão utilizando amostras em pó. A desmineralização foi alcançada utilizando ácido clorídrico  $2 \text{ mol L}^{-1}$  (1:10 p/v), durante 150 min, a 60 °C, sob agitação constante. Em seguida a desproteinização utilizando a quitina desmineralizada, lavada e seca, foi alcançada com hidróxido de sódio  $3 \text{ mol L}^{-1}$  (1:10 p/v), durante 120 min, a 80 °C.

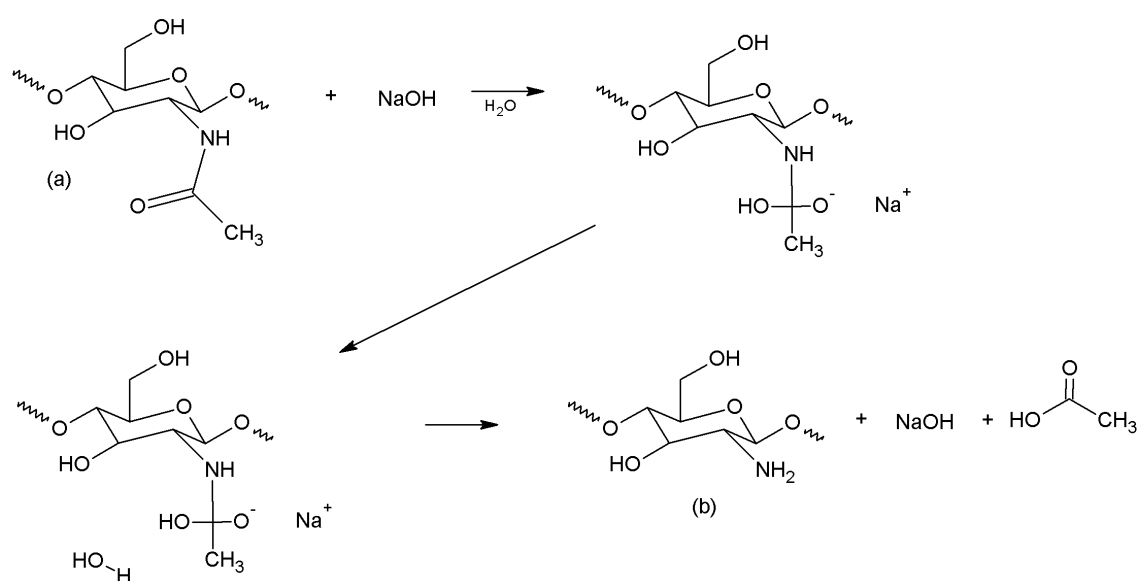
### 3.2 Quitosana

Quitosana é o termo utilizado para um grupo de polímeros obtidos a partir da desacetilação da quitina, sendo que a desacetilação pode ser realizada tanto com solventes ácidos quanto com solventes básicos, no entanto, as ligações glicosídicas da quitina são extremamente sensíveis a solventes ácidos e, portanto, a desacetilação alcalina é a mais comumente utilizada (TANGPASUTHADOL et al., 2003; MOURA et al., 2015). A desacetilação da quitina converte-a em um novo biopolímero, denominado quitosana. Durante a reação de desacetilação alcalina, parte das ligações N-acetil do biopolímero (quitina) são rompidas com a formação de unidades de D-glicosamina que contém um grupo amino livre (quitosana), aumentando a solubilidade do biopolímero em meios aquosos (RINAUDO, 2006; LARANJEIRA e FÁVERE, 2009).

A Figura 2 ilustra o esquema da reação de desacetilação alcalina da quitina desmineralizada e desproteinizada utilizando solução aquosa de



hidróxido de sódio. A reação ocorre com a hidrólise básica da amida, em que a hidroxila da base (nucleófilo) ataca o carbono do grupo acil da amida (eletrófilo), em meio aquoso, ao mesmo tempo em que uma ligação dupla com o oxigênio (=O) é rompida, gerando um ânion R-O<sup>-</sup>. Em seguida, ocorre o deslocamento de elétrons e quebra da ligação entre carbono e nitrogênio, sendo que o nitrogênio atua como base de Lewis e captura o hidrogênio da água e, assim, forma-se a estrutura da quitosana (com grupamento amino), ácido acético e há reconstituição do catalisador hidróxido de sódio, de acordo com SOLOMONS e FRYHLE (2006).



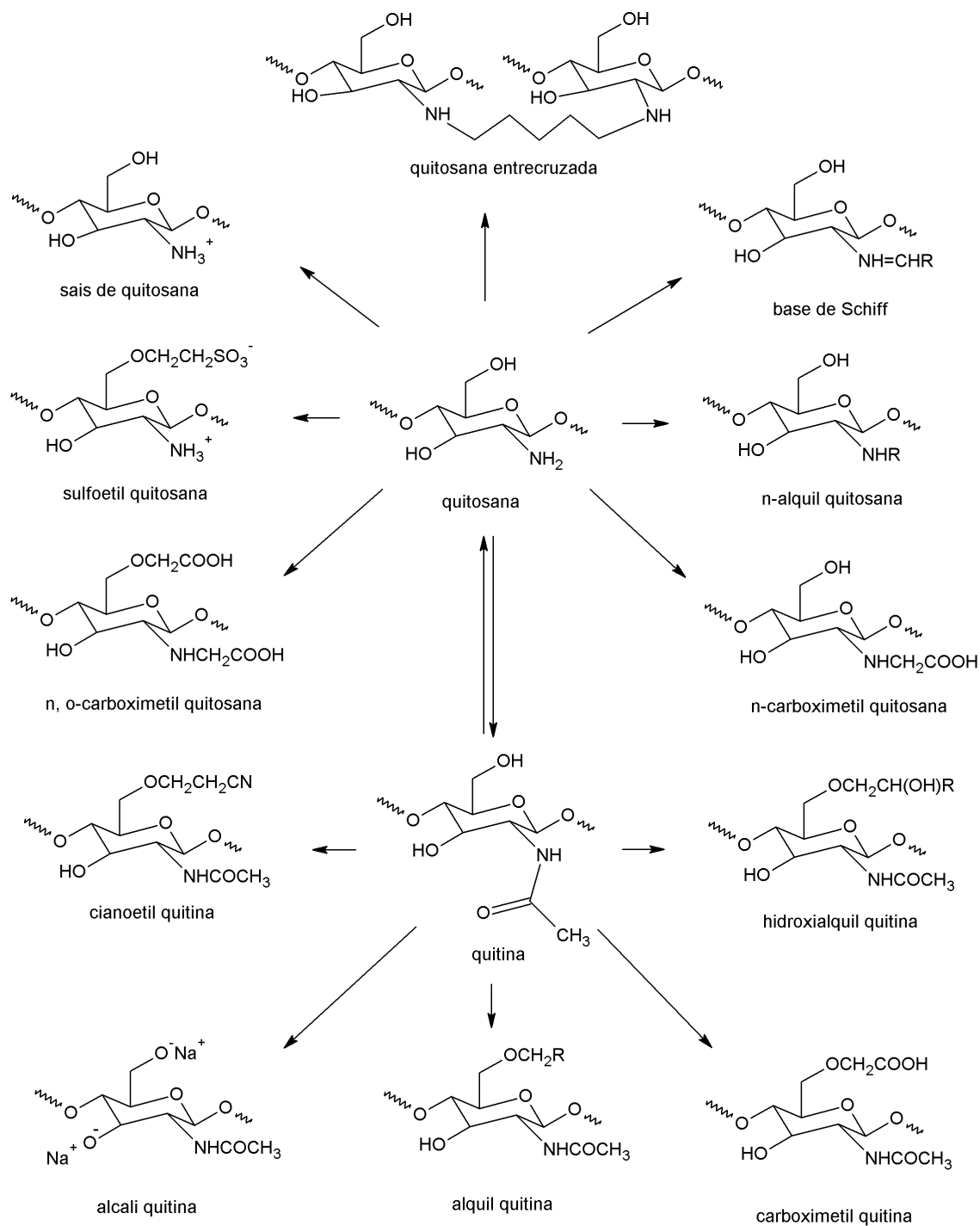
**Figura 2.** Esquema da reação de desacetilação alcalina da quitina e formação de quitosana. Sendo (a) quitina e (b) quitosana. (Adaptado de SOLOMONS e FRYHLE 2006).

A desacetilação da quitina é realizada heterogeneamente ou homogeneamente, no entanto, nas indústrias e laboratórios geralmente são empregados os processos heterogêneos, onde é realizada a desacetilação utilizando a suspensão do polímero em soluções aquosas concentradas de hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio, em tempos variados e temperaturas relativamente altas onde, é alcançado um grau de desacetilação de 85-95 % (RUDRAPATANAM et al., 2003; MOURA et al., 2011; DU et al., 2014). No método homogêneo, é preparada uma dispersão de hidróxido de sódio, água destilada e quitina (30:45:3 p/p/p), à temperatura ambiente, durante o mínimo de três horas, seguido de dissolução em água gelada (0 °C), alcançando um grau de desacetilação entre 48-55 % (MARTINS, 2008).

A quitosana é solúvel em meios aquosos ligeiramente ácidos devido à protonação dos grupos amino e suas unidades glicosamina. Assim, é, a ocorrência de cargas positivas, devido à presença de um número suficiente de grupos amino protonados, que confere solubilidade à quitosana nesses meios. Entretanto, grupos aminos são ácidos fracos e, a quitosana é insolúvel em meios neutros e alcalinos, o que limita suas aplicações. Assim, a modificação estrutural de quitina e quitosana, têm fornecido derivados solúveis em uma ampla faixa de pH e que apresentam propriedades funcionais, as vezes, melhores que os polímeros precursores (Figura 3) (RUDRAPATANAM et al., 2003; CAMPANA-FILHO<sup>a</sup> et al., 2007; CAMPANA-FILHO<sup>b</sup> et al., 2007; MARTINS, 2008).

As reações de conversão de quitina e quitosana em derivados são, geralmente, reações envolvendo os grupos  $-NH_2$  e  $-OH$  presentes nas cadeias dos polímeros. Alguns exemplos de derivados de quitosana que são solúveis em meio neutro como os carboximetilados, os sais de amônio quartenário e os derivados n-alquilados e n-acilados (Figura 3). De outra forma, a o-carboximetilação da quitosana é geralmente executada por reação do polímero com ácido monocloroacético em suspensão de isopropanol/solução aquosa de hidróxido de sódio à temperatura ambiente (CAMPANA-FILHO<sup>a</sup> et al., 2007; CAMPANA-FILHO<sup>b</sup> et al., 2007; BAJAJ et al., 2011).

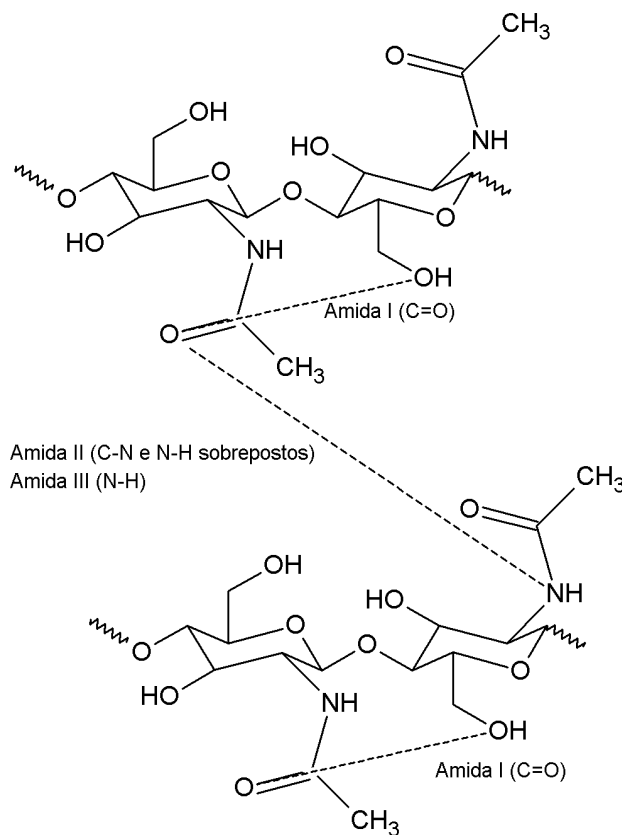
A reação da quitosana com ácido glioxílico, seguida de redução com cianoboroidreto de sódio, resulta em n-carboximetil quitosana. A preparação de sais de amônio quaternário de quitosana introduz cargas positivas permanentes nas cadeias do polímero devido à quaternização dos átomos de nitrogênio dos grupos amino (Figura 3) (CAMPANA-FILHO<sup>a</sup> et al., 2007; CAMPANA-FILHO<sup>b</sup> et al., 2007; BARON et al., 2015; KUMARI et al., 2015; YOUNES et al., 2016).



**Figura 3.** Derivados de quitina e quitosana. (Adaptado de CAMPANA-FILHO<sup>a</sup> et al., 2007).

Durante a desacetilação, os grupos acetil são removidos e ocorre uma despolimerização com a quebra das ligações de hidrogênio (N-H...O e O-H...O) assim desestabilizando o polímero. Nesta fase, a massa molecular é reduzida pela desacetilação em meio alcalino forte (CHEN e HWA, 1996; MOURA et al.,

2011). A Figura 4 evidencia os principais grupos funcionais da quitina, amida I, II e III, os quais podem ser identificados por espectroscopia no IV.



**Figura 4.** Estrutura molecular de duas cadeias de quitina interagindo através de ligações de hidrogênio, envolvendo as amidas I (C=O), II (C-N e N-H sobrepostos) e III (N-H) (Adaptado de GHORBEL-BELLAAJ et al., 2012)

Os procedimentos para converter quitina em quitosana são extensivamente estudadas, e podem ser realizadas por processo enzimáticos (HAJJJI et al., 2015; HAFSA et al., 2016) ou processos químicos (RUDRAPATANAM et al., 2003; BAJAJ et al., 2011; BARON et al., 2015; KUMARI et al., 2015; MOURA et al., 2015; YOUNES et al., 2016).

Os métodos químicos são os mais utilizados para obtenção de quitosana, por ser de baixo custo, sendo assim, passível de ser aplicado em produções de alta escala (RUDRAPATANAM et al., 2003; MARTINS, 2008; MOURA et al., 2011).

A quitosana obtida a partir de desacetilação parcial de quitina ( $GD \geq 60\%$ ) torna-se solúvel no meio ácido aquoso, dependendo da proporção de grupos amino, ao longo das cadeias (JIANG et al., 2003; EINBU et al., 2004; JIANG et al., 2006; DU et al., 2014).

A quitosana possui diversas aplicações (BHATNAGAR e SILLANPÄÄ, 2009; MENDES et al., 2011; KYZAS e KOSTOGLU, 2015) de acordo com sua massa molecular de 50 a 2000 KDa (REGE et al., 2003), esta ainda pode ser preparada como soluções de viscosidade controlada, géis, filmes e membranas, além de microesferas e nanopartículas (DEVLIEGHERE et al., 2004; DU et al., 2014; MOURA et al., 2015; HAFSA et al., 2016; YOUNES et al., 2016).

### **3.3 Suporte de Moléculas Orgânicas em Quitosana**

Dependendo da área de aplicação, a quitosana pode ser modificada para aprimorar suas características funcionais. Esta modificação pode ser feita por suporte ou imobilização. Dentre os compostos, os ácidos carboxílicos, de baixa toxicidade, estão se mostrando promissores para suporte em quitosana (BECKER et al., 2000; SHAMOV et al., 2002; BODDU et al., 2003; HAMDINE et al., 2005; HAMDINE et al., 2006; CHEN et al., 2008; GHOSH e ALI, 2011; GÜMÜSOGLU et al., 2011; LI et al., 2013; FADZALLAH et al., 2014; MI et al., 2015; RAJAN et al., 2016; PEREIRA et al., 2017; UNNITHAN et al., 2017; XU et al., 2017).

Estudos descritos na literatura reportam o tipo de ligação ou interação presente entre os ácidos carboxílicos e as unidades de glicosamina da quitosana (-NH<sub>2</sub>), que sugerem a presença da ligação iônica, ligação de hidrogênio ou reticulação iônica de cadeias de quitosana. (HAMDINE et al., 2006; CHEN et al., 2008; SANTOS et al., 2016).

RITTHIDEJ et al., (2002) avaliaram a variação na capacidade de adsorção de água de filmes compostos por diferentes ácidos carboxílicos (acético, cítrico, fórmico, glicólico, láctico, málico e propiônico) suportados em quitosana (GD 75 %). Os resultados da espectroscopia de IV, para todas as amostras, exibiram banda de deformação (N-H) e estiramento (C=O).

As amostras foram tratadas termicamente, após o tratamento térmico a intensidade das bandas diminuiu, exceto da banda de amida I, principalmente nos filmes formados pelos ácidos acético e propiônico, enquanto que, para os

filmes formados pelos ácidos cítrico e málico, não foi observada a diminuição das bandas.

A diminuição da intensidade das bandas sugere a mudança no tipo de ligação, assim, sem tratamento térmico supõem-se a presença de interação eletrostática entre  $\text{-NH}_3^+$  da quitosana e  $\text{-COO}^-$  (carboxilato).

Em amostras tratadas termicamente as razões da intensidade da banda de estiramento  $\text{C=O}$  em relação ao estiramento  $\text{N-H}$  foram calculadas e, os autores verificaram que, para os filmes formados pelos ácido acético, fórmico e propiônico as razões aumentavam proporcionalmente com o tempo de tratamento, ao contrário do que foi observado nos filmes não tratados, os autores sugerem que, a temperaturas elevadas ( $> 75^\circ\text{C}$ ) o carboxilato poderia ser auto-protonado, formando ácido carboxílico e reagir lentamente com a amina (nucleófilo) para formar a amida, alterando de ligação iônica para ligação covalente.

SHAMOV et al., (2002) estudaram a absorção e a adsorção de quatro ácidos carboxílicos (acético, propiônico, butírico e valérico) e um ácido isocarboxílico (isovalérico) suportados em quitosana (GD 75 %) em dois meios diferentes: aquoso e na mistura água:etanol (3:2 v/v). O objetivo deste estudo foi demonstrar que a interação entre a quitosana e os ácidos carboxílicos é determinada por dois fatores: por interações eletrostáticas entre os grupos funcionais da quitosana e dos ácidos carboxílicos e interações hidrofóbicas entre os domínios internos das cadeias da quitosana e os hidrocarbonetos presentes nas cadeias dos ácidos carboxílicos.

A adsorção e a absorção dos ácidos carboxílicos em quitosana foram influenciadas pela estrutura e comprimento da cadeia dos hidrocarbonetos presentes nos ácidos carboxílicos, bem como o valor da constante de dissociação do ácido (pK). Os resultados demonstraram que, para as interações hidrofóbicas, a adsorção depende da estrutura química do ácido (linear, ramificada, tamanho) e da sua constante de dissociação (pK).

Em soluções aquosas, houve uma diminuição da adsorção dos ácidos carboxílicos a medida que estes apresentavam cadeias e valores de pK maiores, apenas o ácido isovalérico não apresentou esta correlação, onde os autores

sugerem que, devido a estrutura química com ramificações, houve impedimentos estéricos para as interações hidrofóbicas.

Com relação a solução água:etanol (3:2 v/v) onde as interações hidrofóbicas são mais importantes, não houve correlação entre a adsorção e os valores da constante de dissociação, no entanto, verificou-se que quanto maior a cadeia do ácido carboxílico maior era a taxa de adsorção do mesmo em quitosana, mostrando que quando o solvente é menos polar as interações hidrofóbicas tornam-se importantes e complementares em relação as interações iônicas que, neste caso, não menos importantes.

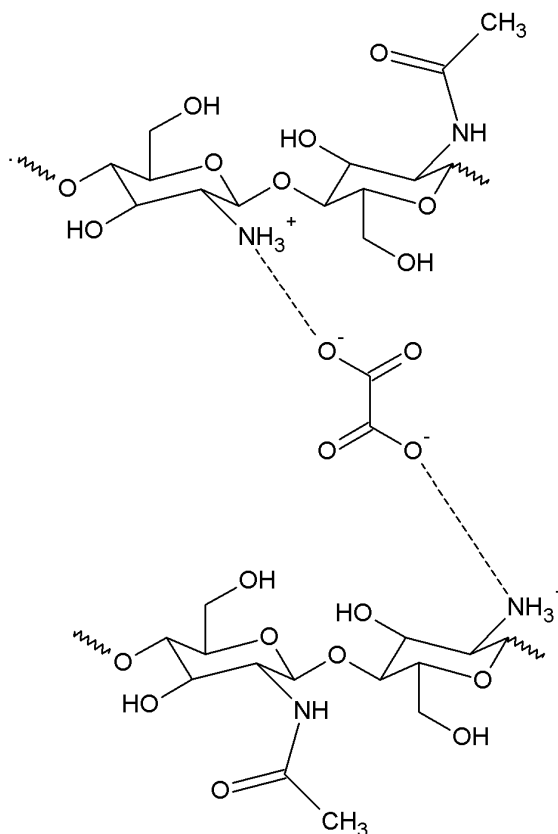
HAMDINE et al., (2005) estudaram diferentes ácidos orgânicos (fórmico, acético, láctico, propiônico, butírico, isobutírico, adípico, oxálico, succínico, málico, maléico, acotínico, ascórbico e cítrico), cloro-orgânicos (cloro-acético, dicloro-acético e tricloro-acético) e inorgânicos (sulfúrico, fosfórico e clorídrico) suportados em quitosana (GD 90 %) para produção de hidrogéis.

Foram avaliados os efeitos do comprimento das cadeias e a complexidade das estruturas químicas dos ácidos carboxílicos nas ligações iônicas para a formação dos hidrogéis. Os resultados demonstraram que as interações nestes hidrogéis ocorreram por dois mecanismos diferentes: ligação iônica juntamente com ligações de hidrogênio nos ácidos oxálico e fosfórico, na proporção de (1:2 ácido:quitosana) e somente reticulação iônica, no caso do ácido sulfúrico.

A presença das interações hidrofóbicas foram verificadas na parte acetilada da quitosana ( $-\text{NH}_2\text{COCH}_3$ ). Com os ácidos cloroacético, di e tricloro-acético, fórmico e láctico, havendo resistência iônica, não houve a formação dos hidrogéis. O ácido oxálico, que possui dois carbonos em sua cadeia, formou hidrogel, assim como o ácido malônico (três carbonos), no entanto, o processo de formação do hidrogel ocorreu de forma lenta.

Para o ácido succínico, que possui quatro carbonos, não houve geleificação, assim como para os ácidos ascórbico, maléico e trans-acetônico, devido às suas estruturas mais complexas e ramificadas. Para ácido dicarboxílicos foi evidenciado um limite de até três carbonos para que ocorresse a geleificação. Ácidos de estruturas volumosas apresentam impedimento ao acesso do grupo amino da quitosana quando a mesma encontra-se na configuração tridimensional em solução aquosa.

Os mesmos autores, HAMDINE et al., (2006) avaliaram o ácido fosfórico e ácido oxálico suportados em quitosana (GD 90 %) para formação de hidrogéis. Os parâmetros avaliados foram: concentração do biopolímero (quitosana), temperatura e força iônica. A Figura 5 ilustra a representação, sugerida pelos autores, para o efeito de reticulação iônica dos íons oxalatos com os grupos amino protonados de duas unidades protonadas de glicosamina da quitosana, na formação do composto (1:2) ácido oxálico/quitosana.



**Figura 5.** Íons oxalato suportados em quitosana (adaptado de HAMDINE et al., 2006).

O efeito de reticulação iônica do ácido oxálico suportado em quitosana também foi observado por CHEN et al., (2008), onde os autores estudaram diferentes ácidos carboxílicos (oxálico, succínico, málico, adípico, glicólico e acético) suportados em quitosana (GD 90 %), com o objetivo de investigar as diferenças nas propriedades de resistência à tração e capacidade de alongamento das membranas formadas.

Os ácidos carboxílicos utilizados neste estudo, especialmente os dicarboxílicos, podem fornecer prótons para quitosana, bem como, interagir ionicamente com seus grupos amino carregados positivamente. Assim, os



resultados da medida de grupos aminos livres, realizados por titulação potenciométrica, sugerem que houve uma diminuição na quantidade destes grupos, devido à formação dos compostos ácido carboxílico/quitosana para todas as membranas formadas.

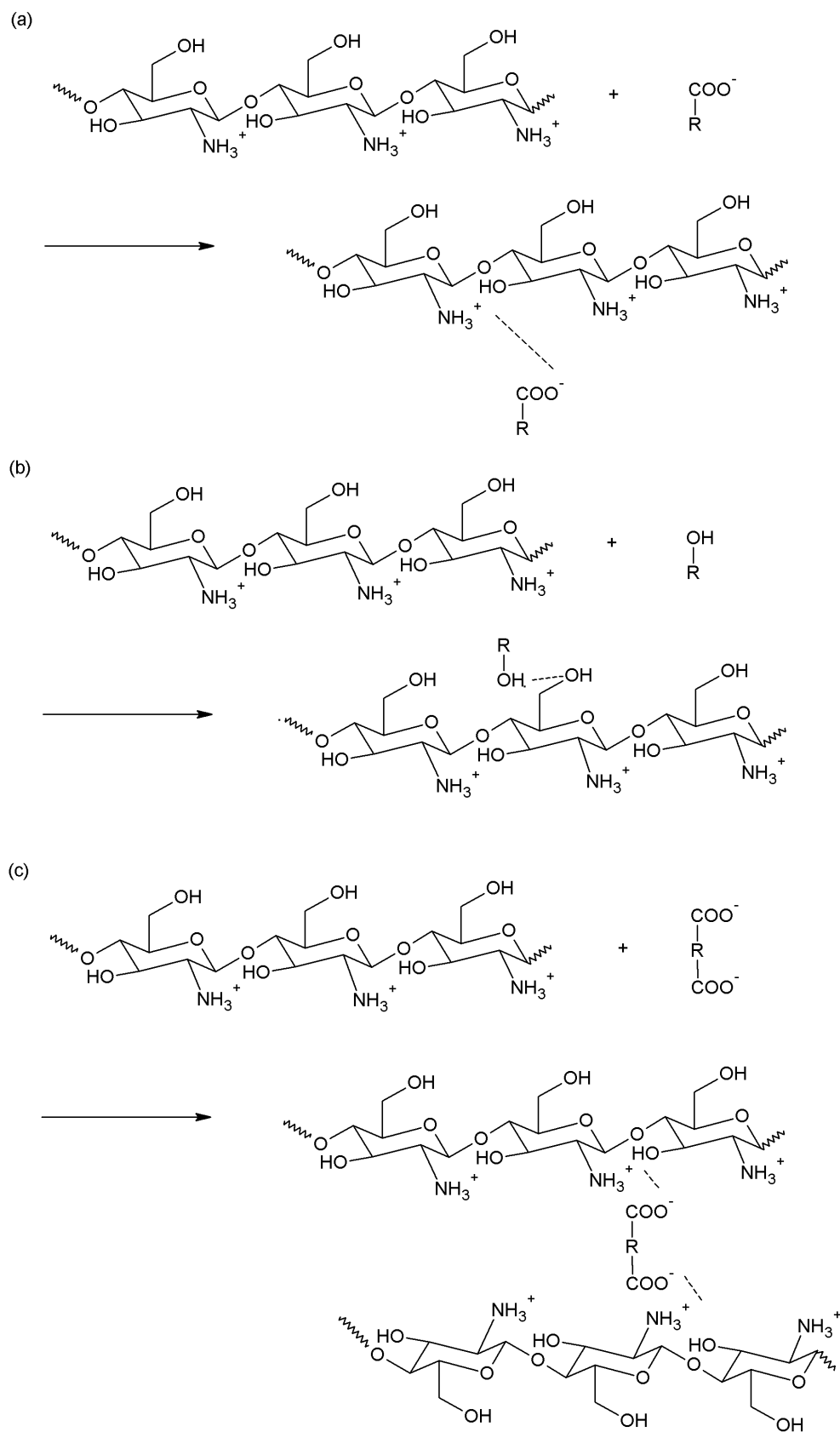
A Figura 6, sugerida pelos autores, evidencia as possíveis ligações entre os ácidos carboxílicos suportados em quitosana, sendo (a) através de ligação iônica, (b) através de ligação de hidrogênio e (c) através de reticulação iônica de cadeias de quitosana.

Com base nos resultados de resistência à tração, o estudo sugere que, uma baixa resistência à tração, observada com o ácido monocarboxílico (acético) sugerem ligação iônica (Figura 6a) entre o carboxilato do ácido e o grupo amino protonado da quitosana. Já as demais estruturas, sugerem ligações mais fortes, uma vez que apresentam melhor resistência à tração.

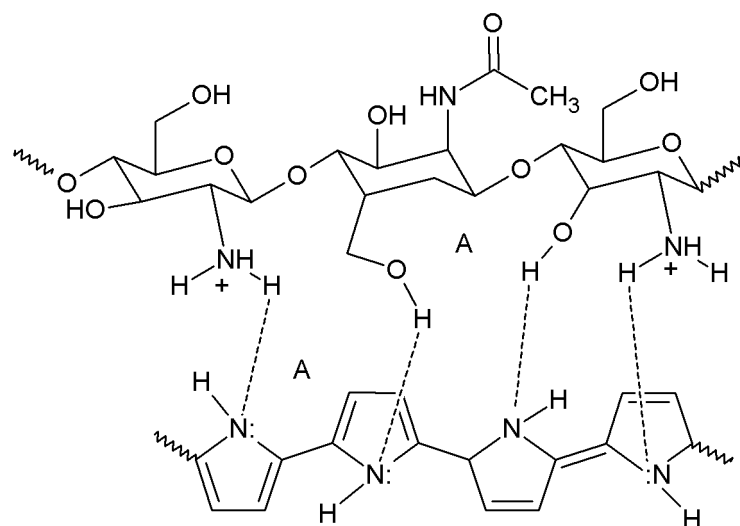
Já a partir dos resultados de capacidade de alongamento, os autores sugerem que um aumento desta capacidade e a melhor adsorção de água nos poros da membrana se devem ao aumento de grupos hidroxila na cadeia dos ácidos carboxílicos (ácido glicólico), o que faz com que ocorra a formação de ligação de hidrogênio (Figura 6b) entre o grupo hidroxila e a quitosana.

Por fim, os ácidos dicarboxílicos (oxálico, succínico, málico e adípico) interagem por reticulação iônica (Figura 6c), o que foi sugerido devido às membranas formadas apresentarem uma maior resistência à tração, melhor adsorção de água nos poros, sem alterar a capacidade de alongamento.

YALÇINKAYA et al., (2010) sintetizaram e caracterizaram um filme composto de polipirrol e ácido oxálico suportados em quitosana (GD 75 %). Na Figura 7 os autores sugerem o modelo de estrutura do composto sintetizado.



**Figura 6.** Interações e ligações entre ácidos carboxílicos e quitosana (Adaptado de CHEN et al., 2008).



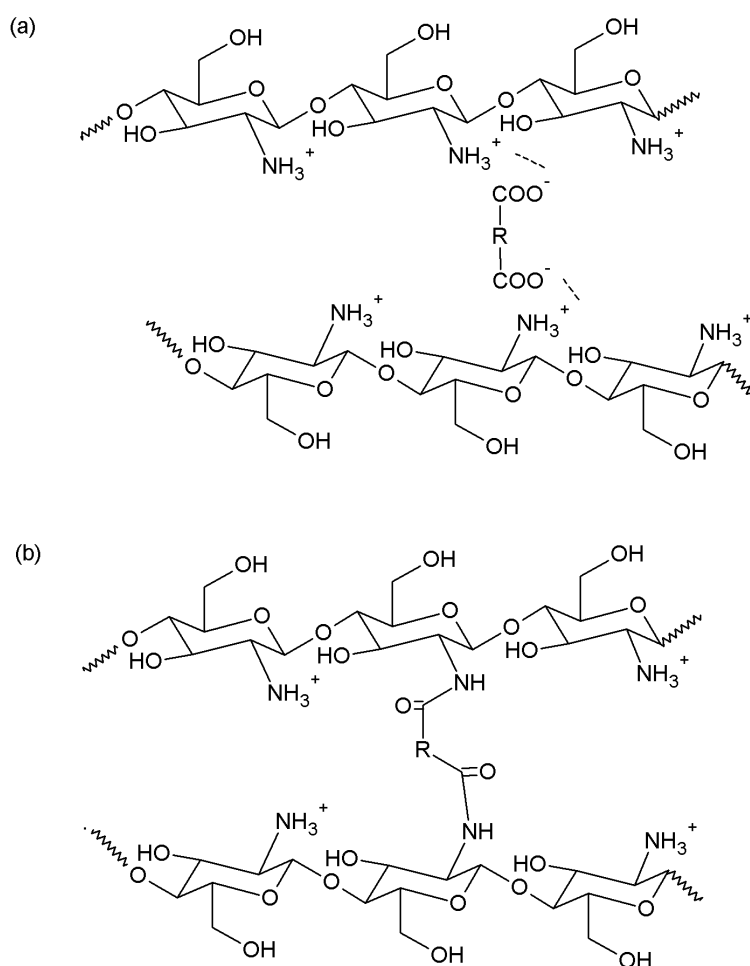
A:  $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$

**Figura 7.** Representação estrutural do composto sintetizado. A = ânion oxalato (Adaptado de YALÇINKAYA et al., 2010).

Os resultados de espectroscopia de IV, para o polipirrol puro, evidenciaram bandas características de estiramento (N-H) em  $3425\text{ cm}^{-1}$ , em  $1600\text{ cm}^{-1}$  estiramento do anel pirrol (C=C) e em  $1033\text{ cm}^{-1}$  deformação no plano da unidade pirrol (C-H). Para quitosana pura, foram relatadas bandas em  $3390\text{ cm}^{-1}$  de estiramento (O-H) sobreposto ao (N-H) e as bandas de ligação hidrogênio do polissacarídeo. Banda em  $2879\text{ cm}^{-1}$  de estiramento (C-H), em  $1655\text{ cm}^{-1}$  estiramento (C=O) devido as unidades acetil, em  $1579\text{ cm}^{-1}$ , em  $1420\text{ cm}^{-1}$  estiramento (C-N) acoplado com deformação do plano (N-H), em  $1376\text{ cm}^{-1}$  deformação simétrica de ( $\text{CH}_3$ ), em  $1030\text{ cm}^{-1}$  estiramento (C-O-C) e em  $1154$  e  $896\text{ cm}^{-1}$  bandas específicas da ponte glicosídica  $\beta(1-4)$ .

Para o composto formado (Figura 7), os autores relataram uma banda larga centrada entre  $3100$  e  $3450\text{ cm}^{-1}$  de estiramento (O-H) sobreposto a banda de estiramento (N-H), esta banda apresentou-se mais larga do que as observadas nos espectros anteriores de polipirrol e quitosana, os autores sugerem que isto ocorre devido às vibrações de estiramento das ligações de hidrogênio (N-H...O, O-H...O e O-H...N). A banda larga (duplete) em  $1600$ - $1660\text{ cm}^{-1}$  se dá pela combinação das bandas (C=C do anel pirrol e C=O da quitosana) antes relatada, nesta faixa, comprovando a formação do composto entre o polipirrol e a quitosana.

GHOSH e ALI, (2012) avaliaram as características físico-químicas dos diferentes ácidos dicarboxílicos (oxálico, malônico, adípico, zeláico) e ácido acético (monocarboxílico) suportados em quitosana (GD 91 %), com o objetivo de melhorar as propriedades físico-químicas dos compostos formados. Foi analisado ácido carboxílico/quitosana em solução e ácido carboxílico/quitosana sólido (liofilizado). Os autores sugerem na Figura 8, os tipos de ligação entre o ácido carboxílico e a quitosana, sendo que Figura 8a evidencia ligação iônica, quando o composto encontra-se em solução e Figura 8b evidencia ligação covalente, ou seja, formação de amida, quando o composto encontra-se em estado sólido (liofilizado).



**Figura 8.** Suporte de ácidos carboxílicos em quitosana. (a) Ligação iônica. (b) Ligação covalente (Adaptado de GHOSH e ALI, 2012).

As interações moleculares não covalentes incluindo ligações de hidrogênio a interações hidrofóbicas apresentam um papel fundamental na organização estrutural de polímeros orgânicos como polissacarídeos e

proteínas. No estado sólido, a quitosana adota uma conformação helicoidal mantida principalmente através de ligações de hidrogênio intremoleculares.

Em solução, a estabilidade das ligações de hidrogênio é abalada, sendo que a estrutura helicoidal é mantida, principalmente, através de interações hidrofóbicas (GHOSH e ALI, 2012 APUD WU et al., 2004 e 2005). O suporte de ácido oxálico em quitosana foi confirmado pela análise de espectroscopia de IV, onde, os resultados mostram que, todos os compostos de ácido carboxílico/quitosana (solução e liofilizados) e quitosana pura, apresentaram absorção na região de  $3000\text{ cm}^{-1}$  devido à vibração de estiramento (O-H) sobreposta ao estiramento (N-H) e bandas das ligações de hidrogênio entre as moléculas de quitosana. As posições destas faixas permanecem praticamente inalteradas em comparação com a quitosana pura, no entanto, a intensidade da absorbância foi influenciada pela interação entre os ácidos carboxílicos e a quitosana.

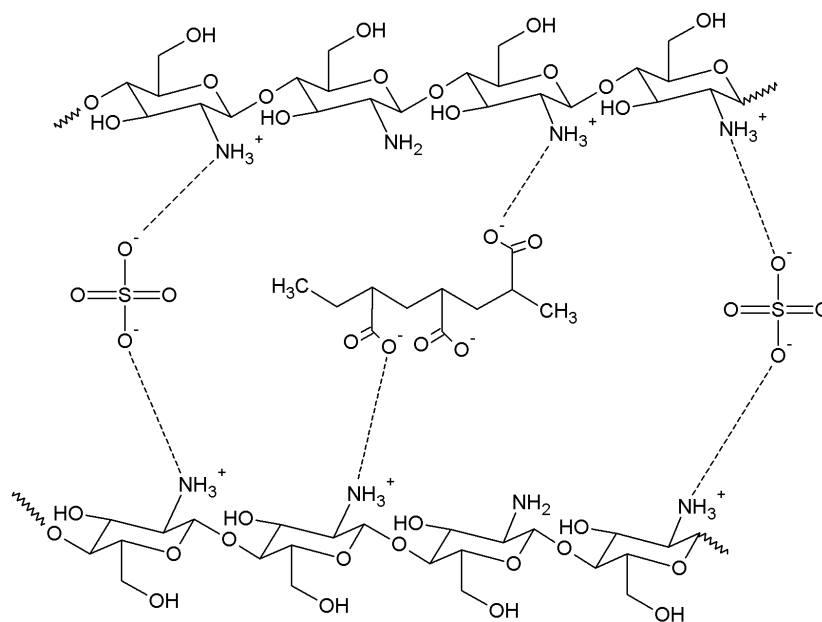
As amostras também mostraram bandas características de estiramento assimétrico e simétrico da ligação (C-H) em  $2929\text{ cm}^{-1}$  e  $2878\text{ cm}^{-1}$ . Os resultados evidenciam que as bandas da carbonila, (C=O-NHR), amina ( $\text{NH}_2$ ) e amônia ( $\text{NH}_3^+$ ) também foram observadas, sendo estas as mais importantes. A quitosana pura apresentou banda de intensidade média em  $1660\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento (C=O) da carbonila da amida e a banda em  $1598\text{ cm}^{-1}$  causada pela deformação ( $\text{NH}_2$ ) da amina primária. Segundo a literatura a presença de “pequeno ombro” em aproximadamente  $1514$  e  $1615\text{ cm}^{-1}$  evidencia a presença de amônia ( $\text{NH}_3^+$ ) e a ausência desta indica a formação da amida (O=C-NHR). No entanto, neste caso, os autores não observaram as bandas referentes à ( $\text{NH}_3^+$ ) nos sais na forma iônica em solução, mesmo assim a interação iônica foi comprovada através de deslocamentos nas bandas.

Quando observada a região do espectro de infravermelho para os compostos formados por ácidos carboxílicos suportados em quitosana em solução, essas bandas de C=O e  $\text{NH}_2$  são claramente movidas para regiões de menor número de onda, devido à interação eletrostática destes grupamentos ( $-\text{COO}^-\cdots^+\text{H}_3\text{N}-$ ). Já em comparação com a quitosana pura os compostos liofilizados (secos a frio ou secos em dessecador) evidenciaram a formação de amida (C-N) entre o ácido carboxílico e a quitosana. Todos os compostos, em

solução e liofilizados, apresentaram bandas em comprimentos de onda superiores a  $1700\text{ cm}^{-1}$  indicando a presença de grupo carbonil de ácidos carboxílicos livres.

Esses resultados indicam que ocorreu ligação iônica entre os ácidos carboxílicos e quitosana nos compostos em solução e ligação covalente nos compostos liofilizados. Por fim, durante o processo de obtenção dos compostos, o que apresentou as melhores respostas, de resistência à tração, flexibilidade mecânica e permeabilidade à água, foi o ácido malônico/quitosana e, a pior resposta foi do ácido azelaico/quitosana, que devido a sua cadeia longa apresentou baixa resistência à tração, pouca flexibilidade mecânica e menor permeabilidade à água.

GÜMÜSOGLU et al., (2011), estudaram a permeabilidade do metanol em membrana composta de ácido poliacrílico (orgânico) suportado em quitosana, tratado e não tratado com ácido sulfúrico (inorgânico). A Figura 9 ilustra as ligações iônicas que ocorrem entre os ácidos, orgânico e inorgânico, quando suportados em quitosana, sendo que ambos os ácidos atuam como reticulantes.



**Figura 9.** Estrutura moléculas evidenciando ligações iônicas para o composto formado de ácido poliacrílico/quitosana tratado com ácido sulfúrico (Adaptado de GÜMÜSOGLU et al., 2011).

Neste estudo os resultados de espectroscopia de IV evidenciam a formação da ligação iônica entre os grupos amino protonados da quitosana e o

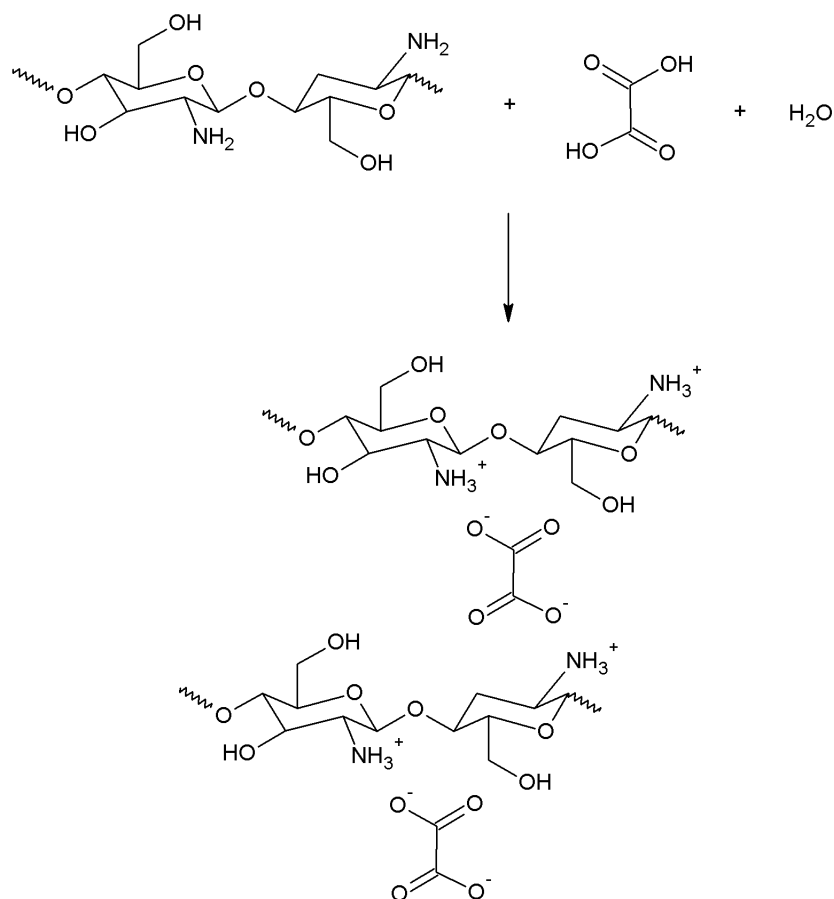
carboxilato do ácido poliacrílico. As bandas de quitosana pura foram observadas nas regiões  $1647\text{ cm}^{-1}$  e  $1567\text{ cm}^{-1}$  características dos grupamentos amida I e II.

Estas bandas citadas foram deslocadas para uma região de menor número de onda nos compostos formados por quitosana e ácido orgânico, tratados e não tratados com ácido sulfúrico, quando comparadas com as regiões encontradas na quitosana pura, comprovando a ligação entre o ácido orgânico e quitosana.

A banda característica do ácido poliacrílico puro foi observada em  $1701\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento ( $\text{C}=\text{O}$ ), quando este é suportado em quitosana as bandas em  $1701\text{ cm}^{-1}$  e  $1647\text{ cm}^{-1}$  correspondem à existência de ácidos carboxílicos livres, do ácido orgânico e da quitosana, respectivamente, enquanto, o aparecimento de duas bandas, a primeira de deformação simétrica em  $1540\text{ cm}^{-1}$ , comprova a formação do grupo ( $\text{NH}_3^+$ ) e, a segunda em  $1630\text{ cm}^{-1}$  comprova a presença dos íons carboxilato ( $\text{COO}^-$ ).

Estas duas bandas são fortes evidências da interação eletrostática entre os grupos amino protonados da quitosana e os grupos carboxilatos do ácido poliacrílico para o composto não tratado com ácido sulfúrico. O infravermelho do composto tratado com ácido sulfúrico evidencia a banda em  $1540\text{ cm}^{-1}$  atribuída, como anteriormente, ao grupamento ( $\text{NH}_3^+$ ), no entanto, esta reticulação iônica tem a contribuição do ácido sulfúrico. Neste composto também são observadas bandas de estiramento ( $\text{N-H}$ ) na região de  $3000 - 3200\text{ cm}^{-1}$  atribuída a protonação dos grupos aminos livres da quitosana. Por fim, o composto tratado, apresentou uma melhora na condutividade e nas propriedades de barreira na permeabilidade do metanol quando comparada com membranas do composto não tratado e de quitosana pura, o que justifica a melhora na reticulação da membrana quando o ácido inorgânico é inserido.

FADZALLAH et al., (2014) avaliaram a interação entre o ácido oxálico, em diferentes concentrações, suportado em quitosana na formação de membranas eletrolíticas sólidas. As interações iônicas foram investigadas por espectroscopia de IV. A Figura 10 evidencia a ligação iônica entre o grupamento amino protonado da quitosana e os grupos carboxilato do ácido oxálico, tendo como efeito secundário a reticulação iônica entre as cadeias de quitosana.



**Figura 10.** Ligação iônica entre o ácido oxálico e quitosana (Adaptado de FADZALLAH et al., 2014).

Nos resultados de espectroscopia de IV observou-se, para quitosana pura, banda larga entre  $3425$  e  $3390\text{ cm}^{-1}$  atribuído a sobreposição dos estiramentos (O-H) e (N-H), banda dupla em  $2929\text{ cm}^{-1}$  e  $2878\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento simétrico e assimétrico de (C-H), banda em  $1647\text{ cm}^{-1}$  referente à carboxamida (C=O) e banda em  $1580\text{ cm}^{-1}$  referente ao grupamento (N-H) da amina.

Outras bandas em  $1416\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-N acoplado a deformação no plano N-H),  $1376\text{ cm}^{-1}$  (deformação angular simétrica de  $\text{CH}_3$ ),  $1320\text{ cm}^{-1}$  (C-N do grupamento amino) e  $1026\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-O-C) também foram observadas. Os resultados para o ácido oxálico puro apresentaram bandas em  $1718\text{ cm}^{-1}$  referente ao grupamento de ácido carboxílico livre,  $1219\text{ cm}^{-1}$  estiramento assimétrico (O-H) e  $712\text{ cm}^{-1}$  estiramento assimétrico do tipo tesoura ( $\text{COOH}$ ).



Por fim, a análise por deconvolução dos espectros de infravermelho para o ácido oxálico suportado em quitosana, para uso como membranas eletrolíticas, evidenciou o deslocamento da banda (O-H) da quitosana em  $3543\text{ cm}^{-1}$  para  $3531\text{ cm}^{-1}$  à medida que aumentava a concentração de ácido oxálico. As bandas simétricas e assimétricas referentes ao estiramento ( $\text{NH}_2$ ) da quitosana foram deslocadas de  $3401\text{ cm}^{-1}$  e  $3268\text{ cm}^{-1}$  para  $3420\text{ cm}^{-1}$  e  $3260\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente.

Os autores sugerem que estas mudanças comprovam a interação de hidrogênio entre próton ( $\text{H}^+$ ) oriundo do ácido oxálico com e o grupo hidroxil da quitosana. Outros deslocamentos também foram observados de  $1575\text{ cm}^{-1}$  para  $1559\text{ cm}^{-1}$  referente à banda de deformação ( $\text{NH}_2$ ) e de  $1647\text{ cm}^{-1}$  para  $1640\text{ cm}^{-1}$  referente à banda de estiramento ( $\text{C}=\text{O}$ ) do grupo carbonil da amida. Por fim, outras bandas, referentes ao ácido oxálico desprotonado ( $\text{COO}^-$ ) ( $1526\text{ cm}^{-1}$ ) e à quitosana protonada ( $\text{NH}_3^+$ ) ( $1600\text{ cm}^{-1}$ ) também foram observadas. A banda referente ao grupo carboxílico livre é observada em  $1720\text{ cm}^{-1}$ . A produção da membrana eletrolítica de ácido oxálico suportado em quitosana teve propriedades aprimoradas, se comparadas à quitosana pura, como o aumento da condutividade, sendo a melhor membrana a que possui a maior concentração de ácido oxálico de 40 % (v/v).

UNNITHAN et al., (2017) estudaram o desenvolvimento de um composto bioativo de óxido de grafeno e ácido hialurônico suportado em quitosana (GD 85 %) para ser utilizado, em conjunto com o fármaco sinvastatina, como indutor em tratamentos ósseos. A partir das análises de espectroscopia de IV, os autores, comprovam a ligação entre o óxido de grafeno e o ácido hialurônico suportado em quitosana.

Para o óxido de grafeno puro foram observadas as principais bandas em  $1034\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento (C-O-C) do alcoxi ou epóxi,  $1226\text{ cm}^{-1}$  banda referente à (C-OH),  $1620\text{ cm}^{-1}$  referente às vibrações (C=C) da estrutura do grafite não oxidado e em  $1730\text{ cm}^{-1}$  referente ao grupo carbonil e carboxil (C=O). Para o ácido hialurônico puro foi observada a banda em  $1405\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento (N-H) da amida, a qual também foi observada no produto formado entre quitosana e ácido hialurônico, no entanto com baixa intensidade. Já as bandas em  $1030\text{ cm}^{-1}$  e  $1580\text{ cm}^{-1}$  são referentes à absorção da ligação

glicosídica do estiramento da ligação glicosídica (-C-O-C-) e do grupamento (N-H) da quitosana, respectivamente.

Quando há a inserção de óxido de grafeno (carboxilas) no produto formado por ácido hialurônico e quitosana, os resultados de espectroscopia de IV são alterados. As bandas referentes à ligação glicosídica e à deformação (N-H) do (NH<sub>2</sub>) da amina da quitosana tiveram deslocamento, sendo observadas em 1038 cm<sup>-1</sup> e 1594 cm<sup>-1</sup>, respectivamente.

Com a inserção de óxido de grafeno e, devido à presença de seus grupos carboxílicos, há um aumento da superfície de contato deste composto formado por ácido hialurônico, quitosana e óxido de grafeno, facilitando sua interação com o medicamento sinvastatina, que apresenta comprovada atividade osteogênica (regeneração óssea), sendo este produto promissor nas pesquisas envolvendo engenharia óssea.

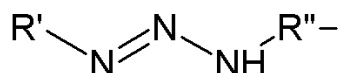
Como visto através dos artigos descritos acima, muitos compostos vêm sendo suportados em quitosana, sendo que estes materiais são devidamente caracterizados e apresentam diversas aplicações.

Assim, devido à inexistência de suporte de triazenos em quitosana, este trabalho optou por seguir nesta linha de pesquisa, isto é, no suporte de triazenos 1-óxido contendo substituinte carboxílico em quitosana. Os compostos triazenos são amplamente estudados e possuem uma vasta importância na área da química podendo ser estudados na química de coordenação ligada a bioinorgânica (CIUNIK et al., 1991; CIUNIK et al., 2002; DEMETGÜL e SERIN, 2008; HÖRNER et al., 2008; ALIZADEH et al., 2014; SANTOS et al., 2014; RAO et al., 2015).

Os triazenos constituem uma classe de compostos químicos que atuam como base de Lewis e possuem cadeia aberta com três átomos de nitrogênio interligados em sequência, ilustrado na Figura 11 (ENDERS et al., 2004).

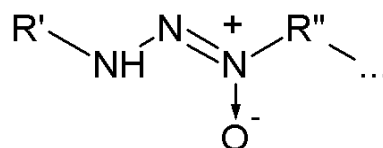
Essas cadeias de nitrogênio apresentam alta instabilidade devido a ligações simples e duplas alternadas as quais podem ser estabilizadas pela alteração dos substituintes (R) por grupos orgânicos, ocasionando uma deslocalização da densidade eletrônica na cadeia de nitrogênio, pelos efeitos, indutivo e mesomérico, dos grupos orgânicos (BURUIANA et al., 2002; ENDERS

et al., 2004; SMIRNOV et al., 2014; PARAGINSKI et al., 2015; MAHDAVINIA et al., 2017).



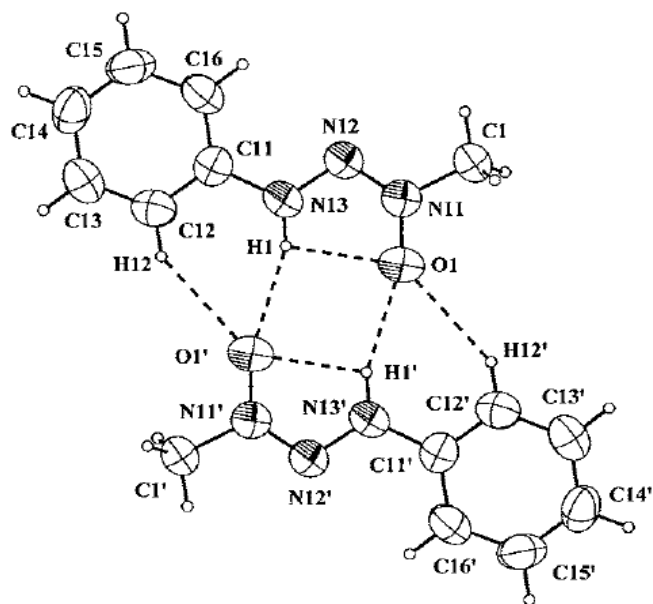
**Figura 11.** Representação geral de triazeno monocatenado, sendo R'=R'' = aquil, fenil. (ENDERS et al., 2004).

Esses compostos podem ter o hidrogênio do grupo amino –N(H) substituído por um grupo hidroxila, formando os chamados triazenos 1-óxido. Estes apresentam uma ligação covalente entre o oxigênio e o nitrogênio da cadeia diazoamínica, quando em estado sólido, já quando em estado líquido, apresentam-se como hidroxitriazenos (ELKINS e HUNTER, 1938; GÓMEZ et al., 1993; BURUIANA et al., 2002; ENDERS et al., 2004; DEMETGÜL e SERIN, 2008; SANTOS, 2010). A Figura 12 ilustra a estrutura química de um triazeno 1-óxido.



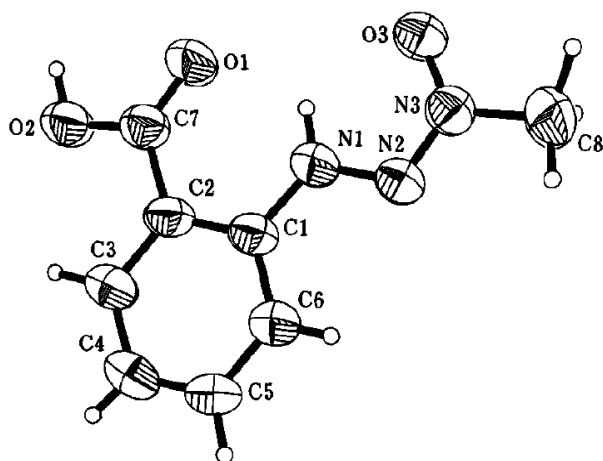
**Figura 12.** Triazeno 1-óxido monocatenado, sendo R'=R'' = aquil, aril. (BURUIANA et al., 2002).

Triazeno 1-óxido semelhante ao utilizado neste trabalho foi sintetizado e caracterizado por Difração de Raios-X em monocristal em 2007 (SANTOS et al., 2007). Há presença de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares na formação de dímeros, Figura 13.



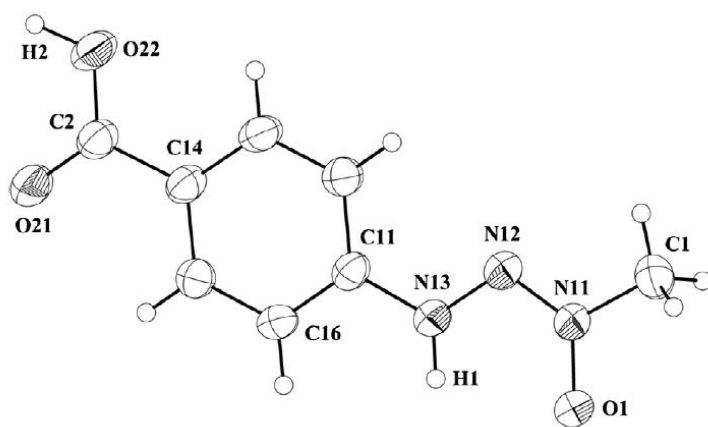
**Figura 13.** Estrutura molecular do 3-fenil-metiltriazeno 1-óxido. Elipsóides térmicas com nível de probabilidade de 50%. (SANTOS et al., 2007).

O composto 3-(*o*-carboxifenil)-1-metiltriazeno 1-óxido foi publicado em 1996 (SORIANO-GARCIA et al.) e 1998 (SAMANTA et al.), Figura 14. Sua estrutura cristalina foi identificada através de Difração de Raios-X em monocristal e mostra o grupo *o*-carboxílico, já o triazeno deste trabalho evidencia o grupo *p*-carboxílico, sendo esta a única diferença entre o composto sintetizado por SORIANO-GARCIA et al. e por SAMANTA et al. e o composto utilizado neste trabalho.



**Figura 14.** Estrutura molecular evidenciando elipsóides térmicas a nível de probabilidade de 50% (SORIANO-GARCIA et al., 1996).

O composto 1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazeno 1-óxido já foi publicado por SANTOS et al. em 2014. Sua estrutura cristalina é demonstrada pela Figura 15.



**Figura 15.** Estrutura molecular evidenciando elipsóides térmicas em nível de probabilidade de 50%. (SANTOS et al., 2014).

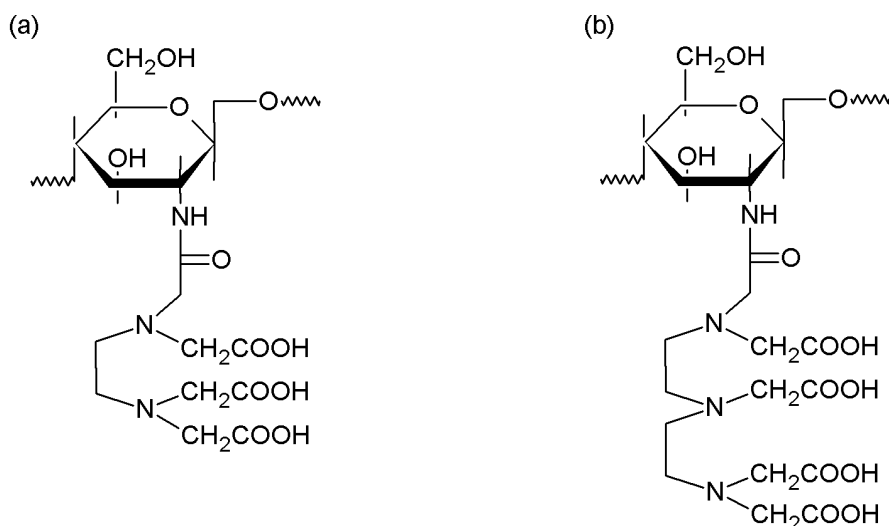
Então, a partir do composto da Figura 15, já descrito na literatura, optou-se por utilizá-lo no suporte em quitosana para a síntese de produtos inéditos. O composto 1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazeno 1-óxido apresenta grupo carboxílico em posição *para* o que poderia servir de ligante de expansão entre as cadeias de quitosana, ao mesmo tempo em que poderia atuar como agente quelante de cátions metálicos.

### 3.4 Suporte de Compostos Inorgânicos em Quitosana

A literatura traz vários exemplos de moléculas suportadas em quitosana com o intuito de formação de complexos a partir da quelação ou complexação com cátions metálicos.

NAGIB et al., (1999) avaliaram a complexação de cinco cátions metálicos (Cu<sup>II</sup>, Ni<sup>II</sup>, Co<sup>II</sup>, Zn<sup>II</sup> e Al<sup>III</sup>) no ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e no ácido dietilenotriamina penta-acético (DTPA), ambos suportados em quitosana (GD 95 %).

A Figura 16 ilustra a estrutura, esperada pelos autores, para o EDTA e o DTPA suportados em quitosana, onde ocorre uma ligação covalente C-N entre o grupamento amina da quitosana e o ácido carboxílico, confirmados por espectroscopia de IV, onde foram observadas bandas da amida (C-N) em  $1644\text{ cm}^{-1}$  e do grupo carboxílico livre (C=O) em  $1736\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 16.** Estrutura química da quitosana modificada com EDTA e DTPA. (Adaptado de NAGIB et al., 1999).

Resultados de titulação com solução aquosa de hidróxido de sódio confirmaram a ligação covalente entre os ácidos e a quitosana a partir da quantificação dos prótons ionizáveis dos grupos carboxílicos livres nos compostos.

Apenas 22 % dos grupos funcionais do DTPA ligaram-se na quitosana, os autores sugerem que esta baixa porcentagem está atribuída a dois fatores, o primeiro é o tamanho da molécula do DTPA que faz com que haja um impedimento estérico e o segundo se dá por reticulação das moléculas do DTPA entre as cadeias da quitosana, já o EDTA apresentou porcentagens superiores a 22 %.

Os testes de adsorção de cátions metálicos demonstraram seletividade para o  $\text{Cu}^{\text{II}}$ ,  $\text{Ni}^{\text{II}}$  e  $\text{Al}^{\text{III}}$  em ambos os compostos quelantes, mas não foram seletivos na adsorção de  $\text{Co}^{\text{II}}$  e  $\text{Zn}^{\text{II}}$ . A ordem de melhor adsorção para as quitosanas modificadas foi de  $\text{Cu}^{\text{II}} > \text{Ni}^{\text{II}} > \text{Co}^{\text{II}} = \text{Zn}^{\text{II}} > \text{Al}^{\text{III}}$ .

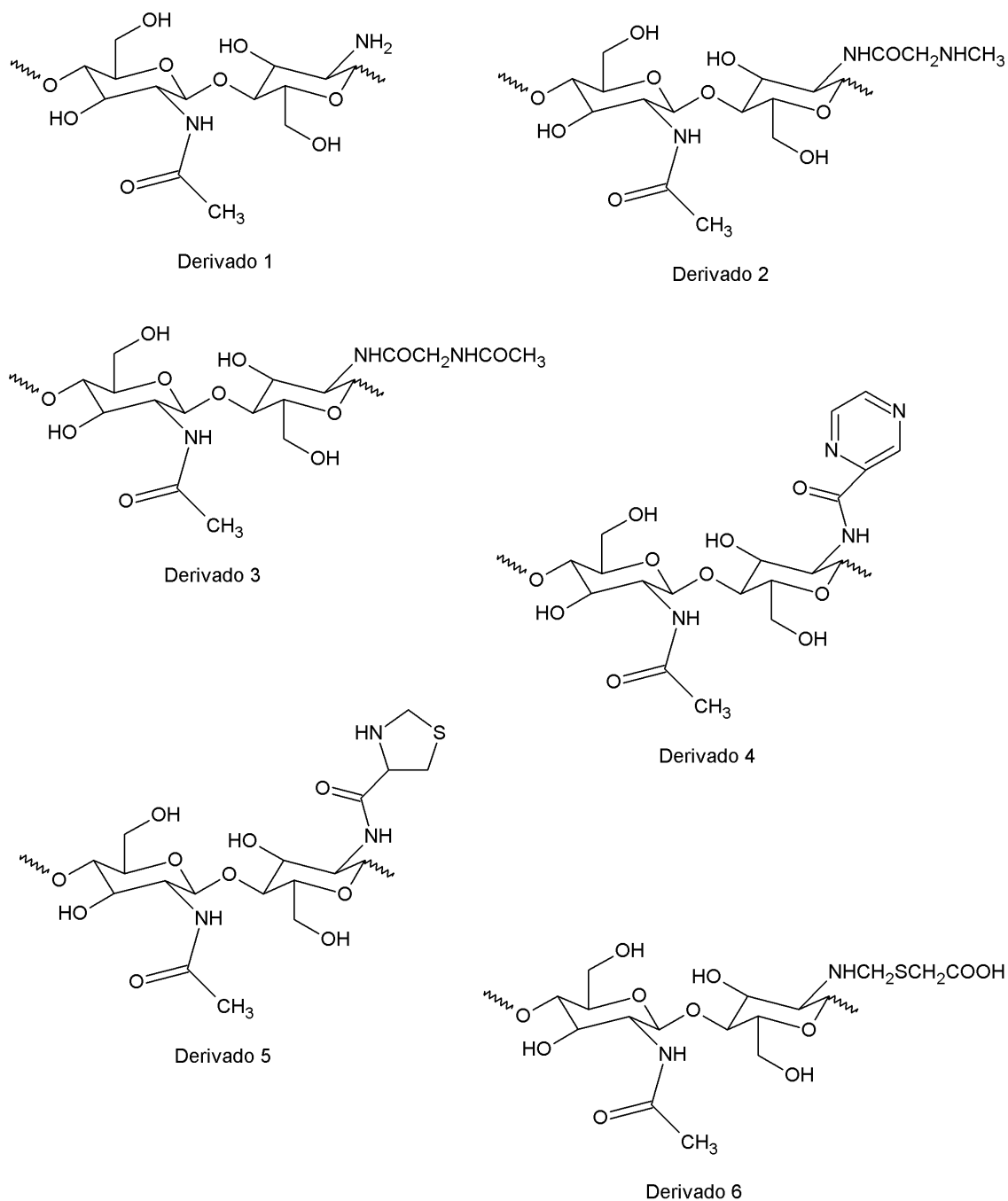
BECKER et al., (2000) utilizaram aldeídos e ácidos carboxílicos suportados em quitosana (GD 83 %) para produção de seis derivados de quitosana (Figura 17).

Os derivados foram obtidos a partir de modificações no grupamento amina da quitosana sendo, o derivado 1, o que possui o grupamento amino não modificado. Os derivados de 2 a 4 foram obtidos a partir da acetilação do grupamento amina do derivado 1 com os ácidos carboxílicos *n*-metilglicina, *n*-acetilglicina e pirazina-2-ácido carboxílico, respectivamente, para formação de amida. O derivado 5 foi obtido a partir da acetilação do grupamento amino da quitosana com o composto (*R*)-triazolidina-4-ácido carboxílico para formação de amida.

Por fim, o derivado 6 foi obtido em duas etapas, sendo a primeira via base de Schiff na formação de imina (C=N) entre quitosana e formaldeído, a segunda etapa resultou na formação de *S/N*-acetal a partir de reação com ácido tioglicólico. Foram avaliados a seletividade na absorção de metais provenientes de soluções aquosas de nitratos, cloretos e sulfatos de diversos cátions (Ni<sup>II</sup>, Zn<sup>II</sup> e Cd<sup>II</sup>) em pH 6,0.

Os resultados de seletividade demonstraram que os derivados de 1 a 4 apresentaram melhor complexação dos cátions a partir de soluções de sulfato em comparação com soluções de nitrato e cloreto. Já para os derivados 5 e 6 não houve diferença entre as soluções aquosas (nitrato, sulfato e cloreto), os autores sugerem que isto ocorre devido a alta estabilidade formada pelos grupos funcionais dos derivados 5 e 6 durante a formação do complexo, sem interferência do ânion.

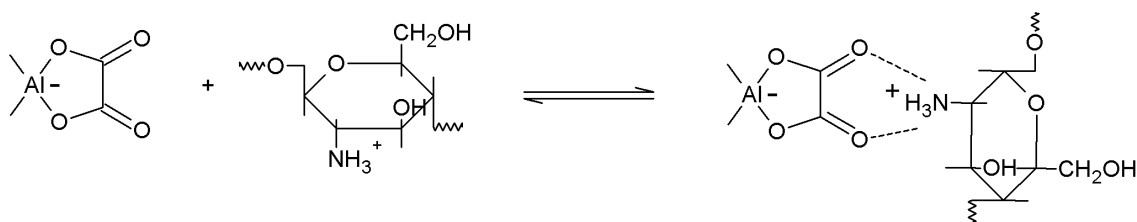
Ainda, os autores relatam que para o derivado 5 o grupamento da (*R*)-triazolidina resulta em maior estabilidade em comparação com o derivado 6, no entanto o derivado 5 não apresenta seletividade entre os cátions analisados, reagindo igualmente com os três cátions metálicos, enquanto que o derivado 6 complexa na seguinte ordem Cd<sup>II</sup> > Zn<sup>II</sup> > Ni<sup>II</sup>.



**Figura 17.** Derivados de quitosana modificada. (Adaptado de BECKER et al., 2000).

BODDU et al., (2003) estudaram um novo bioissorvente utilizando ácido oxálico e alumina suportados em quitosana para remoção de  $\text{Cr}^{\text{VI}}$ . A Figura 18 ilustra o esquema para formação do bioissorvente onde, os autores sugerem que, o grupo carboxilato do ácido oxálico complexa-se à alumina através de um quelato e, ao mesmo tempo, liga-se à quitosana através de interação eletrostática aos grupos  $\text{NH}_3^+$ .





**Figura 18.** Esquema de formação do biossorvente, sendo que o ácido oxálico atua como ponte entre alumina e quitosana (Adaptado de BODDU et al., 2003).

Os resultados demonstraram que o biossorvente apresentou maior capacidade de adsorção do  $\text{Cr}^{\text{VI}}$  em comparação com a quitosana. Os autores sugerem, de acordo com relatos de FU et al., 1997, que a adsorção do íon  $\text{Cr}^{\text{VI}}$  na forma de íon dicromato  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  pode ocorrer por interação eletrostática entre o grupamento  $\text{NH}_3^+$  da quitosana. Assim, este biossorvente pode interagir com  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ , segundo os autores, através de interação eletrostática, ligação de hidrogênio ou interações de Van der Waals.

OSMAN e AROF (2002) estudaram um eletrólito formado a partir do composto triflato de lítio e ácido acético suportado em quitosana. Os autores tiveram como objetivo comprovar a complexação entre o sal de lítio, o ácido e a quitosana a partir de espectroscopia de IV.

Os resultados demonstraram que as bandas referentes ao triflato de lítio, já citadas na literatura, foram observadas em  $766\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta_s\text{ CF}_3$ ),  $1033\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_s\text{ SO}_3$ ),  $1182\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{as}\text{ CF}_3$ ),  $1230\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_s\text{ CF}_3$ ) e  $1263\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{as}\text{ SO}_3$ ). Para quitosana pura foram observadas bandas entre  $1400$  e  $1700\text{ cm}^{-1}$ , esta região refere-se às bandas da carbonila ( $\text{O}=\text{C}-\text{NHR}$ ), amina ( $\text{NH}_2$ ) e grupo amino protonado ( $\text{NH}_3^+$ ).

A carbonila foi observada em  $1667\text{ cm}^{-1}$ , a amina em  $1590\text{ cm}^{-1}$  e o grupo amino protonado em aproximadamente  $1514\text{ cm}^{-1}$  com a característica de ser um pequeno ombro. No composto formado por ácido acético suportado em quitosana, a partir da técnica de *casting*, a ausência da banda  $\text{NH}_3^+$  se dá devido à interação entre a quitosana ( $\text{NH}_3^+$ ) e o ácido acético ( $-\text{COO}^-$ ) formando a banda ( $\text{O}=\text{C}-\text{NHR}$ ) da amida, na amostra sólida.

Assim, os autores relatam que a confirmação de síntese destes compostos e dá pelo deslocamento das bandas da carbonila e amina para menores números de onda,  $1653\text{ cm}^{-1}$  e  $1570\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. No

composto formado a partir da adição do sal de triflato de lítio na quitosana modificada com ácido acético, evidenciou uma mudança em todas as bandas para um menor número de onda.

No produto formado, as bandas da quitosana referentes à carbonila foram observadas em  $1645\text{ cm}^{-1}$  e à amina em  $1560\text{ cm}^{-1}$ , enquanto que as bandas referentes ao sal de lítio foram observadas em 761, 1033, 1182 e  $1263\text{ cm}^{-1}$ , comprovando a formação do composto. Os resultados de condutividade mostraram que o composto formado pela quitosana modificada com ácido acético e sal de lítio, teve maior condutividade do que comparado com os compostos de quitosana sem o sal. Os autores sugerem que o aumento da intensidade observada na banda de deformação em  $761\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CF}_3$ ) se dá ao número de íons livres durante a dissociação do sal, o que explica o aumento da condutividade do composto formado.

BARAN (2008) estudou a inserção do complexo de oxovanádio (IV) em quitosana (GD 75 %) com objetivo de comprovar que a quitosana pode ser utilizada como veículo eficaz na liberação controlada de vanádio, utilizando  $\text{VOSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .

Os resultados de espectroscopia de IV comprovam a formação do composto. Os autores relatam para a quitosana pura uma banda larga em  $3427\text{ cm}^{-1}$  de ( $\nu\text{O-H}$ ) e ( $\nu\text{N-H}$ ), no entanto, no composto não se observa esta banda larga e sim duas bandas em  $3410\text{ cm}^{-1}$  e  $3045\text{ cm}^{-1}$  referentes a estas vibrações. As vibrações de ( $\text{C-H}$ ) podem ser atribuídas tanto para quitosana pura quanto para o composto. Os estiramentos ( $\text{C-H}$ ) são identificados como banda dupla em  $2920$  e  $2870\text{ cm}^{-1}$  na quitosana pura e  $2927$  e  $2845\text{ cm}^{-1}$  no composto. A banda referente à amida I ( $\text{C=O}$ ) em  $1630\text{ cm}^{-1}$  é vista apenas como um ombro na quitosana pura, parcialmente sobreposta à banda forte em  $1597\text{ cm}^{-1}$ .

Esta banda forte é constituída pela sobreposição da banda da amida II e da banda de deformação tesoura ( $\delta\text{NH}_2$ ) da amina primária. A banda da amida II é uma vibração mista de deformação no plano ( $\text{N-H}$ ) e estiramento ( $\text{C-N}$ ). No composto esta banda aparece como duas bandas relativamente intensas e separadas em  $1631\text{ cm}^{-1}$  (amida I) e  $1529\text{ cm}^{-1}$  (amida II), respectivamente.

A banda de amida III, que se observa apenas em amidas secundárias, se origina da mistura vibratória semelhante à banda da amida II, e apresentou

intensidade semelhante na quitosana pura ( $1317\text{ cm}^{-1}$ ) e no composto, no entanto, os autores relatam um pequeno deslocamento para número de onda mais elevado no composto ( $1325\text{ cm}^{-1}$ ).

A banda fraca em  $1153\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{as}}\text{ C-O-C}$ ) em ponte observada na quitosana pura é observada no composto como um pequeno ombro em  $1150\text{ cm}^{-1}$ . A banda de ( $\nu_{\text{as}}\text{ C-O-C}$ ) da piranose da quitosana está sobreposta à banda ( $\nu\text{C-N}$ ) da amina primária.

Por fim, a banda de média intensidade, referente ao oxocátion ( $\nu\text{V}=\text{O}^{2+}$ ) é observada em  $968\text{ cm}^{-1}$ . Assim, os autores relatam que com base nas análises de espectroscopia de IV, é possível propor um modelo para a interação do cátion  $\text{VO}^{2+}$  e quitosana. O deslocamento da banda da amida II ( $\text{NH}_2$ ) para um menor número de onda em conjunto com o deslocamento para um maior número de onda da banda C-O-C da piranose associado a C-N da amina primária comprova a formação do composto envolvendo o grupamento amina da quitosana.

VIJAYA et al., (2008) estudaram a remoção de  $\text{Ni}^{\text{II}}$  de meios aquáticos, através de adsorção, utilizando alginato de cálcio puro, alginato de cálcio suportado em quitosana e sílica suportada em quitosana.

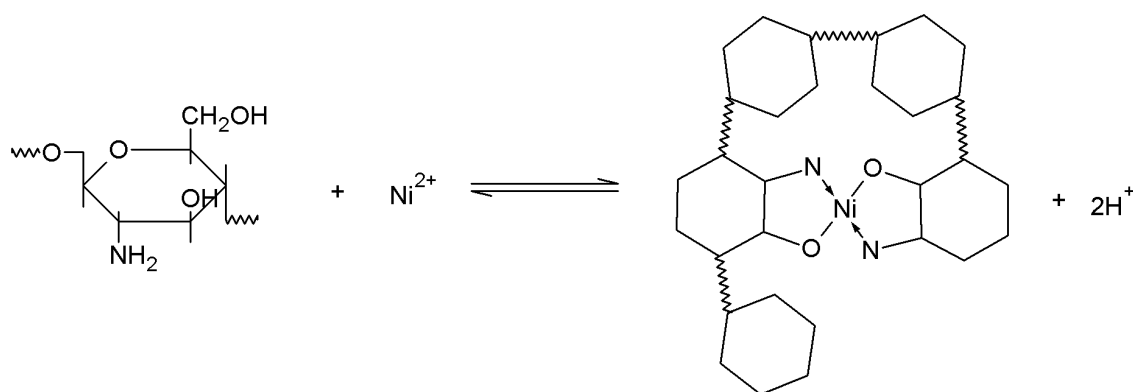
A espectroscopia de IV foi utilizada para caracterização dos biossorventes onde os autores relatam que para o alginato de cálcio puro foram identificadas bandas de estiramento em  $3430\text{ cm}^{-1}$  (O-H), estiramento assimétrico em  $1618\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{COO}^-$ ) e estiramento simétrico  $1429\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{COO}^-$ ).

As bandas em  $1125\text{ cm}^{-1}$  e  $1065\text{ cm}^{-1}$  são referentes ao estiramento C-O dos grupos éter e ao estiramento C-O dos grupos alcoólicos. Para o alginato de cálcio suportado em quitosana foram observadas bandas de estiramento em  $3352\text{ cm}^{-1}$  (O-H e N-H), estiramento em  $2987\text{ cm}^{-1}$  (C-H), deformação tesoura em  $1568\text{ cm}^{-1}$  (N-H), deformação no plano  $1393\text{ cm}^{-1}$  (N-H) e estiramento  $1065\text{ cm}^{-1}$  (-CO), isto evidencia que todos os grupos funcionais presentes no alginato de cálcio e na quitosana estão disponíveis para interação com os íons de  $\text{Ni}^{\text{II}}$  para esse biossorvente.

Já para a sílica suportada em quitosana foram observadas bandas de vibrações fora do plano em  $797\text{ cm}^{-1}$  (C-H), em  $1092\text{ cm}^{-1}$  foi observada banda larga, onde, os autores sugerem que é devido à fusão de bandas relativas a Si-O-Si, Si-O-H e grupos C-O. Outra banda larga também é observada, para a sílica

suportada em quitosana, em  $3439\text{ cm}^{-1}$  referentes ao estiramento N-H e O-H. As bandas referentes aos compostos de  $\text{Ni}^{\text{II}}$  tiveram alteração na posição e intensidade das bandas em todos os casos.

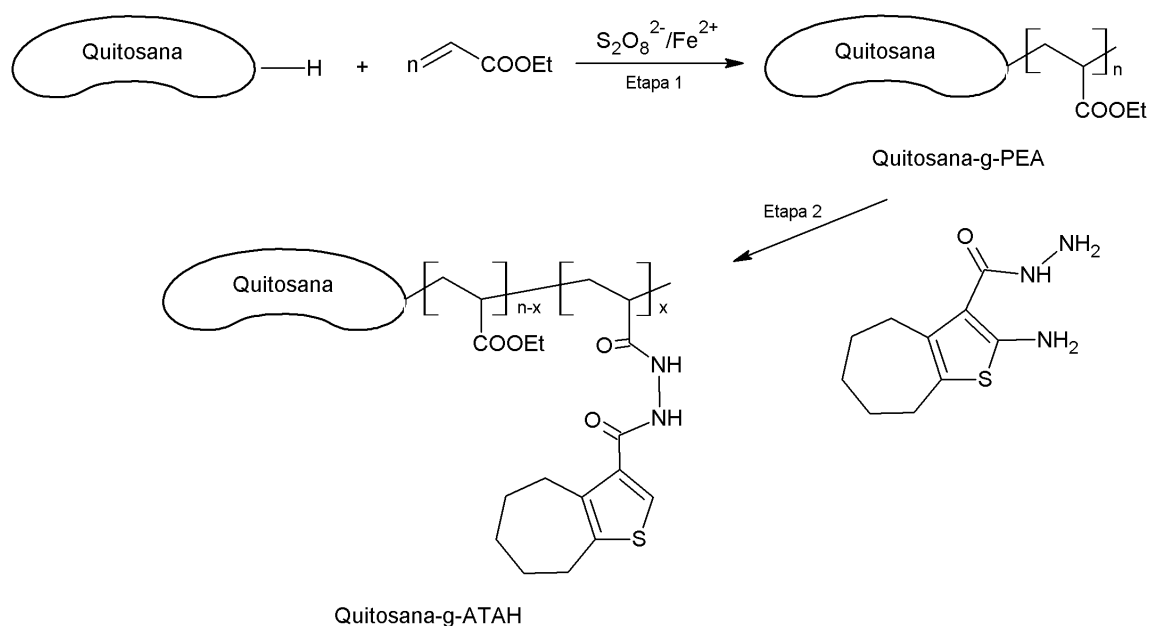
A Figura 19 ilustra uma proposta de composto formado entre a quitosana e  $\text{Ni}^{\text{II}}$ , onde, os autores sugerem que, os grupos amino da quitosana são os principais locais de ligação com íons metálicos, formando complexos de coordenação estáveis. Os elétrons de nitrogênio presentes nos grupos amino podem estabelecer ligação covalente com os íons metálicos (transição). Alguns grupos hidroxilas da quitosana podem ser doadores de elétrons, assim, esses grupos desprotonados estão igualmente envolvidos na coordenação dos íons metálicos formando quelatos e liberando prótons ( $\text{H}^+$ ).



**Figura 19.** Síntese do composto formado entre quitosana e  $\text{Ni}^{\text{II}}$ , onde cada anel de seis membros representa um heterociclo (monômero) de quitosana (Adaptado de VIJAYA et al., 2008).

Os resultados evidenciam que a adsorção de  $\text{Ni}^{\text{II}}$  por alginato de cálcio puro, alginato de cálcio suportado em quitosana e sílica suportada em quitosana foram eficazes, no entanto, a adsorção do íon metálico pelos biossorventes desenvolvidos (alginato de cálcio suportado em quitosana e sílica suportada em quitosana) foram superiores aos polímeros puros (alginato de cálcio, sílica e quitosana).

BEKHEIT et al., (2011) utilizaram acrilato de etila suportada em quitosana para a síntese do polímero, a seguir este composto foi modificado a partir da inserção de 2-amino-4,5-pentametileno-tiofeno-3-ácido carboxílico-hidrazida produzindo a quitosana modificada (Q-g-ATAH), ilustrado na Figura 20, sendo esta utilizada para adsorção de cátions metálicos ( $\text{Cu}^{\text{II}}$ ,  $\text{Co}^{\text{II}}$  e  $\text{Ni}^{\text{II}}$ ).



**Figura 20.** Síntese da quitosana modificada. (adaptado de BEKHEIT et al., 2011).

Nos resultados de espectroscopia de IV para quitosana pura foram observadas bandas de estiramento em  $1076\text{ cm}^{-1}$  (O-C), estiramento em  $1159\text{ cm}^{-1}$  (C-O-C em ponte), deformação em  $1313 - 1481\text{ cm}^{-1}$  (C-H), estiramento  $1627\text{ cm}^{-1}$  (C=O), estiramento em  $2927\text{ cm}^{-1}$  (C-H) e estiramento em  $3431\text{ cm}^{-1}$  (O-H) sobreposto a (N-H).

No entanto, para o composto de acrilato de etileno suportado em quitosana os autores relatam o desaparecimento parcial da banda larga de O-H e  $\text{NH}_2$  anteriormente observada na quitosana pura. Além do surgimento de uma banda em  $1740\text{ cm}^{-1}$  relacionada com o grupo éster das cadeias de polietilacrilato sobre a estrutura da quitosana. Para o composto de quitosana modificada com acrilato de etileno e hidrazida (Q-g-ATAH) (Figura 20) foram observadas novas bandas em  $3230\text{ cm}^{-1}$  relacionadas ao grupamento  $-\text{NH}_2$  do composto final 2-amino-4,5-pentametileno-tiofeno-3-ácido carboxílico-hidrazida, o desaparecimento da banda éster em  $1740\text{ cm}^{-1}$  e o surgimento da banda em  $1639\text{ cm}^{-1}$  é referente à conversão da maioria dos grupamentos éster ( $-\text{COOEt}$ ) em grupos hidrazida ( $-\text{CO-NH-NH-}$ ).

Ainda foi relatado o aparecimento das bandas estreitas em  $1550$  e  $1020\text{ cm}^{-1}$  atribuídas, pelos autores, às ligações C=C e N-N, respectivamente, confirmando a formação da quitosana modificada. Por fim, a quitosana

modificada apresentou propriedades de absorção dos íons metálicos  $\text{Cu}^{\text{II}}$ ,  $\text{Co}^{\text{II}}$  e  $\text{Ni}^{\text{II}}$  e regeneração, a partir de lavagem com solução de EDTA. A capacidade de adsorção do bioissorvente modificado com hidrazida mostrou-se superior se comparada com a quitosana e com o acrilato de etileno puros.

LI et al., (2013) adicionaram alumina ativada a um gel formado por ácido oxálico e quitosana, este composto foi testado no processo de defluoração de água para beber na China.

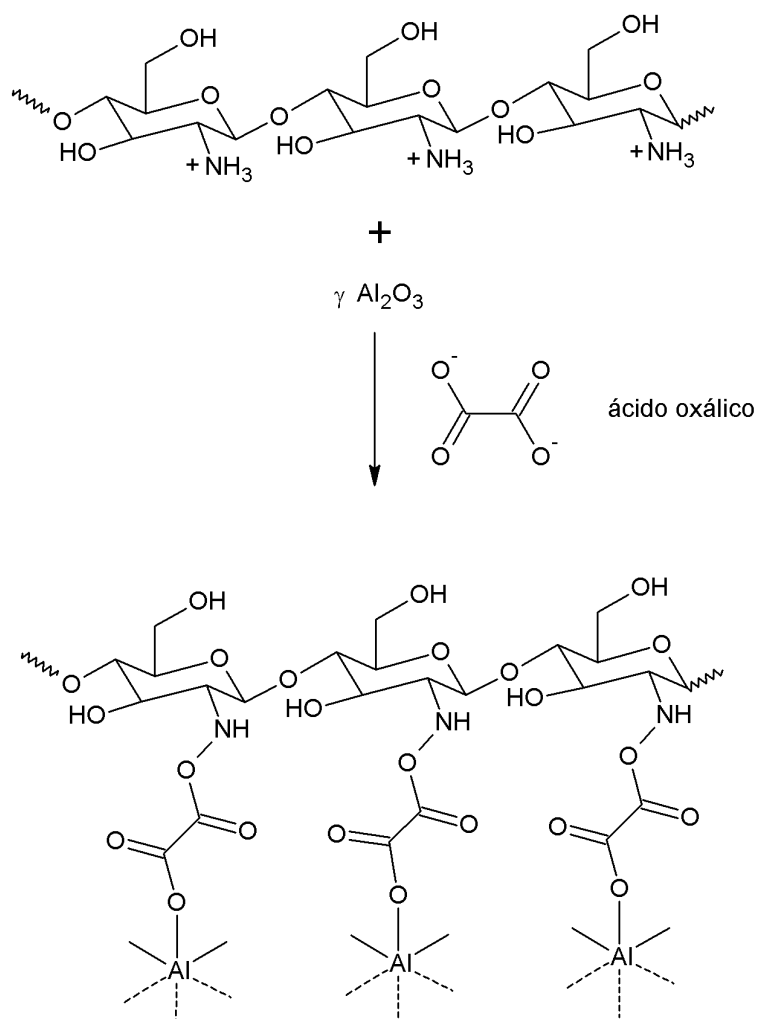
Os resultados de espectroscopia de IV foram utilizados para estudar os sítios de adsorção dos íons  $\text{F}^-$  e seu mecanismo de ligação na quitosana modificada. Para alumina pura foram observadas bandas em  $3473\text{ cm}^{-1}$  referentes a grupos hidroxila presentes na superfície da alumina e três bandas em  $1641$ ,  $1400$  e  $1072\text{ cm}^{-1}$  referentes à vibração da rede da estrutura da alumina e, as bandas em  $783$  e  $636\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas ao estiramento Al-O e deformação O-Al-O, respectivamente.

Para quitosana pura foram observadas bandas em  $3436$ ,  $2922$ ,  $1643$ ,  $1604$ ,  $1384$ ,  $1155$ - $1033\text{ cm}^{-1}$  referentes aos estiramentos (-OH) e (-NH<sub>2</sub>), estiramentos (-CH) e (-CH<sub>2</sub>), estiramento do grupo carbonil presente no acetil (quitina) (-C=O), deformação tesoura (-NH<sub>2</sub>), deformação simétrica (-CH) e estiramento (-CO) da ligação (-COC-), respectivamente. As bandas observadas na faixa de  $900$ - $650\text{ cm}^{-1}$  são referentes às vibrações fora do plano de (-NH<sub>2</sub>).

Na formação dos compostos, os autores sugerem que há uma interação entre a alumina e a quitosana, bem como e entre o ácido oxálico, quitosana e alumina, o que foi comprovado pela análise de espectroscopia de IV onde, para o composto com ácido oxálico foram observadas novas bandas em  $1695$ ,  $1429$  e  $1305\text{ cm}^{-1}$  referentes ao ácido oxálico: estiramento (-C=O), estiramento (-C-OH) e (C-C) e, deformação no plano (-C-O-H) respectivamente.

De acordo com os autores a presença destas três bandas é atribuída à presença do ácido oxálico no composto final. Além disso, alguns deslocamentos são observados nas bandas, indicando a inserção dos componentes. Assim, os autores sugerem que de acordo com a literatura (GHOSH e ALI, 2012) o ácido oxálico liga-se à quitosana por ligação covalente (-N-O-), uma vez que o produto formado é sólido e sintetizado em temperatura máxima de  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Já a interação entre a alumina e o ácido oxálico, ocorre a partir do outro grupo carboxilato do

ácido, formando uma ligação (-Al-O-), assim, o ácido oxálico atua como intercalante entre a alumina e a quitosana. A Figura 21 ilustra a possível estrutura formada entre o ácido oxálico, quitosana e alumina, sugerida pelos autores.



**Figura 21.** Estrutura proposta para o complexo formado (Adaptado de LI et al., 2013).

Os resultados de defluoração em água indicam que a adsorção do fluoreto ocorre nos sítios N-H da quitosana e Al-O do complexo formado, estes resultados explicam a maior capacidade de adsorção do fluoreto pelo composto do que pela quitosana pura, assim, este composto mostrou-se promissor para ser utilizado na purificação de água.

MI et al., (2015) utilizaram o biocomposto formado por ácido oxálico suportado em quitosana para adsorção de Cu<sup>II</sup>. Os resultados de espectroscopia de IV evidenciaram para quitosana pura, bandas em 1151, 1079 e 1027 cm<sup>-1</sup>

atribuída à ligação glicosídica, banda de estiramento (C=O) da amida I em  $1655\text{ cm}^{-1}$  e banda de deformação (N-H) da amina em  $1595\text{ cm}^{-1}$ .

Para o ácido oxálico puro foram observadas bandas de estiramento (C=O) em  $1707\text{ cm}^{-1}$ . O produto formado apresentou bandas em diferentes números de onda, em comparação com a quitosana e o ácido oxálico puros.

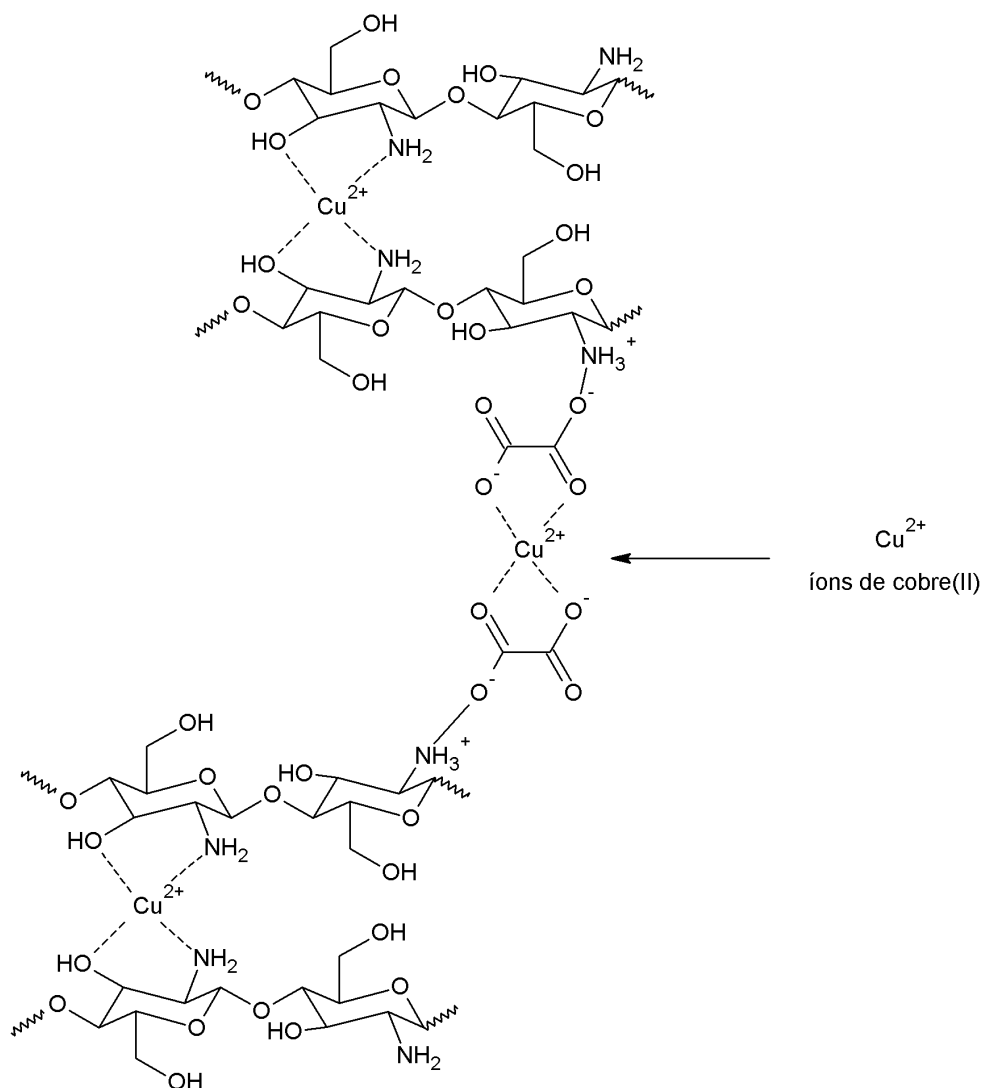
A formação do composto fez com que as bandas da amida I se tornassem bandas largas onde é possível observar um pequeno ombro referente à amina protonada ( $\text{NH}_3^+$ ) observada em  $1527\text{ cm}^{-1}$ .

Ainda foi observado que a banda referente à carboxila do ácido oxálico (-COOH) foi deslocada de  $1707\text{ cm}^{-1}$  para  $1654\text{ cm}^{-1}$  sendo referente a vibração do carboxilato ( $-\text{COO}^-$ ), os autores sugerem que estes resultados indicam que a quitosana e o ácido oxálico são capazes de formar compostos via interações eletrostáticas do carboxilato com o  $\text{Cu}^{\text{II}}$ .

Por fim, os autores relatam através de resultados de espectroscopia de IV que o ácido oxálico não só atua como um solvente para dissolver a quitosana, mas também atua como reticulante ao ser suportado em quitosana, melhorando as propriedades de adsorção de íons metálicos nesta se comparado com a quitosana pura.

Sabe-se que a quitosana já atua como complexante de cátions metálicos, como mostra a Figura 22, no entanto com a adição de ácido oxálico como reticulante, estas propriedades são aperfeiçoadas, como ilustra a figura abaixo, que propõe a estrutura para o composto formado pela complexação do  $\text{Cu}^{\text{II}}$  em quitosana modificada.





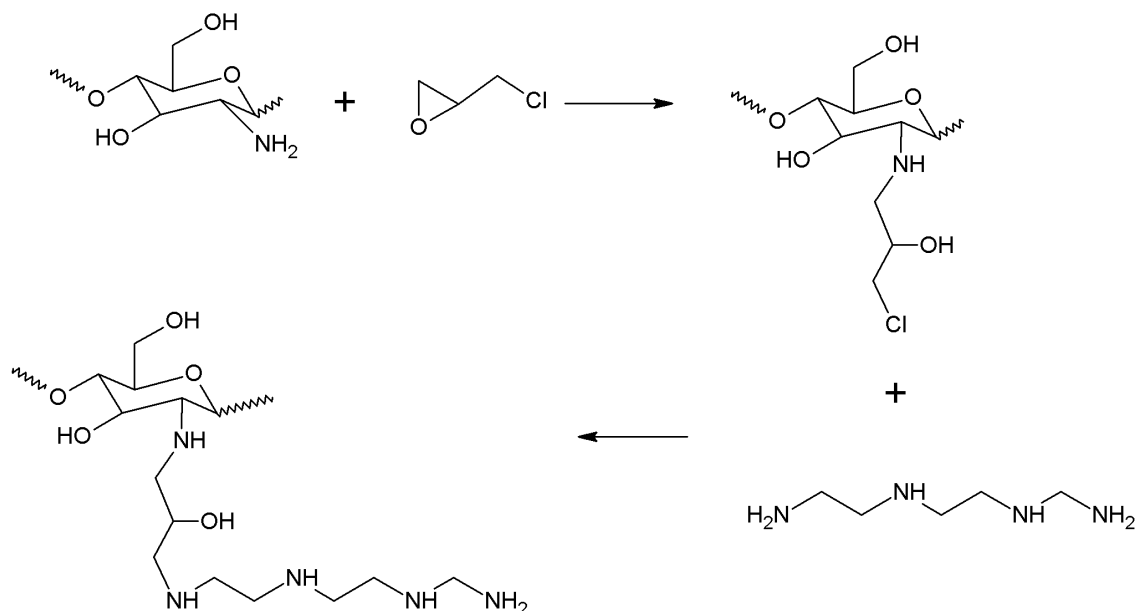
**Figura 22.** Esquemas de complexação do  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (Adaptado de MI et al., 2015).

LIAO et al., (2016) estudaram a produção de um novo biosorvente para adsorção de  $\text{Ni}^{\text{II}}$ , que fosse insolúvel em soluções ácidas aquosas. O biosorvente foi produzido a partir de epícloridrina e trietilenotetramina suportadas em quitosana.

As análises de espectroscopia de IV evidenciaram bandas em  $3430\text{ cm}^{-1}$  dos estiramentos (OH) e (NH),  $2919$  e  $2872\text{ cm}^{-1}$  estiramento assimétrico e simétrico (CH),  $1655\text{ cm}^{-1}$  estiramento (C=O),  $1604\text{ cm}^{-1}$  deformação tesoura ( $\text{NH}_2$ ) para a quitosana.

O surgimento da banda em  $739\text{ cm}^{-1}$ , no produto formado por quitosana e epícloridrina, está relacionado ao estiramento (C-Cl) demonstrando uma possível reação envolvendo a abertura do anel epóxi da epícloridrina e sua inserção na

quitosana. Em comparação ao produto final (quitosana/ epícloridrina/ trietilenotetramina), a banda em  $739\text{ cm}^{-1}$  desaparece, no entanto, há o surgimento das bandas em  $813$ ,  $1379$  e  $1467\text{ cm}^{-1}$  referente os estiramentos de (C-N-C) e o surgimento da banda em  $1580\text{ cm}^{-1}$  referente à (NH) da trietilenotetramina. A Figura 23 ilustra a obtenção do produto final.



**Figura 23.** Obtenção de quitosana modificada (Adaptado de LIAO et al., 2016).

Os resultados de adsorção de  $\text{Ni}^{\text{II}}$  evidenciaram que, em relação à quitosana pura, a quitosana modificada apresentou melhora na estabilidade em solução ácida aumentando assim a sua capacidade de adsorção, além disso, o composto pode ser regenerado e reutilizado por até 5 ciclos de adsorção.

A análise de espectroscopia de IV no produto com  $\text{Ni}^{\text{II}}$  adsorvido evidenciou o deslocamento das bandas em  $3427\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu\text{N-H}$ ) e  $1655\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta\text{N-H}$ ) para um menor número de onda em  $3386$ ,  $1645\text{ cm}^{-1}$ , indicando que o átomo de nitrogênio do produto participou no processo de adsorção de  $\text{Ni}^{\text{II}}$ .

Além disso, há o surgimento de uma banda em  $616\text{ cm}^{-1}$  indicando a ligação  $\text{Ni}^{\text{II}}\text{-N}$ . A mudança no padrão da banda larga entre em  $1153\text{-}1031\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento (C-OH e C-O-C) e deslocamento para menor número de onda indica que os átomos de oxigênio do grupamento hidroxila também podem estar envolvidos na adsorção do  $\text{Ni}^{\text{II}}$ .

Assim, compostos de quitosana modificada pela inserção de intercalantes com aplicação da adsorção de cátions metálicos já vem sendo relatados na literatura. Com base nisso, o presente trabalho, propõe, como algo inédito, a síntese de quitosana modificada, utilizando como intercalante um complexo triazenido de  $\text{Ni}^{\text{II}}$ .

Os triazenos possuem diferentes modos de coordenação a cátions metálicos, o que gera estudos sobre a estrutura destes compostos (DEMETGÜL e SERIN, 2008; BECK et al., 2009; SANTOS, 2010; SEREBRYANSKAYA et al., 2010; ALIZADEH et al., 2014).

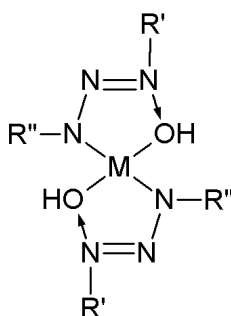
Os complexos triazenidos, em geral, são utilizados em diferentes ramos da ciência, devido a sua diversidade de aplicações nas áreas da química, química bioinorgânica, química de coordenação e catálise (ZACHARIAS e JHONSON, 1976; DEMETGÜL e SERIN, 2008; SANTOS, 2010; SEREBRYANSKAYA et al., 2010).

Essa diversidade de complexação ocorre pela grande versatilidade dos triazenos em função das diferentes alternativas permitidas pela geometria molecular, pelo número de sítios doadores de elétrons e pelo tipo de empacotamento formado no estado sólido. As propriedades dos triazenos 1-óxido como ligantes nitrogenados com um átomo de oxigênio e um de nitrogênio coordenantes são influenciadas pelos fatores eletrônicos e estéricos (GHOLIVAND et al., 2009; ROFOUEI et al., 2009).

Os ligantes triazenidos 1-óxidos podem atuar como quelantes bidentados a um centro metálico, formando um anel de cinco membros o que configura uma maior estabilidade termodinâmica ao quelato formado (SANTOS, 2010; LI et al., 2011; SANTOS et al., 2014; KIA, 2016; SANTOS et al., 2016; XU et al., 2017).

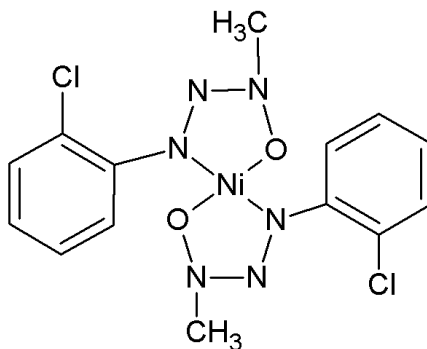
Outro ponto de destaque é o fato de que triazenos 1-óxido possuem afinidade química por uma variedade de cátions metálicos, além de  $\text{Ni}^{\text{II}}$ , como  $\text{Cu}^{\text{II}}$ ,  $\text{V}^{\text{IV}}$ ,  $\text{Co}^{\text{II}}$ . Devido a capacidade e atuarem como agentes quelantes são empregados em química analítica, como reagente complexante, evidenciando na formação dos complexos diferentes geometrias de coordenação (DEMETGÜL e SERIN, 2008; BECK et al., 2009; SANTOS, 2010; SEREBRYANSKAYA et al., 2010; LI et al., 2011; ALIZADEH et al., 2014)

Em 1970 Behera e Chakravorty sintetizaram vários complexos de triazenido 1-óxido de  $\text{Ni}^{\text{II}}$ , com variações de substituintes aril como fenil, *o*-toluil, *m*-toluil, *p*-toluil, etc, e substituintes alquil como metil e etil. A caracterização dos complexos foi feita por análise elementar CHN. Os autores propuseram a formação de anel quelato de cinco membros com  $\text{Ni}^{\text{II}}$ , sendo que o ligante atua como bidentado coordenando-se ao cátion através do N e O, Figura 24.



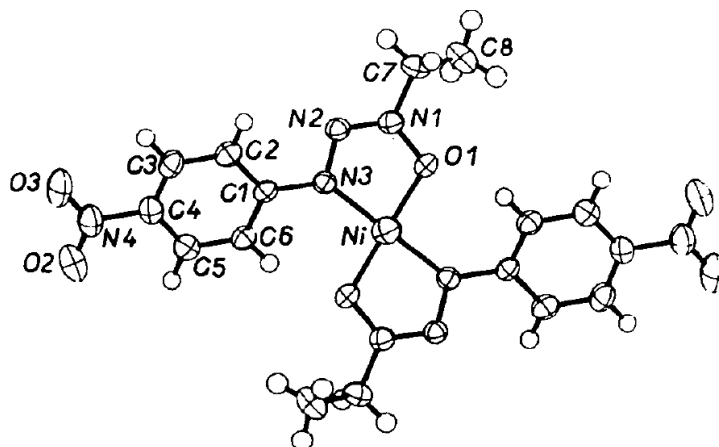
**Figura 24.** Complexo triazenido 1-óxido evidenciando anel quelato de cinco membros. Sendo  $M = \text{Ni}^{\text{II}}$ ,  $R' = \text{alquila}$ ,  $R'' = \text{arila}$ . (Adaptado de BEHERA e CHAKRAVORTY, 1970).

Em 1976, Dwivedi e Srivastava publicaram o complexo *bis*-(1-metil-3-*o*-clorofeniltriazeno 1-óxido)  $\text{Ni}^{\text{II}}$ . Os dados analisados por difração de Raios-X em monocristal mostraram  $\text{Ni}^{\text{II}}$  com geometria quadrática planar, Figura 25.



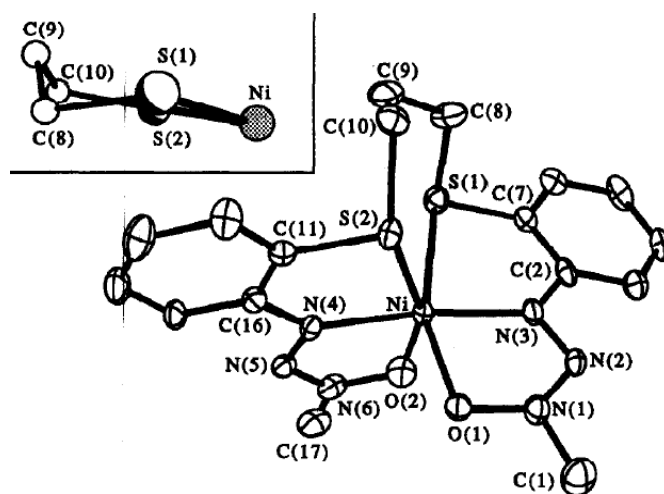
**Figura 25.** Estrutura do complexo de  $\text{Ni}^{\text{II}}$  com formação do anel quelato de 5 membros. (DWIVEDI e SRIVASTAVA, 1976).

CIUNIK et al. (1991) sintetizaram e caracterizaram por difração de Raios-X em monocristal o complexo *bis* (1-etil-3-*p*-nitrofeniltriazeno 1-óxido)  $\text{Ni}^{\text{II}}$ . A estrutura obtida é diamagnética, onde apresenta equilíbrio entre spin baixo e spin alto em solução de clorofórmio e, número de coordenação 4, com geometria quadrática planar, Figura 26.



**Figura 26.** Complexo de Ni<sup>II</sup> com elipsóides térmicas a nível de probabilidade de 50 %. Átomos de hidrogênio foram omitidos. (CIUNIK et al., 1991).

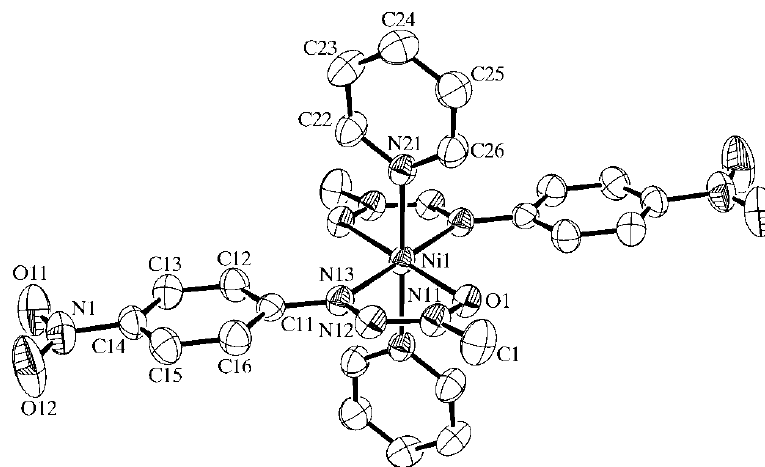
KARMAKAR et al. (1993) sintetizaram e caracterizaram por difração de Raios-X em monocristal o complexo de Ni<sup>II</sup> com um ligante triazenido multidentado. Assim, o complexo formado apresenta estequiometria 1:1 ligante:cátion. Sua geometria de coordenação é octaédrica distorcida, formando o anel de 5 e 6 membros, Figura 27.



**Figura 27.** Complexo de Ni<sup>II</sup> evidenciando o efeito quelato do ligante. Átomos de hidrogênio foram omitidos. Elipsóides térmicas representadas a nível de 50 % de probabilidade. Acima, a figura ressalta o anel de 6 membros do tipo meia-cadeira. (KARMAKAR et al., 1993).

HÖERNER et al. em 2002 descreveram a estrutura cristalina, definida por difração de Raios-X em monocristal, de um complexo octaédrico de Ni<sup>II</sup> formado pelo ligante 1-metil-3-(*p*-nitrofenil)-triazenido 1-óxido com estequiometria 2:1 ligante:cátion metálico, Figura 28. Neste complexo há a formação de dois anéis

quelato de 5 membros e a esfera de coordenação do cátion é completada por duas moléculas de piridina.

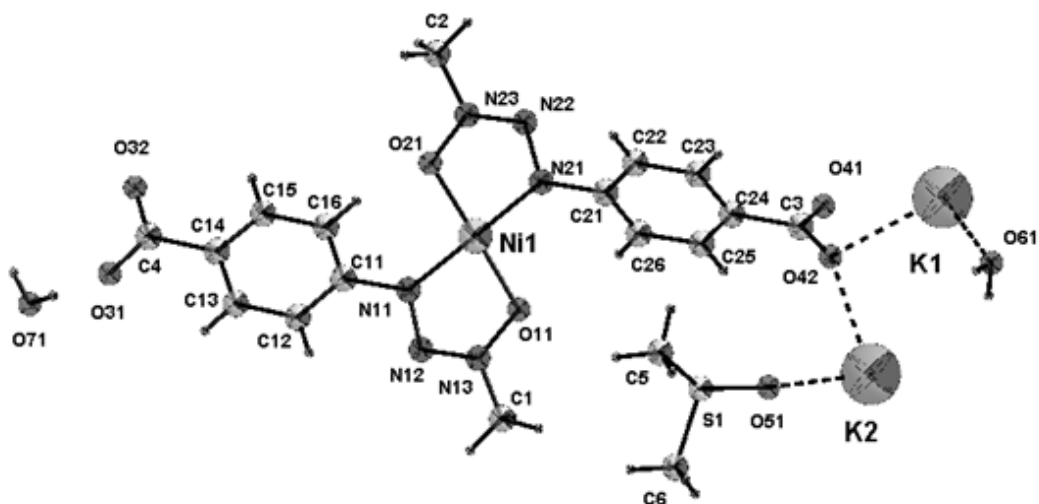


**Figura 28.** Estrutura molecular do complexo triazenido de Ni<sup>II</sup>. Átomos de hidrogênio foram omitidos. Elipsóides térmicas com nível de probabilidade de 50 %. (HÖENER et al., 2002).

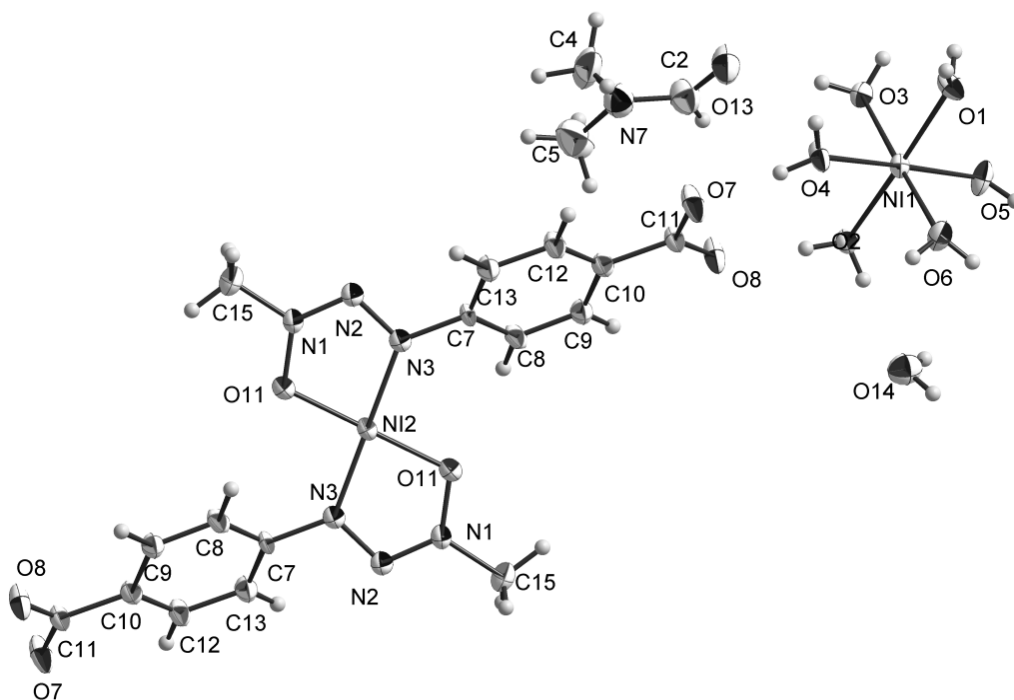
Recentemente foi publicado por SANTOS et al., (2016), Figuras 29 e 30, dois complexos de Ni<sup>II</sup> utilizando o ligante definido como melhor opção para a pesquisa descrita neste trabalho. Este ligante apresenta um substituinte *p*-carboxil e é um representante da classe de triazenos 1-óxido com capacidade de quelar cátions metálicos, a partir da formação de anéis estáveis de cinco membros.

A análise dos dados, por difração de Raios-X em monocristal, dos dois complexos descritos na literatura definiu a geometria quadrática para Ni<sup>II</sup>, com formação de dois anéis quelato de cinco membros e estequiometria 2:1 ligante:Ni<sup>II</sup>. Em ambas as estruturas é evidenciado um arranjo supramolecular proporcionado principalmente pela presença do grupo *p*-carboxilato e sua interação com cátions K<sup>+</sup> (Figura 29) e cátions [Ni(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]<sup>2+</sup> (Figura 30).

A presença deste grupo *p*-carboxilato torna o complexo quadrático de Ni<sup>II</sup> um potencial agente intercalante e extremamente interessante para o suporte em quitosana, gerando materiais inéditos, sendo este o principal objetivo do presente trabalho de doutorado.



**Figura 29.** Estrutura molecular do complexo  $\{[(\text{Ni}^{\text{II}})(1\text{-metil-3-(}p\text{-carboxylatofenil)triazenido 1-óxido})_2][(\text{K1})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{dimetilsulfoxido})]\}$ . Elipsóides térmicas em nível de probabilidade de 50 %. (SANTOS et al., 2016).



**Figura 30.** Estrutura molecular do complexo  $\{[(\text{Ni}^{\text{II}})(1\text{-metil-3-(}p\text{-carboxylatofenil)triazenido 1-óxido})_2][\text{Ni}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_6(\text{H}_2\text{O})(\text{dimetilformamida})]\}$ . Elipsóides térmicas em nível de probabilidade de 50 %. (SANTOS et al., 2016).

Assim, o composto 1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazeno 1-óxido já descrito na literatura (SANTOS et al., 2014; SANTOS et al., 2016) e seu complexo inédito  $[\text{bis}(1\text{-metil-3-(}p\text{-carboxylatofenil)triazenido 1-óxido})\text{Ni}^{\text{II}}]$  podem atuar,

perfeitamente, no suporte em quitosana, de acordo com sua capacidade de formar ânion carboxilato que por sua vez é capaz de interagir com cátions, como demonstram as Figuras 29 e 30.

Uma das potenciais aplicações para os materiais sintetizados neste trabalho está relacionada à catálise em síntese orgânica, uma vez que, complexos de níquel são usados como catalisadores em reações de oligomerização (PERGHER et al., 2015) e como catalisadores em síntese de polietileno ramificado e/ou linear, na presença de metilaluminoxano ou mesmo triálquilalumínino (GUIMARÃES et al., 2004).

Logo, em virtude do que foi exposto, os materiais inéditos que serão sintetizados neste trabalho dão início a uma nova classe de materiais, incluindo triazenos 1-óxido e seus complexos metálicos suportados em quitosana, sendo promissores em catálise homogênea, catálise heterogênea, adsorção de cátions, como reagente analítico e em muitas outras aplicações nas áreas da química, ciência de materiais, biotecnologia, etc.



#### 4. Materiais e Métodos

O desenvolvimento experimental consistiu em padronizar um procedimento para a extração de quitina a partir de cascas de camarão-rosa (*Farfantepenaeus*), seguida da obtenção de quitosana, utilizando de técnica estatística de planejamento fatorial. As cascas de camarão são provenientes de localidades pesqueiras da cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

Após a obtenção da quitosana pelo procedimento otimizado em laboratório, esta foi modificada a partir da inserção de 1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazeno 1-óxido) (**1**) e de *bis*[1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazenido 1-óxido]Ni<sup>II</sup> (**2**). Em todo o estudo a quitosana Sigma Aldrich® foi utilizada como resposta de referência, inclusive para as reações de imobilização citadas anteriormente.

Para a caracterização das amostras foram empregadas análises de: teor de umidade e cinzas (Método nº 935.29 e nº 923.03, AOAC, 1995), determinação de nitrogênio total (Método nº 920.87, AOAC, 1995), titulação potenciométrica, determinação da viscosidade, microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), espectroscopia de energia dispersiva (EDS) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). O trabalho foi desenvolvido e analisado no Laboratório de Sólidos Inorgânicos (LASIR) da Universidade Federal de Pelotas, bem como na Central Analítica da Universidade Federal de Pelotas (UFPeL). Outras análises foram feitas na Universidade Federal do Rio Grande (FURG) e no Centro de Microscopia Eletrônica da Zona Sul (CEME-SUL).

##### 4.1 Solventes e Reagentes

Todos os reagentes e solventes P.A. foram utilizados sem tratamento prévio e foram adquiridos comercialmente das marcas Sigma Adrich (St. Louis, Missouri, EUA), LabSynth Ltda (Diadema SP – Brasil).

|                                                                             |                                          |
|-----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| Acetato de Sódio                                                            | Hidróxido de Sódio                       |
| Ácido Acético                                                               | Fenofaleína 1 %                          |
| Ácido Bórico                                                                | Nitrito de Sódio                         |
| Ácido Clorídrico                                                            | Hidrato de <i>n</i> -metil-hidroxilamina |
| Ácido <i>p</i> -aminobenzóico                                               | Quitosana de peso molar médio            |
| Ácido Sulfúrico                                                             | Sulfato de Cobre(II) pentahidratado      |
| Álcool Etílico                                                              | Sulfato de Sódio                         |
| Cloreto de Níquel(II) hexahidratado                                         | Tetraidrofurano                          |
| Dimetilformamida                                                            | Trietilamina                             |
| Indicador Misto (vermelho de metila,<br>verde de bromo cresol, etanol 70 %) |                                          |

## 4.2 Equipamentos

- Balança analítica, AUW220D (Shimadzu).
- Bomba a vácuo, 131 (Prismatec)
- Calorimetria Exploratória Diferencial, DSC 60, (Shimadzu)
- Capela de exaustão, Q216-22EX (Quimis)
- Destilador de nitrogênio (Tecnal)
- Digestor de proteínas (Tecnal)
- Equipamento de espectroscopia na região do Infravermelho com Refletância Total Atenuada, IRAffinity-1 (Shimadzu)
- Equipamento de espectroscopia na região do Infravermelho, IRPrestige-21(Shimadzu)
- Equipamento de espectroscopia de energia dispersiva de raios-X, JSM6610LV(Jeol)

- Estufa, A4SE (DeLeo)
- Estufa, EL-1,6 (OdontoBrás)
- Metalizador, DeskV (DentonVacuum)
- Microscópio Eletrônico de Varredura, JSM6610LV (Jeol)
- Mufla, 402D (Lavoisier)
- Phmetro, Q400AS (Quimis)
- Picnômetro de vidro de 20 mL
- Prensa, (Shimadzu).
- Titulador potenciométrico, (Metrohm)
- Viscosímetro capilar (200 mm) Cannon-Fensk (Ostwald), (VIDROLABOR®)

#### **4.3 Preparo de Amostra – Quitosana Comercial**

A quitosana utilizada nos experimentos, como padrão de análise, foi adquirida da Sigma Aldrich® P.A. com médio peso molar e grau de desacetilação na faixa de 75-85 %. Um ensaio inicial de purificação da quitosana comercial foi realizado, diluiu-se esta em solução de ácido acético 3 % (pH  $\approx$  2,0), durante 24 h, sob agitação constante. Em seguida, filtrou-se a solução para retirada de material não dissolvido. Logo, foi realizada a precipitação total da quitosana por adição de hidróxido de amônio concentrado (pH 14,0) até a neutralização da solução a pH 7,0. Filtrou-se a suspensão para separação do material sobrenadante. A quitosana comercial purificada foi seca em estufa, à temperatura de 40 °C, por 24 h e armazenada em refrigerador para posteriores análises. Rendimento de 90 %.

#### **4.4 Procedimentos para Extração de Quitina e Síntese de Quitosana**

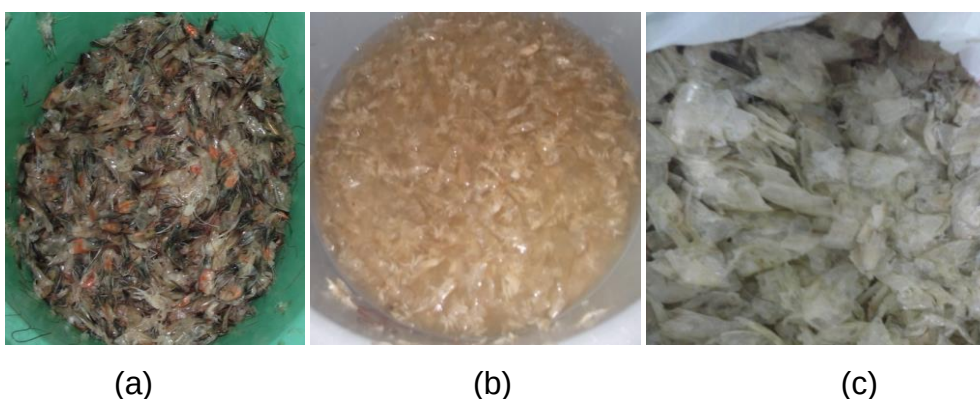
Os procedimentos para extração de quitina a partir de cascas de camarão e síntese de quitosana são consolidadas na literatura (MOURA et al., 2011;

GHORBEL-BELLAAJ et al., 2012; YOUNES et al., 2012; BAJAJ et al., 2015; BARON et al., 2015; MOURA et al., 2015; YOUNES e RINAUDO, 2015; YOUNES et al., 2016), no entanto, a adequação desses procedimentos à infraestrutura de cada laboratório e ao tipo de matéria prima é necessária.

Devido a isto, foi utilizada a ferramenta estatística de planejamento experimental fatorial para adaptação de um procedimento de extração de quitina e síntese de quitosana que fosse adequada ao Laboratório de Sólidos Inorgânicos (LASIR), visando diminuir o tempo de análise, diminuir a exposição do analista aos solventes e reagentes e diminuir a quantidade de resíduos gerados. A quitosana comercial Sigma Aldrich foi utilizada como referência de comparação com a quitosana sintetizada no LASIR a partir da casca de camarão.

#### 4.4.1 Preparo de Amostra – Casca de Camarão-Rosa

Os resíduos de casca do camarão-rosa (*Penaeus brasiliensis*) foram obtidos em mercados locais da cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. Inicialmente as amostras passaram pelo processo de catação para retirada de materiais grosseiros, tais como areia e materiais orgânicos e, em seguida, foram lavadas em água corrente. Após a limpeza das cascas, estas foram secas a temperatura ambiente e separadas, de acordo com a granulometria, em fragmentos maiores e menores que 5 mm (Figura 31 a,b,c).



**Figura 31.** Limpeza das cascas: catação (a); lavagem (b); cascas secas (c).

As cascas secas foram armazenadas em refrigerador a temperatura de - 20 °C para posteriores etapas de extração de quitina.

#### 4.4.2 Extração e Desacetilação da Quitina

Os processos de extração da quitina foram realizados a partir das etapas de desmineralização e desproteínização das amostras de casca de camarão *in natura* (lavadas e secas), em seguida, foi realizado o processo de desacetilação da quitina para obtenção da quitosana. Os procedimentos foram adaptados por técnica de planejamento fatorial completo a fim de encontrar os pontos ótimos de desmineralização, desproteínização e desacetilação. Assim, foram realizados três planejamentos, sendo um para cada etapa.

O primeiro planejamento foi montado para o processo de desmineralização utilizando-se a estratégia de dois níveis e três fatores ( $2^3$ ) sem repetições, totalizando oito ensaios, onde todas as combinações possíveis entre todos os níveis e cada fator estão presentes caracterizando assim, um esquema de planejamento fatorial completo  $2^3$  (Delineamento Composto Central – DCC). Os fatores como a superfície de contato, tempo de reação e acidez do meio foram as variáveis independentes e a resposta, cinzas residuais, expressa em porcentagem, foi a variável dependente. A acidez e o tempo foram variados de acordo com o descrito na literatura (RHAZI et al., 2000; MOURA et al., 2006; HENNIG, 2009; XIAOLIN et al., 2009). A Tabela 1 apresenta os valores codificados para o primeiro planejamento fatorial, referente à etapa de desmineralização.

**Tabela 1.** Valores utilizados no DCC para a desmineralização.

| Variáveis          | Código         | Níveis |     |
|--------------------|----------------|--------|-----|
|                    |                | -1     | +1  |
| Granulometria (mm) | X <sub>1</sub> | < 5    | > 5 |
| Tempo (min)        | X <sub>2</sub> | 30     | 180 |
| Acidez HCl (M)     | X <sub>3</sub> | 0,1    | 1,6 |

Após a obtenção do ponto ótimo da desmineralização, foi realizado o segundo planejamento, para o processo de desproteínização onde foi montado

utilizando a estratégia de dois níveis, três fatores e quatro pontos centrais com repetições totalizando doze ensaios. Neste planejamento todas as combinações possíveis entre todos os níveis e cada fator estão presentes e as repetições ocorrem apenas no ponto central, configurando um planejamento fatorial completo com pontos centrais (DCC  $2^3 + 4$  pc).

Os fatores, basicidade do meio, temperatura e tempo de reação foram as variáveis independentes e a resposta foi o teor de porcentagem de proteína, expresso em porcentagem sendo este a variável dependente. A basicidade e o tempo foram variados de acordo com o descrito na literatura (MOURA et al., 2006; WESKA et al., 2007). A Tabela 2 apresenta os valores codificados para o segundo planejamento fatorial para a etapa de desproteínização.

**Tabela 2.** Valores utilizados no DCC para a desproteínização.

| Variáveis           | Código         | Níveis |    |      |
|---------------------|----------------|--------|----|------|
|                     |                | -1     | 0  | +1   |
| Temperatura (°C)    | X <sub>4</sub> | 25     | 45 | 70   |
| Basicidade NaOH (M) | X <sub>5</sub> | 0,75   | 1  | 1,25 |
| Tempo (min)         | X <sub>6</sub> | 30     | 75 | 120  |

Após a obtenção do ponto ótimo da desproteínização, foi realizado o terceiro planejamento, para o processo de desacetilação onde foi montado utilizando-se a mesma estratégia do segundo planejamento, ou seja, dois níveis, três fatores e quatro pontos centrais com repetições, totalizando doze ensaios e configurando um planejamento fatorial completo com pontos centrais (DCC  $2^3 + 4$  pc).

Os fatores, velocidade de agitação, tempo e temperatura foram as variáveis independentes e a resposta foi o grau de desacetilação, expresso em porcentagem, sendo este a variável dependente. O tempo e a temperatura foram variados de acordo com o descrito na literatura (MOURA et al., 2006; XIAOLIN et al., 2009). A Tabela 3 apresenta os valores codificados para o terceiro planejamento fatorial para a etapa de desacetilação.

**Tabela 3.** Valores utilizados no DCC para a desacetilação

| Variáveis        | Código         | Níveis |     |      |
|------------------|----------------|--------|-----|------|
|                  |                | -1     | 0   | +1   |
| Agitação (rpm)   | X <sub>7</sub> | 200    | 850 | 1500 |
| Temperatura (°C) | X <sub>8</sub> | 100    | 120 | 140  |
| Tempo (min)      | X <sub>9</sub> | 120    | 240 | 360  |

As análises estatísticas foram realizadas para os três planejamentos fatoriais, com o intuito de gerar as funções matemáticas que representam cada processo. Detalhes dos procedimentos estão descritos no Anexo A e B.

#### 4.5 Procedimentos de Síntese dos Materiais

A síntese dos materiais baseia-se no suporte de 1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazeno 1-óxido) (**1**) e *bis*[1-metil-3-(*p*-carboxitofenil)triazenido 1-óxido]Ni<sup>II</sup> (**2**) em quitosana comercial e quitosana sintetizada, formando os materiais (**3a**), (**3b**), (**4a**) e (**4b**), respectivamente.

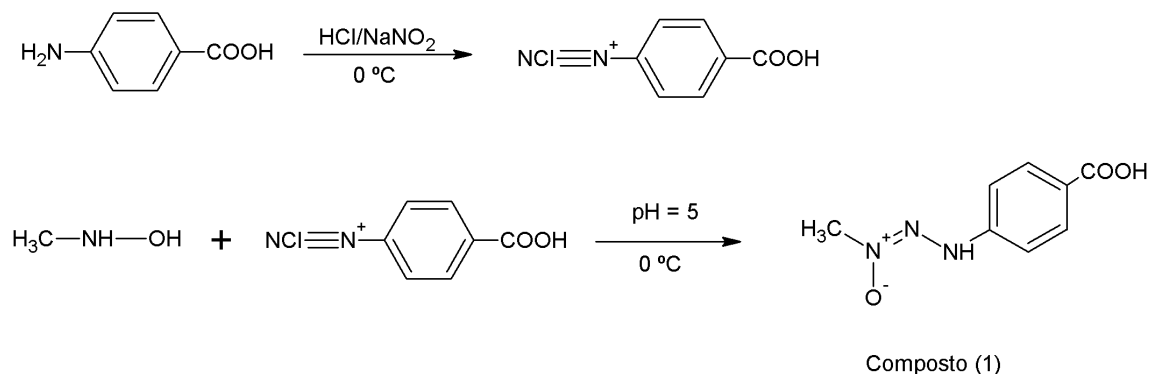
##### 4.5.1 Síntese de 1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazeno 1-óxido (**1**)

O composto (**1**), já descrito na literatura, será suportado em quitosana comercial e sintetizada, na formação dos compostos (**3a**) e (**3b**), o que justifica sua síntese.

Assim, a síntese de 1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazeno 1-óxido ocorre pela diazotação do ácido *p*-aminobenzóico em solução aquosa de nitrito de sódio, na proporção estequiométrica 1:1, de acordo com Santos et al., (2007), ilustrado na Figura 32.

Para isso, preparou-se uma suspensão de 1 g (7,3 mmol) de ácido *p*-aminobenzóico em 30 mL de ácido clorídrico e 30 mL de água deionizada, a 0 °C. Esta solução foi mantida a uma temperatura entre 0 e 5 °C (banho de gelo), sobre ela adicionou-se lentamente uma solução contendo 0,6 g (7,3 mmol) de nitrito de sódio e 2 mL de água destilada gelada. O meio de reação foi agitado por 50 min na temperatura indicada (banho de gelo). Após tratou-se o sal de diazônio formado com uma solução aquosa de 0,6 g (7,3 mmol) de hidrato de *N*-metil-hidroxilamina. A temperatura foi mantida por 40 min, após este tempo, neutralizou-se a solução até pH 6,0 com uma solução saturada de acetato de

sódio ( $\approx 200$  mL). Decorridos 15 min filtrou-se o precipitado formado, de coloração amarelo-róseo, e lavou-se com 200 mL de água destilada gelada e álcool etílico. Posteriormente o produto foi seco em dessecador contendo sílica anidra.



**Figura 32.** Síntese do composto (1).

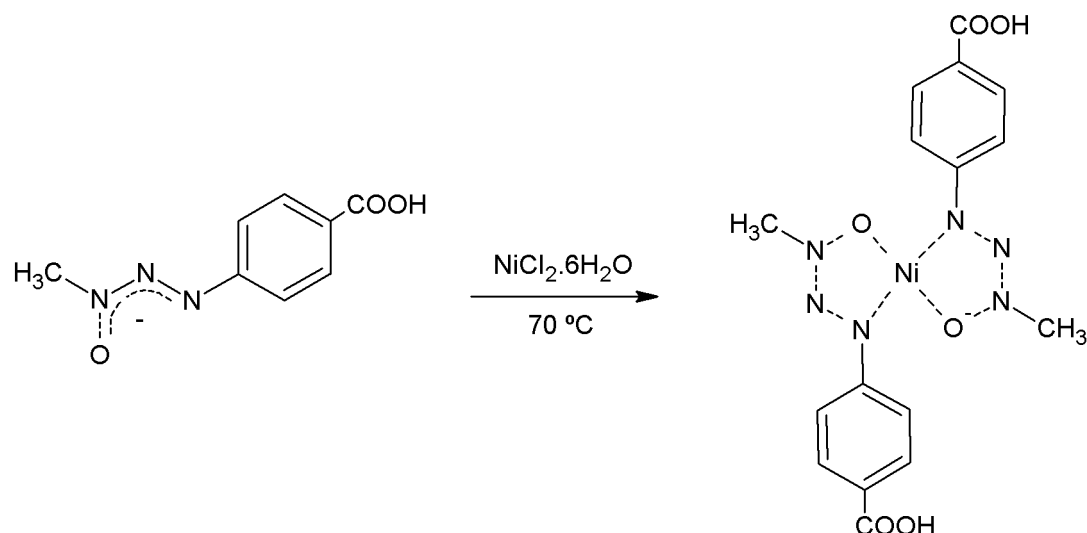
O composto (1) ( $C_8H_7N_3O_3$ ;  $M = 195 \text{ g mol}^{-1}$ ) foi isolado sem purificação adicional, com rendimento de 43 % calculado a partir da quantidade molar de hidreto de *n*-metil-hidroxilamina. O ponto de fusão do composto (1) foi determinado em  $205^\circ\text{C}$ .

#### 4.5.2 Síntese de bis[1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazenido 1-óxido] $Ni^{II}$ (2)

O composto (2) inédito, ilustrado na Figura 33, será suportado em quitosana comercial e sintetizada, na formação dos compostos (4a) e (4b), respectivamente, o que justifica sua síntese.

Assim, a um balão de 50 mL adiciona-se 122,64 mg (0,6288 mmol) do composto (1), 10 mL de dimetilformamida e aproximadamente oito gotas de trietilamina. Deixou-se reagir, em agitação magnética, por 20 min a temperatura ambiente. Na sequência, adicionou-se 74,74 mg (0,3144 mmol) de cloreto de  $Ni^{II}$  hexahidratado, sendo que o meio de reação permaneceu por 30 min a uma temperatura de  $70^\circ\text{C}$ , em banho de óleo.





**Figura 33.** Obtenção do composto **(2)** evidenciando a quelação do  $\text{Ni}^{\text{II}}$  por duas moléculas de triazenido 1-óxido. Estrutura esperada e planejada através das quantidades estequiométricas de síntese 1:2 (metal:ligante).

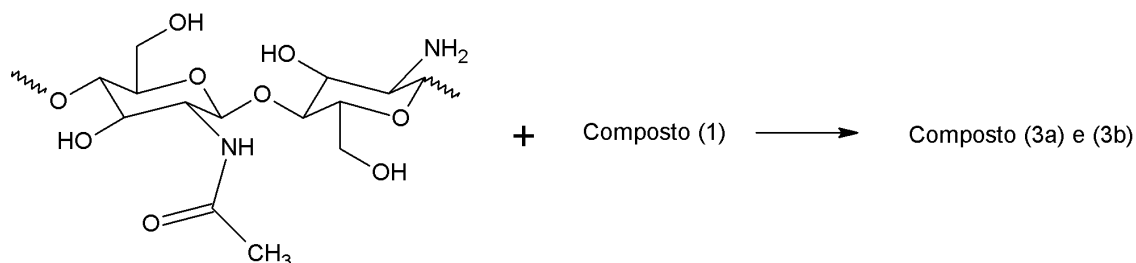
Após, a solução foi filtrada para retirada de impurezas não solúveis e o produto em solução foi deixado para cristalização. Após algumas semanas de evaporação lenta, em sistema semi-aberto, o composto **(2)** ( $\text{C}_{16}\text{N}_6\text{O}_6\text{H}_{16}\text{Ni}$ ;  $447 \text{ g mol}^{-1}$ ) foi isolado, na forma de sólido marrom. Rendimento 72,33 %, calculado a partir da quantidade molar de sal de níquel(II).

#### 4.5.3 Síntese dos Compostos **(3a)** e **(3b)**

A imobilização ou suporte de 1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazeno 1-óxido **(1)** em quitosana comercial e sintetizada origina os compostos inéditos **(3a)** e **(3b)**, respectivamente. Estes materiais **(3a)** e **(3b)** foram sintetizados de acordo com a descrição a seguir.

A um balão de 50 mL adicionou-se 61,23 mg (0,3144 mmol) do composto **(1)** e 10 mL de tetraidrofurano deixou-se agir por 20 min, a 60°C, sob banho de óleo. Em seguida, solubilizou-se a quitosana 50 mg (0,3144 mmol) em 2 mL de ácido acético 3 % até formação de um gel. Adicionou-se o gel de quitosana à solução contida no balão e deixou-se reagir em banho de óleo, a 70 °C, por 24 h.

Após o tempo reação, os compostos foram isolados, na forma de sólidos de coloração levemente amarelada, lavados com tetrahidrofurano e secos em estufa por 24 h, a 40 °C. O rendimento de síntese para o composto (**3a**) foi de 66,33 %, já para o composto (**3b**) foi de 53,78 %. As etapas de síntese estão ilustradas na Figura 34.



**Figura 34.** Esquema de síntese dos compostos (**3a**) e (**3b**).

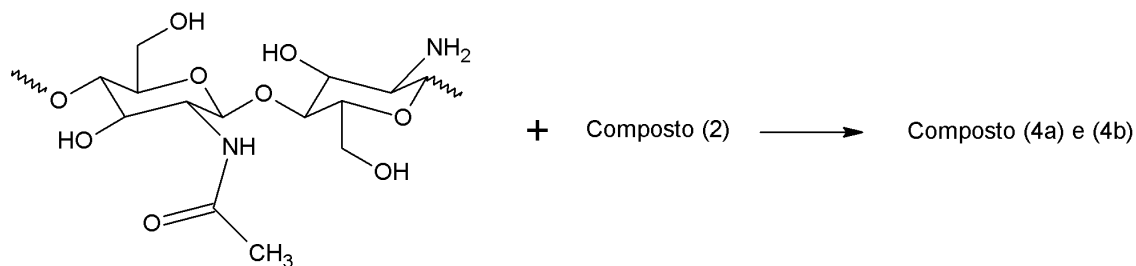
#### 4.5.4 Síntese dos compostos (**4a**) e (**4b**)

A imobilização ou suporte de *bis*[1-metil-3-(*p*-carboxifenil) triazenido 1-óxido] Ni<sup>II</sup> (**2**) em quitosana comercial e sintetizada origina os compostos inéditos (**4a**) e (**4b**), respectivamente. Estes materiais (**4a**) e (**4b**) foram sintetizados de acordo com a descrição a seguir.

A um balão de 50 mL adicionou-se 122,64 mg (0,6288 mmol) do composto (**1**), 10 mL de dimetilformamida e aproximadamente oito gotas de trietilamina. Deixou-se reagir por 20 min à temperatura ambiente e adicionou-se 74,74 mg (0,3144 mmol) de cloreto de Ni<sup>II</sup> hexahidratado. Deixou-se reagir por 30 min a 70 °C, em banho de óleo. Com a realização desta etapa esperou-se igual aquela descrita anteriormente para o composto (**2**). Assim, após a obtenção do composto (**2**) em solução, adicionou-se o gel de quitosana (50 mg de quitosana (0,3144 mmol) diluídos em 2 mL de ácido acético 3 %) e deixou-se reagir por 24 h, a 70 °C, em banho de óleo.

Após o tempo de reação os compostos foram isolados, na forma de sólidos de coloração levemente marrom, lavados com tetrahidrofurano e secos em estufa por 24 h, a 40 °C. O rendimento de síntese para o composto (**4a**) foi

de 33,67 %, já para o composto **(4b)** foi de 26,79 %. As etapas de síntese estão ilustradas na Figura 35.



**Figura 35.** Esquema para obtenção dos compostos **(4a)** e **(4b)**.

#### 4.6 Procedimentos de Caracterização dos Materiais

Para análise de umidade foi empregado o método nº 935.29 da *Association of Official Analytical Chemists International* – AOAC (1995), a determinação de cinzas foi realizada pelo método nº 923.03 da AOAC (1995), os níveis protéicos foram determinados pelo método de micro-Kjeldahl, nº 920.87 da AOAC (1995) empregando fator de conversão 6,25 para proteínas da carne e misturas de proteína de acordo com a legislação brasileira (Resolução RDC n.268, de 22 de setembro de 2005, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, citado pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO), a massa molecular foi avaliada pelo método físico de viscosidade utilizando viscosímetro capilar Cannon-Fenske (Ostwald), o grau de desacetilação foi determinado pelo método de titulação potenciométrica de acordo com metodologia descrita na literatura (MOURA et al., 2006; MOURA et al., 2011; MOURA et al., 2015).

Análises de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e calorimetria exploratória diferencial (DSC), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS) também foram realizados.

#### 4.6.1 Determinação de Umidade

Pesou-se aproximadamente 5,0000 g das amostras, em balança analítica adequada, em cadinhos de alumínio previamente tarados em estufa, a  $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante 5 h. Em seguida, colocaram-se as amostras em dessecador até chegar a temperatura ambiente. Em seguida, pesou-se as amostras de 1 em 1 h até a massa permanecer constante. Todas as análises de umidade foram realizadas em triplicata, no LASIR, UFPel.

O cálculo do teor de umidade foi realizado de acordo com a equação 1.

$$U = \frac{P_1 - P_2}{P_a} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

onde:  $U$  é a porcentagem de perda de água;  $P_1$  representa o peso do cadinho;  $P_2$  o peso do cadinho contendo a amostra após a dessecação em estufa, e  $P_a$  o peso da amostra.

#### 4.6.2 Determinação de Cinzas

Pesou-se aproximadamente 2,0000 g das amostras em balança analítica, em cadinhos de porcelana previamente tarados em mufla, a  $550\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante 4 h. Primeiramente, as amostras foram incineradas no cadinho de porcelana em capela utilizando tripé e lamparina, em seguida, as amostras já incineradas foram colocadas na mufla durante 6 h a  $550\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, as amostras foram retiradas e colocadas em dessecador até que atingissem a temperatura ambiente. As amostras foram pesadas para avaliar o teor de cinzas, em seguida, as amostras foram colocadas em mufla a  $550\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , após, as amostras foram pesadas de 1 em 1 h até atingir massa constante. Todas as análises de cinzas foram realizadas em triplicata no LASIR, UFPel.

O cálculo do teor de cinzas foi realizado de acordo com a equação 2.

$$C = \frac{P_1 - P_2}{P_a} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

onde:  $C$  é a porcentagem de cinzas residuais;  $P_1$  representa o peso do cadinho;  $P_2$  o peso do cadinho contendo a amostra após a incineração em mufla, e  $P_a$  o peso da amostra.

#### 4.6.3 Determinação de Proteínas

A determinação de proteína foi realizada pelo método de micro-Kjeldahl onde aproximadamente 0,5000 g de amostra foram pesadas em papel manteiga e colocados em tubos de Kjeldahl onde se adicionou 2,5 g de mistura catalítica (sulfato de sódio e sulfato de cobre(II) pentahidratado 10:1 p/p) e 12 mL de ácido sulfúrico concentrado. Os tubos foram aquecidos em bloco digestor, lentamente, mantendo a temperatura de 50 °C, por 1 h e, em seguida, aumentando gradativamente até que atingissem 400 °C, onde permaneceram por mais 1 h. Ao completar o ciclo de digestão, os tubos foram retirados e esperou-se até que atingissem a temperatura ambiente e, em seguida, adicionou-se 10 mL de água destilada.

As amostras foram colocadas em erlenmeyer e foi adicionado 20 mL de ácido bórico 4 % e 3 gotas de indicador misto, preparado anteriormente com cerca de 0,132 g de vermelho de metila ( $C_{15}H_{15}N_3O_2$ ), 0,06 g de verde de bromo cresol ( $C_{21}H_{14}Br_4O_5S$ ), dissolvidos em aproximadamente 200 mL de solução de álcool etílico ( $C_2H_6O$ ) 70 % (v/v). Em seguida, os tubos foram adaptados ao destilador de nitrogênio onde se adicionou 50 mL de solução de hidróxido de sódio 40 % e, então, estas amostras foram destiladas por arraste de vapor até o volume aproximado de 150 mL no erlenmeyer.

Em seguida, para quantificação do teor de nitrogênio total as amostras foram tituladas com ácido sulfúrico 0,05 M até a viragem do indicador (fenolftaleína 1 %), isto é, até que a coloração do meio de reação mudasse de verde para roxo. Todas as análises de nitrogênio total foram realizadas em

triplicata, incluindo a prova em branco, ou seja, a análise realizada apenas com os reagentes. Estas análises foram realizadas no LABGRÃOS, UFPel.

As reações relacionadas a este processo de determinação de nitrogênio constam no Anexo C.

O cálculo do nitrogênio total foi realizado de acordo com as equações 3 e 4.

$$N_T = \frac{V \times N \times 0,0014 \times 100}{m} \quad \text{Equação 3}$$

onde:  $N_T$  é a porcentagem de nitrogênio total;  $V$  é o volume de solução de ácido sulfúrico ( $0,0499 \text{ mol L}^{-1}$ ) gastos na titulação;  $N$  correspondente a normalidade teórica da solução de ácido sulfúrico (multiplicado por 2); 0,0014 é o valor do miliequivalente grama do nitrogênio e  $m$  é a massa da amostra em gramas.

$$P = N_T \times 6,25 \quad \text{Equação 4}$$

onde:  $P$  é a porcentagem de proteínas;  $N_T$  é a porcentagem de nitrogênio total e 6,25 é o fator de conversão da carne e misturas de proteínas.

#### 4.6.4 Determinação da Viscosidade e Cálculo da Massa Molar Média

As medidas viscosimétricas das amostras de quitosana comercial e sintetizada foram realizadas em viscosímetro capilar Ostwald a uma temperatura controlada de  $25,0 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Soluções diluídas de quitosana, nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ , utilizando como solvente solução de ácido acético 0,3 M e acetato de sódio 0,2 M (1:1 v/v), foram preparadas. O tempo de escoamento para cada solução foi avaliado em triplicata para obtenção da média dos tempos. Estas análises foram realizadas no LASIR, UFPel.

A partir do tempo de escoamento são utilizadas equações para a determinação seqüencial da viscosidade relativa ( $\eta_{\text{rel}}$ ), viscosidade específica

( $\eta_{\text{esp}}$ ), viscosidade reduzida ( $\eta_{\text{red}}$ ), viscosidade inerente ( $\eta_{\text{ine}}$ ) e, por fim a viscosidade intrínseca ( $\eta$ ) por extrapolação gráfica, descritas no Anexo D.

A partir da determinação da viscosidade intrínseca  $[\eta]$ , foi possível calcular a massa molar viscosimétrica média, através da equação de Mark-Houwink-Sakurada, equação 5, citada por Roberts e Domszy (1982).

$$[\eta] = K.M_v^\alpha \quad \text{Equação 5}$$

onde:  $[\eta]$  é a viscosidade intrínseca,  $M_v$  corresponde a massa molar média viscosimétrica,  $\alpha = 0,76$  e  $K = 0,074$  são constantes que dependem do específico sistema solvente-polímero adotado neste trabalho, uma solução de ácido acético 0,3 M e acetato de sódio 0,2 M (1:1 v/v) (ROBERTS e DOMSZY, 1982; RINAUDO et al., 1993).

No caso da quitosana, não há consenso sobre a variação do sistema solvente adotado em função do grau de acetilação de cada amostra considerada, assim, diferentes fatores são adotados na literatura (ROBERTS e DOMSZY, 1982; RINAUDO et al., 1993; BRUGNEROTTO, et al., 2001; ALSARRA et al.; 2002; GALED et al., 2005; MOURA et al., 2011; MOURA et al., 2015).

#### 4.6.5 Titulação Potenciométrica e Cálculo do Grau de Desacetilação

O procedimento de titulação potenciométrica linear iniciou-se pela dissolução de 0,250 g de quitosana em 20 mL de ácido clorídrico (0,1 M). Esta solução de quitosana 0,078 M foi titulada com solução aquosa de hidróxido de sódio 1 M. O cálculo do grau de desacetilação foi obtido de acordo com a equação 6.

$$GD\% = \frac{16,1 \times [Base] \times (V_2 - V_1)}{m} \quad \text{Equação 6}$$

onde 16,1 é fração molar de quitosana,  $[Base]$  é a concentração da solução titulante (NaOH (mol L<sup>-1</sup>)),  $(V_2 - V_1)$  é o volume entre os dois pontos de inflexão

da curva de titulação,  $m$  é a massa em gramas da quitosana utilizada no experimento (0,250 g) e  $GD\%$  é o grau de desacetilação.

A determinação do grau de desacetilação das amostras de quitosana foi realizada no equipamento Metrohm, pertencente à Escola de Química e Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande (EQA-FURG).

No Anexo E encontra-se um gráfico típico de titulação potenciométrica (volume do titulante versus mV da solução), com a indicação do ponto de equivalência e início e fim da inflexão na curva.

#### *4.6.6 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)*

As análises FTIR foram conduzidas com o espectrômetro FTIR IRAffinity-1, Shimadzu, resolução  $400 - 4000\text{ cm}^{-1}$  e 32 varreduras. Para preparo das amostras, pesou-se aproximadamente 2 mg de quitosana, seca previamente, em estufa a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h. Adicionou-se 100 mg de brometo de potássio, seco previamente em estufa a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h. A quitosana e o brometo de potássio foram homogeneizados em gral e pistilo de ágata. Em seguida, as pastilhas foram preparadas utilizando-se a prensa. Este procedimento foi realizado na Central Analítica do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA, UFPel).

#### *4.6.7 Calorimetria exploratória diferencial – DSC*

As análises de calorimetria foram realizadas utilizando-se de 1,000 mg a 3,000 mg de amostra, em cadinhos de alumínio fechados, não herméticos. As amostras foram aquecidas com uma taxa de  $0,5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , na faixa de  $30 - 400\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sob fluxo de nitrogênio ( $50\text{ mL min}^{-1}$ ). Este procedimento foi realizado no CCQFA, UFPel.



#### *4.6.8 Microscopia Eletrônica de Varredura Acoplada a Sistema de Espectroscopia de Energia Dispersiva – MEV/EDS*

A análise de morfologia superficial foi verificada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram metalizadas com ouro utilizando uma corrente de 20 mA, por 120 s, a voltagem de aceleração utilizada foi de 10 keV e faixa de magnificação variou de 30 a 300.000 vezes, as imagens obtidas foram de 50 x, 800 x e 2000 x.

Acoplado ao MEV encontra-se o sistema de espectroscopia de energia dispersiva, o qual possibilitou a determinação da composição qualitativa e semi quantitativa das amostras, a partir da emissão de raios X característicos dos elementos presentes na região atingida pelo feixe de elétrons. É considerado um processo de medida rápido, pois permite analisar os comprimentos de onda de modo simultâneo. Essa análise foi realizada no CEME-SUL, FURG.

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1 Caracterização da Quitosana Comercial

Como a quitosana comercial foi utilizada como amostra de comparação para a quitosana sintetizada neste trabalho, fez-se necessária a caracterização completa desta amostra. A ficha técnica da quitosana comercial da marca Sigma Aldrich® apresenta a descrição de quitosana com peso molecular médio e grau de desacetilação entre 75-85 % (SIGMA ALDRICH®).

Assim, a quitosana comercial (purificada e não purificada) foi caracterizada pelas determinações de umidade, cinzas e nitrogênio total, apresentando valores de 5 %; 0,1 % e 0,042 % para quitosana purificada e 5,7 %; 0,1 % e 0,05 % para quitosana não purificada, respectivamente. Os valores apresentados mostram que o processo de purificação não alterou de maneira significativa as características da amostra. Assim, optou-se por utilizar a quitosana comercial não purificada. Além disso, o processo de purificação resultou em rendimento de 90 % corroborando ao fato de que a purificação da quitosana comercial não é realmente necessária.

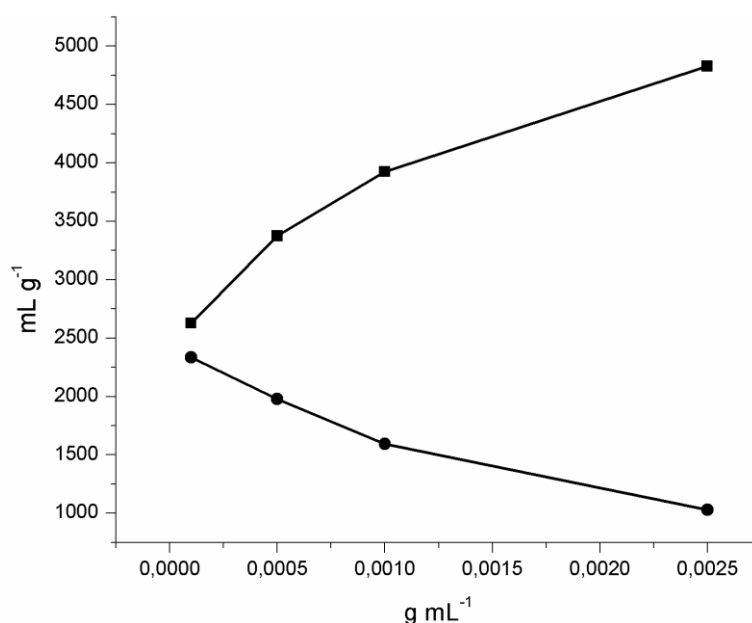
A viscosidade para a quitosana comercial não purificada foi avaliada a partir dos tempos de escoamento da solução em diferentes concentrações ( $0,1$  a  $2,5 \times 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$ ) e as viscosidades relativa, específica, reduzida e inerente, e a massa viscosimétrica molar foram calculadas. O solvente (ácido acético 3 M e acetato de sódio 0,2 M (1:1 v/v)) sem adição de quitosana apresentou tempo médio de escoamento de 6,02 s. A Tabela 4 apresenta os tempos de escoamento e as viscosidades para a quitosana comercial.

**Tabela 4.** Tempos de escoamento em viscosímetro Ostwald e viscosidades para soluções de quitosana comercial.

| Solução ( $\text{g mL}^{-1}$ ) | Tempo* (s) | $\eta_{rel}$ | $\eta_{esp}$ | $\eta_{red}$ ( $\text{mL g}^{-1}$ ) | $\eta_{ine}$ ( $\text{mL g}^{-1}$ ) |
|--------------------------------|------------|--------------|--------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| $0,1 \times 10^{-3}$           | 7,61       | 1,263        | 0,263        | 2627,3                              | 2332,8                              |
| $0,5 \times 10^{-3}$           | 16,21      | 2,688        | 0,688        | 3376,0                              | 1977,6                              |
| $1,0 \times 10^{-3}$           | 29,70      | 4,926        | 3,926        | 3925,8                              | 1594,5                              |
| $2,5 \times 10^{-3}$           | 78,8       | 13,07        | 12,07        | 4828,2                              | 1028,1                              |

\*Tempos de escoamento, média das triplicatas.

As viscosidades, reduzida e inerente, foram utilizadas para elaboração do gráfico em função da concentração, Figura 36, assim obtendo-se o valor da viscosidade intrínseca  $[\eta]$  a partir da extrapolação das retas para uma concentração tendendo a zero. O valor do coeficiente de correlação ( $R^2$ ) foi de 0,93 e 0,95 para a viscosidade reduzida e inerente, respectivamente e as equações das curvas foram:  $y = 85284x + 2815$  para viscosidade reduzida e  $y = -1984x + 2266$  para viscosidade inerente.

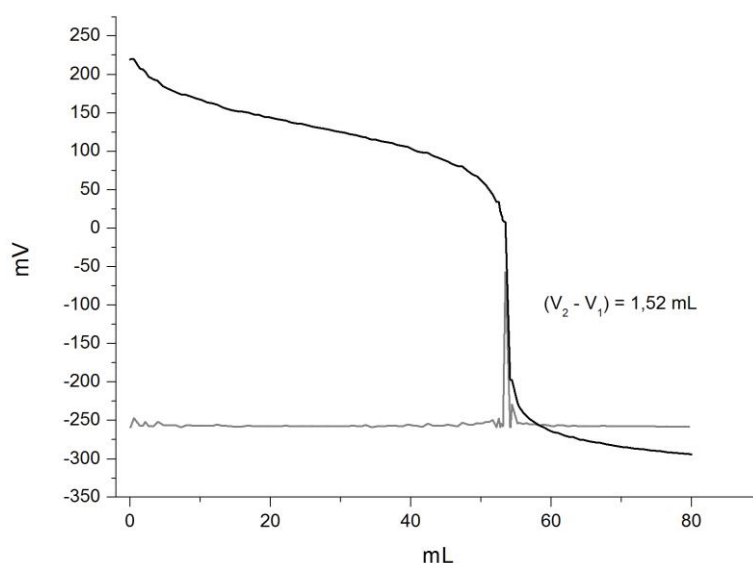


**Figura 36.** Viscosidade reduzida (■) e viscosidade inerente (●) *versus* concentração das soluções de quitosana comercial.

As viscosidades intrínsecas calculadas a partir da viscosidade reduzida e da viscosidade inerente foram de 2815 mL g<sup>-1</sup> e 2266 mL g<sup>-1</sup>, respectivamente, sendo assim, a massa da quitosana comercial encontra-se na faixa de  $79,92 \times 10^4$  g mol<sup>-1</sup> (799 KDa) a  $106,33 \times 10^4$  g mol<sup>-1</sup> (1063 KDa). Assim, já se sabe o que esperar de uma quitosana com massa molecular média (ANEXO D).

Já o grau de desacetilação da quitosana foi determinado a partir de titulação potenciométrica. A amostra de quitosana comercial não purificada foi titulada com solução de hidróxido de sódio padronizada (0,9559 M). A Figura 37 apresenta a curva potenciométrica (preto) e a curva da derivativa (cinza), onde o primeiro ponto de inflexão corresponde à neutralização do excesso do ácido clorídrico na solução (24,003 mL) e o segundo ponto de inflexão se refere à

neutralização dos grupos amino protonados (25,522 mL), apresentando um grau de desacetilação de aproximadamente 94 % calculado pela Equação 6 (ANEXO D).



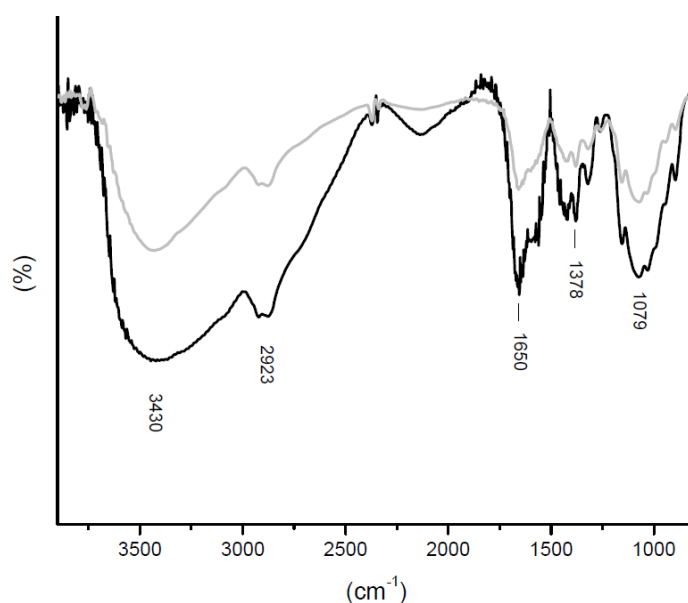
**Figura 37.** Curva de potenciométrica (preto) e derivativa (cinza) da titulação da quitosana comercial não purificada. Potencial (mV) versus Volume (mL)

Em seguida foram realizadas as análises de FTIR que não evidenciaram diferença entre a amostra comercial purificada e não purificada, mais um ponto que reforça o fato da purificação não ser necessária.

A análise de FTIR, ilustrada na Figura 38, mostra as principais bandas características da quitosana:  $3430 \text{ cm}^{-1}$  [ $\nu$ O-H] sobreposta a banda [N-H],  $2923 \text{ cm}^{-1}$  [ $\nu_s$ C-H],  $1650 \text{ cm}^{-1}$  [ $\delta$ N-H] pertencente à deformação  $\text{NH}_2$  a qual se sobrepõem a banda [ $\nu$ C=O],  $1378 \text{ cm}^{-1}$  [ $\delta_s$ C-H],  $1200 \text{ cm}^{-1}$  [ $\nu$ C-N] e  $1160 - 900 \text{ cm}^{-1}$  [ $\nu$ C-O-C] da ligação glicosídica (BRUGNEROTTO et al., 2001; LOPES e FASCIO, 2004; ANTONINO, 2007; SILVERSTEIN et al., 2007; AFANAS'EVA et al., 2013; ABDEL-RAHMAN et al., 2015; MOURA et al., 2015; KUMARI et al., 2015; SJAIFULLAH e SANTOSO, 2016; SKOŁUCKA-SZARY et al., 2016).

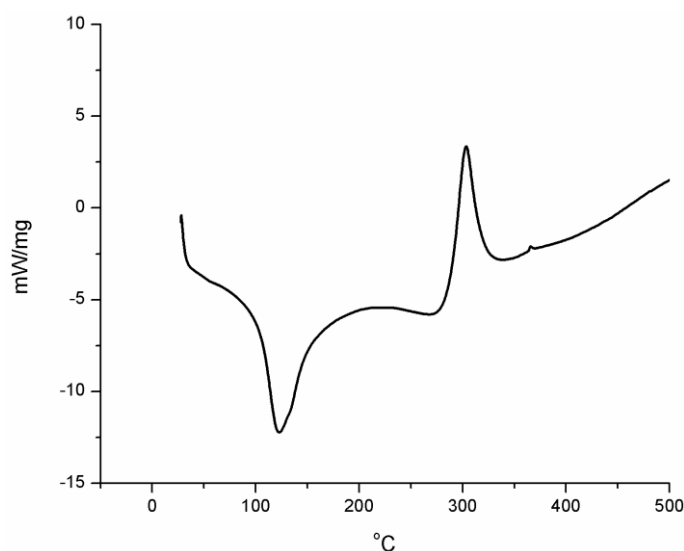
GHOSH e ALI, (2012) reportaram bandas características de quitosana em  $3000 \text{ cm}^{-1}$  [ $\nu$ O-H] sobreposta a [N-H], estiramentos assimétricos e simétricos em  $2929 \text{ cm}^{-1}$  e  $2878 \text{ cm}^{-1}$  [C-H],  $1660 \text{ cm}^{-1}$  [C=O],  $1598 \text{ cm}^{-1}$  [ $\delta\text{NH}_2$ ] da amina primária além das bandas polissacarídeas em  $1556 \text{ cm}^{-1}$ .

GÜMÜSOGLU et al., (2011) reportaram bandas de quitosana características dos grupamentos amida I e II em  $1647\text{ cm}^{-1}$  e  $1567\text{ cm}^{-1}$ . LI et al., (2013) observaram bandas para quitosana pura em 3436, 2922, 1643, 1604, 1384, 1155-1033  $\text{cm}^{-1}$  referentes a (-OH) e (-NH<sub>2</sub>), (-CH) e (-CH<sub>2</sub>), (-C=O), (-NH<sub>2</sub>), (-CH) e (-CO) da ligação (-COC-), respectivamente. FADZALLAH et al., (2014) observaram bandas de quitosana em 3425 e 3390  $\text{cm}^{-1}$  [O-H] e [N-H], 2929  $\text{cm}^{-1}$  e 2878  $\text{cm}^{-1}$  [C-H], 1647  $\text{cm}^{-1}$  [C=O], 1580  $\text{cm}^{-1}$  [N-H] da amina além das bandas em 1416  $\text{cm}^{-1}$  [C-N] acoplado [N-H] e 1026  $\text{cm}^{-1}$  [C-O-C].



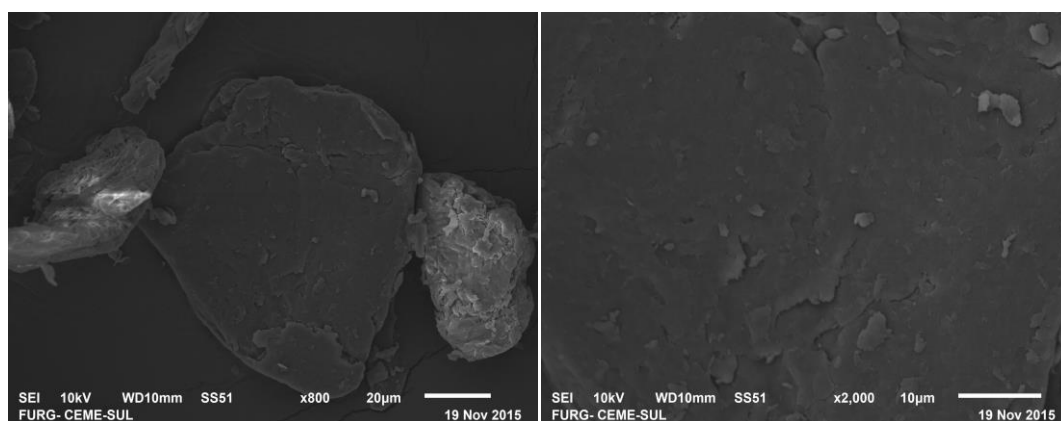
**Figura 38.** FTIR da quitosana purificada (preta) e não purificada (cinza). Transmitância (%) versus Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

A Figura 39 referente à análise por DSC mostra o termograma da quitosana comercial não purificada, onde se observam dois efeitos térmicos, sendo, o primeiro pico endotérmico, com valores de  $T_{\text{onset}}$ : 105,66 °C;  $T_{\text{endset}}$ : 146,72 °C;  $T_{\text{pico}}$ : 122,59 °C e  $\Delta H = 185,74\text{ J g}^{-1}$ , que correspondente provavelmente à perda de água e de outros compostos voláteis adsorvidos. O segundo pico é exotérmico, com os valores de  $T_{\text{onset}}$ : 288,81 °C;  $T_{\text{endset}}$ : 317,82 °C;  $T_{\text{pico}}$ : 303,22 °C e  $\Delta H = -153,48\text{ J g}^{-1}$ , que corresponde à degradação da amostra. Esses dois picos estão de acordo com o descrito na literatura, onde SREENIVASAN (1996) descreveu dois eventos térmicos para amostras de quitosana, sob fluxo de nitrogênio em curvas de DSC.



**Figura 39.** Termograma da quitosana comercial não purificada. Fluxo de calor ( $\text{mW mg}^{-1}$ ) versus temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ).

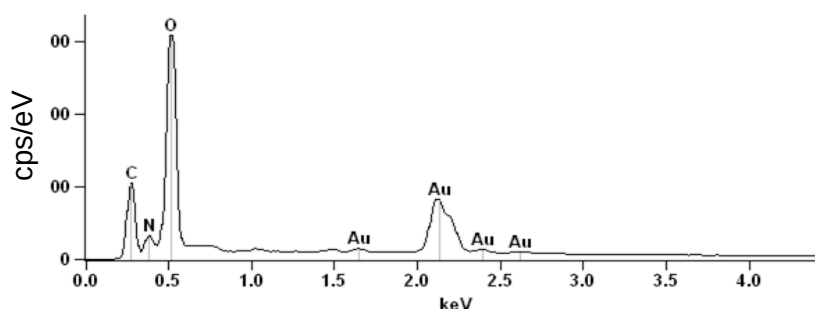
A análise por MEV revela características gerais da superfície. A Figura 40 ilustra as Micrografias com magnitudes de 800 e 2000 X, respectivamente. As Micrografias mostram pequenos grânulos com tamanhos irregulares e superfície pouco rugosa para o pó de quitosana comercial não purificada, as mesmas características de superfície foram relatadas por TRIMUKHE e VARMA (2008) e CORAZZARI et al., (2015).



**Figura 40.** Micrografia da quitosana comercial não purificada.

Já a análise de EDS, acoplada ao MEV, foi utilizada para caracterização qualitativa e semi qualitativa de átomos presentes na amostra. A Figura 41 ilustra o espectro de EDS, onde se pode observar a presença dos compostos de carbono, nitrogênio e oxigênio, em 0,282; 0,392; 0,523 keV, respectivamente, que são os constituintes orgânicos da quitosana. A presença de ouro, no

espectro, se dá pela preparação da amostra, onde o ouro é utilizado como metalizador.



**Figura 41.** Espectro de EDS para a quitosana comercial não purificada. Intensidade (cps eV<sup>-1</sup>) versus energia (keV).

## 5.2 Caracterização da Casca de Camarão

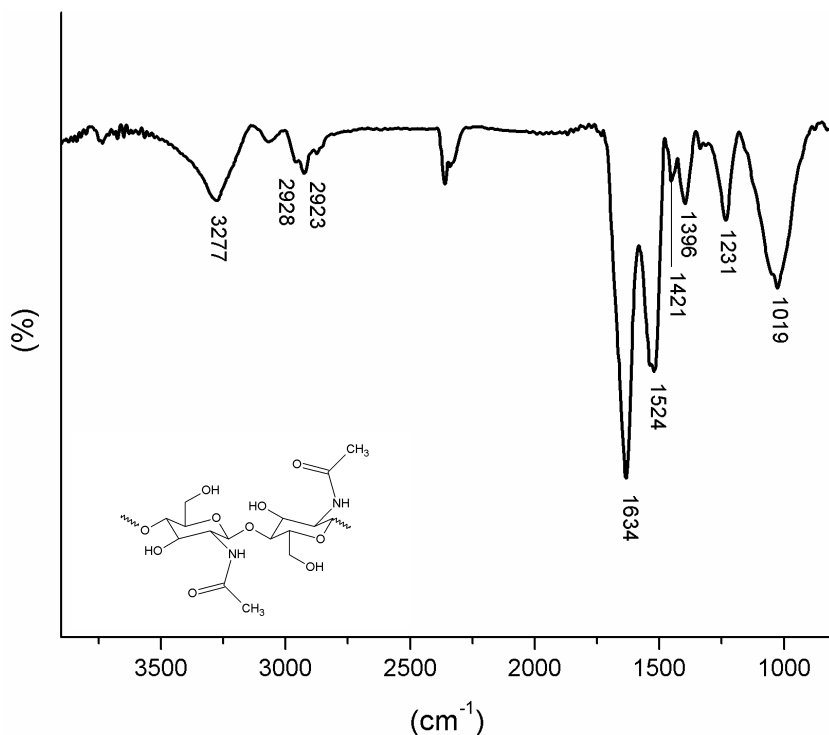
A caracterização da casca *in natura* do camarão é justificada pelo fato de esta biomassa ser a matriz para extração da quitina e, posterior, síntese de quitosana neste estudo.

Assim na casca *in natura* do camarão foram realizadas as análises de umidade, cinzas e nitrogênio total, obtendo-se os seguintes valores 83,2 %; 1,76 % e 16,3 %, respectivamente. Estes valores estão de acordo com valores encontrados na literatura para resíduos de camarão (SRIKET et al., 2007; DAMASCENO et al., 2009).

No espectro de FTIR da amostra de casca *in natura*, uma série de bandas foi observada, as mais relevantes são as características das amidas I, II e III da quitina, composto presente numa quantidade de 15 a 20 % no exoesqueleto dos crustáceos (CRAVEIRO et al., 1999; ASSIS et al., 2008).

As bandas características da quitina foram identificadas, na Figura 42, em 3277 cm<sup>-1</sup> [νO-H] e [νN-H] sobrepostos, estiramento assimétrico e simétrico em 2928 cm<sup>-1</sup> e 2923 cm<sup>-1</sup> [νC-H], 1634 cm<sup>-1</sup> [ν<sub>s</sub>N-H] da amida II, 1524 cm<sup>-1</sup> [νC-N acoplado a deformação no plano δN-H] da amida III, 1396 cm<sup>-1</sup> [δ<sub>s</sub>C-H], 1231cm<sup>-1</sup> [νC-N] e 1019 a 890 cm<sup>-1</sup> [νC-O-C e νC-O] da ligação glicosídica. A banda [νC=O] da amida I não foi identificada. As bandas identificadas estão de acordo

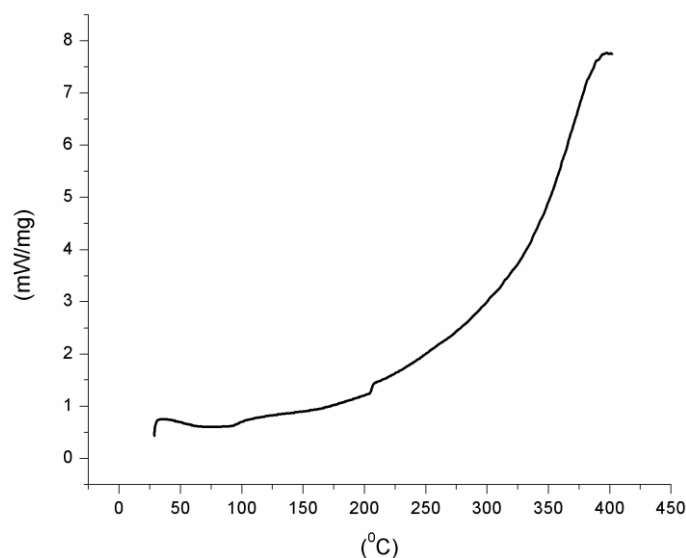
com o encontrado na literatura para quitina em casca de camarão (SUGIMOTO et al., 1998; LOPES e FASCIO, 2004; JIANG et al., 2003; PAULINO et al., 2006; RINAUDO 2006; ANTONINO, 2007; AZEVEDO et al., 2007; SILVERSTEIN et al., 2007, SAGHEER et al., 2009; KUMIRSKA et al., 2010; SKOŁUCKA-SZARY et al., 2016).



**Figura 42.** FTIR da casca *in natura* do camarão e, no detalhe, a estrutura da quitina. Transmitância (%) versus Número de onda (cm<sup>-1</sup>).

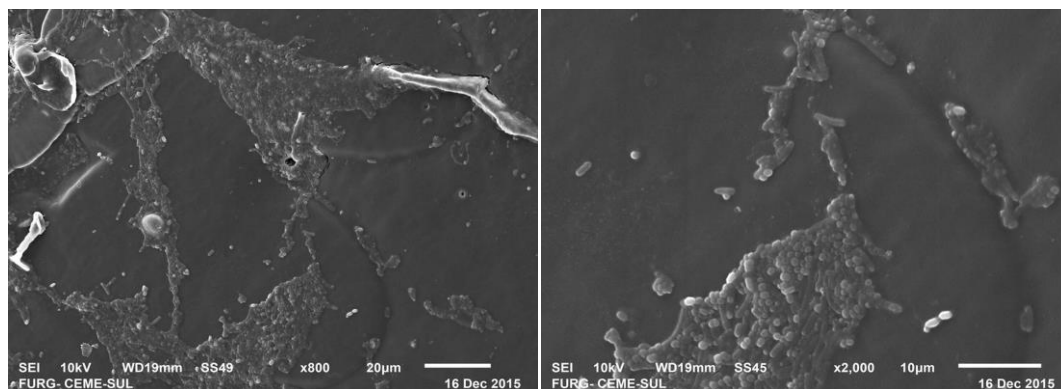
A Figura 43 mostra o termograma de DSC da casca *in natura*, onde se observa dois efeitos térmicos, um pico endotérmico com valores de  $T_{\text{onset}}$ : 55,11 °C;  $T_{\text{endset}}$ : 91,23 °C;  $T_{\text{pico}}$ : 74,06 °C e  $\Delta H = 1,12 \text{ J g}^{-1}$  correspondente a perda de água e outros compostos voláteis um pico exotérmico, com valores de  $T_{\text{onset}}$ : 205,37 °C;  $T_{\text{endset}}$ : 211,94 °C;  $T_{\text{pico}}$ : 211,74 °C e  $\Delta H = - 2,01 \text{ J g}^{-1}$ , correspondente à degradação de matéria orgânica presente na casca, seguido da decomposição da amostra a partir de 212 °C.





**Figura 43.** Termograma de DSC da casca *in natura*. Fluxo de calor (mW g<sup>-1</sup>) versus temperatura (°C).

A análise por MEV foi realizada para verificar a microestrutura superficial da amostra de casca *in natura*. A Figura 44 ilustra as imagens captadas com magnificação de 800 e 2000 X, respectivamente. É possível verificar que a casca não é homogênea, apresentando regiões diversas na superfície.

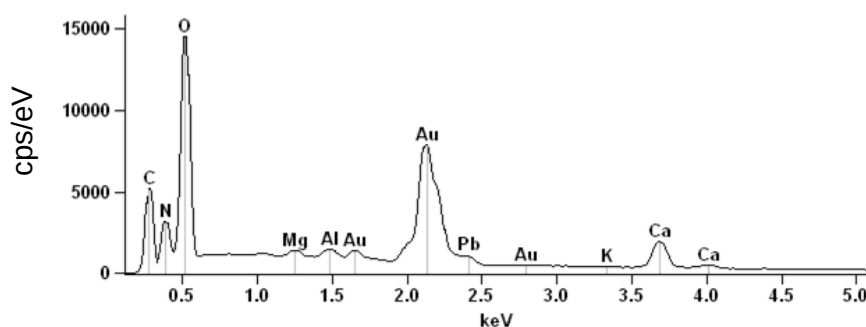


**Figura 44.** Micrografia em MEV da casca *in natura*.

A análise de EDS, acoplada ao MEV, Figura 45, ilustra o espectro para a casca do camarão, onde se pode observar a presença dos compostos de carbono, nitrogênio e oxigênio característicos da quitina e outros constituintes orgânicos da casca em 0,282; 0,392; 0,523 keV, respectivamente, característicos da quitina e de outros constituintes orgânicos presentes na casca.

Além dos constituintes orgânicos, também foram identificados metais, numa análise semi-quantitativa, cujas porcentagens atômicas seguem entre

parênteses: magnésio (0,65 %), alumínio (0,77 %), chumbo (0,29 %), potássio (0,16 %) e cálcio (6,42 %), em 1,254; 1,487; 2,346; 3,312 e 3,690 keV, respectivamente. O cálcio apresenta a maior porcentagem atômica uma vez que este é constituinte da casca na forma de carbonato de cálcio. A presença destes metais, na casca do camarão, é equivalente aos encontrados por DÁMARIS et al., (2014) onde dos quatorze metais detectados, pelos autores, o cálcio apresentou a maior porcentagem em massa, corroborando com o espectro de EDS da casca *in natura* deste estudo.



**Figura 45.** Espectro de EDS para a casca *in natura* do camarão. Intensidade (cps eV<sup>-1</sup>) versus energia (keV).

### 5.3 Extração da Quitina (Desmineralização e Desproteínização) e Síntese da Quitosana (Desacetilação)

#### 5.3.1 Desmineralização da Casca de Camarão

A desmineralização foi realizada na casca *in natura* do camarão para extração de quitina. O procedimento deste estudo foi desenvolvido a partir de planejamento fatorial completo ( $2^3$  – DCC) onde as variáveis independentes, granulometria ( $x_1$ ), tempo de reação ( $x_2$ ) e concentração molar do ácido clorídrico ( $x_3$ ), foram estudadas em relação ao efeito simultâneo no processo de desmineralização. A Tabela 5 apresenta a matriz do primeiro planejamento ( $2^3$ ), considerando a desmineralização ( $y_1$ ) como resposta, ou seja, a variável dependente, sendo que  $y_1$  corresponde às cinzas residuais.

As condições foram:  $x_1$  (maior que 5 mm e menor que 5 mm),  $x_2$  (30 min e 180 min),  $x_3$  (0,1 M e 1,6 M). De acordo com esses resultados, foi alcançada uma faixa de 78 a 90 % de desmineralização em relação à casca *in natura*. Nos experimentos foram utilizadas granulometrias diferentes apesar da literatura relatar que há uma diminuição do peso molecular da quitosana quando granulometrias menores são utilizadas (MOURA et al., 2015). Além disso, a literatura também relata que a maior partícula facilita a produção de quitosana com maior peso molecular para obtenção de filmes, no entanto, o aumento do peso molecular da quitosana está diretamente ligado a diminuição do grau de desacetilação para quitosana obtida a partir de cascas de camarão (MOURA et al., 2011).

Logo, apesar de terem sido avaliadas diferentes granulometrias, a granulometria que interessa a este estudo é a maior, uma vez que há interesse em síntese de quitosana que possibilite a formação de filmes.

**Tabela 5.** Valores decodificados e resposta  $y_1$  (cinzas residuais).

| Experimentos | $x_1$ (mm) | $x_2$ (min) | $x_3$ (M) | $y_1$ (%) | *Cinzas (%) | Desmin. (%) |
|--------------|------------|-------------|-----------|-----------|-------------|-------------|
| 1            | 1 (> 5)    | 1 (180)     | 1 (1,6)   | 0,33      | 18,8        | 81,2        |
| 2            | 1 (> 5)    | 1 (180)     | -1 (0,1)  | 0,38      | 21,7        | 78,3        |
| 3            | 1 (> 5)    | -1 (30)     | 1 (1,6)   | 0,28      | 16,0        | 84,0        |
| 4            | 1 (> 5)    | -1 (30)     | -1 (0,1)  | 0,37      | 21,1        | 78,9        |
| 5            | -1 (< 5)   | 1 (180)     | 1 (1,6)   | 0,24      | 13,6        | 86,4        |
| 6            | -1 (< 5)   | 1 (180)     | -1 (0,1)  | 0,24      | 13,5        | 86,5        |
| 7            | -1 (< 5)   | -1 (30)     | 1 (1,6)   | 0,17      | 9,7         | 90,3        |
| 8            | -1 (< 5)   | -1 (30)     | -1 (0,1)  | 0,20      | 11,4        | 88,6        |

\*Cinzas.: resultados de cinzas residuais calculados a partir da relação de  $y_1$  com 1,76% de cinzas residuais na casca, considerados como 100%; Desmin.: desmineralização alcançada.

Assim, a partir dos resultados da Tabela 5, observa-se que os melhores processos de desmineralização, a partir da resposta  $y_1$ , são os dos experimentos 5, 6, 7 e 8. Além disso, é possível observar que há diferença entre a porcentagem de desmineralização em granulometrias maiores e menores, no entanto, esta diferença será considerada neste trabalho, tendo em vista que não é elevada e que há interesse na síntese de quitosana com maior massa molecular média.

Logo, o melhor experimento, que reúne a maior granulometria e maior porcentagem de desmineralização é o experimento 3.

As condições para os experimentos 1-8 foram escolhidas com base na literatura, levando em consideração os relatos das maiores porcentagens de desmineralização, ou seja, menores valores de cinzas residuais. Outros fatores

observados na literatura e que serviram de base para a definição experimental deste trabalho de desmineralização foram menor tempo de reação e concentração ácida mais branda.

Assim, todos os processos de desmineralização de casca de camarão relatados na literatura são baseado em tratamentos contínuos utilizando, em sua maioria, concentrações de ácido clorídrico relativamente elevadas de 1 a 10 M, com tempos de até 72 h. Concentrações mais baixas ( $< 1$  M) raramente foram aplicadas, no entanto, PERCOT et al., (2003) avaliaram a desmineralização utilizando uma concentração de 0,25 M de HCl (1:40 p/v), à temperatura ambiente, por 15 min, ao final do processo obteve 0,01 % de minerais residuais. Já BARON et al., (2015) avaliaram a desmineralização utilizando diferentes ácidos (acético, fórmico, cítrico, fosfórico e clorídrico), durante 6 h de reação, tendo como melhor resultado o processo com ácido clorídrico.

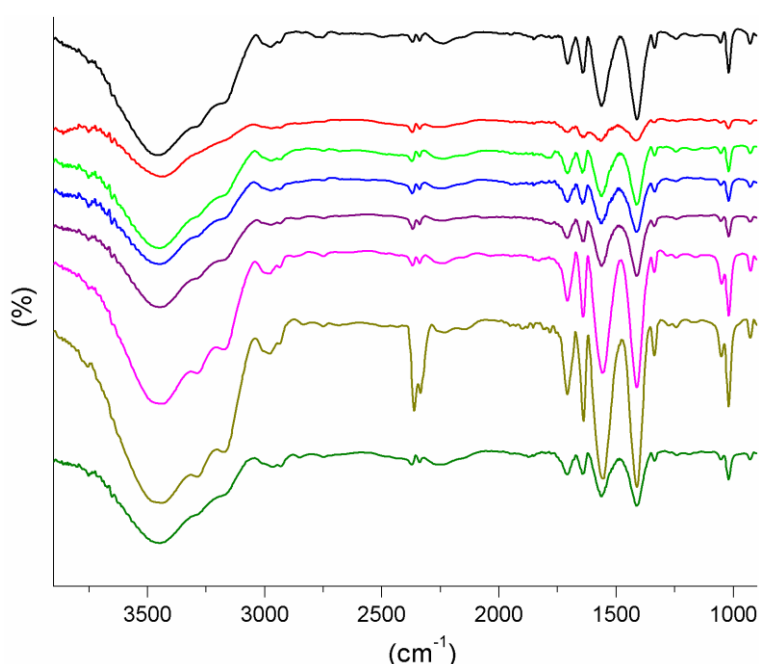
A literatura também relata o uso de planejamento fatorial para a definição de melhores condições de desmineralização, utilizando variáveis de concentração de ácido clorídrico, tempo de reação, bem como neste trabalho, no entanto a temperatura de reação foi avaliada ao invés da granulometria, que foi fixada pelos autores numa faixa de 2-3 mm. Assim, YOUNES et al., (2016) estudaram a desmineralização utilizando planejamento fatorial  $2^{5-1}$  e definiram como ponto ótimo, para a granulometria já pré-definida, uma concentração de 0,5 M de solução de HCl (1:10 p/v), temperatura de 4 °C, numa agitação de 30 rpm por 30 min., obtendo 99 % de desmineralização.

Os diferentes autores apontam para a importância de otimização dos parâmetros do processo de desmineralização (tempo, temperatura, concentração ácida, agitação e granulometria) de modo a minimizar a degradação da quitina e diminuir as impurezas no final do processo e é justamente isso que foi realizado neste trabalho.

Assim, a partir do planejamento dos experimentos 1-8 e de sua execução, foi necessário avaliar se as amostras foram degradadas ou não, com as condições experimentais adotadas. Para isso utilizou-se a análise de espectroscopia na região do infravermelho.

A Figura 46 ilustra os espectros de FTIR para a quitina desmineralizada pelos experimentos 1-8, sendo que as bandas observadas em todos os

experimentos são semelhantes as bandas relatadas na caracterização da casca *in natura*, neste experimento. Pela análise de FTIR, Figura 46, onde os experimentos estão representados por diferentes cores e ordenados de cima para baixo da seguinte maneira: Experimento 1 (preto), 2 (vermelho), 3 (verde claro), 4 (azul), 5 (violeta), 6 (rosa), 7 (marrom) e 8 (verde escuro), é possível observar que todos possuem bandas semelhantes e que caracterizam bandas de quitina (SUGIMOTO et al., 1998; LOPES e FASCIO, 2004; JIANG et al., 2003; PAULINO et al., 2006; RINAUDO 2006; ANTONINO, 2007; AZEVEDO et al., 2007; SILVERSTEIN et al., 2007, SAGHEER et al., 2009; KUMIRSKA et al., 2010; SJAIFULLAH e SANTOSO, 2016; SKOŁUCKA-SZARY et al., 2016).

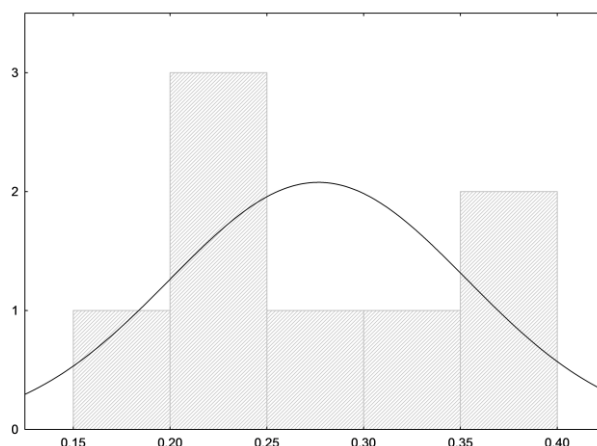


**Figura 46.** Espectros FTIR dos experimentos 1-8 de desmineralização da quitina. Transmitância (%) versus Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Como as análises de FTIR evidenciaram que todos os experimentos 1-8 resultaram na extração de quitina, todos os resultados dos processos de desmineralização ( $y_1$ ) foram considerados para a avaliação do melhor resultado.

Assim a partir dos dados da resposta ( $y_1$ ), os primeiros testes estatísticos foram realizados iniciando com a avaliação da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk efetuado no programa *Statistica 7.0* (STATSOFT, EUA) ilustrado na Figura 47, onde os resultados das variáveis independentes ( $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$ ) seguem uma distribuição normal simétrica com valor de  $p = 0,60$  (sendo então o intervalo de confiança  $p > 0,10$ ) mostrando que não houve diferença significativa

entre os resultados dos experimentos, ou seja, os valores  $y_1$  se situam em torno da média, assim os resultados poderão ser todos significativos ou todos não significativos (RODRIGUES e LEMMA 2009; PIANA et al., 2009).



**Figura 47.** Histograma de normalidade para o processo de desmineralização ( $y_1$ ). Número de observações *versus*  $y_1$ .

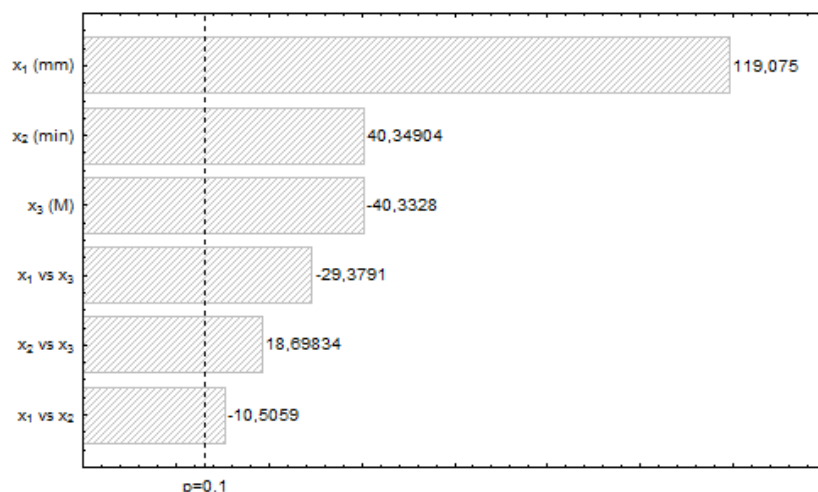
Na Tabela 6, verifica-se que todas as variáveis foram significativas ( $p < 0,10$ ), estando de acordo com o teste de normalidade. A partir dos dados da tabela e para avaliar quais resultados são significativos e quais não são significativos é realizado o teste de Pareto. Essa significância pode ser confirmada pelo diagrama de Pareto efetuado no programa *Statística 7.0* (STATSOFT, EUA), Figura 46.

**Tabela 6.** Efeitos e coeficientes de regressão  $y_1$ .

| Fatores  | Efeitos   | t        | p        | Coeficientes de regressão |
|----------|-----------|----------|----------|---------------------------|
| Média    | 0,276631  | 527,5078 | 0,001207 | 0,276631                  |
| $x_1$    | 0,124888  | 119,0750 | 0,005346 | 0,062444                  |
| $x_2$    | 0,042319  | 40,3490  | 0,015775 | 0,021159                  |
| $x_3$    | -0,042302 | -40,3328 | 0,015781 | -0,021151                 |
| $x_1x_2$ | -0,011019 | -10,5059 | 0,060415 | -0,005509                 |
| $x_1x_3$ | -0,030813 | -29,3791 | 0,021661 | -0,015407                 |
| $x_2x_3$ | 0,019611  | 18,6983  | 0,034014 | 0,009806                  |

$x_1$ .: granulometria (mm);  $x_2$ .: tempo (min);  $x_3$ .: concentração ácida HCl (M).

Na Figura 48, observa-se que a variável granulometria ( $x_1$ ) foi a mais significativa seguida pelo tempo de reação ( $x_2$ ) e concentração molar ácida do ácido clorídrico ( $x_3$ ). As variáveis  $x_1$ ,  $x_2$  e a interação de  $x_2x_3$  desfavoreceram o procedimento de desmineralização. No entanto, as variáveis  $x_3$  e as interações  $x_1x_2$  e  $x_1x_3$  favoreceram o processo de desmineralização, isto é, a menor porcentagem de cinzas residuais ( $y_1$ ).



**Figura 48.** Diagrama de Pareto para o processo de desmineralização ( $y_1$ ). Fatores *versus* Efeitos.

Verificados a normalidade e os efeitos, é possível, utilizando os coeficientes de regressão, gerar o modelo que prediz a resposta da variável dependente ( $y_1$ ) em função das variáveis independentes (Equação 7).

$$y_1 = 0,277 + 0,062x_1 + 0,021x_2 - 0,021x_3 - 0,005x_1x_2 - 0,015x_1x_3 + 0,01x_2x_3$$

Equação 7

onde:  $y_1$  é a resposta para o processo de desmineralização (cinzas residuais);  $x_1$  a granulometria (mm);  $x_2$  o tempo (min) e  $x_3$  a concentração molar do ácido clorídrico (M).

Para o ajuste do modelo foi utilizada análise de variância (ANOVA) utilizando o programa *Statistica 7.0* (STATSOFT, EUA), e as equações do teste F (ANEXO A) (RODRIGUES e LEMMA 2009).

A partir dos resultados (Tabela 7), pode-se dizer que o modelo é preditivo e significativo, já que o F calculado foi maior que o F crítico (tabelado) e o  $R^2$  (0,999) próximo de 1, logo, podemos traçar a superfície de resposta e a curva de contorno. O baixo erro puro indica uma ótima precisão da análise (RODRIGUES e LEMMA, 2009).

**Tabela 7.** Análise de variância (ANOVA).

| Fonte de variação | Soma quadrática | Graus de liberdade | Média quadrática | F <sub>cal</sub> | F <sub>cal</sub> /F <sub>tab</sub> | R <sup>2</sup> |
|-------------------|-----------------|--------------------|------------------|------------------|------------------------------------|----------------|
| Regressão         | 0,041266        | 6                  | 0,00688          | 3126             | 53,7                               | 0,999          |
| Resíduo           | 0,000002        | 1                  | 0,000002         |                  |                                    |                |
| Falta de ajuste   | -               |                    |                  |                  |                                    |                |
| Erro puro         | 0,000002        | 1                  |                  |                  |                                    |                |
| Total             | 0,041268        | 7                  |                  |                  |                                    |                |

F<sub>cal</sub>: F calculado; F<sub>tab</sub>: F tabelado<sub>6;1;010</sub> = 58,20 (Anexo B); R<sup>2</sup>: coeficiente de determinação.

A Tabela 8 mostra os resultados experimentais obtidos, onde esses se assemelham aos resultados preditos, calculados a partir do modelo matemático. Apesar da existência de desvios (ANEXO A) pode-se considerar que os resultados de comparação entre os valores experimentais e preditos foram matematicamente satisfatórios com desvios menores que 20 % (RODRIGUES e LEMMA, 2009).

**Tabela 8.** Resultados experimentais e preditos para o processo de desmineralização.

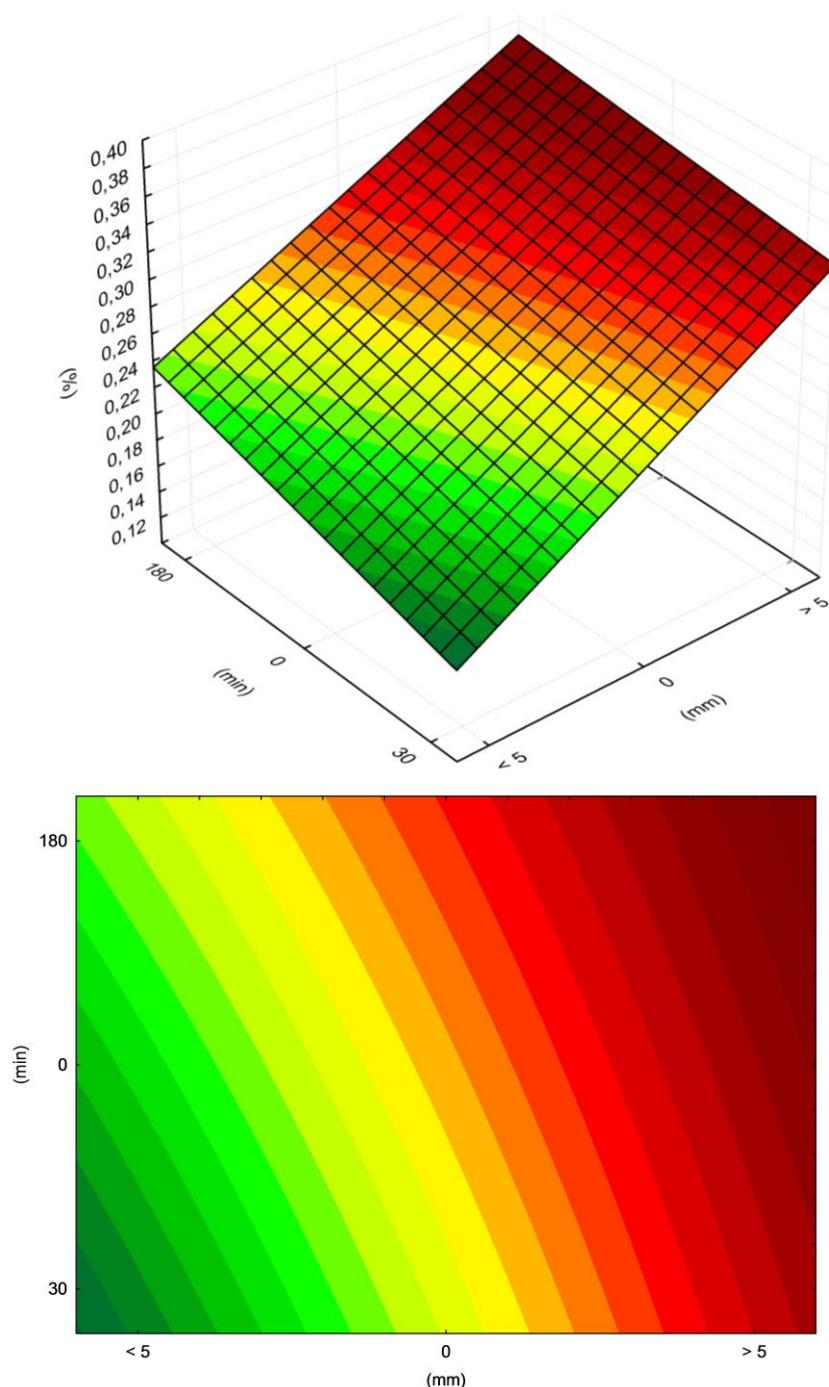
| Experimento | y <sub>1</sub> Experimental | y <sub>1</sub> ' Predito | Desvio (%) |
|-------------|-----------------------------|--------------------------|------------|
| 1           | 0,3312                      | 0,3279                   | 0,976      |
| 2           | 0,3815                      | 0,3815                   | -0,015     |
| 3           | 0,2815                      | 0,2770                   | 1,585      |
| 4           | 0,3706                      | 0,3698                   | 0,219      |
| 5           | 0,2384                      | 0,2449                   | -2,706     |
| 6           | 0,2382                      | 0,2368                   | 0,5707     |
| 7           | 0,1713                      | 0,1719                   | -0,371     |
| 8           | 0,2010                      | 0,2031                   | -1,064     |

y<sub>1</sub>: resposta para o processo de desmineralização (cinzas residuais); y<sub>1</sub>': resposta predita para o processo de desmineralização (cinzas residuais) predita.

As Figuras 49, 50 e 51 ilustram as superfícies de resposta e curvas de contorno para as interações significativas, ou seja, entre as variáveis x<sub>1</sub>x<sub>2</sub>; x<sub>1</sub>x<sub>3</sub> e x<sub>2</sub>x<sub>3</sub>, respectivamente. A resposta esperada para a variável dependente (y<sub>1</sub>) satisfaz o menor valor de y<sub>1</sub> (coloração verde escura), evidenciando o ponto ótimo para o procedimento de desmineralização.

De acordo com a Figura 49, onde são observadas as interações das variáveis x<sub>1</sub>x<sub>2</sub>, o ponto ótimo do processo de desmineralização ocorreu em x<sub>1</sub> (-1) e x<sub>2</sub> (-1), ou seja, na menor granulometria (< 5 mm) e menor tempo de reação (30 min).

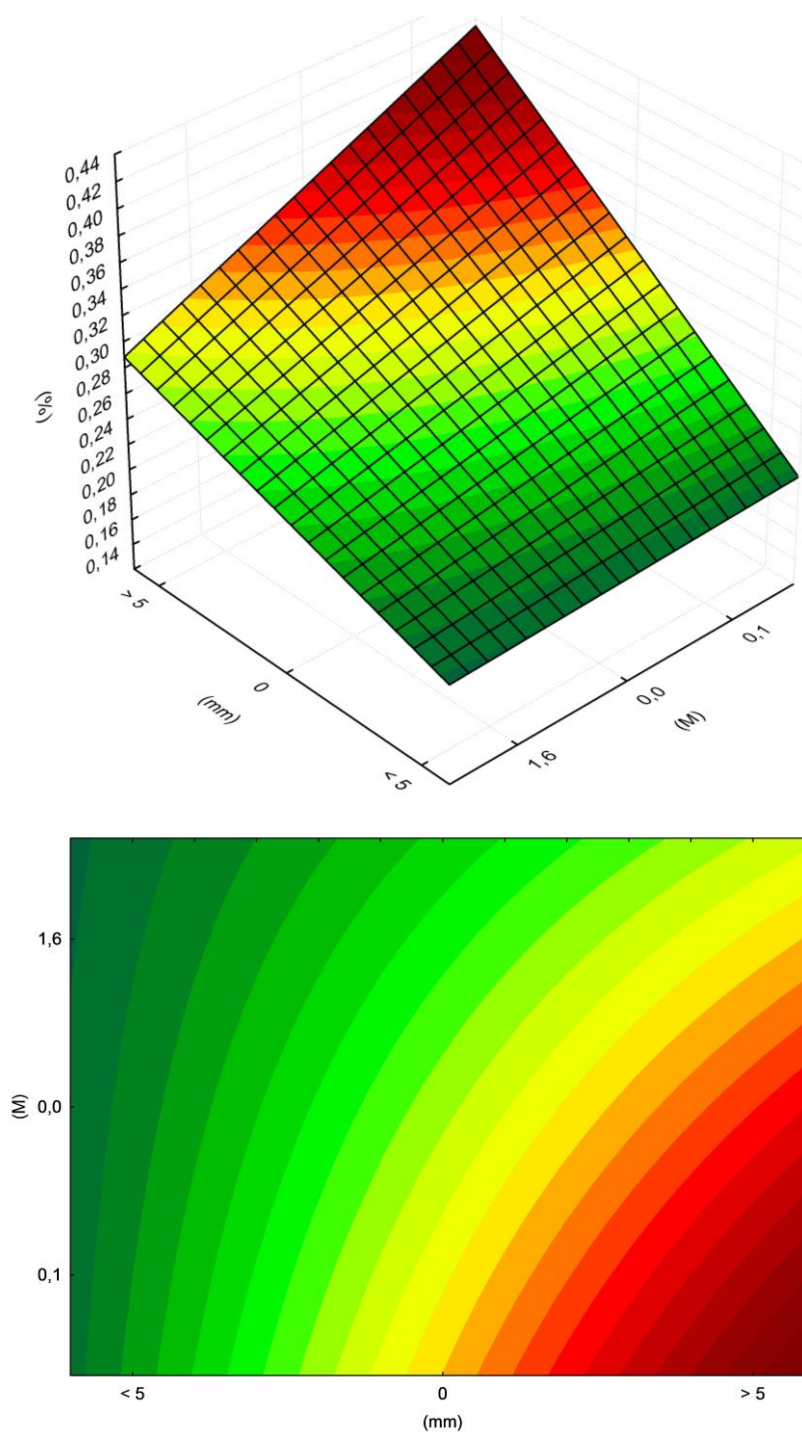




**Figura 49.** Superfície de resposta e curva de contorno para a interação significativa entre as variáveis  $x_1x_2$ , ou seja, granulometria ( $x_1$ ) e tempo de reação ( $x_2$ ).

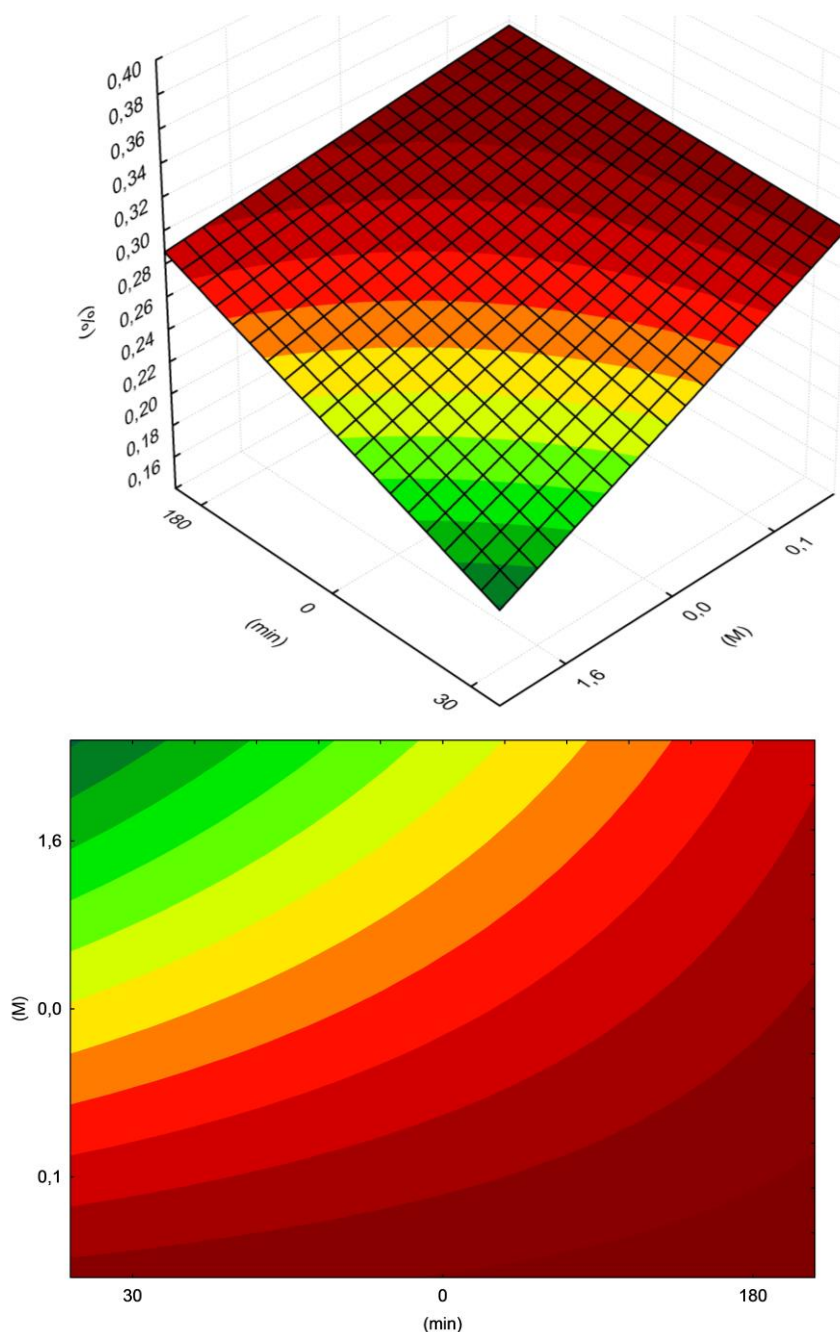
De acordo com a Figura 50, onde são observadas as interações das variáveis  $x_1x_3$ , o ponto ótimo do processo de desmineralização ocorreu em  $x_1$  (-1) e  $x_3$  (+1), ou seja, na menor granulometria (< 5 mm) e maior concentração molar do ácido clorídrico (1,6 M). Assim, como a avaliação anterior da interação  $x_1x_2$  já havia definido o menor tempo e aliando à informação obtida da interação  $x_1x_3$  de que a maior concentração é que resulta em uma melhora na

desmineralização, tira-se a conclusão preliminar de que as melhores condições se referem ao experimento 7. No entanto, deve-se atentar ao fato de que o objetivo deste trabalho é sintetizar quitosana com maior massa molecular, o que pode ser obtido a partir da utilização de casca de camarão com granulometrias maiores, isto é, em torno de 5 mm.



**Figura 50.** Superfície de resposta e curva de contorno para a interação significativa entre as variáveis  $x_1x_3$ , ou seja, granulometria ( $x_1$ ) e acidificação molar do ácido clorídrico ( $x_3$ ).

Os resultados obtidos pela Figura 51 corroboram com o que foram discutidas acima, sendo maior concentração e menor tempo as variáveis que resultam em maior desmineralização. A Figura abaixo mostra a interações das variáveis  $x_2x_3$ , sendo o ponto ótimo de desmineralização em  $x_2$  (-1) e  $x_3$  (+1), ou seja, no menor tempo de reação (30 min) e na maior concentração molar de ácido clorídrico (1,6M).



**Figura 51.** Superfície de resposta e curva de contorno para a interação significativa entre as variáveis  $x_2x_3$ , ou seja, tempo ( $x_2$ ) e acidificação molar do ácido clorídrico ( $x_3$ ).

Então, avaliando-se somente as superfícies de resposta e curvas de contorno, a melhor condição para desmineralização da casca *in natura*, ocorreu na menor granulometria (< 5 mm), menor tempo de reação (30 min) e maior concentração molar de ácido clorídrico (1,6 M), experimento 7.

No entanto, quando utilizada a menor granulometria até a obtenção do produto final há uma diminuição do peso molecular da quitosana. MOURA et al. (2015) onde as granulometrias de 1 e 5 mm foram avaliadas e concluiu-se que a maior partícula facilita a produção de quitosana com maior peso molecular para obtenção de filmes, no entanto, o aumento do peso molecular da quitosana esta diretamente ligado a diminuição do grau de desacetilação, efeito relatado por MOURA et al. (2011) onde foi realizado um estudo cinético e comprovado a inversibilidade do grau de desacetilação e peso molecular de quitosana obtida a partir de cascas de camarão.

Assim, utilizando-se a maior granulometria e avaliando as superfícies de resposta e as curvas de contorno observou-se que o melhor experimento foi mesmo o experimento 3 (desmineralização de 84 %), isto é, o experimento adequado aos objetivos propostos nesta pesquisa, com granulometria maior que 5 mm, concentração de ácido (1,6 M) e menor tempo (30 min).

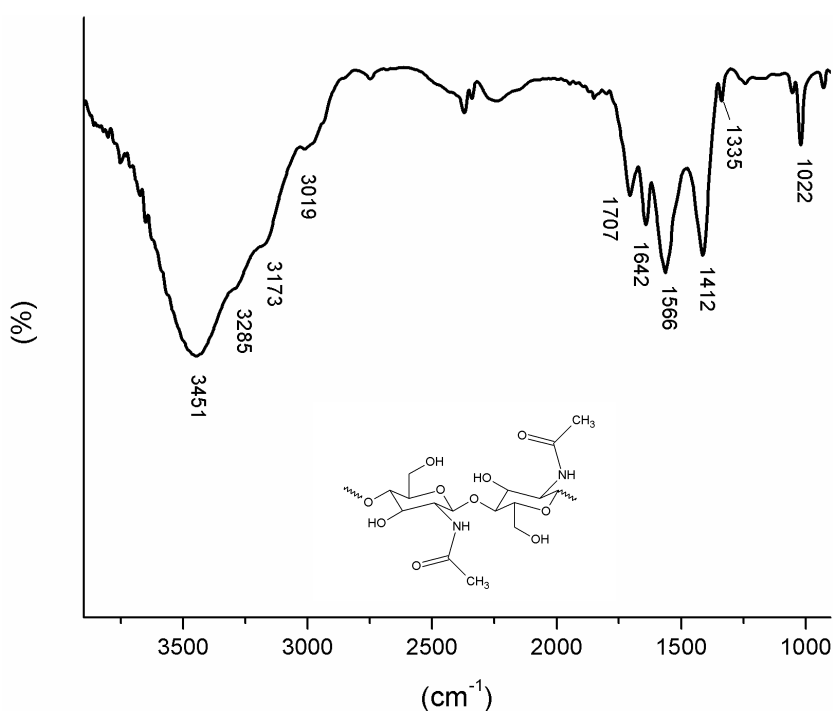
Assim, a melhor condição de desmineralização da casca *in natura*, para esta pesquisa, com o intuito de síntese de quitosana com massa molar adequada a formação de filmes, foi obtida através do experimento 3, sendo esta a condição de desmineralização adotada para a extração da quitina.

#### 5.3.1.1 Caracterização da Quitina Desmineralizada

A quitina desmineralizada, obtida no experimento 3 do primeiro planejamento, foi caracterizada em relação à umidade (25,3 %), cinzas (0,3 %) e proteínas totais (13,5 %) havendo uma diminuição de todos os parâmetros, se comparado com a casca *in natura* onde, a umidade, a cinza e proteínas totais apresentaram valores de 83,2 %, 1,76 % e 16,3 %, respectivamente.

A análise de FTIR, Figura 52, ilustra o espectro da melhor condição de desmineralização (experimento 3), onde são observadas as principais bandas

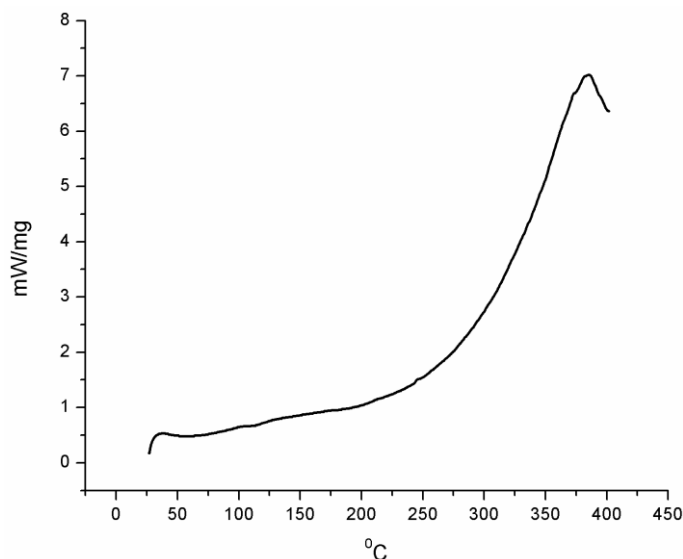
da quitina:  $3451\text{ cm}^{-1}$  [ $\nu\text{O-H}$ ] sobreposta [ $\nu\text{N-H}$ ], estiramento assimétrico e simétrico em  $3173\text{ cm}^{-1}$  e  $3019\text{ cm}^{-1}$  [ $\nu\text{C-H}$ ],  $1707\text{ cm}^{-1}$  [ $\nu\text{C=O}$ ] da amida I,  $1642\text{ cm}^{-1}$  [ $\nu\text{sN-H}$ ] da amida II,  $1566\text{ cm}^{-1}$  [ $\nu\text{C-N}$  acoplado a deformação no plano  $\delta\text{N-H}$ ] da amida III,  $1412\text{ cm}^{-1}$  [ $\delta\text{sC-H}$ ],  $1335\text{ cm}^{-1}$  [ $\nu\text{C-N}$ ]  $1022\text{ cm}^{-1}$  a  $890\text{ cm}^{-1}$  [ $\nu\text{C-O-C}$  e  $\nu\text{C-O}$ ] e da ligação glicosídica, estando estas de acordo com o descrito na literatura (SUGIMOTO et al., 1998; BRUGNEROTTO et al., 2001; LOPES e FASCIO, 2004; RINAUDO, 2006; ANTONINO 2007; SILVERSTEIN et al., 2007; SAGHEER et al., 2009; SJAIFULLAH e SANTOSO, 2016; SKOŁUCKA-SZARY et al., 2016).



**Figura 52.** Espectro de FTIR da quitina desmineralizada (Experimento 3) e, no detalhe, a estrutura da quitina. Transmitância (%) versus Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

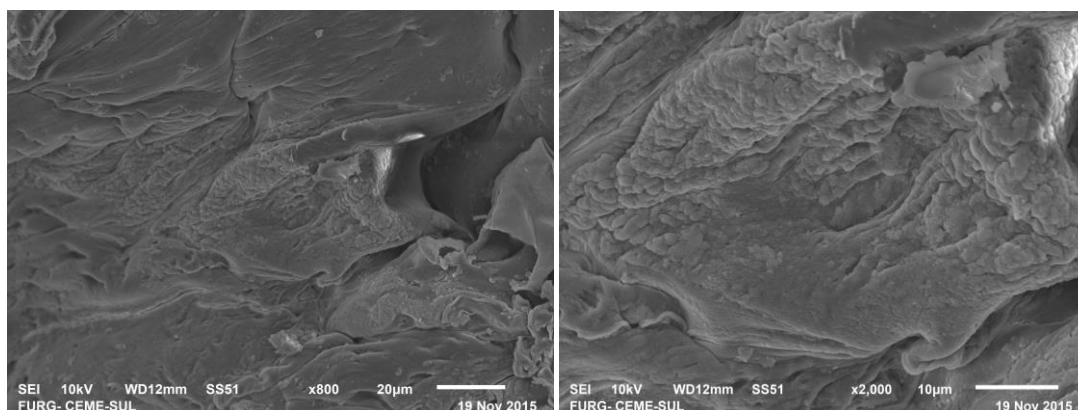
Na Figura 53, observa-se o termograma de DSC para a quitina desmineralizada. O efeito térmico endotérmico com valores de  $T_{\text{onset}}$ :  $50,22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $T_{\text{endset}}$ :  $79,60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $T_{\text{pico}}$ :  $70,87\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $\Delta H = 0,06\text{ J g}^{-1}$  correspondente a perda de água e outros compostos voláteis, semelhante ao pico apresentado pela casca *in natura* em  $T_{\text{pico}}$ :  $74,06\text{ }^{\circ}\text{C}$ , no entanto, a diminuição no valor da entalpia, antes com valor de  $\Delta H = 1,12\text{ J g}^{-1}$ , comprova a esperada perda de estabilidade térmica do material com a desmineralização. O pico exotérmico, antes apresentado na casca *in natura* ( $T_{\text{pico}}$ :  $211,74\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) não é observado na quitina

após a desmineralização. Somente é observada uma curva crescente, com o aumento da temperatura, evidenciando o processo de degradação térmica da quitina.



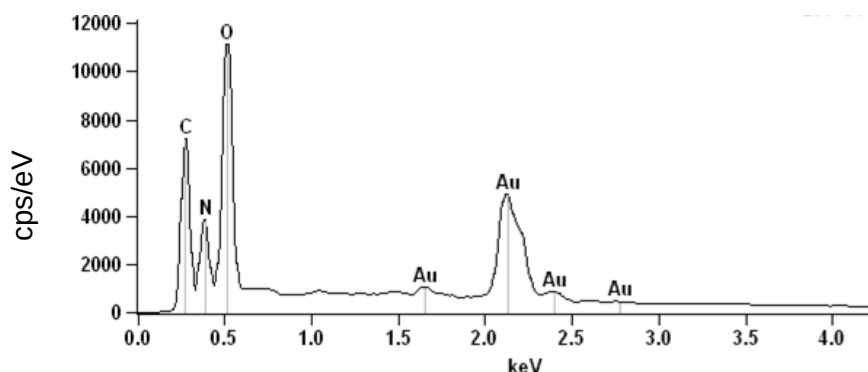
**Figura 53.** Termograma de DSC da quitina desmineralizada (Experimento 3). Fluxo de calor ( $\text{mW mg}^{-1}$ ) versus Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ).

Na análise por MEV, Figura 54, através das micrografias foram captadas com magnificação de 800 e 2000 X, observa-se que a quitina desmineralizada apresentou características estruturais com superfícies irregulares semelhantes às morfologias descritas por RAMAPRASAD et al., (2008) para quitina desmineralizada.



**Figura 54.** Micrografias obtidas em MEV para a quitina desmineralizada (Experimento 3).

Já pelo espectro de EDS, na Figura 55, observa-se que, para a quitina desmineralizada, houve eficiência da desmineralização, quando comparado ao espectro da casca *in natura*. Antes do processo de desmineralização, a casca apresentava cinco metais em sua composição, os quais não foram mais detectados na amostra desmineralizada. Na quitina desmineralizada foi detectado a presença de carbono, nitrogênio e oxigênio, em 0,282; 0,392; 0,523 keV, respectivamente, característico da parte orgânica da quitina.



**Figura 55.** Espectro de EDS para a quitina desmineralizada (Experimento 3). Intensidade (cps eV<sup>-1</sup>) versus energia (keV).

A caracterização da quitina desmineralizada é justificada pelo fato de esta ser a primeira etapa de extração da quitina para síntese da quitosana a partir de cascas de camarão, servindo, assim, de comparação às etapas posteriores de extração de quitina e síntese de quitosana.

### 5.3.2 Desproteínização da Quitina Desmineralizada

Alguns dos processos de desproteínização da quitina desmineralizada relatados na literatura são baseados em tratamentos utilizando soluções com variações na concentração de hidróxido de sódio (NaOH) em conjunto com temperaturas superiores a 50 °C.

PERCOT et al., (2003) realizaram o procedimento de desproteínização da quitina desmineralizada com hidróxido de sódio 1 M, a 70 °C, por 24 h, alcançando uma desproteínização de 95 %.

TOLAIMATE et al., (2003) avaliaram a desproteínização da quitina desmineralizada de diferentes crustáceos utilizando hidróxido de sódio (0,3 M),



a 80 °C, por 1 h, alcançando 100 % de desproteínização para quitina proveniente de cascas de camarão. Através da literatura, observa-se que a concentração de solução de NaOH mais adotada é próxima a 1 M.

EINBU et al., (2004) realizaram a desproteínização da quitina desmineralizada com uma solução de hidróxido de sódio 1 M, a 95 °C, durante 5 h, sob agitação constante, obtendo 80 % de desproteínização.

Já SAGHEER et al., (2009), utilizaram a mesma concentração de hidróxido de sódio 1 M, a 70 °C, durante 24 h, para desproteínização de quitina desmineralizada proveniente de cascas de camarão, alcançando uma desproteínização de 99 %.

Assim, de acordo com a literatura, escolheu-se avaliar as seguintes condições no processo de desproteínização deste trabalho:  $x_4$  (0,75 M; 1,0 M e 1,25 M),  $x_5$  (25 °C, 45 °C e 70 °C) e  $x_6$  (30 min, 75 min e 120 min).

A desproteínização foi realizada na quitina desmineralizada (experimento 3), sendo este processo a segunda e última etapa de extração da quitina, obtenção assim, a quitina desmineralizada e desproteínizada.

O procedimento deste estudo foi desenvolvido a partir de planejamento fatorial completo ( $2^3 + 4pc - DCC$ ) onde as variáveis independentes, concentração molar do hidróxido de sódio ( $x_4$ ), temperatura ( $x_5$ ) e tempo de reação ( $x_6$ ), foram estudadas em relação ao efeito simultâneo no processo de desproteínização da quitina desmineralizada.

A literatura relata um planejamento fatorial, feito por BAJAJ et al., (2011) para desproteínização de quitina desmineralizada proveniente da casca de camarão.

Neste planejamento, os autores avaliaram diferentes proporções de NaOH 2 M (1:4; 1:6; 1:8 e 1:10 p/v), em rotação constante de 100 rpm, 30 °C, por 6 h e obtiveram o melhor resultado de desproteínização na proporção de 1:4 (p/v) alcançando 83 % de desproteínização.

A Tabela 9 apresenta a matriz do segundo planejamento ( $2^3 + 4 pc$ ), considerando a desproteínização ( $y_2$ ) como resposta, ou seja, a variável dependente. De acordo com o resultado dos experimentos 1-8, onde foi avaliada a concentração molar de solução de NaOH ( $x_4$ ), temperatura ( $x_5$ ) e tempo de



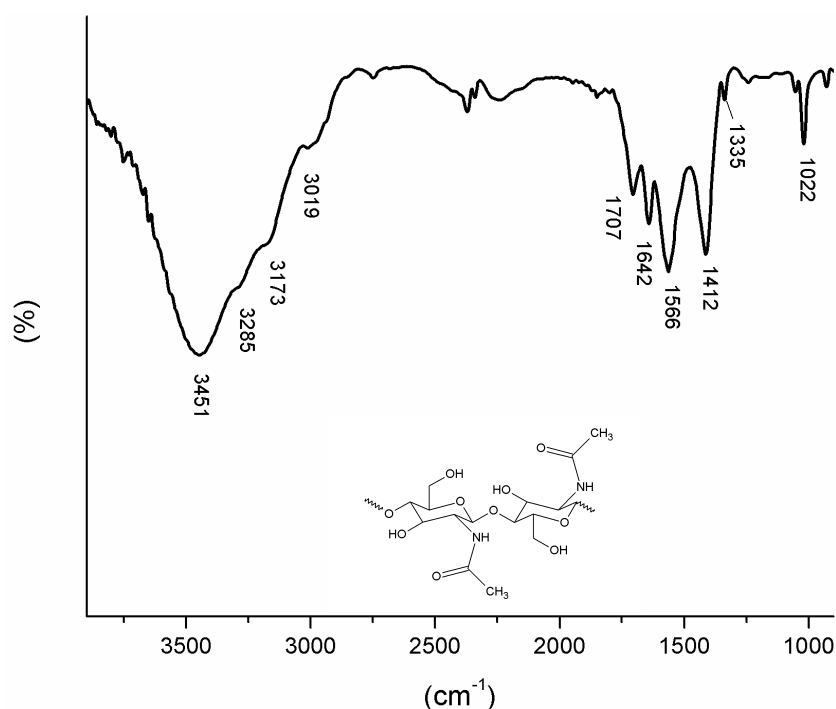
reação ( $x_6$ ), observou-se que foi alcançada uma faixa de 95 a 98 % de desproteinização em relação à casca desmineralizada.

**Tabela 9.** Valores decodificados e respostas  $y_2$  (proteínas totais)

| Experimentos | $x_4$ (M) | $x_5$ (°C) | $x_6$ (min) | $y_2$ (%) | *P (%) | *D (%) |
|--------------|-----------|------------|-------------|-----------|--------|--------|
| 1            | 1 (1,25)  | 1 (70)     | 1 (120)     | 0,45      | 3,31   | 96,69  |
| 2            | 1 (1,25)  | 1 (70)     | -1 (30)     | 0,35      | 2,56   | 97,44  |
| 3            | 1 (1,25)  | -1 (25)    | 1 (120)     | 0,53      | 3,93   | 96,07  |
| 4            | 1 (1,25)  | -1 (25)    | -1 (30)     | 0,52      | 3,88   | 96,12  |
| 5            | -1 (0,75) | 1 (70)     | 1 (120)     | 0,41      | 3,07   | 96,93  |
| 6            | -1 (0,75) | 1 (70)     | -1 (30)     | 0,23      | 1,72   | 98,28  |
| 7            | -1 (0,75) | -1 (25)    | 1 (120)     | 0,46      | 3,40   | 96,60  |
| 8            | -1 (0,75) | -1 (25)    | -1 (30)     | 0,49      | 3,64   | 96,36  |
| 9            | 0 (1,0)   | 0 (45)     | 0 (75)      | 0,56      | 4,13   | 95,87  |
| 10           | 0 (1,0)   | 0 (45)     | 0 (75)      | 0,53      | 3,96   | 96,04  |
| 11           | 0 (1,0)   | 0 (45)     | 0 (75)      | 0,55      | 4,08   | 95,92  |
| 12           | 0 (1,0)   | 0 (45)     | 0 (75)      | 0,53      | 3,96   | 96,04  |

\*P.: resultados de proteínas totais calculados a partir da relação de  $y_2$  com 13,5% de proteínas totais na quitina desmineralizada, considerados como 100%. \*D. desproteinização alcançada.

Pela Tabela 9, observa-se que o melhor processo de desproteinização, a partir da resposta  $y_2$ , foi o experimento 6, onde foi utilizado uma concentração básica de NaOH 0,75 M, a uma temperatura de 70 °C durante 120 min. A Figura 56 ilustra o espectro da quitina desmineralizada pelo primeiro planejamento.

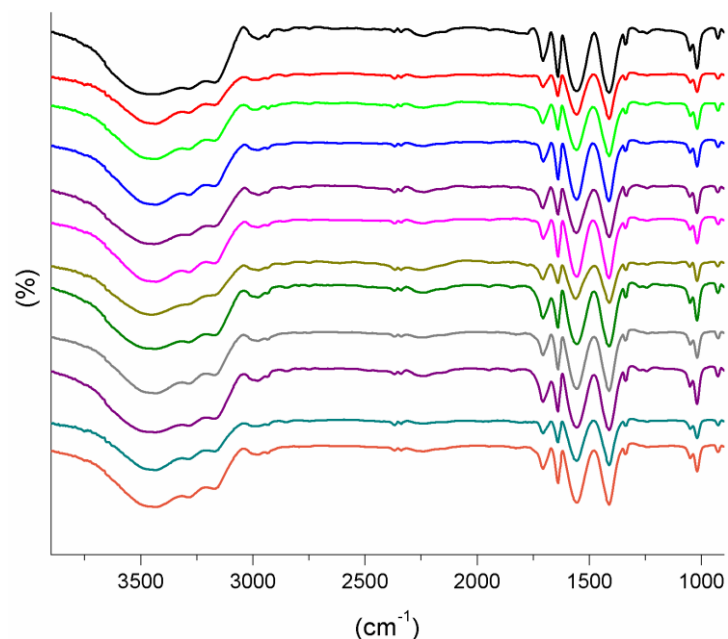


**Figura 56.** Espectro de FTIR da quitina desmineralizada (Experimento 3) e, no detalhe, a estrutura da quitina. Transmitância (%) versus Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Assim, a partir do planejamento dos experimentos 1-12 e de sua execução, foi necessário avaliar se as amostras foram degradadas ou não, com as condições experimentais adotadas. Para isso utilizou-se a análise de espectroscopia na região do infravermelho. A Figura 57 ilustra os espectros de FTIR, para os experimentos de desproteínização da quitina desmineralizada, onde os experimentos estão representados por diferentes cores e ordenados de cima para baixo da seguinte maneira: Experimento 1 (preto), 2 (vermelho), 3 (verde claro), 4 (azul), 5 (violeta), 6 (rosa), 7 (marrom), 8 (verde escuro), 9 (cinza), 10 (lilás), 11 (azul petróleo) e 12 (laranja). Convém destacar que os experimentos 9 a 12, a princípio devem evidenciar os mesmos resultados, uma vez que as condições são idênticas, isto é, uma quadruplicata do ponto central deste planejamento (BRUGNEROTTO et al., 2001; ANTONINO, 2007; SILVERSTEIN et al., 2007; SAGHEER et al., 2009; JIN et al., 2013; ABDEL-RAHMAN et al., 2015; SJAIFULLAH e SANTOSO, 2016; WU et al., 2016).

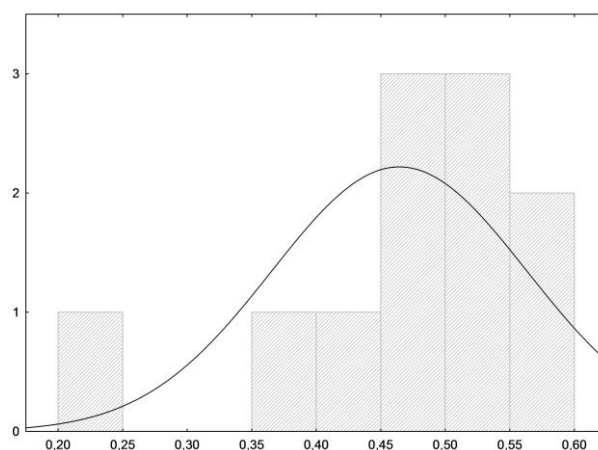
Em todos os 12 experimentos do segundo planejamento observam-se as bandas caracterísiticas da quitina em comparação aos 8 experimentos anteriores do primeiro planejamento mostrando eficiência nos procedimentos de purificação (desmineralização e desproteínização) da quitina, sendo que essa melhora nos sinais do espectro de IV, após a ultima etapa de purificação, é referenciada pela literatura (MOURA et al., 2011; JIN et al., 2013; ABDEL-RAHMAN et al., 2015; MOURA et al., 2015; SJAIFULLAH e SANTOSO 2016; WU et al., 2016).

Os espectros de FTIR evidenciaram que em todos os experimentos a extração da quitina foi eficiente. Então, adotou-se o Experimento 6 (Tabela 9) como o melhor, uma vez que apresentou o maior grau de deproteínização, isto é, a menor porcentagem de nitrogênio ( $y_2$ ), que foi utilizada como resposta para os testes estatísticos.



**Figura 57.** Espectros FTIR dos doze diferentes experimentos realizados para desproteínização da quitina desmineralizada. Transmitância (%) *versus* Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Foram realizados testes estatísticos com a avaliação da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk efetuado no programa *Statistica 7.0* (STATSOFT, EUA) ilustrado na Figura 58, onde os resultados das variáveis independentes ( $x_4$ ,  $x_5$  e  $x_6$ ) seguem uma distribuição normal assimétrica com valor de  $p = 0,06$  (neste caso  $p < 0,10$ ) mostrando que houve diferença significativa entre os resultados dos experimentos, ou seja, os resultados  $y_2$  se situam distante da média, assim, não é possível prever quais fatores são significativos e quais não são significativos (RODRIGUES e LEMMA 2009; PIANA et al., 2009).



**Figura 58.** Histograma de normalidade para porcentagem de nitrogênio ( $y_2$ ). Número de observações *versus*  $y_2$ .

Então para avaliar quais variáveis são significativas e quais não são significativas é realizado o teste de Pareto (Tabela 10).

Na Tabela 10, são apresentados os efeitos significativos e não significativos para um intervalo de confiança de 90 %, observa-se que os fatores concentração básica ( $x_4$ ), temperatura ( $x_5$ ), tempo ( $x_6$ ) e a interação  $x_5x_6$  foram significativas ( $p < 0,10$ ) enquanto que as interações  $x_4x_5$  e  $x_4x_6$  não foram significativas ( $p > 0,10$ ), o que pode ser confirmado pelo diagrama de Pareto efetuado no programa *Statistica 7.0* (STATSOFT, EUA), Figura 59.

**Tabela 10.** Efeitos e coeficientes de regressão  $y_2$ .

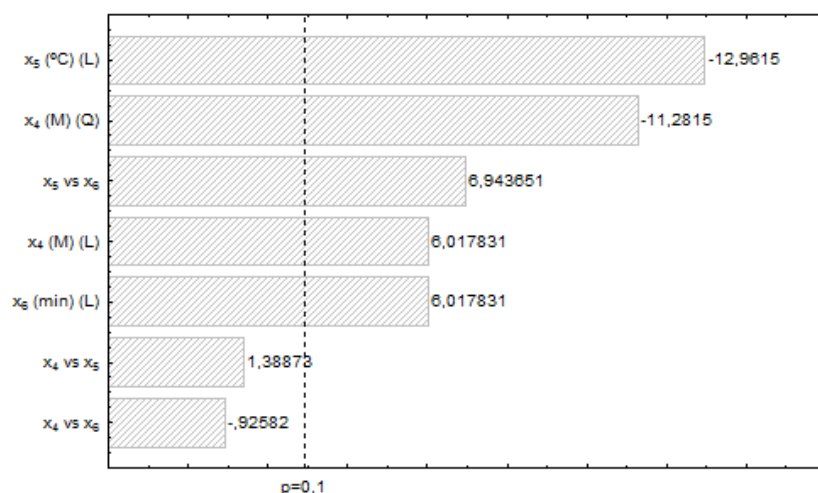
| Fatores   | Efeitos  | Erro puro | t        | p        | Coeficientes de regressão |
|-----------|----------|-----------|----------|----------|---------------------------|
| Média     | 0,54666  | 0,015870  | 34,44689 | 0,000054 | 0,546667                  |
| $x_4$ (L) | 0,06500  | 0,019437  | 3,34422  | 0,044248 | 0,032500                  |
| $x_4$ (Q) | -0,23333 | 0,037218  | -6,26936 | 0,008192 | -0,116667                 |
| $x_5$ (L) | -0,14000 | 0,019437  | -7,20294 | 0,005516 | -0,070000                 |
| $x_6$ (L) | 0,06500  | 0,019437  | 3,34422  | 0,044248 | 0,032500                  |
| $x_4x_5$  | 0,01500  | 0,019437  | 0,77174  | 0,496484 | 0,007500                  |
| $x_4x_6$  | -0,01000 | 0,019437  | -0,51450 | 0,642409 | -0,005000                 |
| $x_5x_6$  | 0,075000 | 0,019437  | 3,85872  | 0,030759 | 0,037500                  |

$x_4$ .: concentração básica (M);  $x_5$ .: temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ );  $x_6$ .: tempo (min). (L): linear; (Q): quadrático

Para a análise dos coeficientes que podem predizer o modelo matemático é preciso realizar o ajuste do modelo, levando em consideração apenas os valores significativos, com isso, os valores não significativos, ou seja, as interações  $x_4x_5$  e  $x_4x_6$  foram ignoradas ( $p > 0,10$ ).

Pelo Diagrama de Pareto, Figura 59, observa-se que a variável temperatura ( $x_5$ ) foi a mais significativa seguida pela concentração molar básica ( $x_4$ ) e tempo reacional ( $x_6$ ). As variáveis  $x_5$  (L) e  $x_4$  (Q) favoreceram o procedimento de desproteínização.

No entanto, a interação  $x_5x_6$  e as variáveis  $x_6$  (L),  $x_4$  (L) desfavoreceram o processo de desproteínização. As interações das variáveis  $x_4x_5$  e  $x_4x_6$  não foram significativas.



**Figura 59.** Diagrama de Pareto para o processo de desproteínização ( $y_2$ ). Fatores versus Efeitos.

Verificados a normalidade e ajustados os efeitos, ou seja, ignorando as interações não significativas, é possível, pelos coeficientes de regressão gerar o modelo que prediz a resposta da variável dependente ( $y_2$ ) em função das variáveis independentes.

$$y_2 = 0,547 + 0,0325x_4 - 0,117x_4^2 - 0,07x_5 + 0,0325x_6 + 0,0375x_5x_6$$

Equação 8

onde:  $y_2$  é a resposta para o processo de desproteínização (proteínas totais);  $x_4$  a concentração molar do hidróxido de sódio (M);  $x_5$  a temperatura (°C) e  $x_6$  o tempo (min).

A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para verificação da significância dos resultados a partir do teste F utilizando o programa *Statistica 7.0* (STATSOFT, EUA) e as equações do teste F (ANEXO A) (RODRIGUES e LEMMA 2009).

De acordo com a Tabela 11, pode-se dizer que o modelo além de significativo, também é preditivo, já que o F calculado foi maior que o F crítico (tabelado) e o  $R^2$  (0,971) próximo de 1, logo, podemos traçar a superfície de resposta e a curva de contorno para a única interação significativa e preditiva  $x_5x_6$  (concentração molar básica e tempo). O baixo erro puro sugere uma ótima precisão da análise (RODRIGUES e LEMMA, 2009).

**Tabela 11.** Análise de variância (ANOVA).

| Fonte de variação | Soma quadrática | Graus de liberdade | Média quadrática | F <sub>cal</sub> | F <sub>cal</sub> /F <sub>tab</sub> | R <sup>2</sup> |
|-------------------|-----------------|--------------------|------------------|------------------|------------------------------------|----------------|
| Regressão         | 0,99917         | 8                  | 0,124897         | 214,1            | 64,10                              | 0,971          |
| Resíduo           | 0,00292         | 5                  | 0,000583         |                  |                                    |                |
| Falta de ajuste   | 0,00245         | 3                  |                  |                  |                                    |                |
| Erro puro         | 0,00047         | 2                  |                  |                  |                                    |                |
| Total             | 0,99964         | 10                 |                  |                  |                                    |                |

F<sub>cal</sub>: F calculado; F<sub>tab</sub>: F tabelado<sub>8;5;0,10</sub> = 3,34; R<sup>2</sup>: coeficiente de determinação.

A Tabela 12 mostra os resultados experimentais e observa-se que esses se assemelham aos resultados preditos, calculados a partir do modelo matemático.

Apesar da existência de desvios (ANEXO A) pode-se considerar que os resultados foram satisfatórios, pois, os desvios ficaram abaixo de 20 % (RODRIGUES e LEMMA, 2009).

**Tabela 12.** Resultados experimentais e preditos para o processo de desproteínização.

| Experimento | y <sub>2</sub> Experimental | y <sub>2</sub> ' Predito | Desvio (%) |
|-------------|-----------------------------|--------------------------|------------|
| 1           | 0,4532                      | 0,4648                   | -4,128     |
| 2           | 0,3511                      | 0,3246                   | 6,201      |
| 3           | 0,5308                      | 0,5270                   | 0,752      |
| 4           | 0,5213                      | 0,5386                   | -2,861     |
| 5           | 0,4111                      | 0,4028                   | 2,669      |
| 6           | 0,2323                      | 0,2626                   | -13,09     |
| 7           | 0,4607                      | 0,4650                   | -1,207     |
| 8           | 0,4912                      | 0,4766                   | 2,925      |
| 9           | 0,5619                      | 0,5486                   | 1,549      |
| 10          | 0,5341                      | 0,5486                   | -2,576     |
| 11          | 0,5551                      | 0,5486                   | 0,450      |
| 12          | 0,5331                      | 0,5486                   | -2,640     |

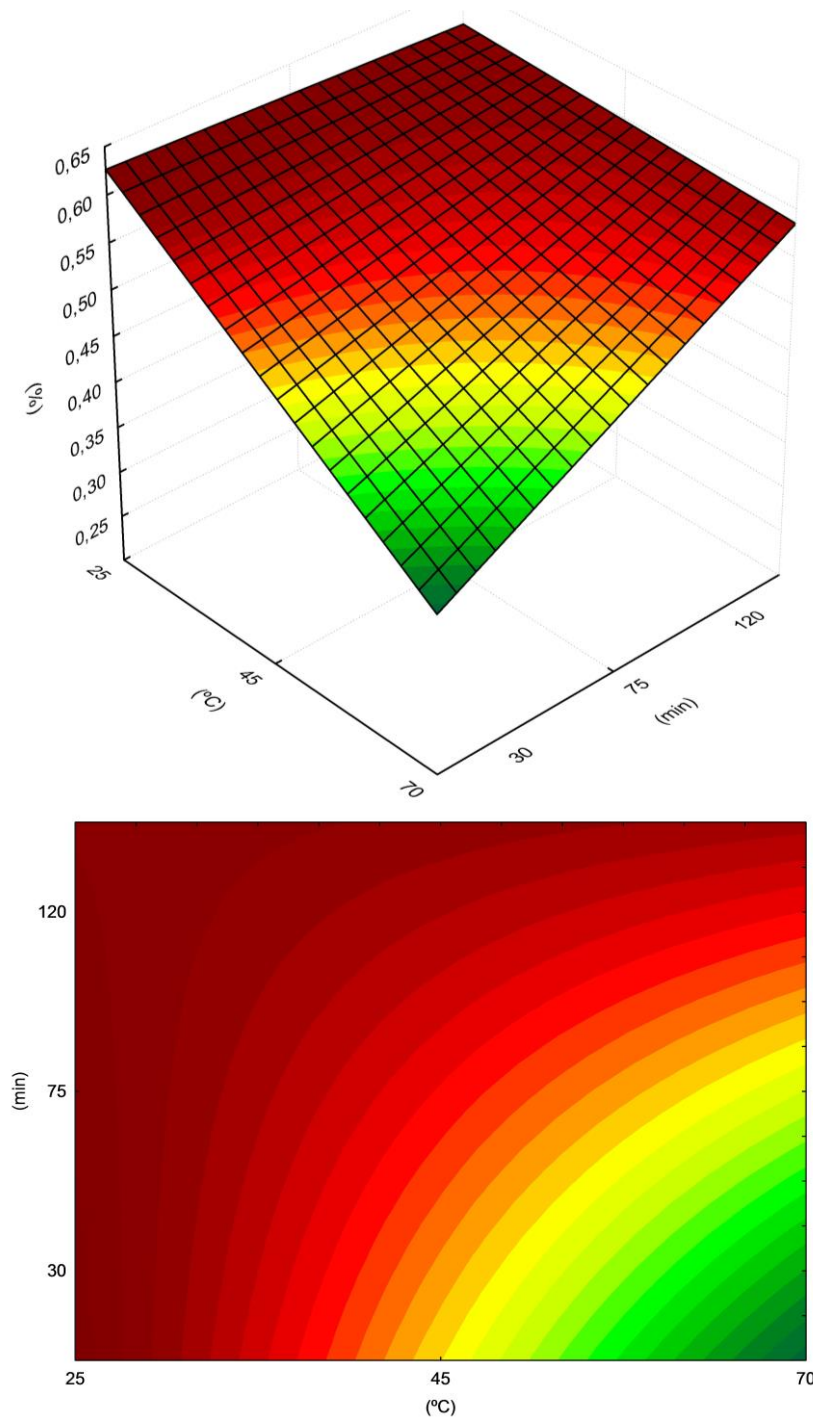
y<sub>2</sub>: resposta para o processo de desproteínização (proteínas totais); y<sub>2</sub>': resposta predita para o processo de desproteínização (proteínas totais) predita.

A Figura 60 ilustra a superfície de resposta e curva de contorno para a única interação significativa (x<sub>5</sub>x<sub>6</sub>). A resposta esperada para a variável dependente (y<sub>2</sub>) é a de coloração verde escura, ou seja, quanto menor o valor, melhor o procedimento de desproteínização empregado.

Assim, na interação das variáveis x<sub>5</sub>x<sub>6</sub>, o ponto ótimo do processo de desproteínização ocorreu em x<sub>5</sub> (1) e x<sub>6</sub> (-1), ou seja, na maior temperatura (70 °C) e menor tempo (30 min).

Como não foi possível pelos testes estatísticos confirmar o ponto ótimo para a concentração básica, devido as suas interações não serem significativas, foi considerado como ponto ótimo o pertencente ao experimento 6, ou seja, a menor concentração molar básica.

Assim, de acordo com os resultados dos testes estatísticos o ponto ótimo de desproteinização ocorreu com uma concentração básica de hidróxido de sódio de 0,75 M, uma temperatura de 70 °C e 30 min de tempo de reação, (experimento 6), alcançando uma desproteinização de 98 % em relação a casca desmineralizada.



**Figura 60.** Superfície de resposta e curva de contorno para a interação significativa entre as variáveis  $x_5x_6$ , ou seja, temperatura ( $x_5$ ) e tempo ( $x_6$ ).

### 5.3.2.1 Caracterização da Quitina Desmineralizada e Desproteinizada

A quitina desmineralizada e desproteinizada, obtida do experimento 6, do segundo planejamento (desproteínização), foi caracterizada em relação à umidade (23,8 %), cinzas (0,1 %) e proteínas totais (0,2 %) havendo uma diminuição de todos os parâmetros (umidade, cinzas, porcentagem de proteína), se comparado com a casca *in natura* (83,2 %; 1,76 % e 16,3 %) e a quitina somente desmineralizada (25,3 %; 0,3 % e 13,5 %), mostrando que os procedimentos de extração da quitina da casca *in natura* do camarão, foram alcançadas com êxito, bem como que o processo de desproteínização foi eficiente.

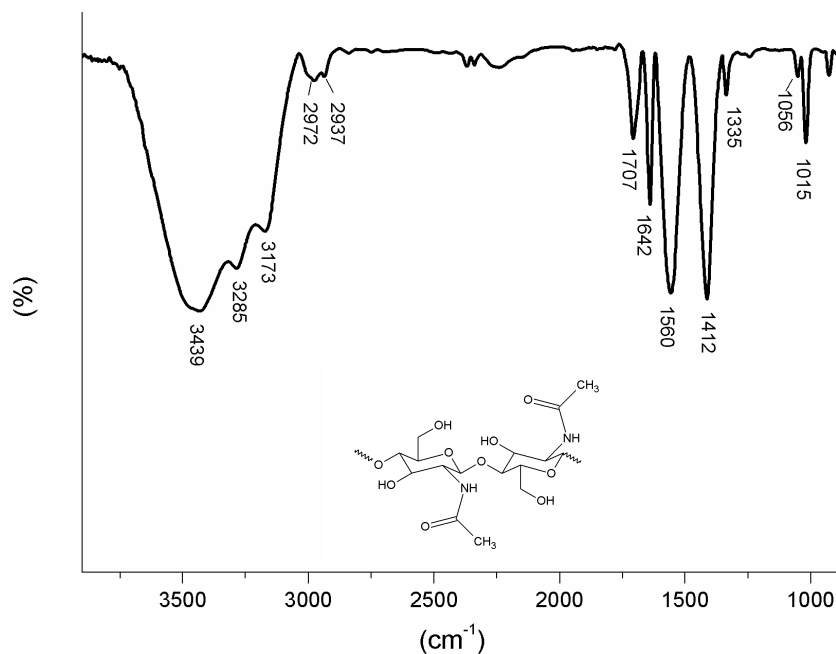
A análise de FTIR, Figura 61, mostra as principais bandas da quitina desmineralizada e desproteinizada. As bandas observadas, já haviam sido identificadas na quitina da casca *in natura* e na quitina desmineralizada.

As principais bandas observadas foram:  $3439\text{ cm}^{-1}$  [ $\nu\text{O-H}$ ] sobreposta [ $\nu\text{N-H}$ ], estiramentos assimétrico e simétrico em  $2972\text{ cm}^{-1}$  e  $2937\text{ cm}^{-1}$  [ $\nu\text{C-H}$ ],  $1707\text{ cm}^{-1}$  [ $\nu\text{C=O}$ ] da amida I,  $1642\text{ cm}^{-1}$  [ $\nu\text{sN-H}$ ] da amida II,  $1560\text{ cm}^{-1}$  [ $\nu\text{C-N}$  acoplado a deformação no plano  $\delta\text{N-H}$ ] da amida III,  $1412\text{ cm}^{-1}$  [ $\delta\text{sC-H}$ ],  $1335\text{ cm}^{-1}$  [ $\nu\text{C-N}$ ],  $1056\text{ cm}^{-1}$  a  $1015\text{ cm}^{-1}$  [ $\nu\text{C-O-C}$  e  $\nu\text{C-O}$ ] e da ligação glicosídica estando de acordo com o descrito na literatura (SUGIMOTO et al., 1998; BRUGNEROTTO et al., 2001; LOPES e FASCIO, 2004; RINAUDO, 2006; ANTONINO 2007; AZEVEDO et al., 2007; SILVERSTEIN et al., 2007; SAGHEER et al., 2009; SJAIFULLAH e SANTOSO, 2016; SKOŁUCKA-SZARY et al., 2016). Assim o espectro de FTIR evidencia sucesso na extração de quitina.

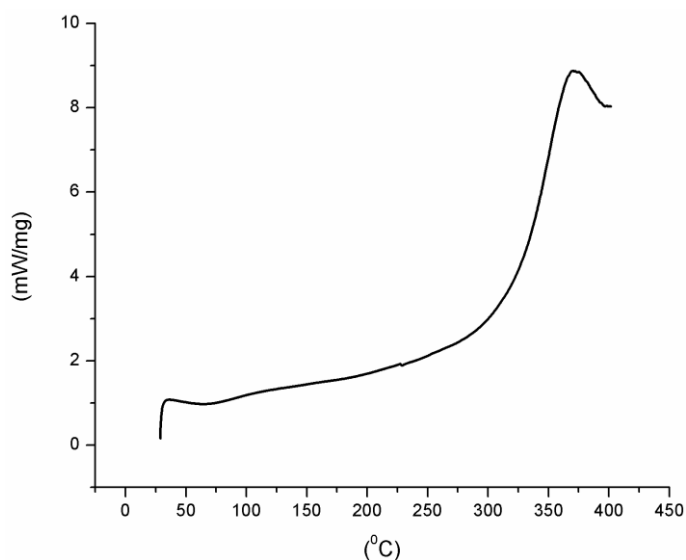
Na Figura 62, observa-se o termograma de DSC para a quitina desmineralizada e desproteinizada. Onde um pico endotérmico com valores de  $T_{\text{onset}}$ :  $58,49\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $T_{\text{endset}}$ :  $84,85\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $T_{\text{pico}}$ :  $64,95\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $\Delta H = 0,80\text{ J g}^{-1}$  é observado e correspondente a perda de água e outros compostos voláteis. O pico exotérmico, antes apresentado para a casca *in natura* ( $T_{\text{pico}}$ :  $211,74\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) não é observado na quitina após a purificação (desmineralização e desproteínização). Observa-se nesta amostra o início da degradação térmica das cadeias orgânicas da quitina a partir de  $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sendo esta característica já observada anteriormente para a quitina desmineralizada, estando de acordo com o descrito na literatura



(ANTONINO 2007; FARINHA et al., 2015; MOURA et al., 2015; KUMARI et al., 2015).



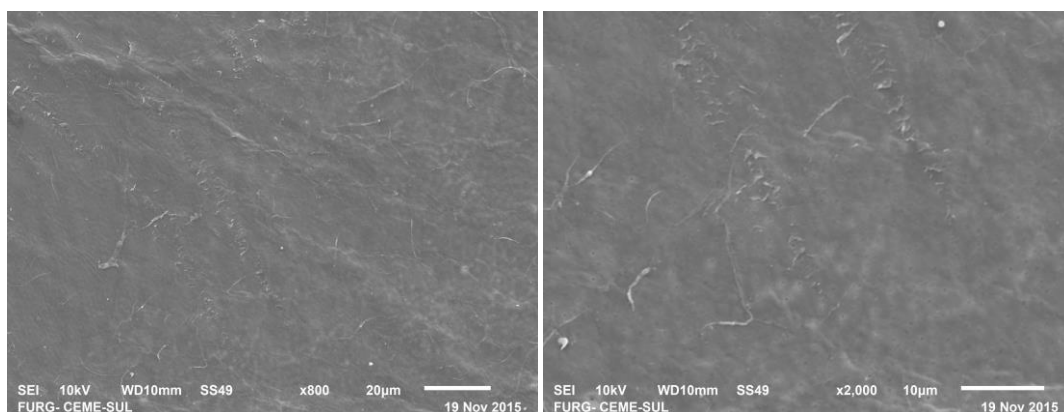
**Figura 61.** Espectro de FTIR da quitina desmineralizada e desproteínizada (Experimento 6) e, no detalhe, a estrutura da quitina. Transmitância (%) *versus* Número de onda (cm<sup>-1</sup>).



**Figura 62.** Termograma de DSC da quitina desmineralizada e desproteínizada (Experimento 6). Fluxo de calor (mW mg<sup>-1</sup>) *versus* Temperatura (°C).

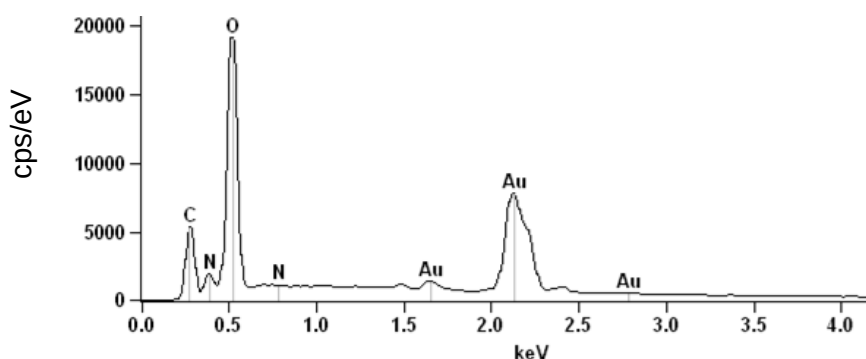
Através de MEV, Figura 63, foram captadas micrografias com magnificação de 800 e 2000 X, respectivamente. Observa-se que a quitina

desmineralizada e desproteínizada apresentou características estruturais diferentes da quitina desmineralizada, uma vez que o processo de desproteínização modificou a superfície antes irregular, em uma superfície de característica mais lisa. Morfologia semelhante foi descrita por SAGHEER et al., (2009) para quitina desmineralizada e desproteínizada pelo processo de desmineralização e desproteínização.



**Figura 63.** Micrografias obtidas em MEV para quitina desmineralizada e desproteínizada (Experimento 6).

A análise de EDS, Figura 64, ilustra o espectro de EDS, avaliado para a quitina desmineralizada e desproteínizada onde se pode observar, como o esperado, a presença de carbono, nitrogênio e oxigênio em 0,282; 0,392; 0,523 keV, respectivamente.



**Figura 64.** Espectro de EDS para a quitina desmineralizada e desproteínizada (Experimento 6). Intensidade (cps eV<sup>-1</sup>) versus energia (keV).

A partir da obtenção e caracterização da quitina desmineralizada e desproteínizada, o próximo passo foi proceder com o processo de desacetilação para síntese da quitosana.

### 5.3.3 Desacetilação da Quitina Desmineralizada e Desproteínizada

Após a extração da quitina através dos processos de desmineralização de acordo com o Experimento 3 e, desproteínização de acordo com o Experimento 6, foi realizado a desacetilação da quitina desmineralizada e desproteínizada para síntese de quitosana.

Os processos de desacetilação citados na literatura, na sua maioria, utilizaram soluções com altas concentrações de hidróxido de sódio. MOURA et al., (2006) estudaram o processo de desacetilação da quitina obtida da casca de camarão e cascas de siri, utilizando solução aquosa de NaOH 42,3 %, sob agitação constante, em agitador magnético, a uma temperatura de 130 °C, durante 2 h. Obtendo ao final do processo um grau de desacetilação de 86 % para a quitosana obtida da casca do camarão e 87 % para a quitosana obtida da casca do siri.

Em 2011, MOURA et al., (2011) estudaram o processo de desacetilação da quitina a partir de cascas de camarão, utilizando uma solução de NaOH de igual concentração (45 °Bé; 42,3 %; 10,6 M), mesma temperatura (130 °C), no entanto o tempo de reação aumentou para 4 h, obtendo um grau de desacetilação de 93 %, melhor que o processo descrito em 2006.

BAJAJ et al., (2011) avaliaram o processo de desacetilação da quitina, obtida a partir de cascas de camarão, utilizando solução aquosa de NaOH 50 %, durante 1 h, a 105 °C, sob atmosfera de nitrogênio e 2 bar de pressão, chegando a um grau de desacetilação de 90 %. ABDEL-RAHMAN et al., (2015) estudaram o processo de desacetilação da quitina, obtida a partir de cascas de camarão, utilizando, também solução concentrada de NaOH 50 %, por um período maior (3,5 h), e temperatura um pouco menor (90 °C), obtendo um grau de desacetilação, também, de 90 %.

Já KUMARI et al., (2015) utilizaram escamas de peixes e avaliaram o processo de desacetilação desta quitina utilizando uma solução aquosa de NaOH 50 %, durante 5 h, sob refluxo, ao final do processo obtiveram uma quitosana com grau de desacetilação de 61 %.

MOURA et al., (2015), além da concentração de NaOH (40 – 45 %) e tempo de reação (90 – 240 min), avaliaram, também, a granulometria (1 – 5 mm)

e a proporção quitina:solução de NaOH (1:20 – 1:60 p/v). Esta avaliação foi feita por meio de planejamento fatorial completo sem repetições. Ao final do processo obtiveram amostras de quitosana com uma faixa de desacetilação de 64 a 96 %. Sendo o melhor procedimento o de maior granulometria (5 mm), razão quitina:solução de NaOH 40 % (1:20 p/v) e tempo reação de 90 min a temperatura de 60 °C.

Então, observou-se que a literatura relata o uso de soluções concentradas de NaOH variando de 40 a 50 % para a desacetilação de quitina obtida de casca de camarão, escama de peixe e casca de siri. Já o tempo de reação variou de 1 a 5 h e a temperatura variou de 60 a 130 °C. Assim, a partir destes dados optou-se por usar no planejamento fatorial deste trabalho as seguintes variações: tempo de reação (120 min, 240 min e 360 min), temperatura (80 °C, 100 °C e 120 °C) e velocidade de agitação (200 rpm, 850 rpm e 1500 rpm). Manteve-se fixa a concentração de solução de NaOH em 45 °Bé (42,3 %; 10,6 M), uma vez que esta concentração vem sendo relatada com frequência na literatura (TOLAIMATE et al., 2003; WESKA et al., 2007; MOURA et al., 2011; MOURA et al., 2015).

O procedimento de desacetilação, neste trabalho, foi desenvolvido a partir de planejamento fatorial completo ( $2^3 + 4$  pc – DCC) onde as variáveis independentes, agitação magnética ( $x_7$ ), tempo reacional ( $x_8$ ) e temperatura ( $x_9$ ), foram estudadas em relação ao efeito simultâneo no processo de desacetilação da quitina para síntese de quitosana.

A Tabela 13 apresenta a matriz do terceiro planejamento ( $2^3 + 4$  pc), considerando o grau de desacetilação ( $y_3$ ) como resposta, ou seja, a variável dependente. As condições estudadas foram:  $x_7$  (200 rpm, 850 rpm e 1500 rpm),  $x_8$  (120 min, 240 min e 360 min) e  $x_9$  (80 °C, 100 °C e 120 °C).

Na Tabela 13 observa-se que o melhor processo de desacetilação, a partir da resposta  $y_3$ , foi o Experimento 1, onde foi utilizado uma agitação magnética de 1500 rpm, durante 360 min a 120 °C. Não foi realizada a determinação do grau de desacetilação da casca *in natura*, da quitina desmineralizada e da quitina desmineralizada e desproteinizada, uma vez que estas amostras apresentam o grupo acetil em grande quantidade, portanto alto grau de acetilação, o que dificulta sua solubilização para o procedimento de titulação.

**Tabela 13.** Valores decodificados e respostas de porcentagem de desacetilação.

| Experimentos | x <sub>7</sub> (rpm) | x <sub>8</sub> (min) | x <sub>9</sub> (°C) | y <sub>3</sub> (%) |
|--------------|----------------------|----------------------|---------------------|--------------------|
| 1            | 1 (1500)             | 1 (360)              | 1 (120)             | 66,1               |
| 2            | 1 (1500)             | 1 (360)              | -1 (80)             | 46,2               |
| 3            | 1 (1500)             | -1 (120)             | 1 (120)             | 18,9               |
| 4            | 1 (1500)             | -1 (120)             | -1 (80)             | 6,3                |
| 5            | -1 (200)             | 1 (360)              | 1 (120)             | 47,0               |
| 6            | -1 (200)             | 1 (360)              | -1 (80)             | 33,2               |
| 7            | -1 (200)             | -1(120)              | 1 (120)             | 10,8               |
| 8            | -1 (200)             | -1 (120)             | -1 (80)             | 8,1                |
| 9            | 0 (850)              | 0 (240)              | 0 (100)             | 35,1               |
| 10           | 0 (850)              | 0 (240)              | 0 (100)             | 36,0               |
| 11           | 0 (850)              | 0 (240)              | 0 (100)             | 29,8               |
| 12           | 0 (850)              | 0 (240)              | 0 (100)             | 33,2               |

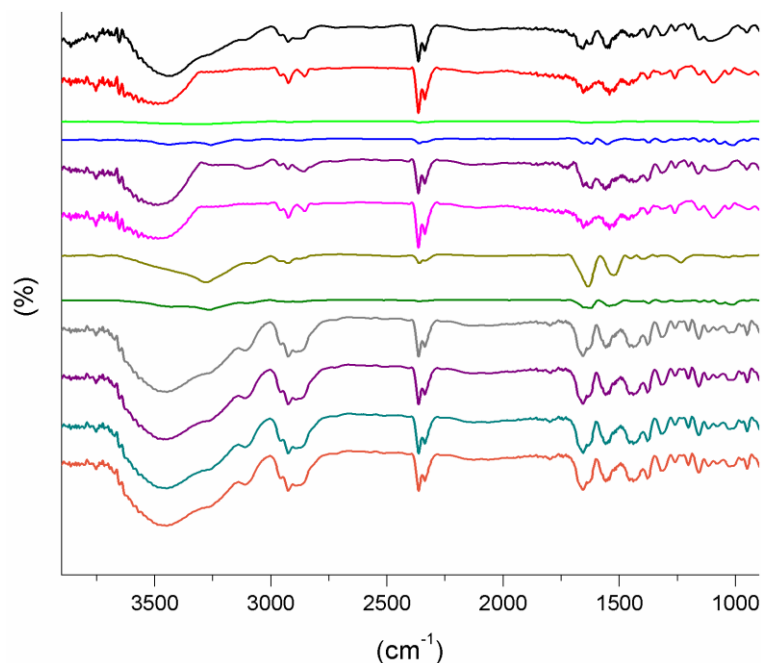
A análise de espectroscopia de IV foi realizada para todos os experimentos do terceiro planejamento (desacetilação). A Figura 65 ilustra os espectros de FTIR para os experimentos de desacetilação da quitina desmineralizada e desproteinizada, onde os experimentos estão representados por diferentes cores e ordenados de cima para baixo da seguinte maneira: Experimento 1 (preto), 2 (vermelho), 3 (verde claro), 4 (azul), 5 (violeta), 6 (rosa), 7 (marrom), 8 (verde escuro), 9 (cinza), 10 (lilás), 11 (azul petróleo) e 12 (laranja).

Os experimentos 9 a 12, a princípio devem evidenciar os mesmos resultados, uma vez que as condições são idênticas, isto é, uma quadruplicata do ponto central deste planejamento.

Analisando os dados de espectroscopia de IV (Figura 65), é possível observar que o processo de desacetilação resultou em espectros com bandas características de quitosana nos experimentos 1, 2, 5, 6, 9, 10, 11 e 12. (BRUGNEROTTO et al., 2001; LOPES e FASCIO, 2004; ANTONINO, 2007; SILVERSTEIN et al., 2007; ABDEL-RAHMAN et al., 2015; CORAZZARI et al., 2015; KUMARI et al., 2015; MOURA et al., 2015; SJAIFULLAH e SANTOSO, 2016; SKOŁUCKA-SZARY et al., 2016).

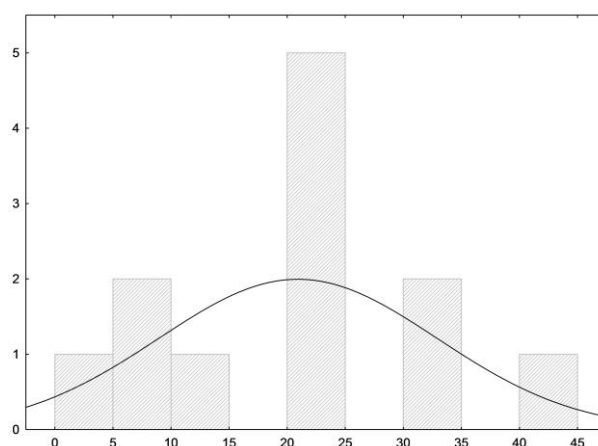
Nos experimentos 3, 4, 7 e 8 não foi possível observar as bandas características da quitosana, ou seja, os procedimentos aplicados no processo de desacetilação da quitina causaram a perda das funções orgânicas que compõem a estrutura química da quitosana, o que pode ser comprovado pelo baixo grau de desacetilação observado na Tabela 13.

Mesmo a Tabela 13 evidenciando que o melhor procedimento foi o experimento 1, estes resultados de grau de desacetilação ( $y_3$ ), foram utilizados para os testes estatísticos.



**Figura 65.** Espectros FTIR dos doze diferentes experimentos realizados para obtenção de quitina desacetilada (quitosana). Transmitância (%) *versus* Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Foram realizados os testes estatísticos com a avaliação da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk efetuado no programa *Statistica 7.0* (STATSOFT, EUA) ilustrado na Figura 66, onde, os resultados das variáveis independentes ( $x_7$ ,  $x_8$  e  $x_9$ ) seguem uma distribuição normal assimétrica com valor de  $p=0,50$  (sendo então  $p > 0,10$ ), mostrando, então, que houve diferença significativa entre os resultados dos experimentos, ou seja, os resultados  $y_3$  se situam em torno da média, no entanto com lacunas, assim, alguns resultados poderão ser significativos e outros não significativos (RODRIGUES e LEMMA 2009; PIANA et al., 2009).



**Figura 66.** Histograma de normalidade para o processo de desacetilação ( $y_3$ ). Número de observações *versus*  $y_3$ .

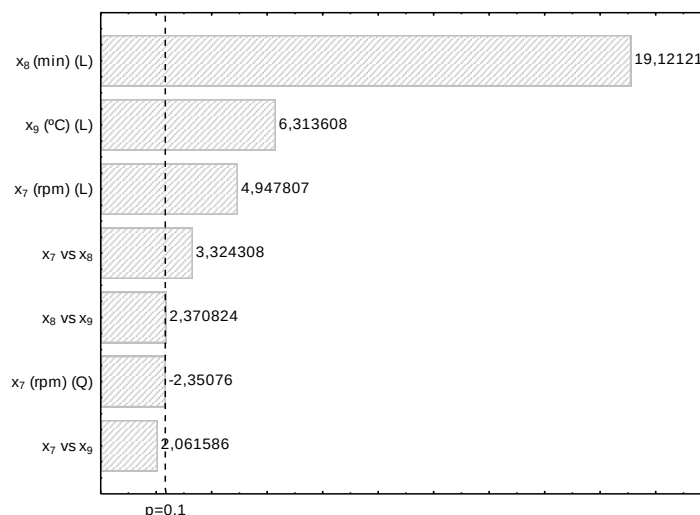
Então para avaliar se as variáveis são significativas ou não significativas realiza-se o teste de Pareto. Na Tabela 14, verifica-se que apenas a interação entre as variáveis  $x_7x_9$  não foi significativa ( $p > 0,10$ ), esses resultados de significância podem ser confirmados pelo diagrama de Pareto, efetuado no programa *Statistica 7.0* (STATSOFT, EUA), Figura 67. Assim para a análise dos coeficientes de regressão que podem predizer o modelo matemático é preciso realizar o ajuste do modelo, levando em consideração apenas os valores significativos, com isso, o valor não significativo referente à interação  $x_7x_9$ , foi ignorado.

**Tabela 14.** Efeitos e coeficientes de regressão  $y_3$ .

| Fatores   | Efeitos  | Erro puro | t        | p        | Coeficientes de regressão |
|-----------|----------|-----------|----------|----------|---------------------------|
| Média     | 33,52500 | 1,371966  | 24,43573 | 0,000150 | 33,5250                   |
| $x_7$ (L) | 9,60000  | 1,940253  | 4,94781  | 0,015841 | 4,8000                    |
| $x_7$ (Q) | -7,90000 | 3,360618  | -2,35076 | 0,090237 | -3,9500                   |
| $x_8$ (L) | 37,10000 | 1,940253  | 19,12121 | 0,000312 | 18,5500                   |
| $x_9$ (L) | 12,25000 | 1,940253  | 6,31361  | 0,008031 | 6,1250                    |
| $x_7x_8$  | 6,45000  | 1,940253  | 3,32431  | 0,044909 | 3,2250                    |
| $x_7x_9$  | 4,00000  | 1,940253  | 2,06159  | 0,131296 | 2,0000                    |
| $x_8x_9$  | 4,60000  | 1,940253  | 2,37082  | 0,098431 | 2,3000                    |

$x_7$ .: agitação magnética (rpm);  $x_8$ .: tempo (min);  $x_9$ .: temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ). (L): linear; (Q): quadrático

Pelo Diagrama de Pareto, Figura 67, observa-se que a variável tempo de reação ( $x_8$ ) foi a mais significativa seguida pela temperatura ( $x_9$ ) e agitação magnética ( $x_7$ ). As variáveis  $x_8$  (L),  $x_9$  (L) e  $x_7$  (L) e as interações  $x_7x_8$  e  $x_8x_9$  favoreceram o procedimento de desacetilação, no entanto, a variável  $x_7$  (Q) desfavorece o procedimento.



**Figura 67.** Diagrama de Pareto para desacetilação ( $y_3$ ). Fatores *versus* Efeitos.

Verificadas a normalidade e ajustados os efeitos, ou seja, ignorando as interações não significativas, é possível, pelos coeficientes de regressão, gerar o modelo que prediz a resposta da variável dependente ( $y_3$ ) em função das variáveis independentes.

$$y_3 = 33,525 + 4,80x_7 - 3,95x_7^2 + 18,55x_8 + 6,125x_9 + 3,225x_7x_8 + 2,30x_8x_9$$

Equação 9

onde:  $y_3$  é a resposta para o processo de desacetilação (grau de desacetilação);  $x_7$  a agitação magnética (rpm);  $x_8$  o tempo de reação (min) e  $x_9$  a temperatura (°C).

A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para verificação da significância dos resultados a partir do teste F utilizando o programa *Statistica 7.0* (STATSOFT, EUA) e as equações do teste F (ANEXO A) (RODRIGUES e LEMMA 2009).

De acordo com a Tabela 15, pode-se dizer que o modelo é preditivo e significativo, já que o F calculado foi maior que o F crítico (tabelado) e o  $R^2$  (0,983) próximo de 1, logo, assim, pode ser traçada a superfície de resposta e a curva de contorno para as interações significativas e preditivas. O baixo erro sugere uma ótima precisão da análise (RODRIGUES e LEMMA 2009).



**Tabela 15.** Análise de variância (ANOVA).

| Fonte de variação | Soma quadrática | Graus de liberdade | Média quadrática | F <sub>cal</sub> | F <sub>cal</sub> /F <sub>tab</sub> | R <sup>2</sup> |
|-------------------|-----------------|--------------------|------------------|------------------|------------------------------------|----------------|
| Regressão         | 3438,20         | 8                  | 429,77           | 38,10            | 11,40                              | 0,983          |
| Resíduo           | 56,39           | 5                  | 11,27            |                  |                                    |                |
| Falta de ajuste   | 33,81           | 2                  |                  |                  |                                    |                |
| Erro puro         | 22,58           | 3                  |                  |                  |                                    |                |
| Total             | 3460,78         | 11                 |                  |                  |                                    |                |

F<sub>cal</sub>: F calculado; F<sub>tab</sub>: F tabelado<sub>8;5;0,10</sub> = 3,34; R<sup>2</sup>: coeficiente de determinação.

A Tabela 16 mostra os resultados experimentais e observa-se que esses se assemelham aos resultados preditos, calculados a partir do modelo matemático. Apesar da existência de desvios (ANEXO A) pode-se considerar que os resultados foram satisfatórios para a maior parte dos experimentos (desvios menores que 20%) (RODRIGUES e LEMMA, 2009). No entanto três experimentos (4, 7 e 8) ficaram com valores acima de 20 %, ou seja, valores muito distantes dos reais, não podendo ser predito, sendo estes 3 experimentos justamente aqueles com baixo grau de desacetilação e com espectro de IV com bandas que não caracterizavam quitosana. Isso comprova que as condições adotadas nos experimentos 4, 7 e 8 são realmente inadequadas para o processo de desacetilação.

**Tabela 16.** Resultados experimentais e preditos

| Experimento | y <sub>3</sub> Experimental | y <sub>3</sub> ' Predito | Desvio (%) |
|-------------|-----------------------------|--------------------------|------------|
| 1           | 66,11                       | 64,585                   | 2,2919     |
| 2           | 46,21                       | 47,735                   | -3,3225    |
| 3           | 18,90                       | 16,435                   | 13,0423    |
| 4           | 6,32                        | 8,785                    | -39,4444   |
| 5           | 47,03                       | 48,535                   | -3,2659    |
| 6           | 33,24                       | 31,685                   | 4,5632     |
| 7           | 10,81                       | 13,285                   | -23,0093   |
| 8           | 8,11                        | 5,635                    | 30,4321    |
| 9           | 35,12                       | 33,535                   | 4,4586     |
| 10          | 36,09                       | 33,535                   | 6,8472     |
| 11          | 29,80                       | 33,535                   | -12,5336   |
| 12          | 33,24                       | 33,535                   | -1,0090    |

y<sub>3</sub>: resposta para o processo de desacetilação (grau de desacetilação); y<sub>3</sub>': resposta predita para o processo de desacetilação (grau de desacetilação) predito.

As Figuras 68 e 69 ilustram as superfícies de resposta e curvas de contorno para as interações significativas x<sub>7</sub>x<sub>8</sub> e x<sub>8</sub>x<sub>9</sub>, respectivamente. A resposta esperada para a variável dependente (y<sub>3</sub>), ou seja, coloração vermelho escuro.

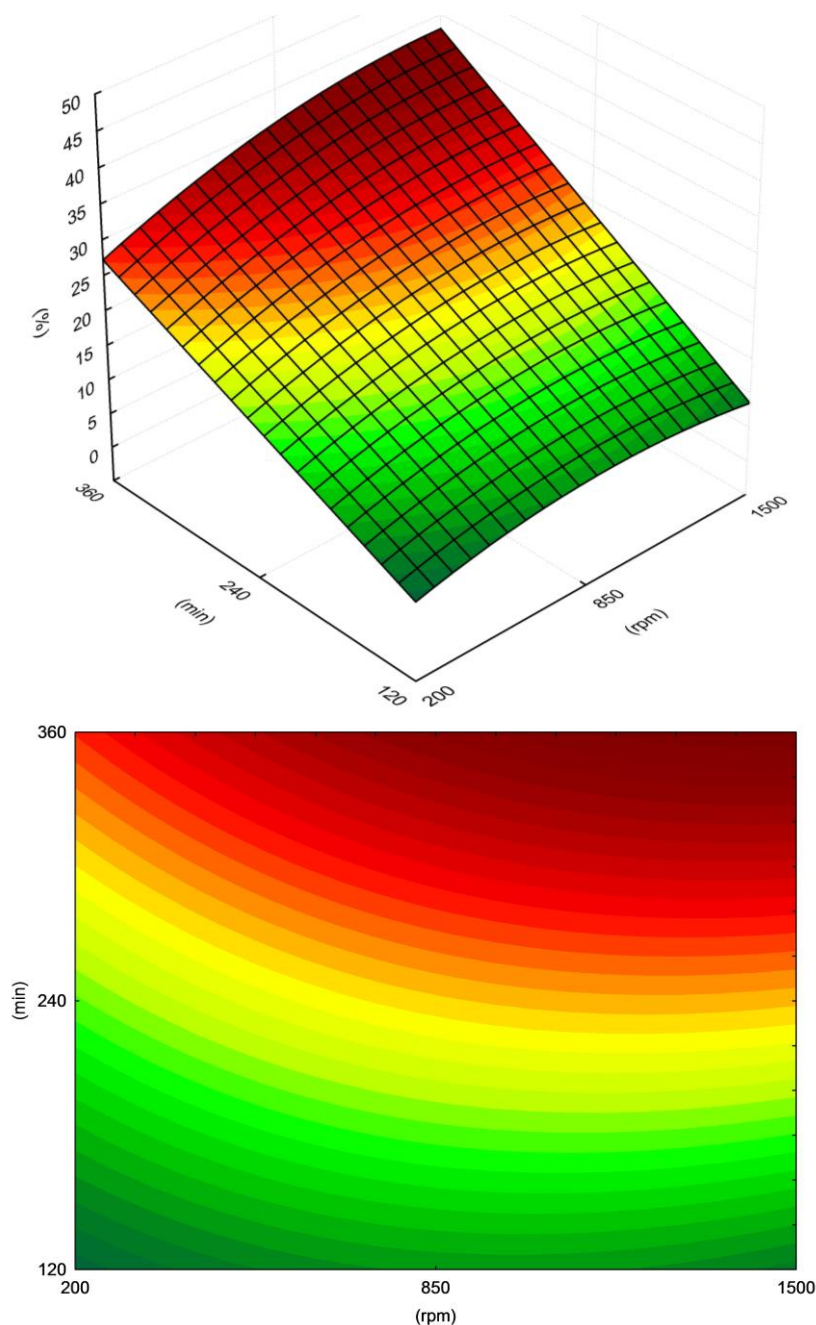
De acordo com a Figura 69, onde são observadas as interações das variáveis x<sub>7</sub>x<sub>8</sub>, o ponto ótimo do processo de desacetilação ocorreu no nível (1)

para os dois fatores, ou seja, maior velocidade de agitação magnética ( $x_7$ ) e maior tempo de reação ( $x_8$ ), o que está de acordo com o Experimento 1, que evidencia o maior grau de desacetilação na maior agitação magnética (1500 rpm) e maior tempo (360 min).

Já para a interação das variáveis  $x_8x_9$ , Figura 70, observa-se, também, que o ponto ótimo do processo de desacetilação ocorreu no nível (1) para os dois fatores, ou seja, no maior tempo de reação (360 min) e para  $x_8$  e maior temperatura (120 °C) para  $x_9$ , o que está de acordo com o maior grau de desacetilação evidenciando para o Experimento 1.

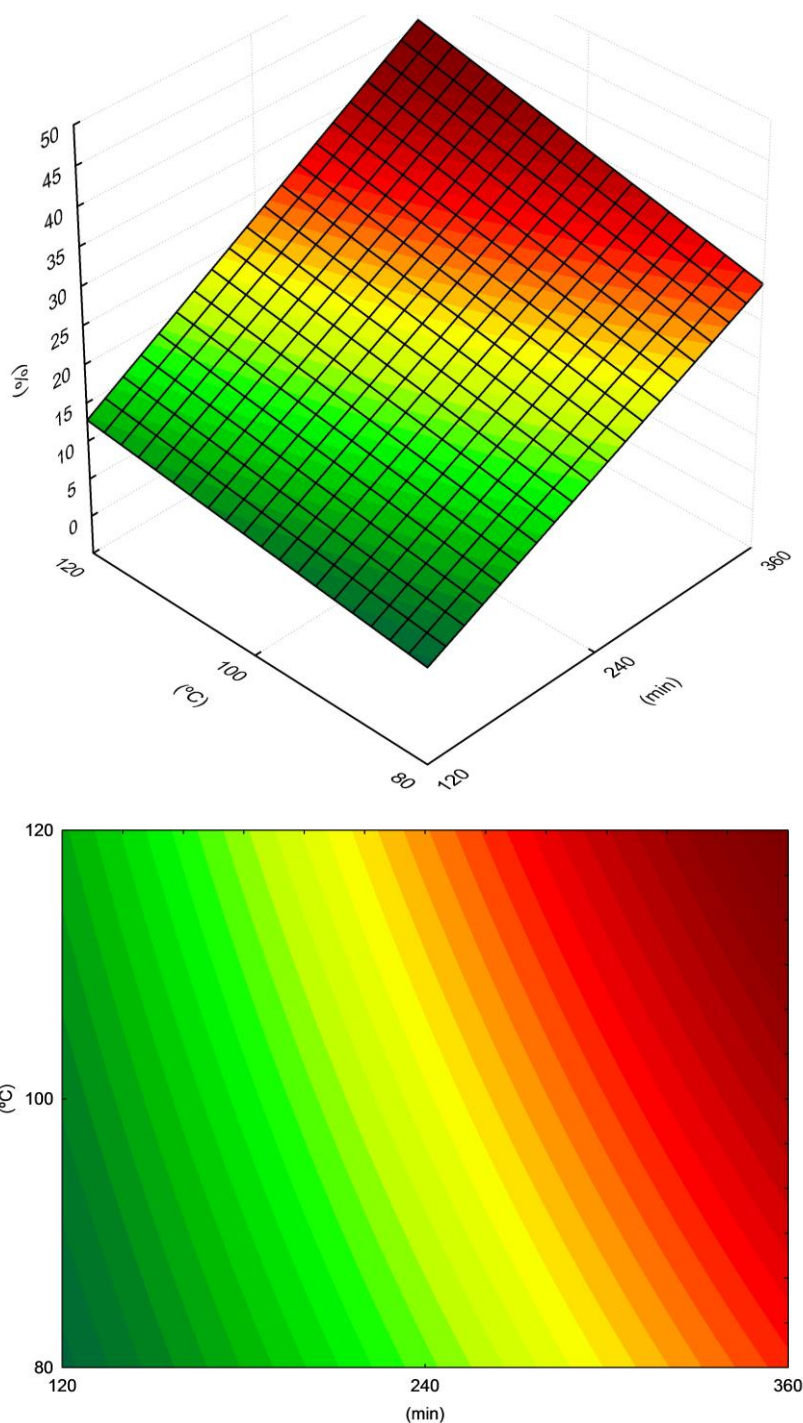
A degradação da quitina ocorre inevitavelmente durante a reação de desacetilação. Autores supõem que a desacetilação ocorre, preferencialmente, seguindo das extremidades para o interior da região interior da região cristalinado polímero (ROBERTS et al., 1982), assim o tamanho da cadeia polimérica e o grau de enovelamento dela influenciam na taxa de desacetilação. Assim, quanto maior a cadeia do polímero (maior massa molecular) e maior o seu enovelamento, menor será a chance de degradação da quitina durante a síntese da quitosana (MOURA et al., 2011).

Na presença de solventes fortemente alcalinos, como solução de hidróxido de sódio 42,3 % (10,5 M), utilizada neste estudo, as cadeias poliméricas de quitina estão sujeitas à degradação e formação de monômeros, além disso, o tempo prolongado de reação e a temperatura elevada também degradam a cadeia polimérica formando monômeros. Assim, quanto maior o tempo de reação, maior será o grau de desacetilação alcançado, no entanto, a massa molecular do polímero de quitosana será menor (RHAZI et al., 2000; MOURA et al., 2011). Este é mais um motivo que apoia o fato da escolha da maior granulometria de casca no início do processo, isto é, a maior granulometria foi escolhida para evitar a formação de monômeros e, assim obter um polímero de maior massa molecular.



**Figura 68.** Superfície de resposta e curva de contorno para a interação entre as variáveis  $x_7$   $x_8$ , ou seja, agitação magnética ( $x_7$ ) e tempo ( $x_8$ ).

Nos experimentos, nos quais não houve indícios de formação de quitosana, bem como o grau de desacetilação obtido foi baixo, os experimentos 3, 4, 7 e 8, apresentam em comum tempo insuficiente de reação, isto é, tempo inferior à 360 min de reação. Associado ao tempo insuficiente, ainda foi observado temperatura insuficiente para o experimento 4 e velocidade de rotação insuficiente para os experimentos 7 e 8.



**Figura 69.** Superfície de resposta e curva de contorno para a interação significativa entre as variáveis  $x_8x_9$ , ou seja, tempo ( $x_8$ ) e temperatura ( $x_9$ ).

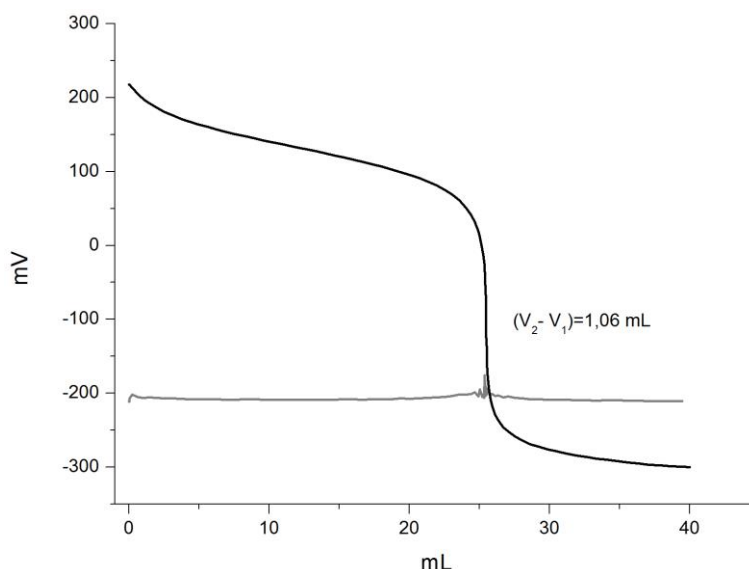
Assim, as superfícies de resposta e as curvas de contorno confirmaram que o ponto ótimo para a desacetilação ocorreu com uma rotação magnética de 1500 rpm, um tempo de 360 min a uma temperatura de 120 °C, (Experimento 1), alcançando um grau de desacetilação de 66 %. Isto significa que o tempo e

temperatura adotados foram adequados, obtendo-se uma quitosana com grau de desacetilação aceitável, quando se espera um polímero e não monômeros.

#### 5.3.3.1 Caracterização da quitosana sintetizada

A amostra de quitosana sintetizada no experimento 1 do terceiro planejamento foi titulada com solução de hidróxido de sódio padronizada (0,9559 M), a Figura 70 evidencia a curva potenciométrica (preto) e a curva da derivativa (cinza), onde o primeiro ponto de inflexão corresponde a neutralização do excesso do ácido clorídrico (24,472 mL) e o segundo ponto de inflexão se refere à neutralização dos grupos amino protonados (25,532 mL).

Foi obtido um grau de desacetilação de aproximadamente  $66,1 \pm 1,1$  % calculado pela equação citada no item 4.6.5, sendo este valor inferior ao obtido para quitosana comercial que foi de aproximadamente 94 %.



**Figura 70.** Curva de potenciométrica (preto) e derivativa (cinza) da titulação da quitosana sintetizada. Potencial (mV) versus Volume (mL).

Os dados da viscosidade podem ser observados na Tabela 17 onde esta foi avaliada pelos tempos de escoamento das soluções com diferentes concentrações. As viscosidades relativa, específica, reduzida e inerente foram calculadas pelas equações descritas no ANEXO D. A Tabela 17 também

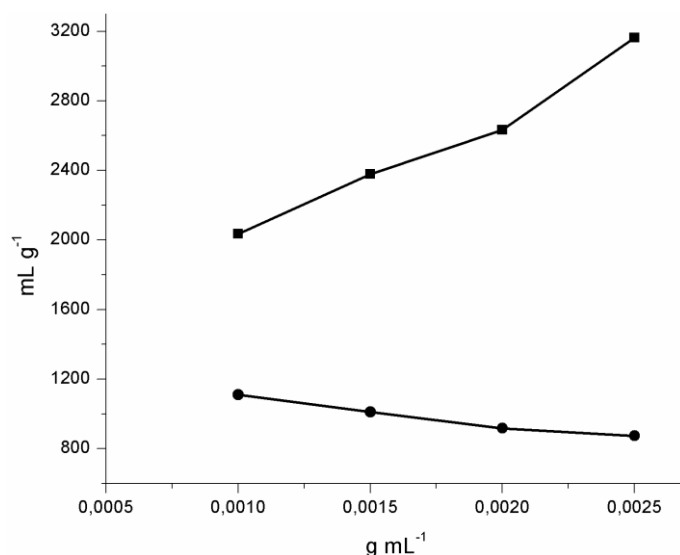
apresenta as diferentes soluções preparadas e os tempos de escoamento no viscosímetro de Ostwald de 250 mm. Estas soluções foram preparadas em solução de ácido acético 0,3 M e acetato de sódio 0,2 M (1:1 v/v). O solvente sem adição de quitosana apresentou tempo médio de escoamento de 256 s.

**Tabela 17.** Tempos de escoamento em viscosímetro Ostwald e viscosidades calculadas para quitosana sintetizada.

| Solução (g mL <sup>-1</sup> ) | Tempo* (s) | $n_{rel}$ | $n_{esp}$ | $n_{red}$ (mL g <sup>-1</sup> ) | $n_{ine}$ (mL g <sup>-1</sup> ) |
|-------------------------------|------------|-----------|-----------|---------------------------------|---------------------------------|
| 1,0x10 <sup>-3</sup>          | 777        | 3,035     | 2,035     | 2035,1                          | 1110,2                          |
| 1,5x10 <sup>-3</sup>          | 1166       | 4,556     | 3,556     | 2378,3                          | 1010,9                          |
| 2,0x10 <sup>-3</sup>          | 1604       | 6,265     | 5,265     | 2632,8                          | 917,5                           |
| 2,5x10 <sup>-3</sup>          | 2280       | 8,906     | 7,906     | 3162,5                          | 874,7                           |

\*Média das triplicatas dos tempos de escoamento

As viscosidades, reduzida e inerente, foram utilizadas para elaboração do gráfico em função da concentração, Figura 71, assim obtendo-se o valor da viscosidade intrínseca  $[\eta]$  a partir da extrapolação das retas para uma concentração tendendo a zero, onde o valor do coeficiente de correlação ( $R^2$ ) para as retas da viscosidade reduzida e inerente obtiveram valores de 0,98 e 0,97 respectivamente e, as equações das curvas foram:  $y = 72734x + 1279$  para viscosidade reduzida e  $y = -15998x + 1258$  para viscosidade inerente.



**Figura 71.** Gráfico da viscosidade reduzida (■) e viscosidade inerente (●) versus concentração das soluções de quitosana sintetizada.

A viscosidade intrínseca calculada a partir da viscosidade reduzida e da viscosidade inerente para quitosana sintetizada foram de 1279 mL g<sup>-1</sup> e 1258 mL g<sup>-1</sup>, respectivamente.

Sendo assim, fazendo uso da equação contida no ANEXO D, a massa molar média viscosimétrica da quitosana sintetizada está na faixa de  $37,66 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$  (376 KDa) a  $36,84 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$  (368 KDa).

Estes valores obtidos estão abaixo dos valores determinados para a quitosana comercial, cuja massa molar ficou na faixa de 799 a 1063 KDa, indicando que o polímero de quitosana sintetizado em laboratório (368 – 376 KDa) apresenta cadeia de menor massa molecular que a quitosana comercial, no entanto ainda é considerado um valor adequado para polímeros, na casa de  $10^4 \text{ g mol}^{-1}$ .

Durante todo o trabalho, a quitosana sintetizada foi caracterizada comparativamente com a quitosana comercial. A Tabela 18 evidencia a estas duas amostras comparando todas as análises realizadas, bem como as especificações do fabricante.

Tabela 18. Comparação entre amostras de quitosana comercial e quitosana sintetizada em laboratório.

| Análises                                      | Quitosana Comercial* | Quitosana Comercial**      | Quitosana Sintetizada***  |
|-----------------------------------------------|----------------------|----------------------------|---------------------------|
| Umidade (%)                                   | < 10,0               | $5 \pm 2,3$                | $8 \pm 0,6$               |
| Cinzas (%)                                    | < 1,0                | $0,1 \pm 0,2$              | $0,87 \pm 0,04$           |
| Proteína (%)                                  | < 0,5                | $0,05 \pm 0,2$             | $0,2 \pm 0,1$             |
| Viscosidade intrínseca ( $\text{mL g}^{-1}$ ) | 600 – 6000           | 2266 – 2815                | 1258 – 1279               |
| Massa específica ( $\text{g mol}^{-1}$ )      | $10^4 - 10^6$        | $7,99 - 10,63 \times 10^5$ | $3,76 - 3,68 \times 10^5$ |
| Grau de desacetilação (%)                     | 70 – 95              | 95                         | $66,1 \pm 1,1$            |

Fonte \*Especificações técnicas da quitosana comercial (Sigma®) (SIGMA ALDRICH®) \*\*Valores obtidos experimentalmente para a quitosana comercial (Sigma®); \*\*\*Valores obtidos experimentalmente para quitosana sintetizada.

Ao comparar dos dados da Tabela 18, nota-se que as análises realizadas para a quitosana comercial (\*\*) estão de acordo com as especificações do fabricante (\*).

A quitosana sintetizada em laboratório enquadrou-se em quase todas as especificações do fabricante para uma amostra de quitosana Sigma®, excetuando-se o grau de desacetilação que foi de aproximadamente 66,1 %, isto é, inferior a 70 %.

Foram comparados os espectros de FTIR da quitosana comercial (cinza), da quitosana sintetizada (preto) e da quitina desmineralizada e desproteínizada (azul), ilustrado na Figura 72, que mostra semelhanças nos espectros da quitina e da quitosana, mas também algumas diferenças, sendo estas diferenças

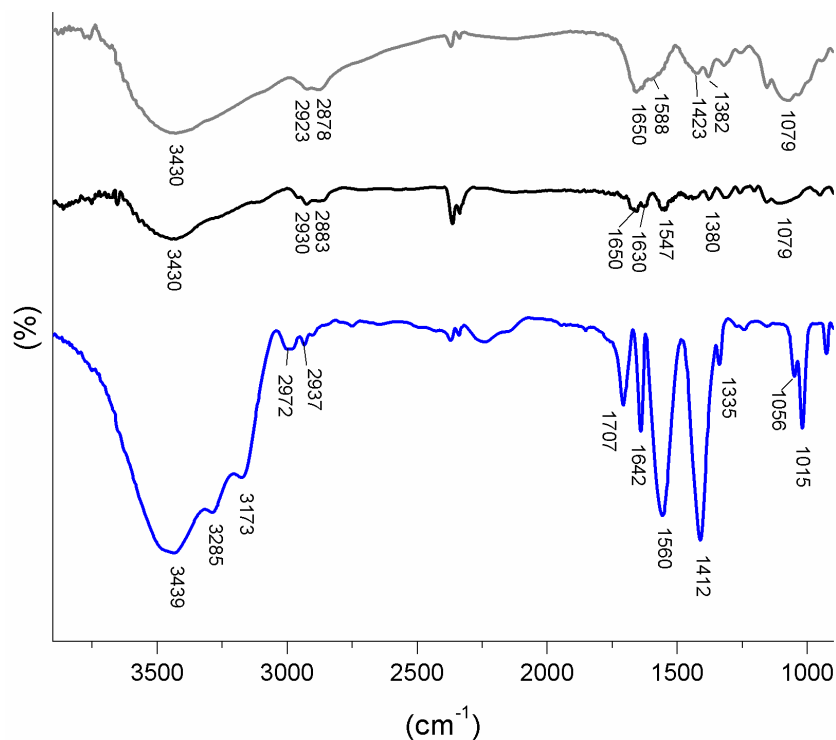
atribuídas à incidência de grupos acetamida, principalmente nas regiões correspondentes aos seguintes intervalos de número de onda: 3600 – 3000  $\text{cm}^{-1}$  e 1800 – 1200  $\text{cm}^{-1}$ , uma vez que a quitosana apresenta este grupo em menor quantidade que a quitina.

Nos espectros das quitosanas (cinza e preto) é visível a alteração no formato das bandas entre 3600 – 3000  $\text{cm}^{-1}$  quando comparadas ao espectro da quitina (azul). Entretanto, nota-se a permanência da banda larga na região de 3400  $\text{cm}^{-1}$ , que está relacionada ao [vO-H] que sobrepõe às demais bandas na região. Já ambas as amostras de quitosana apresentam bandas características semelhantes.

O desaparecimento das bandas antes observada na quitina em 1707  $\text{cm}^{-1}$  [vC=O], 1642  $\text{cm}^{-1}$  [v<sub>s</sub>N-H] da amida I e o surgimento da banda em 1650  $\text{cm}^{-1}$ , comprova a desacetilação da quitina, no entanto, na quitosana sintetizada esta banda possui um “pequeno ombro” em 1630  $\text{cm}^{-1}$  referente aos grupamentos acetamino da quitina. Ainda se observa que a banda forte em 1412  $\text{cm}^{-1}$  referente à [δ<sub>s</sub>C-H] sobreposta à banda [vC-N] em 1335  $\text{cm}^{-1}$  na quitina, origina na quitosana sintetizada uma banda larga em 1380  $\text{cm}^{-1}$  referente a estas vibrações, outras bandas em 1100 – 1000  $\text{cm}^{-1}$  [vC-O-C e vC-O] características de estruturas polissacarídeas são observadas. (SUGIMOTO et al., 1998; BRUGNEROTTO et al., 2001; LOPES e FASCIO, 2004; RINAUDO, 2006; ANTONINO 2007; AZEVEDO et al., 2007; SILVERSTEIN et al., 2007; SAGHEER et al., 2009; XIAOLIN et al., 2009; SJAIFULLAH e SANTOSO, 2016; SKOŁUCKA-SZARY et al., 2016).

A principal diferença entre os espectros da quitosana comercial (cinza) e sintetizada (preto) na região de 1800 – 1500  $\text{cm}^{-1}$  se devem ao fato do grau de desacetilação (GD), determinado experimentalmente, entre elas ser diferente. A Figura 73 observa-se, a formação da banda em 1650  $\text{cm}^{-1}$  [vC=O] da amida e 1547  $\text{cm}^{-1}$  [δN-H] da amina primária que na quitosana sintetizada aparece de uma forma mais proeminente, devido ao menor grau de desacetilação da quitosana sintetizada (66 %) em comparação com a quitosana comercial (94 %).

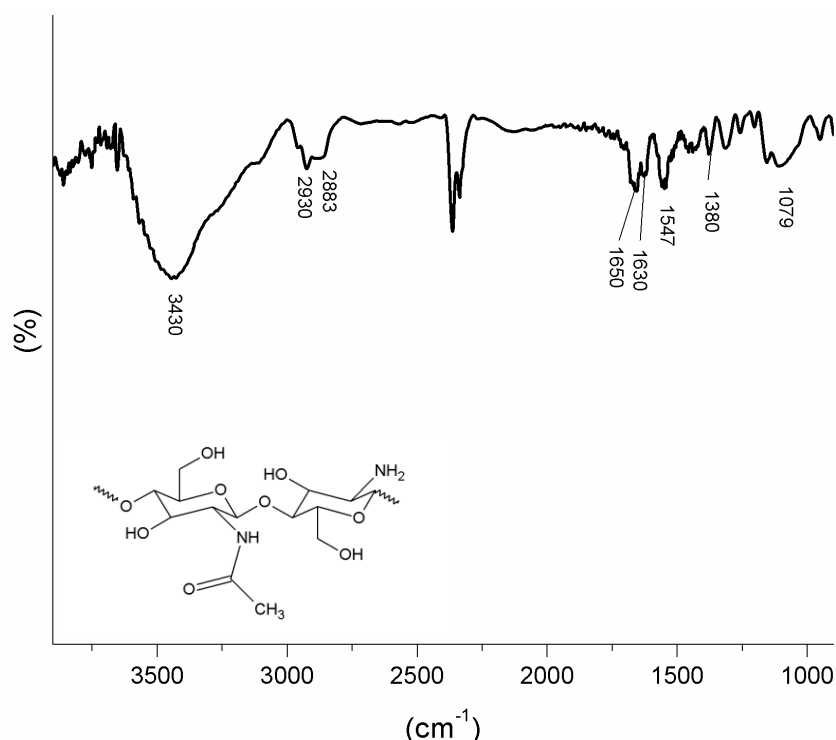




**Figura 72.** Espectro FTIR da quitosana comercial (cinza) e quitosana sintetizada (preto) e quitina desmineralizada e desproteínizada (azul). Transmitância (%) versus Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

O surgimento da banda em  $1650 \text{ cm}^{-1}$  comprova o processo de desacetilação. A banda referente à  $[\delta\text{N-H}]$  em  $1547 \text{ cm}^{-1}$  permanece na quitosana sintetizada indicando, provavelmente, desacetilação ineficiente quando comparada a quitosana comercial, a banda em  $1630 \text{ cm}^{-1}$  é observada como um “pequeno ombro” referente à formação da amônia  $[\text{NH}_3^+]$ , este pequeno ombro é descrito na literatura como sugestão da desacetilação da quitina e formação da quitosana. (HAMDINE et al., 2006; BARAN et al., 2008; VIJAYA et al., 2008; BEKHEIT et al., 2011; KADOUCHE et al., 2012; GHOSH e ALI, 2012; FADZALLAH et al., 2014; SANTOS et al., 2014; YUDHASASMITA e NUGROHO, 2015; MI et al., 2015; LIAO et al., 2016; ARAUJO et al., 2017; PEREIRA et al., 2017).

A Figura 74 mostra os termogramas de DSC da quitosana comercial (cinza), quitosana sintetizada (preto) e quitina desmineralizada e desproteínizada (azul), onde se observaram o aumento da estabilidade térmica da quitosana sintetizada quando comparado com a quitina desmineralizada e desproteínizada.

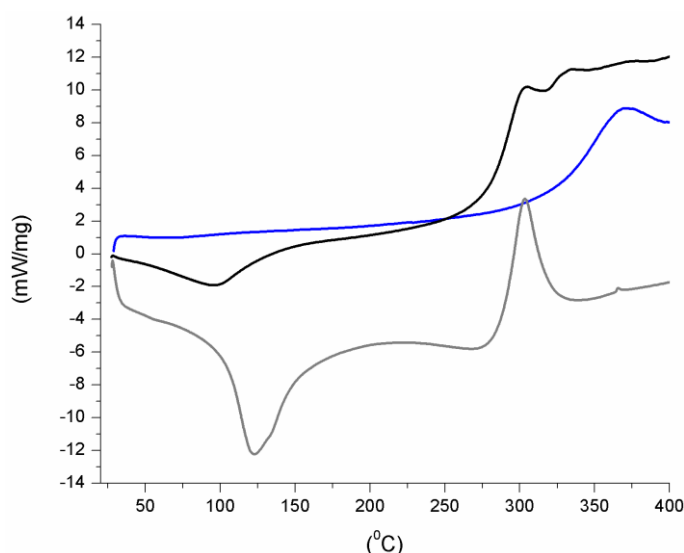


**Figura 73.** Espectro FTIR da quitosana sintetizada e, no detalhe, a estrutura da quitosana. Transmitância (%) versus Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Na quitosana sintetizada (preto) se observam valores de dois efeitos térmicos, assim como na quitina desmineralizada e desproteínizada (azul), sendo, o primeiro efeito endotérmico referente à evaporação de água e outros compostos voláteis, com valores de  $T_{\text{onset}}$ : 70,76 °C;  $T_{\text{endset}}$ : 114,40 °C;  $T_{\text{pico}}$ : 95,26 °C e  $\Delta H = 43,34 \text{ J g}^{-1}$ , este pico endotérmico, quando observado para quitina desmineralizada e desproteínizada, apresentou valores menores de  $T_{\text{pico}}$ : 64,95 °C e  $\Delta H = 0,80 \text{ J g}^{-1}$  mostrando um aumento na estabilidade na obtenção da quitosana sintetizada, no entanto, em comparação a quitosana comercial, este pico endotérmico foi observado em  $T_{\text{pico}}$ : 122,59 °C e  $\Delta H = 185,74 \text{ J g}^{-1}$  mostrando que a quitosana comercial é mais estável que a quitosana sintetizada.

O aumento da estabilidade térmica na obtenção da quitosana sintetizada a partir da quitina desmineralizada e desproteínizada também é observado no segundo efeito térmico, no entanto, se comparado a quitosana comercial a quitosana sintetizada apresenta-se menos estável. O segundo pico exotérmico da quitosana sintetizada apresentou valores de  $T_{\text{onset}}$ : 297,31 °C;  $T_{\text{endset}}$ : 310,10 °C;  $T_{\text{pico}}$ : 304,98 °C e  $\Delta H = -11,06 \text{ J g}^{-1}$  apresentando um aumento de estabilidade se comparado a quitina desmineralizada e

desproteínizada a qual não apresentou este segundo efeito térmico, no entanto, a quitosana comercial com valores de  $T_{\text{onset}}$ : 288,81 °C;  $T_{\text{endset}}$ : 317,82 °C;  $T_{\text{pico}}$ : 303,22 °C e  $\Delta H = -153,48 \text{ J g}^{-1}$  confirma sua maior estabilidade térmica em relação à quitosana sintetizada. Esses eventos térmicos estão de acordo com o descrito na literatura (HAMDINE et al., 2006; GHOSH e ALI, 2012; PEREIRA et al., 2017).



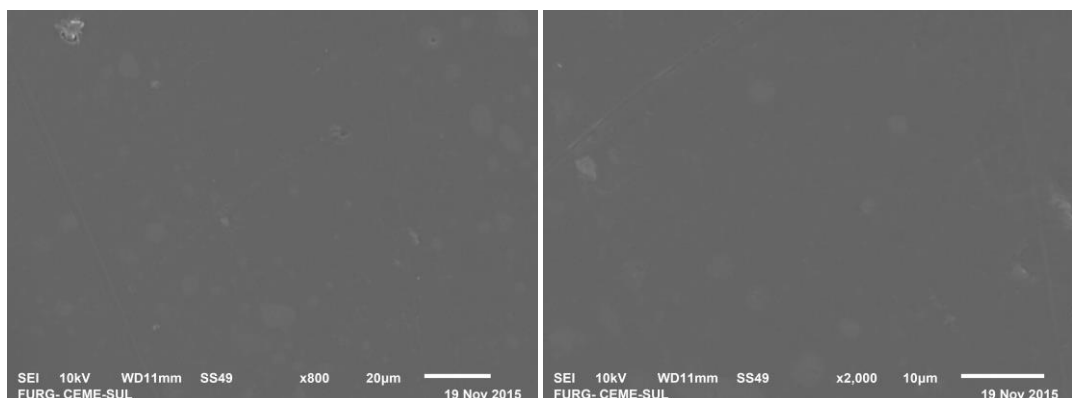
**Figura 74.** Termograma de DSC da quitosana comercial (cinza), quitosana sintetizada (preto) e quitina desmineralizada e desproteínizada (azul). Fluxo de calor ( $\text{mW mg}^{-1}$ ) versus Temperatura (°C).

A análise por MEV revela características mais gerais da superfície do polímero de quitosana sintetizada.

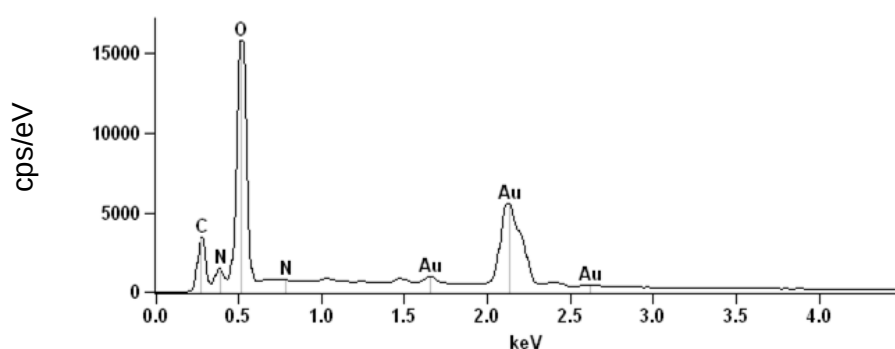
A Figura 75 ilustra as Micrografias com magnitudes de 800 e 2000 X, respectivamente. Quando a quitosana é seca, há uma tendência na formação de filmes com pequenas irregularidades na superfície.

Estas mesmas características de superfície foram relatadas na literatura (CHEN et al., 2008; YALÇINKAYA et al., 2010; MOURA et al., 2011). A análise de EDS, acoplada ao MEV, ilustra na Figura 76 o espectro de EDS para a quitosana sintetizada, onde se pode observar a presença dos compostos de carbono, nitrogênio e oxigênio em 0,282; 0,392; 0,523 keV, respectivamente.

A comparação das análises de espectroscopia de IV, DSC e EDS para as amostras de quitosana comercial, quitina desmineralizada e desproteínizada e quitosana sintetizada foram resumidas na Tabela 19.



**Figura 75.** Micrografias em MEV da quitosana sintetizada.



**Figura 76.** Espectro de EDS para a quitosana sintetizada. Intensidade ( $\text{cps eV}^{-1}$ ) versus energia (keV).

**Tabela 19.** Comparação das caracterizações para quitosana comercial, quitina desmineralizada e desproteínizada e quitosana sintetizada.

| Caracterizações                                                   | Quitosana Comercial | Quitina Desmineralizada e Desproteínizada | Quitosana Sintetizada |
|-------------------------------------------------------------------|---------------------|-------------------------------------------|-----------------------|
| Umidade (%)                                                       | 5,7                 | 23,8                                      | 8                     |
| Cinzas (%)                                                        | 0,1                 | 0,1                                       | 0,87                  |
| Proteína (%)                                                      | 0,05                | 0,2                                       | 0,2                   |
| FTIR [ $\nu\text{O-H}$ ] ( $\text{cm}^{-1}$ )                     | 3430                | 3439                                      | 3430                  |
| FTIR [ $\nu\text{C-H}$ ] ( $\text{cm}^{-1}$ )                     | 2923, 2878          | 2972, 2937                                | 2930, 2883            |
| FTIR [ $\nu\text{C=O}$ ] amida I ( $\text{cm}^{-1}$ )             | 1650                | 1707                                      | 1650                  |
| FTIR [ $\nu\text{sN-H}$ ] amida II ( $\text{cm}^{-1}$ )           | 1588                | 1642                                      | 1630                  |
| FTIR [ $\delta\text{N-H}$ ] ( $\text{cm}^{-1}$ )                  | 1588                | 1560                                      | 1547                  |
| FTIR [ $\delta\text{sC-H}$ ] ( $\text{cm}^{-1}$ )                 | 1423                | 1412                                      | 1380                  |
| FTIR [ $\nu\text{C-N}$ ] ( $\text{cm}^{-1}$ )                     | 1382                | 1335                                      | 1200                  |
| FTIR [ $\nu\text{C-O-C}$ e $\nu\text{C-O}$ ] ( $\text{cm}^{-1}$ ) | 1100 - 900          | 1000 – 890                                | 1100 – 900            |
| *DSC: $\Delta H_{\text{ENDOTÉRMICO}}$ ( $\text{J g}^{-1}$ )       | 185,74              | 0,8                                       | 43,34                 |
| **DSC: $\Delta H_{\text{EXOTÉRMICO}}$ ( $\text{J g}^{-1}$ )       | -153,48             | Nd.                                       | -11,06                |
| EDS: Átomos                                                       | C, N, O             | C, N, O                                   | C, N, O               |

Nd.: Não detectado; \*DSC.: pico endotérmico na região de 50 – 100°C; \*\*DSC.: pico exotérmico na região de 289 – 317 °C.

Já a comparação das análises de espectroscopia de IV, DSC e EDS para as amostras de casca *in natura* de camarão, quitina desmineralizada e quitina desmineralizada e desproteinizada foram resumidas na Tabela 20, o que pode ser comprovado através da Figura 75. Observa-se que após a primeira etapa de desmineralização, as bandas no espectro FTIR, apresentaram um deslocamento para um maior número de onda, permanecendo, na mesma região ao final do processo (desmineralização e desproteinização) demonstrando, que os grupos funcionais, sua vizinhança e algumas ligações ou interações moleculares foram modificadas após a perda de minerais e proteínas da estrutura. Além disso, com os processos de extração da quitina tornaram-se mais passíveis de identificação pela técnica de espectroscopia de infravermelho em comparação com a casca *in natura*.

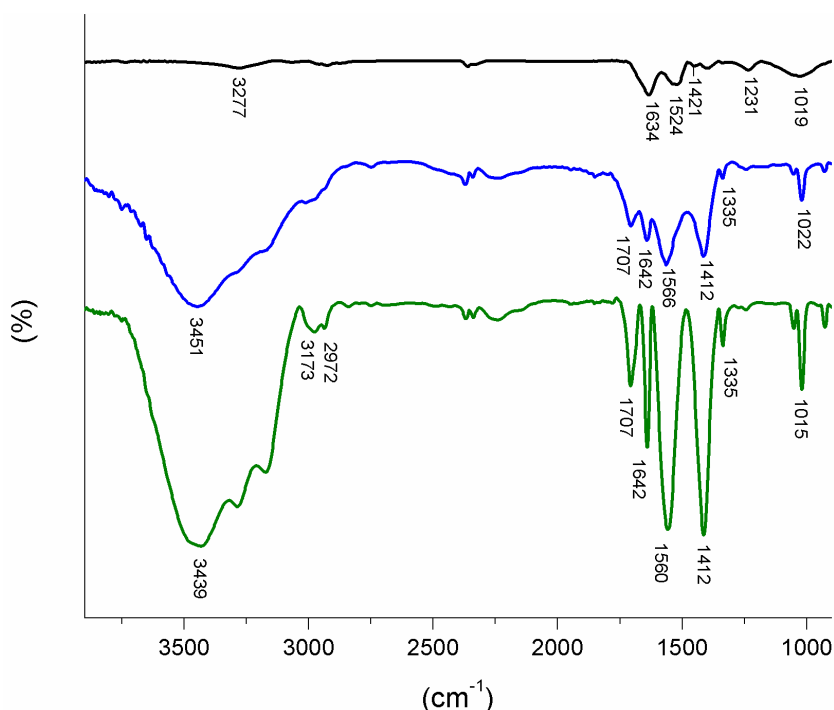
**Tabela 20.** Comparação das caracterizações para casca de camarão, quitina desmineralizada e quitina desmineralizada e desproteinizada.

| Caracterizações                                      | Casca <i>in natura</i>     | Quitina desmineralizada | Quitina desmineralizada e desproteinizada |
|------------------------------------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------------------------|
| Umidade (%)                                          | 83,2                       | 25,3                    | 23,8                                      |
| Cinzas (%)                                           | 1,76                       | 0,3                     | 0,1                                       |
| Proteína (%)                                         | 16,3                       | 13,5                    | 0,2                                       |
| FTIR [ $\nu$ O-H] ( $\text{cm}^{-1}$ )               | 3277                       | 3451                    | 3439                                      |
| FTIR [ $\nu$ S-C-H] ( $\text{cm}^{-1}$ )             | 2923                       | 3173, 3019              | 2972, 2937                                |
| FTIR [ $\nu$ C=O] amida I ( $\text{cm}^{-1}$ )       | Nd.                        | 1707                    | 1707                                      |
| FTIR [ $\nu$ S-N-H] amida II ( $\text{cm}^{-1}$ )    | 1634                       | 1642                    | 1642                                      |
| FTIR [ $\delta$ N-H] ( $\text{cm}^{-1}$ )            | 1524                       | 1566                    | 1560                                      |
| FTIR [ $\delta$ S-C-H] ( $\text{cm}^{-1}$ )          | 1396                       | 1412                    | 1412                                      |
| FTIR [ $\nu$ C-N] ( $\text{cm}^{-1}$ )               | 1231                       | 1335                    | 1335                                      |
| FTIR [ $\nu$ C-O-C e $\nu$ C-O] ( $\text{cm}^{-1}$ ) | 1100 - 890                 | 1100 - 890              | 1100 - 890                                |
| *DSC: $\Delta H_{\text{ENDOTÉRMICO}}$ (J/g)          | 1,12                       | 0,06                    | 0,8                                       |
| **DSC: $\Delta H_{\text{EXOTÉRMICO}}$ (J/g)          | -2,01                      | Nd.                     | Nd.                                       |
| EDS: Átomos                                          | Mg, Al, Pb, K, Ca, C, N, O | C, N, O                 | C, N, O                                   |

Nd.: Não detectado; \*DSC.: pico endotérmico na região de 50 – 100°C; \*\*DSC.: pico exotérmico na região de 206 – 212 °C.

A Figura 77 mostra a comparação entre os espectros de IV da casca *in natura* de camarão (preto), quitina desmineralizada (azul) e quitina desmineralizada e desproteinizada (verde) onde se observa para a quitina a permanência das bandas características na região de 1700 – 1500  $\text{cm}^{-1}$  referentes às bandas da amida I [ $\nu$ C=O], amida II [ $\nu$ S-N-H] e amida III [ $\nu$ C-N acoplado  $\delta$ N-H].

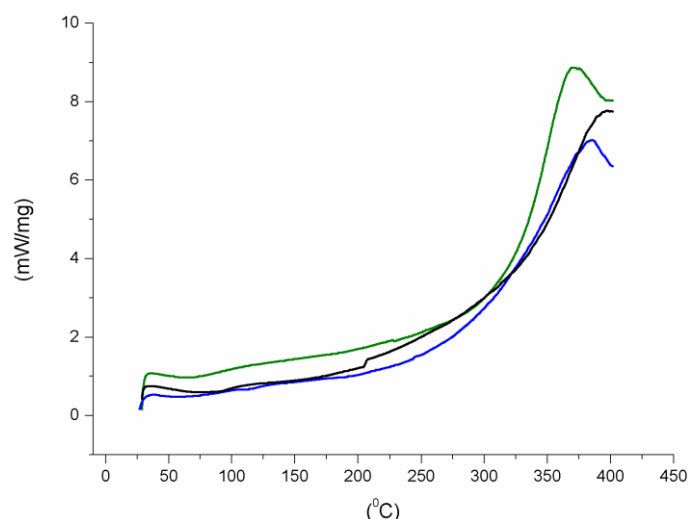
Na casca *in natura* (preto) não foram observadas bandas característica de amina I, enquanto que no espectro de quitina desmineralizada (azul) e quitina desmineralizada e desproteínizada (verde) as bandas da amida I são observadas em  $1707\text{ cm}^{-1}$  e  $1707\text{ cm}^{-1}$ . Nos três espectros são observadas bandas de amida II em  $1524\text{ cm}^{-1}$ ,  $1642\text{ cm}^{-1}$  e  $1642\text{ cm}^{-1}$  e de amida III, em  $1421\text{ cm}^{-1}$ ,  $1566\text{ cm}^{-1}$  e  $1560\text{ cm}^{-1}$  respectivamente.



**Figura 77.** Espectro FTIR da casca *in natura* (preto), quitina desmineralizada (azul) e quitina desmineralizada e desproteínizada (verde). Transmitância (%) versus Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Na análise de DSC, comparando a casca *in natura* (preto), quitina desmineralizada (azul) e quitina desmineralizada e desproteínizada (verde), Figura 78, a ausência do efeito exotérmico na região de  $206 - 212\text{ }^{\circ}\text{C}$ , antes detectado na casca *in natura*, assim como a ausência de metais no EDS, evidencia a eficiência da extração da quitina, estando esta apta para ser utilizada como precursora para a obtenção do seu derivado desacetilado, denominado quitosana sintetizada.

A Figura 78 mostra a comparação entre os DSC da casca *in natura* (preto), quitina desmineralizada (azul) e quitina desmineralizada e desproteínizada (verde) evidenciando a semelhança no perfil térmico da casca com a quitina desmineralizada e quitina demineralizada e desproteínizada.



**Figura 78.** Termograma de DSC da casca *in natura* (preto), quitina desmineralizada (azul) e quitina desmineralizada e desproteínizada (verde). Fluxo de calor ( $\text{mW mg}^{-1}$ ) versus Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ).

#### 5.4 Etapas Padronizadas de Síntese de Quitosana

De acordo com os resultados apresentados pelos três planejamentos experimentais fatoriais empregados para obtenção de quitosana a partir da casca do camarão rosa proveniente da região pesqueira de Pelotas-RS, pôde-se padronizar as etapas para síntese de quitosana, sendo estas descritas a seguir.

Inicialmente a casca do camarão foi limpa em água corrente, triturada a uma granulometria de cerca de 5 mm e seca em estufa a temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$ , por 24 h. Em seguida, adicionou-se as cascas uma solução aquosa de ácido clorídrico 1,6 M (1:30 p/v) e manteve-se sob agitação constante, por 30 min à temperatura ambiente.

Após, a casca do camarão desmineralizada foi lavada diversas vezes com água destilada até a neutralização, alcançado o pH 7,0. Em seguida, filtrou-se a casca para a retirada do excesso de água e adicionou-se uma solução aquosa de hidróxido de sódio 0,75 M (1:30 p/v) sob agitação constante por 30 min, à  $70^{\circ}\text{C}$ , em banho de óleo.

Após esta etapa, a casca desmineralizada e desproteínada (quitina) foi lavada novamente com água destilada até a neutralização (pH 7,0). Para a

desacetilação da quitina, ou seja, síntese de quitosana, adicionou-se solução aquosa de hidróxido de sódio 42,3 % (10,6 M) (1:30 p/v) à quitina desmineralizada e desproteinizada, sob agitação de 1500 rpm.

Manteve-se a reação nestas condições durante 360 min, à 120 °C, utilizando banho de óleo, sob refluxo. Em seguida, a quitosana foi lavada com água destilada até a neutralização (pH 7,0) e seca em estufa a 40 °C, durante 48 h. O produto final foi armazenado em refrigerador a - 20 °C. Rendimento de  $20 \pm 5$  % calculado a partir da casca de camarão. Esta amostra de quitosana sintetizada apresenta grau de desacetilação de 66,1 % e massa molar de 368 – 376 KDa.

Por fim, o procedimento padronizado mostrou-se eficaz em todas as etapas de desmineralização, desproteinização e desacetilação da quitina para obtenção da quitosana sintetizada, com características semelhantes à quitosana comercial da marca Aldrich.

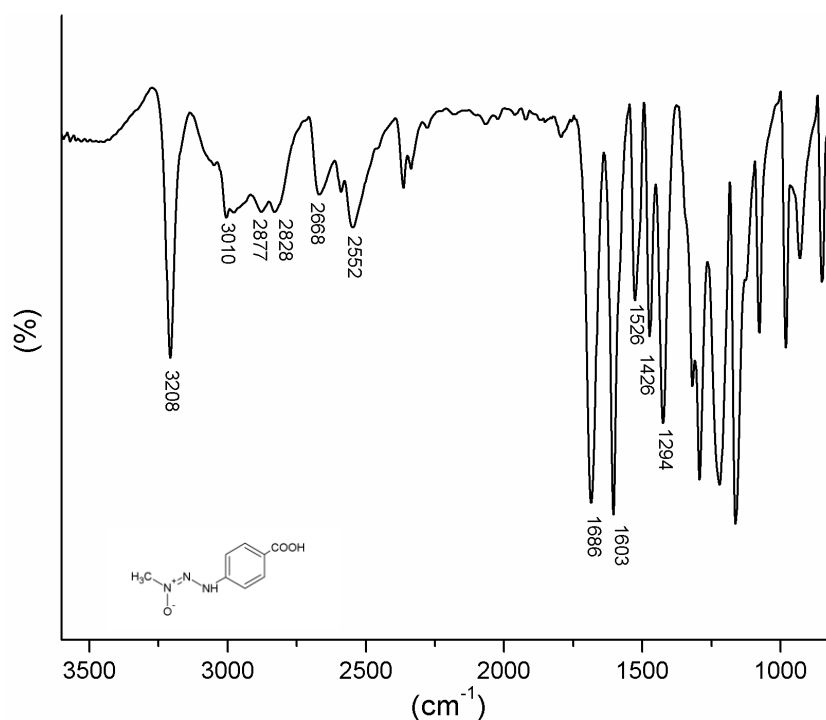
### **5.5 Caracterização do 1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazeno 1-óxido (1)**

A síntese do composto (1), de fórmula molecular  $C_8H_9N_3O_3$  e massa molecular de  $195 \text{ g mol}^{-1}$  foi realizada de acordo com o descrito na literatura (SANTOS et al., 2007).

Sua síntese e caracterização se fazem necessárias, uma vez que é reagente de partida para a síntese dos demais compostos desta tese. O composto (1) foi caracterizado por análises de FTIR, DSC, MEV e EDS.

De acordo com o espectro na região do infravermelho, Figura 79, são observadas bandas características dos principais grupos funcionais:  $3208 \text{ cm}^{-1}$  [ $\nu\text{N-H}$ ],  $3010$ ,  $2877$ ,  $2828$ ,  $2668$ ,  $2552 \text{ cm}^{-1}$  [ $\nu\text{C-H}$ ],  $1686 \text{ cm}^{-1}$  [ $\nu\text{C=O}$ ],  $1603 \text{ cm}^{-1}$  [ $\nu\text{C=C}$ ],  $1526 \text{ cm}^{-1}$  [ $\nu\text{C-N}$ ],  $1426 \text{ cm}^{-1}$  [ $\nu\text{N=N}$ ],  $1294 \text{ cm}^{-1}$  [ $\nu\text{N-N}$ ], sendo que estas bandas estão de acordo com o descrito na literatura para triazenos (SEREBRYANSKAYA et al., 2010; FERREYDUNI et al., 2012) e para este composto específico (SANTOS et al., 2014).



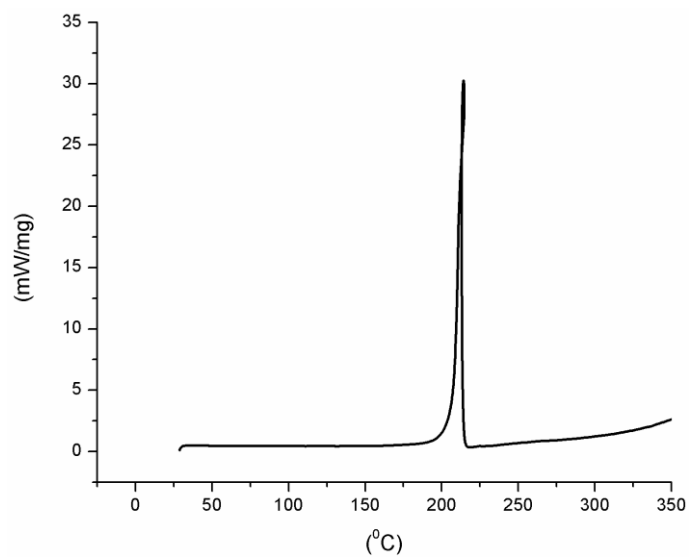


**Figura 79.** Espectro de FTIR do composto **(1)** e, no detalhe, a estrutura do composto **(1)**. Transmitância (%) versus Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

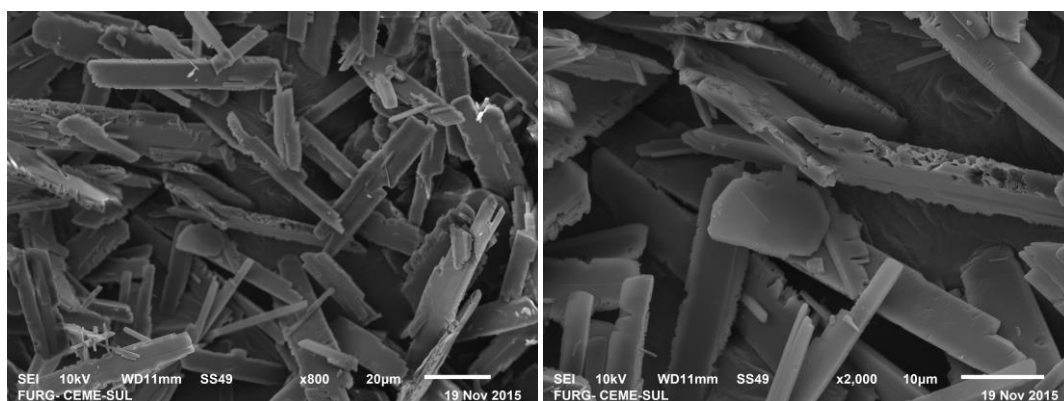
A Figura 80 ilustra o termograma de DSC do composto **(1)**, onde se pode observar um único pico exotérmico que é exatamente o ponto de fusão do composto, com valores de  $T_{\text{onset}}$ : 210,87 °C;  $T_{\text{endset}}$ : 214,47 °C;  $T_{\text{pico}}$ : 212,89°C e  $\Delta H = -653,94 \text{ J g}^{-1}$ , onde esta energia é medida pela integração da área do pico exotérmico que se refere ao calor de decomposição do grupo azo do composto **(1)** (SANTOS et al., 2014).

Em seguida foram analisadas as características gerais da superfície do composto **(1)** (Figura 81), através de MEV. As Micrografias com magnitude de 800 e 2000 X, respectivamente, evidenciam uma estrutura superficial irregular, de forma retangular, assemelhando-se a pequenos cristais.

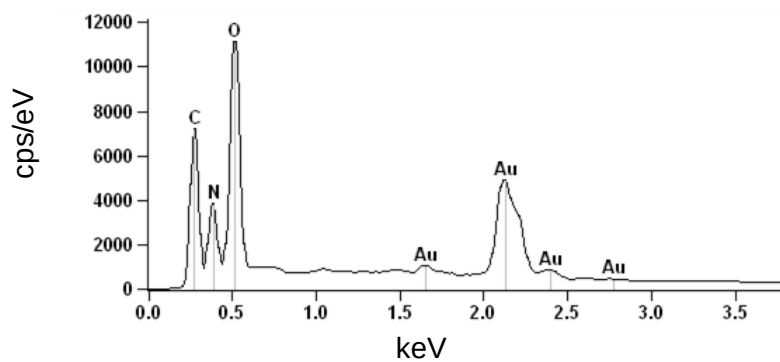
A análise por EDS do composto **(1)** (Figura 82) confirma a presença dos elementos carbono, nitrogênio e oxigênio, em 0,282; 0,392; 0,523 keV respectivamente, os quais são constituintes da molécula.



**Figura 80.** Termograma de DSC do composto (1). Fluxo de calor ( $\text{mW mg}^{-1}$ ) versus Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ).



**Figura 81.** Micrografia em MEV do composto (1).



**Figura 82.** Espectro de EDS do composto (1). Intensidade ( $\text{cps eV}^{-1}$ ) versus energia (keV).

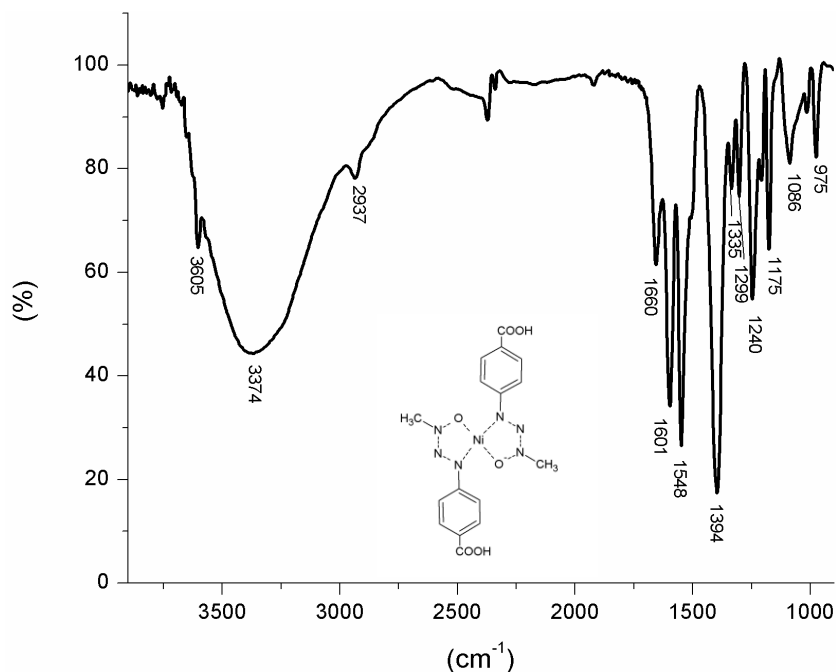
## 5.6. Caracterização *bis*[1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazenido 1-óxido]Ni<sup>II</sup> (2)

A estrutura do composto (2), de fórmula molecular C<sub>16</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>H<sub>16</sub>Ni e massa de 447 g mol<sup>-1</sup>, foi proposta de acordo com as quantidades estequiométricas utilizadas em sua síntese. Este composto foi caracterizado por FTIR, Figura 83, onde se observam alterações nas bandas em comparação às bandas do composto (1).

As alterações mostram a interação esperada dos cátions níquel (II) com a cadeia triazenido1-óxido do composto (1) formando o complexo de Ni<sup>II</sup>. As bandas observadas foram: 3374 cm<sup>-1</sup> [νO-H], 2937 cm<sup>-1</sup> [νC-H], 1660 cm<sup>-1</sup> [νC=O], 1601 cm<sup>-1</sup> [νC=C], 1548 cm<sup>-1</sup> [νC-N], 1394 cm<sup>-1</sup> [νNNN].

O desaparecimento da banda [νN-H] observada em 1294 cm<sup>-1</sup> no composto (1), bem como o surgimento da banda [νNNN] em 1394 cm<sup>-1</sup> evidencia a formação do complexo de Ni<sup>II</sup>.

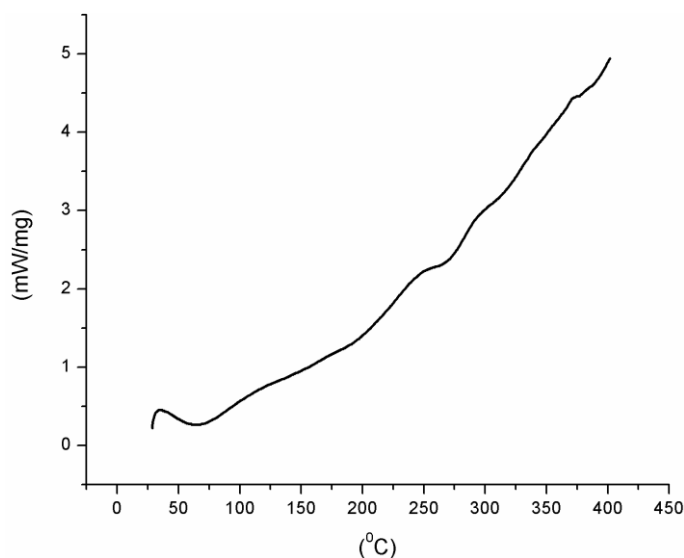
Estes resultados estão de acordo com o descrito na literatura para complexos trizenidos 1-óxido com metais de transição M<sup>II</sup> (SEREBRYANSKAYA et al., 2010; FERREYDUNI et al., 2012; SANTOS et al., 2016).



**Figura 83.** Espectro de FTIR do composto (2). Transmitância (%) versus Número de onda (cm<sup>-1</sup>).

Através da análise de DSC podem ser observados três efeitos térmicos, Figura 84, sendo o primeiro endotérmico referente à evaporação da água e outros compostos voláteis, com valores de  $T_{\text{onset}}$ : 41,05 °C;  $T_{\text{endset}}$ : 86,47 °C;  $T_{\text{pico}}$ : 64,30 °C e  $\Delta H = 35,50 \text{ J g}^{-1}$ , um segundo e terceiro efeitos exotérmicos, com valores de  $T_{\text{onset}}$ : 224,41 °C;  $T_{\text{endset}}$ : 260,11 °C;  $T_{\text{pico}}$ : 258,40 °C e  $\Delta H = - 8,42 \text{ J g}^{-1}$  e  $T_{\text{onset}}$ : 276,56 °C;  $T_{\text{endset}}$ : 310,49 °C;  $T_{\text{pico}}$ : 307,28 °C e  $\Delta H = - 10,60 \text{ J g}^{-1}$ .

Há uma completa mudança de perfil térmico do composto (2) em relação ao composto (1), com aumento da estabilidade térmica do composto (2) com a quelatação dos cátions de  $\text{Ni}^{\text{II}}$ . A partir de 310 °C observa-se a decomposição do composto.

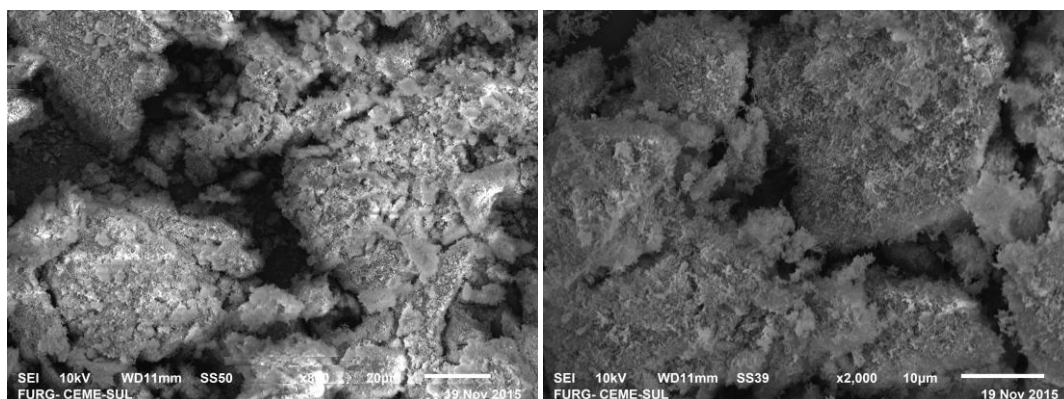


**Figura 84.** Termograma de DSC do composto (2). Fluxo de calor ( $\text{mW mg}^{-1}$ ) versus Temperatura (°C).

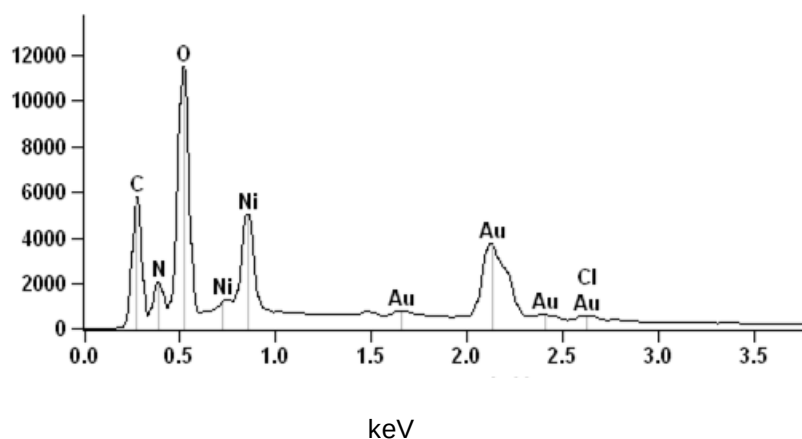
As características gerais da superfície do composto (2), analisadas por MEV, são ilustradas na Figura 85. Nas micrografias abaixo, com magnitude de 800 e 2000 X nota-se formação de pequenos aglomerados, assemelhando-se a pó compacto, diferente da superfície de pequenos cristais observada para o composto (1).

Os dados de EDS, Figura 86, identificaram qualitativamente e semi qualitativamente os átomos constituintes do composto (2) e confirmaram a presença de carbono, nitrogênio, oxigênio, níquel e cloro, em 0,282; 0,392; 0,523; 0,849 e 2,622 keV respectivamente. A presença do níquel comprova a

inserção de  $\text{Ni}^{\text{II}}$  na formação do complexo *bis*[1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazenido 1-óxido] $\text{Ni}^{\text{II}}$ , ou seja, na formação do composto (2), sendo a proporção atômica de níquel de 10,6 %. A presença do cloro se dá pela utilização do reagente  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  na síntese do composto (2).



**Figura 85.** Micrografia em MEV do composto (2).

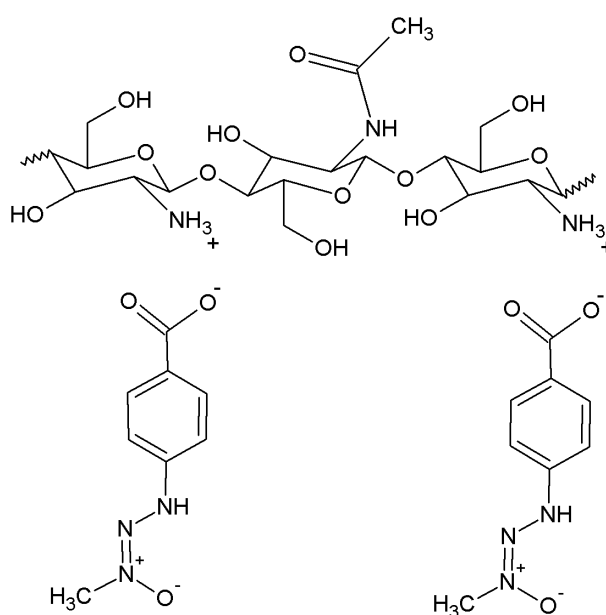


**Figura 86.** Espectro de EDS do composto (2). Intensidade ( $\text{cps eV}^{-1}$ ) versus energia (keV).

## 5.7 Caracterização dos Compostos (3a) e (3b)

O composto (3a) é originado do suporte do composto (1) em quitosana comercial, já o composto (3b) é originado do suporte do composto (1) em quitosana sintetizada.

A partir da estequiometria de síntese 1:1 quitosana: composto (1) é proposta uma estrutura para os compostos (3a) e (3b), isto é, é proposto um esquema de imobilização do composto (1) em quitosana, interações eletrostáticas entre grupos amino protonados ( $\text{-NH}_3^+$ ) da quitosana com grupos carboxilatos ( $\text{-COO}^-$ ) do composto (1), Figura 87 (SHAMOV et al., 2002; HAMDINE et al., 2005; YALÇINKAYA et al., 2010; GHOSH e ALI, 2011; GÜMÜSOGLU et al., 2011; FADZALLAH et al., 2014; SANTOS et al., 2016; RAJAN et al., 2016; XU et al., 2017; UNNITHAN et al., 2017; PEREIRA et al., 2017).



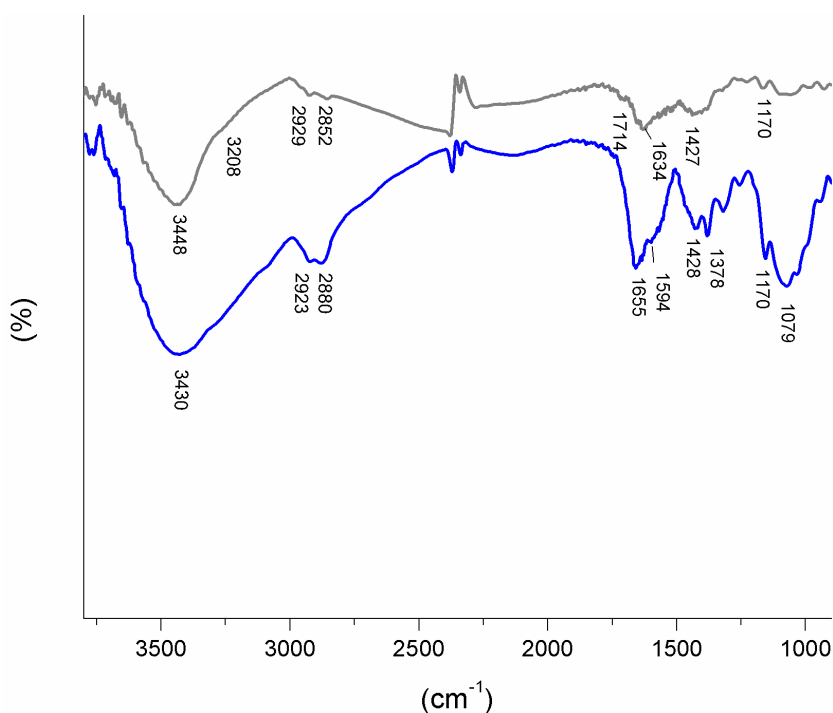
**Figura 87.** Estrutura proposta para os compostos (3a) e (3b), evidenciando o suporte do composto (1) em quitosana.

A Figura 88 ilustra o espectro de FTIR da quitosana comercial (azul) e do composto (3a) (cinza).

Para o composto (3a) foi observada a banda em  $3448\text{ cm}^{-1}$  referente à banda antes observada em  $3430\text{ cm}^{-1}$  [ $\nu\text{O-H}$  sobreposto a  $\nu\text{N-H}$ ] da quitosana e a banda em  $3208\text{ cm}^{-1}$  [ $\nu\text{N-H}$ ] do composto (1). As bandas da quitosana referentes à [ $\nu\text{C=O}$  sobreposto a  $\delta\text{N-H}$ ], antes observadas em  $1655\text{ cm}^{-1}$  e  $1594\text{ cm}^{-1}$ , se tornam no composto (3a), uma única banda, em  $1634\text{ cm}^{-1}$  o que sugere a interação eletrostática entre o grupamento amino da quitosana e o carboxilato do composto (1) (SHAMOV et al., 2002; HAMDINE et al., 2005; HAMDINE et al., 2006; CHEN et al., 2008; YALÇINKAYA et al., 2010; GHOSH e

ALI, 2012; GÜMÜSOGLU et al., 2011; FADZALLAH et al., 2014; UNNITHAN et al., 2017).

Ainda é observado o surgimento de uma pequena banda em  $1714\text{ cm}^{-1}$  que indica a inserção do composto (**1**) na quitosana, uma vez que no composto (**1**) aparece  $[\nu\text{C=O}]$  em  $1686\text{ cm}^{-1}$ . Autores relatam que, na região entre  $1700 - 1500\text{ cm}^{-1}$  evidenciam a modificação da quitosana a partir da interação eletrostática envolvendo o grupamento amino protonado. Esta interação é observada como uma mudança de região e/ou característica da banda. (SHAMOV et al., 2002; HAMDINE et al., 2005; YALÇINKAYA et al., 2010; GHOSH e ALI, 2011; GÜMÜSOGLU et al., 2011; FADZALLAH et al., 2014; SANTOS et al., 2016; RAJAN et al., 2016; XU et al., 2017; UNNITHAN et al., 2017; PEREIRA et al., 2017).



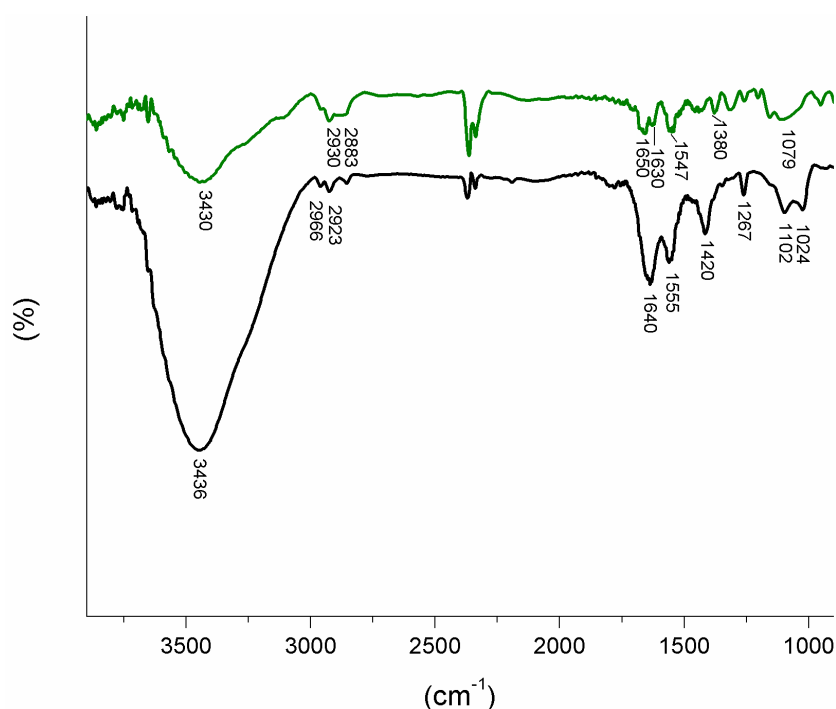
**Figura 88.** Espectro de FTIR da quitosana comercial (azul) e do composto (**3a**) (cinza). Transmitância (%) versus Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

As mesmas bandas, antes observadas no composto (**3a**) são observadas no composto (**3b**), comprovando a formação do composto (**3b**).

A Figura 89 ilustra o espectro de FTIR da quitosana sintetizada (verde) e do composto (**3b**) (preto), onde é observada, para o composto (**3b**), a banda larga que sugere a interação eletrostática em  $1640\text{ cm}^{-1}$  antes observada como duas bandas em  $1650\text{ cm}^{-1}$  e  $1630\text{ cm}^{-1}$  na quitosana sintetizada.

Esta modificação, nas bandas da quitosana sintetizada no composto (**3b**), está de acordo com a literatura, onde, são relatadas interações eletrostáticas a partir dos grupos amino protonados da quitosana, no processo de modificação de quitosana pela inserção de diferentes compostos. (KADOUCHE et al., 2012; ANTONY et al., 2013; PIVARCIOVÁ et al., 2014; SANTOS et al., 2014; YUDHASASMITA e NUGROHO, 2015; KYZAS e KOSTOGLU, 2015; NGUYEN et al., 2016; SANTOS et al., 2016; XU et al., 2017; UNNITHAN et al., 2017; PEREIRA et al., 2017).

Além disso, o surgimento das bandas em 1420 e 1267  $\text{cm}^{-1}$  no composto (**3b**) indicam a inserção do composto (**1**) na quitosana, uma vez que o composto (**1**) evidencia as bandas em 1426  $\text{cm}^{-1}$  [ $\nu\text{N}=\text{N}$ ] e 1294  $\text{cm}^{-1}$  [ $\nu\text{N}-\text{N}$ ].

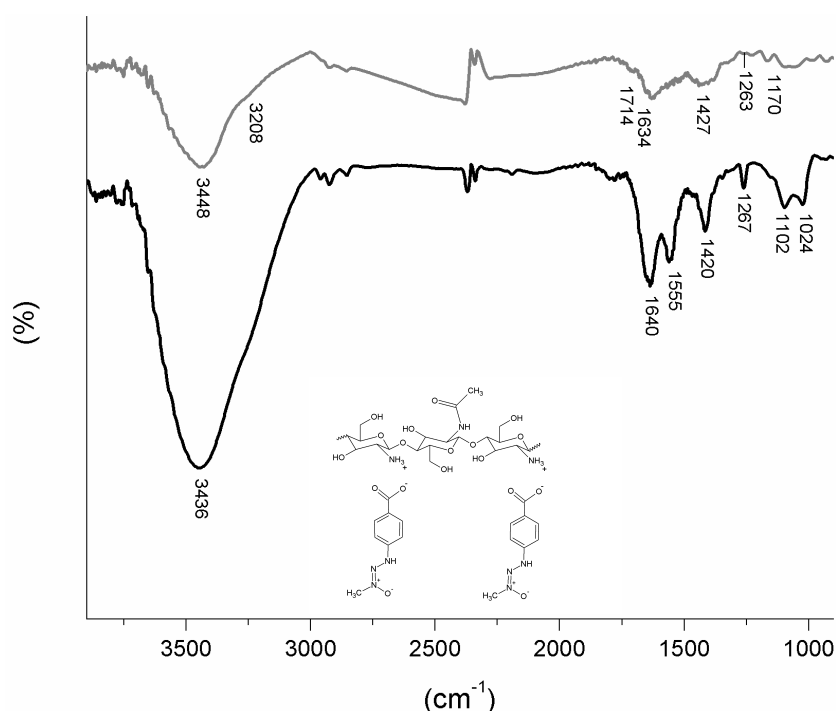


**Figura 89.** Espectro de FTIR da quitosana sintetizada (verde) e do composto (**3b**) (preto). Transmittância (%) versus Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Na Figura 90 ilustra o espectro de comparação dos compostos (**3a**) (cinza) e (**3b**) (preto) onde se evidencia a formação dos compostos, por interação eletrostática, através do surgimento das bandas observadas em 1634  $\text{cm}^{-1}$  e 1640  $\text{cm}^{-1}$  para os compostos (**3a**) e (**3b**) respectivamente. (SHAMOV et al., 2002; HAMDINE et al., 2005; HAMDINE et al., 2006; CHEN et al., 2008; YALÇINKAYA et al., 2010; GHOSH e ALI, 2012; GÜMÜSOGLU et al., 2011; FADZALLAH et al., 2014; UNNITHAN et al., 2017).



Compostos semelhantes foram sintetizados, utilizando diferentes ácidos carboxílicos suportados em quitosana, e, sugerem que a formação de bandas na região de  $1700 - 1500 \text{ cm}^{-1}$  ocorrem por interação eletrostática para obtenção de quitosana modificada. (KADOUCHE et al., 2012; ANTONY et al., 2013; PIVARCIOVÁ et al., 2014; SANTOS et al., 2014; YUDHASASMITA e NUGROHO, 2015; KYZAS e KOSTOGLU, 2015; NGUYEN et al., 2016; SANTOS et al., 2016; XU et al., 2017; UNNITHAN et al., 2017; PEREIRA et al., 2017).

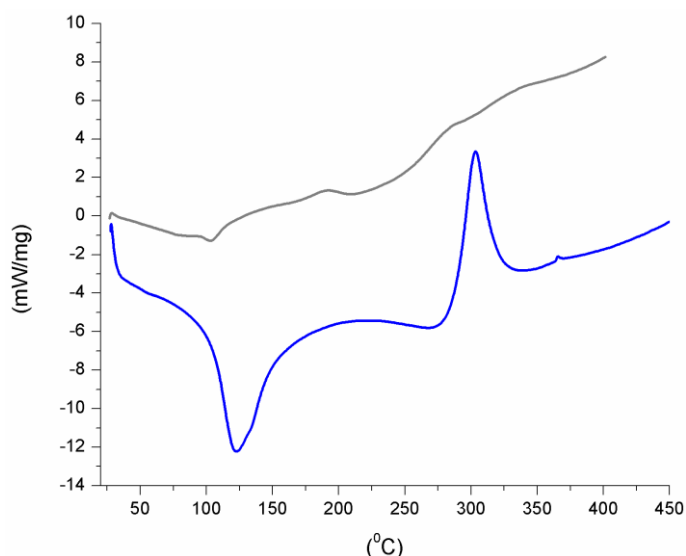


**Figura 90.** Espectro de FTIR do composto **(3a)** (cinza) e **(3b)** (preto). Transmitância (%) versus Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

A Figura 91 ilustra a análise de DSC do composto **(3a)** (cinza) em comparação com a quitosana comercial (azul). Observam-se para o composto **(3a)** quatro efeitos térmicos, sendo um primeiro pico endotérmico referente à evaporação de água e outros compostos voláteis, com valores de  $T_{\text{onset}}$ :  $96,31 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $T_{\text{endset}}$ :  $110,36 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $T_{\text{pico}}$ :  $103,66 \text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $\Delta H = 9,84 \text{ J g}^{-1}$ , um segundo pico, exotérmico, referente à degradação do grupo azo do composto **(1)** com valores de  $T_{\text{onset}}$ :  $173,24 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $T_{\text{endset}}$ :  $205,12 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $T_{\text{pico}}$ :  $189,50 \text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $\Delta H = -20,32 \text{ J g}^{-1}$  e um terceiro e quarto picos também exotérmicos em  $T_{\text{pico}}$ :  $284,32 \text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $T_{\text{pico}}$ :  $336,43 \text{ }^{\circ}\text{C}$  referentes à degradação da quitosana.

Estes efeitos térmicos do composto (**3a**) estão semelhantes à quitosana comercial onde o pico endotérmico de evaporação da água e outros compostos voláteis ocorreram em 122 °C ( $\Delta H = 185,74 \text{ J g}^{-1}$ ) e o pico exotérmico, referente à degradação da quitosana ocorreram em 303 °C ( $\Delta H = - 153,48 \text{ J g}^{-1}$ ).

No entanto, devido às entalpias da quitosana comercial apresentarem valores superiores do que o composto (**3a**) na região até 180 °C observa-se que este composto (**3a**) tem menor capacidade de absorção de água e compostos voláteis que a quitosana pura, além disso, a ligação é menos estável, sendo que os compostos voláteis são liberados em temperaturas menores que na quitosana pura isso pode ter relação com o fato dos sítios de ligação da quitosana estarem comprometidos com a ligação ao composto (**1**) e ao fato de no composto (**3a**) as moléculas de água e outros voláteis estarem apenas adsorvidos na estrutura (ANTONY et al., 2013; PIVARCIOVÁ et al., 2014; KYZAS e KOSTOGLU, 2015; NGUYEN et al., 2016; XU et al., 2017; UNNITHAN et al., 2017; PEREIRA et al., 2017).

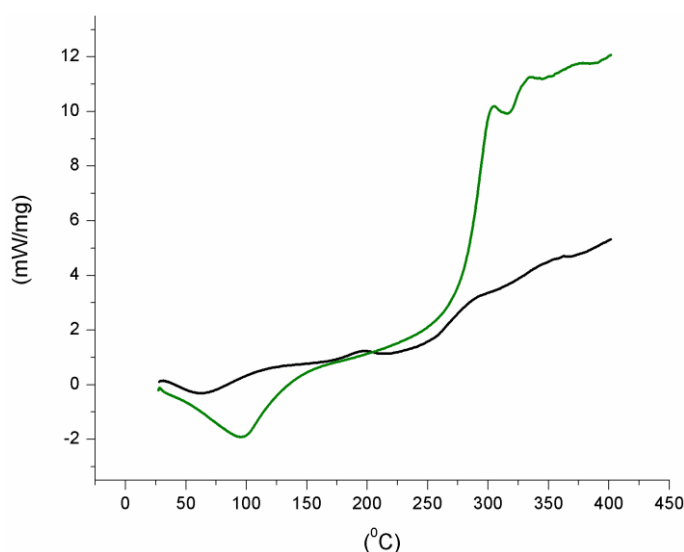


**Figura 91.** Termograma de DSC do composto (**3a**) (cinza) e da quitosana comercial (azul). Fluxo de calor ( $\text{mW mg}^{-1}$ ) versus Temperatura (°C).

A Figura 92 ilustra a análise de DSC do composto (**3b**) (preto) em comparação com a quitosana sintetizada (verde). Observa-se para o composto (**3b**) também quatro efeitos térmicos onde o primeiro pico, endotérmico, é referente à evaporação de água e outros compostos voláteis  $T_{\text{onset}}$ : 35,48 °C;  $T_{\text{endset}}$ : 88,39 °C;  $T_{\text{pico}}$ : 62,37 °C e  $\Delta H = 62,34 \text{ J g}^{-1}$  um segundo pico, exotérmico, é referente à degradação do grupo azo do composto (**1**)  $T_{\text{onset}}$ : 177,42 °C;  $T_{\text{endset}}$ :

209,79 °C;  $T_{\text{pico}}$ : 194,93 °C e  $\Delta H = -21,55 \text{ J g}^{-1}$  e o terceiro e quarto picos, ambos exotérmicos, nas temperaturas de  $T_{\text{pico}}$ : 285,98 °C e 352,75 °C referentes à degradação da quitosana sintetizada.

O perfil térmico do composto (**3b**) está semelhante ao evidenciados pela quitosana sintetizada, onde o pico endotérmico de evaporação da água e outros compostos voláteis ocorreu em 95,26 °C ( $\Delta H = 43,34 \text{ J g}^{-1}$ ) e o pico exotérmico, referente à degradação da quitosana ocorreram em 304,98 °C ( $\Delta H = -11,06 \text{ J g}^{-1}$ ).



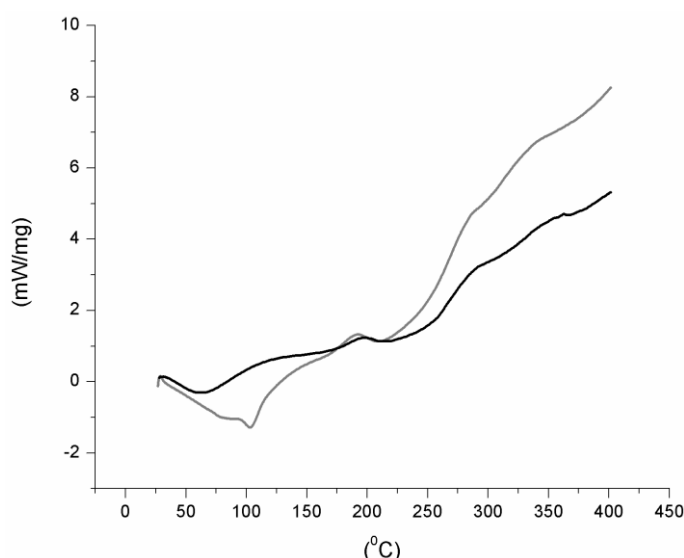
**Figura 92.** Termograma de DSC do composto (**3b**) (preto) e da quitosana sintetizada (verde). Fluxo de calor ( $\text{mW mg}^{-1}$ ) versus Temperatura (°C).

Diferentemente que no composto (**3a**), o composto (**3b**) apresentou uma melhora na capacidade de absorção e adsorção de água e outros compostos voláteis na região até 180 °C, quando comparado à quitosana sintetizada, o que pode ser observado pelo aumento da entalpia no pico endotérmico.

Isto pode estar relacionado ao fato de a inserção do composto (**1**) ter contribuído para o desnovelamento do polímero e consequente melhora na capacidade de adsorção de água e outros voláteis pela exposição de sítios de ligação. No entanto, a ligação de água e outros compostos voláteis ao composto (**3b**) é feita de maneira mais fraca, uma vez que a liberação ocorre em temperaturas mais baixas, isso pode ter relação com o fato dos sítios de ligações mais fortes na quitosana estarem comprometidos com o composto (**1**) (KADOUCHE et al., 2012; PIVARCIOVÁ et al., 2014; KYZAS e KOSTOGLU, 2015; XU et al., 2017; UNNITHAN et al., 2017; PEREIRA et al., 2017).

A Figura 93 ilustra a análise de DSC comparando os compostos **(3a)** (cinza) e **(3b)** (preto), onde se observa que não há diferença significativa no perfil térmico, tendo os dois compostos comportamentos térmicos semelhantes em temperaturas muito próximas.

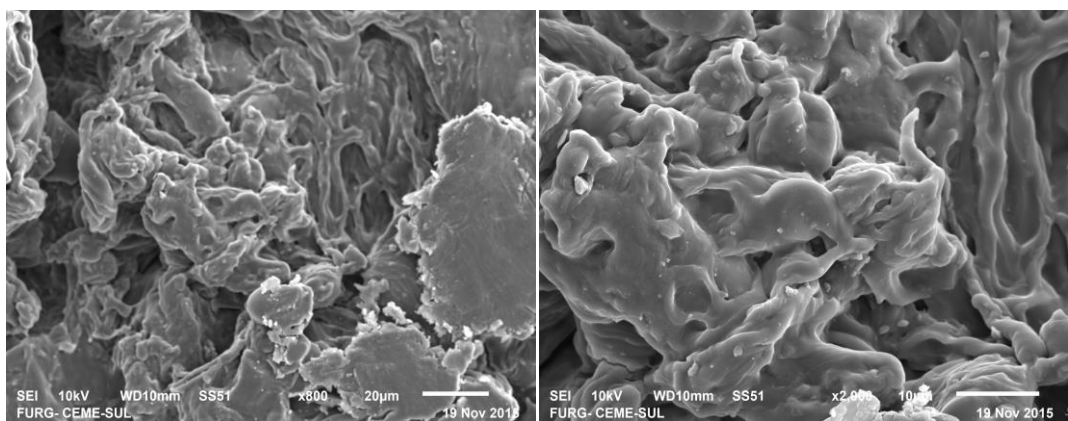
No entanto, é possível afirmar que em temperatura até 180 °C o composto **(3b)** evidenciou uma maior capacidade de adsorção de água e outros compostos voláteis, o que pode ser comprovado comparando-se as entalpias dos picos endotérmicos de  $\Delta H = 9,84 \text{ J g}^{-1}$  para o composto **(3a)** e  $\Delta H = 85,65 \text{ J g}^{-1}$  para o composto **(3b)**. No entanto, a ligação da água e outros compostos voláteis é mais forte no composto **(3a)** do que no composto **(3b)**, uma vez que o pico endotérmico ocorre em menor temperatura em **(3b)**.



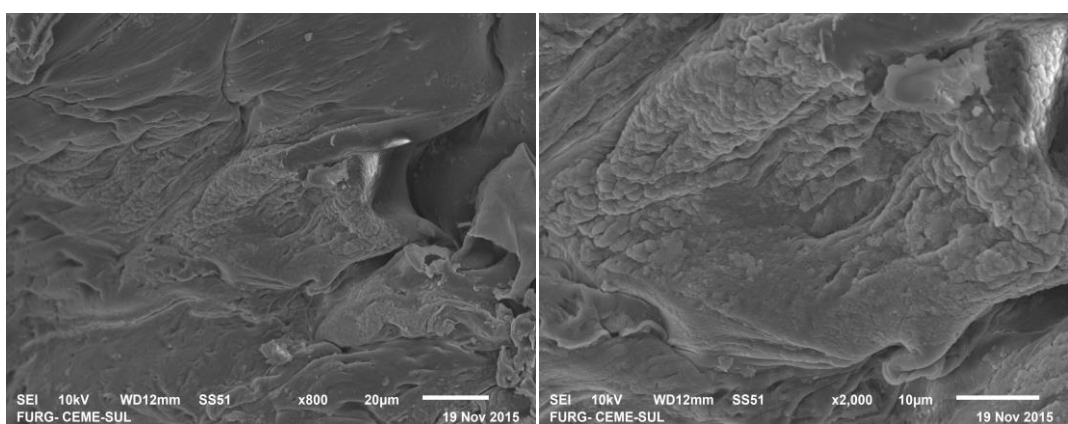
**Figura 93.** Sobreposição dos espectros de DSC dos compostos **(3a)** cinza e **(3b)** preto. Fluxo de calor ( $\text{mW mg}^{-1}$ ) versus temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ).

Através da análise de MEV, Figura 96 e 97, realizada com magnitude de 800 e 2000 X, respectivamente, é possível observar que os compostos **(3a)** e **(3b)** apresentam superfície diferentes.

O composto **(3a)** apresenta uma superfície irregular, com maior possibilidade de formação de poros, já o composto **(3b)** apresenta-se mais homogênea e laminar, o que não é esperado, uma vez que o DSC evidenciou maior capacidade de adsorção de água para o composto **(3b)**, então se esperava que este composto fosse mais poroso, com maior superfície de contato que o composto **(3a)**. Assim, é possível que os poros em **(3b)** sejam menores que 10  $\mu\text{m}$ .

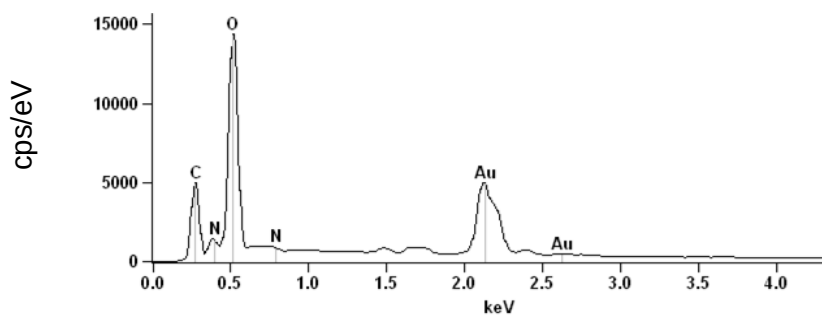


**Figura 94.** Micrografia em MEV do composto (3a).

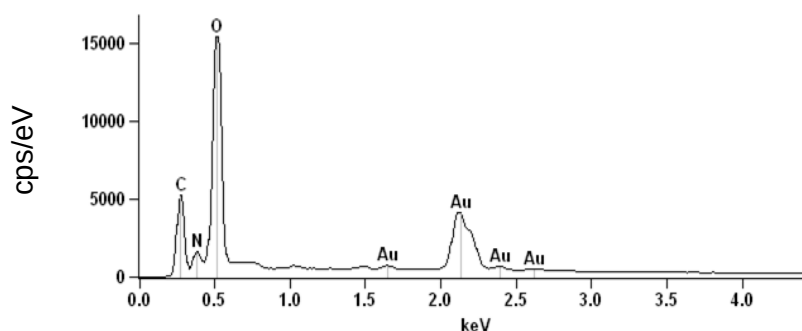


**Figura 95.** Micrografias do composto (3b).

A análise de EDS, acoplado ao MEV, identificou qualitativamente os átomos presentes nos compostos (3a) e (3b). Os espectros nas Figuras 96 e 97 evidenciaram a presença de carbono, nitrogênio e oxigênio em 0,282; 0,392 e 0,523 keV respectivamente, sendo estes átomos característicos das estruturas do composto (1) e da quitosana, precursores dos compostos (3a) e (3b).



**Figura 96.** Espectro de EDS do composto (3a). Intensidade (cps eV<sup>-1</sup>) versus energia (keV).



**Figura 97.** Espectro de EDS do composto (**3b**). Intensidade (cps eV<sup>-1</sup>) versus energia (keV).

O suporte de 1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazeno 1-óxido (**1**) em quitosana comercial e quitosana sintetizada para formação dos compostos (**3a**) e (**3b**) foi realizada de forma inédita e com êxito.

A quitosana é vastamente modificada com diferentes materiais para melhoramento da sua capacidade de adsorção de cátions metálicos, entre outras aplicações (SHAMOV et al., 2002; HAMDINE et al., 2005; HAMDINE et al., 2006; CHEN et al., 2008; YALÇINKAYA et al., 2010; GÜMÜSOĞLU et al., 2011; GHOSH e ALI, 2012; KADOUCHE et al., 2012; FADZALLAH et al., 2014; PIVARCIOVÁ et al., 2014; KYZAS e KOSTOĞLOU, 2015; PEREIRA et al., 2017; UNNITHAN et al., 2017; XU et al., 2017). Os compostos formados, de forma inédita, neste trabalho (**3a**) e (**3b**), são promissores para serem utilizados neste tipo de aplicação, por serem compostos com capacidade quelante através do grupo triazeno 1-óxido.

## 5.8 Caracterização dos Compostos (**4a**) e (**4b**)

O composto (**4a**) é originado do suporte do composto (**2**) em quitosana comercial, já o composto (**4b**) é originado do suporte do composto (**2**) em quitosana sintetizada.

A partir das condições de síntese 1:1 de quitosana: composto (**2**) a estrutura para os (**4a**) e (**4b**) é proposta a partir de interações eletrostáticas entre grupos amino protonados (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) da quitosana com grupos carboxilatos (-COO<sup>-</sup>) do composto (**2**) (Figura 98)

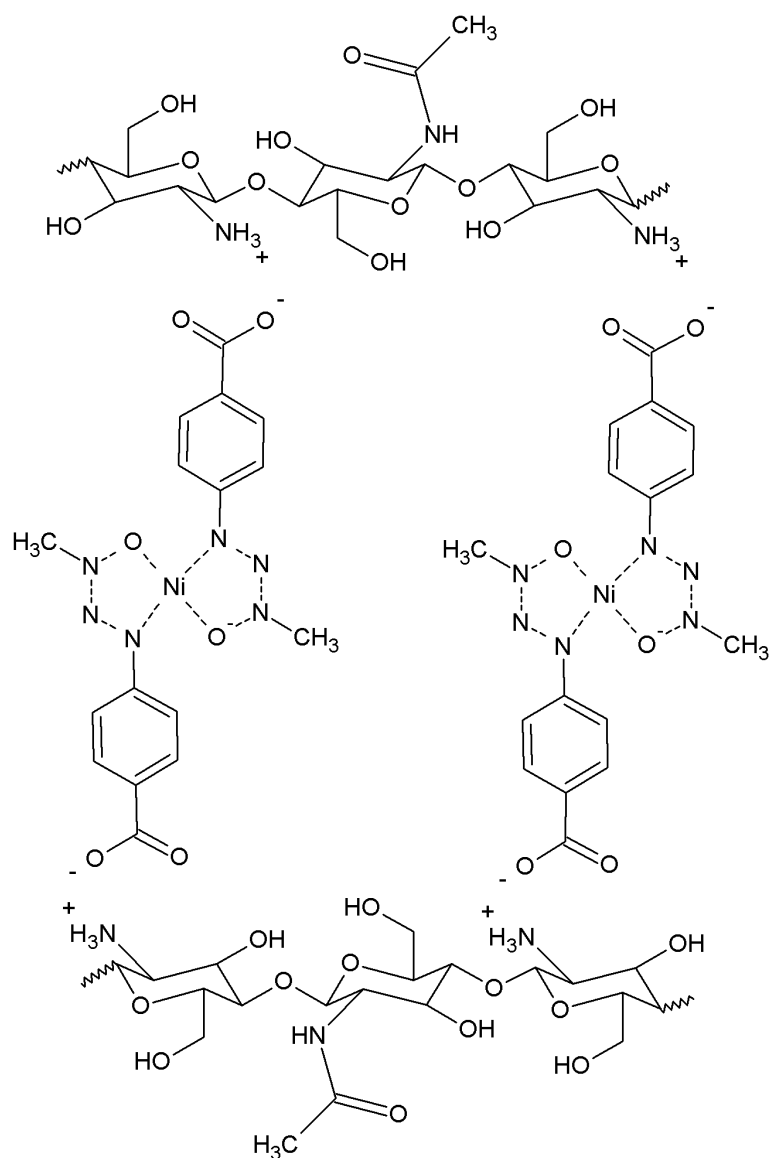
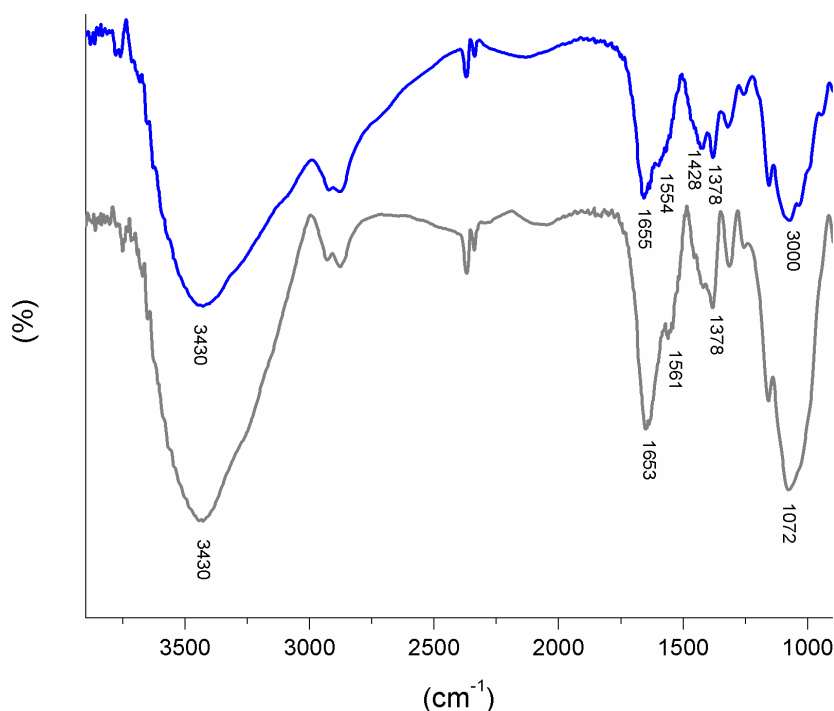


Figura 98. Estrutura proposta para os compostos (**4a**) e (**4b**), evidenciando o suporte do composto (**2**) em quitosana.

A Figura 99 ilustra os espectros de FTIR da quitosana comercial (azul) e do composto (**4a**) (cinza). Podem ser observadas bandas características da quitosana que não apresentaram deslocamentos nos números de onda sendo estas bandas em  $3430\text{ cm}^{-1}$  [ $\nu\text{O-H}$  sobreposto  $\nu\text{N-H}$ ],  $1655\text{ cm}^{-1}$  [ $\delta\text{N-H}$ ] pertencente à deformação  $\text{NH}_2$  a qual se sobrepõem a banda [ $\nu\text{C=O}$ ] e em  $1378\text{ cm}^{-1}$  [ $\delta\text{sC-H}$ ].

Assim, em comparação com a quitosana, o composto (**4a**) evidencia uma melhor definição da banda referente à  $[\nu\text{C=O}]$  em  $1653\text{ cm}^{-1}$ , o que indica o suporte do composto (**2**) na quitosana. A literatura sugere que a presença do “pequeno ombro” em  $1561\text{ cm}^{-1}$ , referente à  $\text{NH}_3^+$ , comprova a inserção do composto (**2**) na quitosana formando o composto (**4a**) a partir de interações eletrostáticas entre o grupamento amino protonado da quitosana e o grupamento carboxilato do composto (**2**) (NAGIB et al., 1999; BECKER et al., 2000; BODDU et al., 2003; OSMAN et al., 2002; BARAN et al., 2008; VIJAYA et al., 2008; BEKHEIT et al., 2011; LI et al., 2013; FADZALLAH et al., 2014; MI et al., 2015; LIAO et al., 2016; ARAUJO et al., 2017). Além disso, o alargamento da banda em  $1378\text{ cm}^{-1}$  pode ser indicativo de  $[\nu\text{NNN}]$  muito característico do composto (**2**).



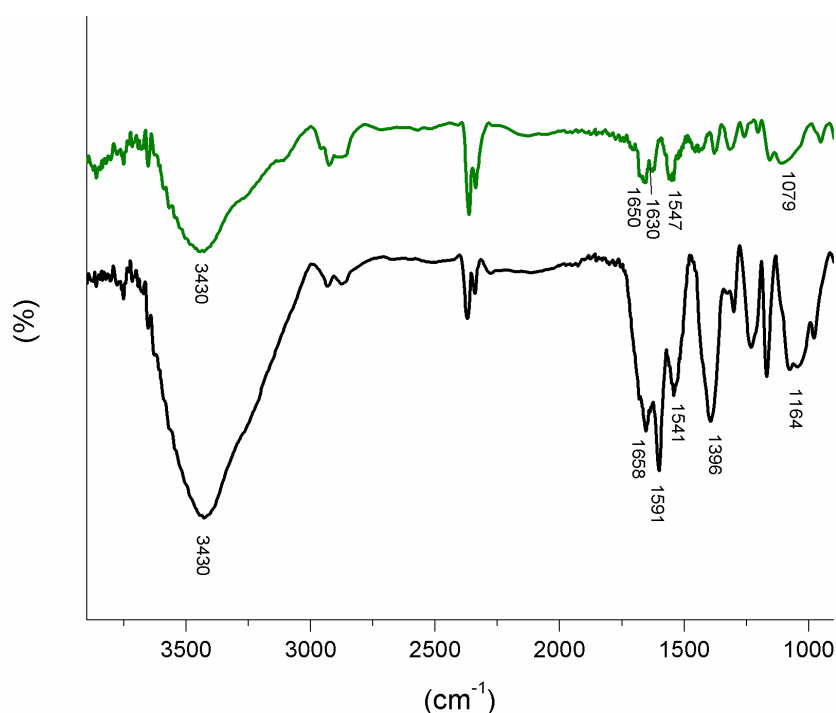
**Figura 99.** Espectro de FTIR da quitosana comercial (azul) e do composto (**4a**) (cinza).  
Transmitância (%) versus Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

As mesmas bandas são observadas na formação do composto (**4b**) onde a Figura 100 ilustra os espectros da quitosana sintetizada (verde) e do composto (**4b**) (preto).

Podem ser observadas que as bandas características da quitosana em  $1650\text{ cm}^{-1}$  em  $1630\text{ cm}^{-1}$ . Já na formação do composto (**4b**) é observado um



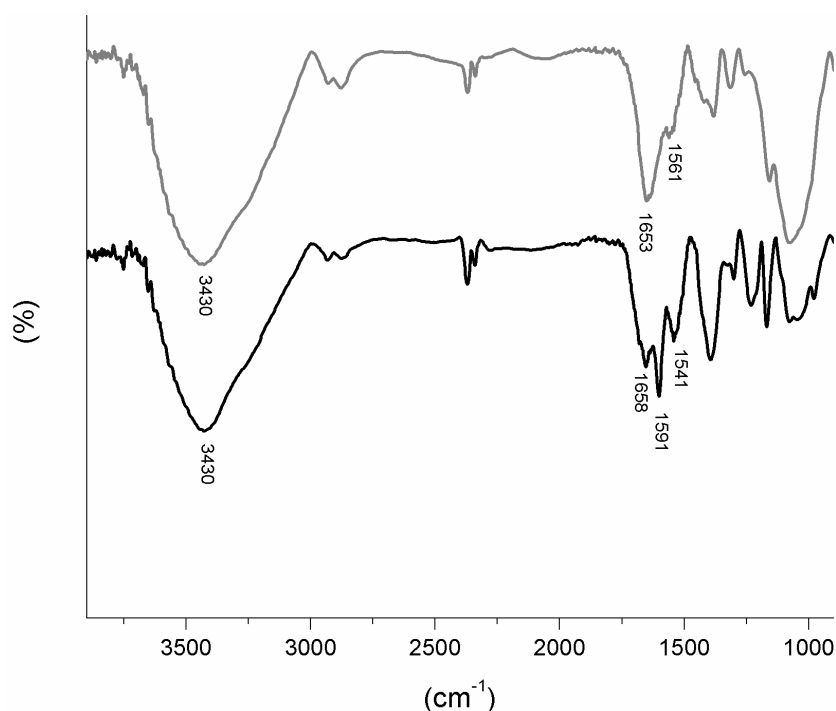
deslocamento nas bandas, sendo uma banda é visualizada em  $1658\text{ cm}^{-1}$  e outra banda destaca-se em  $1591\text{ cm}^{-1}$ . O destaque da banda em  $1591\text{ cm}^{-1}$  é indicativo da interação do carboxilato do composto **(2)** com o grupamento amino da quitosana, já que faz referência ao grupo  $[\text{NH}_3^+]$ . Além disso, deve-se destacar o surgimento da banda  $[\nu\text{NNN}]$  em  $1396\text{ cm}^{-1}$  bem característica do composto **(2)**, indicando seu suporte em quitosana. (NAGIB et al., 1999; BECKER et al., 2000; BODDU et al., 2003; OSMAN et al., 2002; BARAN et al., 2008; VIJAYA et al., 2008; BEKHEIT et al., 2011; LI et al., 2013; FADZALLAH et al., 2014; MI et al., 2015; LIAO et al., 2016; ARAUJO et al., 2017).



**Figura 100.** Espectro de FTIR da quitosana sintetizada (verde) e do composto **(4b)** (preto). Transmitância (%) versus Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Do mesmo modo que na formação dos compostos **(3a)** e **(3b)**, o grau de desacetilação das quitosanas estudadas (comercial 94 % e sintetizada 66 %) influenciou na formação dos compostos **(4a)** e **(4b)** uma vez que a interação ocorre nos grupos amino da quitosana, então se há maior quantidade deles na quitosana comercial, então esta quitosana está mais propícia a reticulação proposta pela inserção do composto **(2)** (NAGIB et al., 1999; BECKER et al., 2000; BODDU et al., 2003; OSMAN et al., 2002; BARAN et al., 2008; VIJAYA et al., 2008; BEKHEIT et al., 2011; LI et al., 2013; PIVARCIOVÁ et al., 2014;

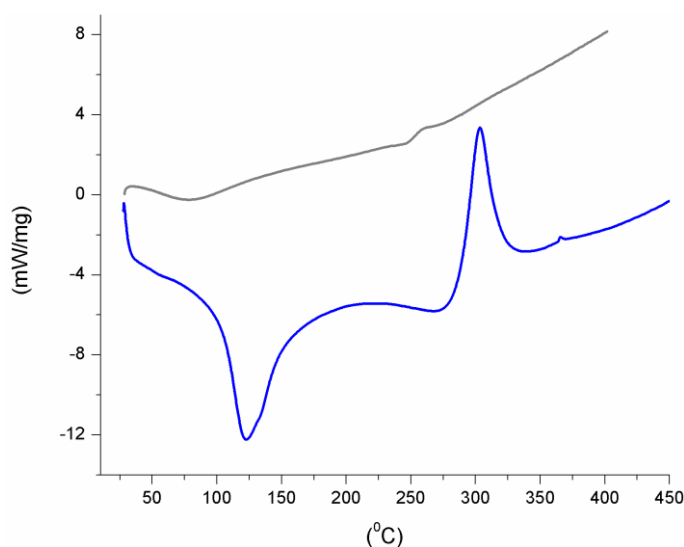
YUDHASASMITA e NUGROHO, 2015; KYZAS e KOSTOGLU, 2015; NGUYEN et al., 2016; SANTOS et al., 2016).



**Figura 101.** Espectro de FTIR dos compostos **(4a)** cinza e **(4b)** preto. Transmitância (%) *versus* Número de onda (cm<sup>-1</sup>).

A Figura 102 ilustra a análise de DSC da quitosana comercial (azul) e do composto **(4a)** (cinza). Observa-se para o composto **(4a)** um primeiro pico, endotérmico, com valores de  $T_{\text{onset}}$ : 59,46 °C;  $T_{\text{endset}}$ : 105,61 °C;  $T_{\text{pico}}$ : 78,32 °C e  $\Delta H = 46,86 \text{ J g}^{-1}$  sendo referente à evaporação de água e outros compostos voláteis, um segundo pico exotérmico com valores de  $T_{\text{onset}}$ : 232,15 °C;  $T_{\text{endset}}$ : 242,37 °C;  $T_{\text{pico}}$ : 236,81 °C e  $\Delta H = - 0,92 \text{ J g}^{-1}$  e, um terceiro pico exotérmico, com valores de  $T_{\text{onset}}$ : 250,55 °C;  $T_{\text{endset}}$ : 269,79 °C;  $T_{\text{pico}}$ : 266,34 °C e  $\Delta H = - 11,79 \text{ J g}^{-1}$ . Este terceiro pico é característico do composto **(2)** sendo que havia sido evidenciado em 258,40 °C com  $\Delta H = - 8,42 \text{ J g}^{-1}$ . O efeito térmico endotérmico do composto **(4a)**  $\Delta H = 46,86 \text{ J g}^{-1}$  apresentou entalpia menor do que na quitosana comercial  $\Delta H = 185,74 \text{ J g}^{-1}$ , além disso, a perda dos compostos voláteis no composto **(4a)** ocorre em menores temperaturas indicando que a adsorção de água é menor e sua ligação é menos intensa no composto **(4a)** que na quitosana, o que indica que os sítios de ligação com água na quitosana agora estão ocupados com a ligação ao composto **(2)**. Ao comparar

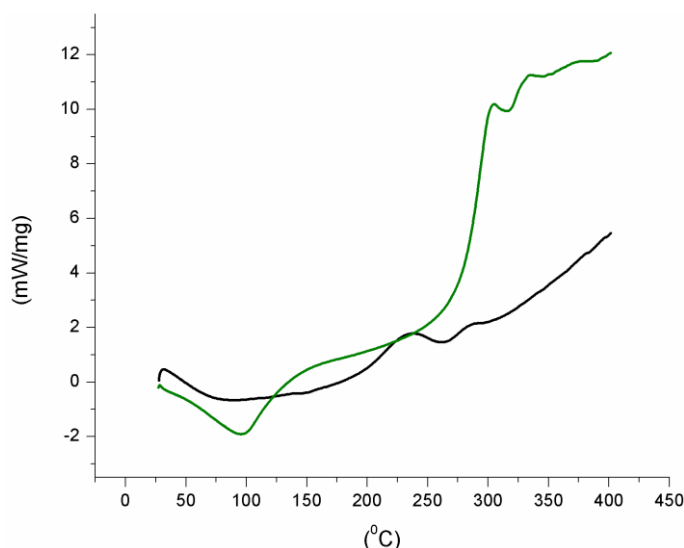
o efeito endotérmico de **(4a)** (78,32 °C,  $\Delta H = 46,86 \text{ J g}^{-1}$ ) com **(3a)** (103,66 °C,  $\Delta H = 9,84 \text{ J g}^{-1}$ ) observa-se que a inserção do cátion  $\text{Ni}^{\text{II}}$  contribuiu na melhora da capacidade de adsorção de água, no entanto esta interação é mais fraca.



**Figura 102.** Termograma de DSC do composto **(4a)** (cinza) e da quitosana comercial (azul). Fluxo de calor ( $\text{mW mg}^{-1}$ ) versus Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ).

A Figura 103 ilustra a análise de DSC da quitosana sintetizada (verde) e do composto **(4b)** (preto). Observa-se para o composto **(4b)** um efeito endotérmico referente à evaporação de água e outros compostos voláteis e dois efeitos exotérmicos. O efeito endotérmico foi observado com valores de  $T_{\text{onset}}$ : 64,11 °C;  $T_{\text{endset}}$ : 90,87 °C;  $T_{\text{pico}}$ : 88,50 °C;  $\Delta H = 14,56 \text{ J g}^{-1}$  e os efeitos exotérmicos apresentam valores de  $T_{\text{onset}}$ : 214,69 °C;  $T_{\text{endset}}$ : 256,62 °C;  $T_{\text{pico}}$ : 237,87 °C;  $\Delta H = -63,03 \text{ J g}^{-1}$  e de  $T_{\text{onset}}$ : 272,36 °C;  $T_{\text{endset}}$ : 298,51 °C;  $T_{\text{pico}}$ : 295,82 °C;  $\Delta H = -12,32 \text{ J g}^{-1}$ . O composto **(4b)** apresenta picos característicos do composto **(2)** sendo um endotérmico e dois exotérmicos em faixas de temperatura semelhantes. Já comparando os valores das entalpias endotérmicas da quitosana sintetizada e composto **(4b)**,  $\Delta H = 43,34 \text{ J g}^{-1}$  e  $\Delta H = 14,56 \text{ J g}^{-1}$ , respectivamente, observa-se que o composto **(4b)**, apresentou menor entalpia indicando que houve menor adsorção de água em **(4b)** uma vez que os sítios de ligação na quitosana, antes ocupados por água agora são ocupados pelo composto **(2)**, além disso, a adsorção de água no composto **(4b)** é mais fraca, uma vez que a liberação dos voláteis ocorre em temperatura menor

que a evidenciada na quitosana sintetizada (OSMAN et al., 2002; BARAN et al., 2008; VIJAYA et al., 2008; BEKHEIT et al., 2011; LI et al., 2013; FADZALLAH et al., 2014; MI et al., 2015; SANTOS et al., 2016; LIAO et al., 2016; ARAUJO et al., 2017).

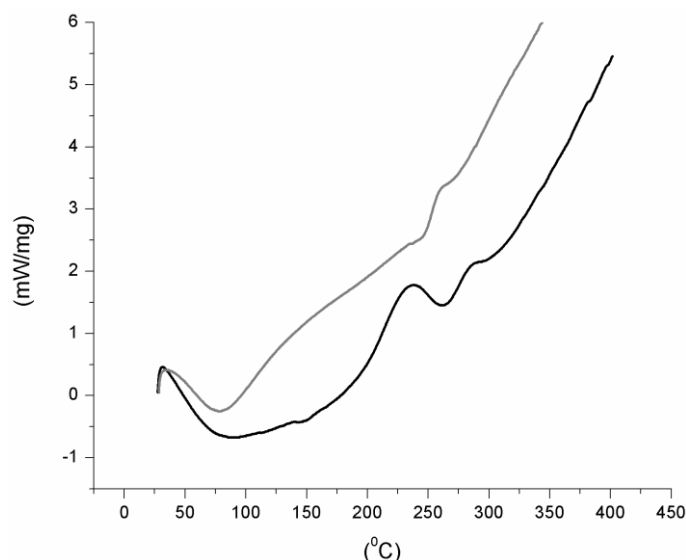


**Figura 103.** Termograma de DSC do composto **(4b)** (preto) e da quitosana sintetizada (verde). Fluxo de calor (mW mg<sup>-1</sup>) versus Temperatura (°C).

A análise comparativa do termograma dos compostos **(4a)** cinza e **(4b)** preto está ilustrada na Figura 104. O perfil térmico dos compostos **(4a)** e **(4b)** se assemelham entre si e também ao perfil térmico do composto **(2)** com pico endotérmico de 64,30 °C e picos exotérmicos em 260,11 °C e 307,28 °C. Já, ao comparar os compostos **(4a)** e **(4b)** observa-se que na região de 200 °C a entalpia é maior ( $\Delta H = -63,03 \text{ J g}^{-1}$ ) para **(4b)** quando comparada a entalpia do composto **(4a)** ( $\Delta H = -0,92 \text{ J g}^{-1}$ ), o que indica que a interação do composto **(2)** com a quitosana sintetizada foi mais intensa que com a quitosana comercial, o que evidencia que o grau de desacetilação maior da quitosana comercial não teve relevância na interação entre quitosana e composto **(2)** (NAGIB et al., 1999; BECKER et al., 2000; BODDU et al., 2003; OSMAN et al., 2002; BARAN et al., 2008; VIJAYA et al., 2008; BEKHEIT et al., 2011; LI et al., 2013; FADZALLAH et al., 2014; MI et al., 2015; SANTOS et al., 2016; LIAO et al., 2016; ARAUJO et al., 2017).

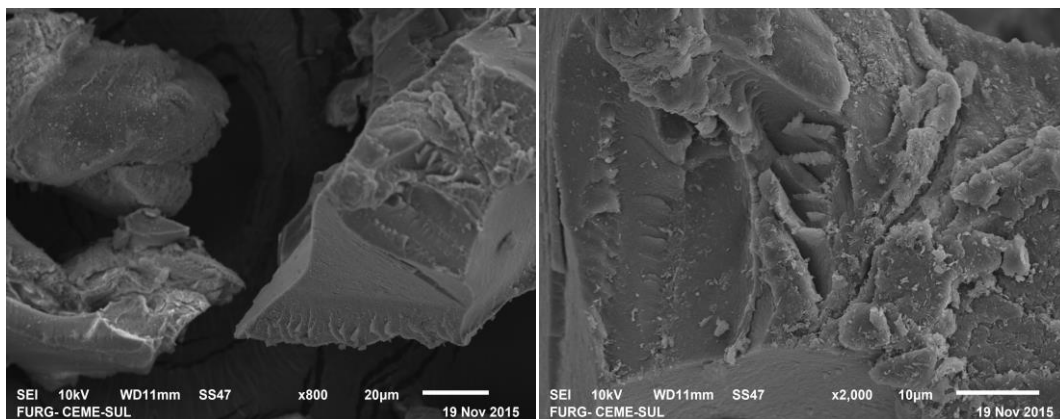
Ao avaliar os picos endotérmicos, numa comparação entre **(4a)** (78,32 °C e  $\Delta H = 46,86 \text{ J g}^{-1}$ ) e **(4b)** (88,50 °C e  $\Delta H = 14,56 \text{ J g}^{-1}$ ) observa-se que o

composto **(4a)** tem uma capacidade maior de adsorção de água, no entanto neste composto a interação com a água é menos intensa. Isto pode estar ligado ao fato de o composto **(4a)** ser formado por quitosana comercial cujo grau de desacetilação é maior que a quitosana sintetizada presente em **(4b)**.

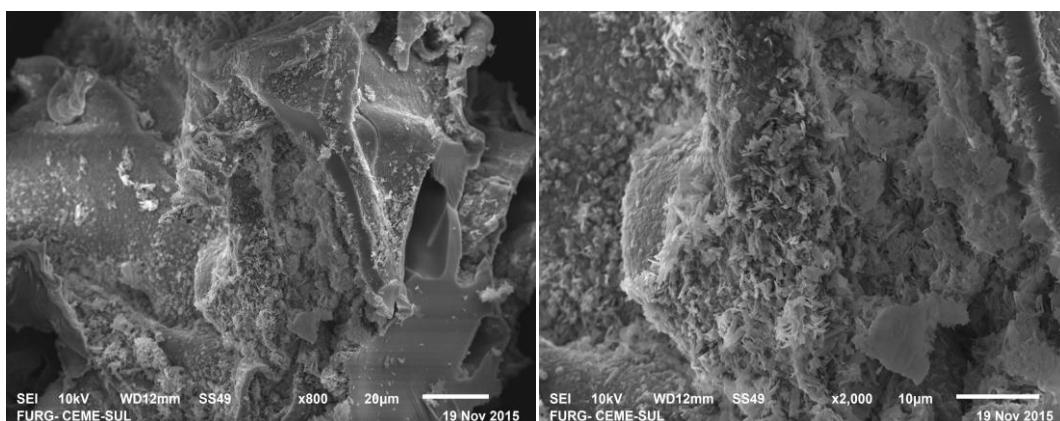


**Figura 104.** Sobreposição dos espectros de DSC dos compostos **(4a)** cinza e **(4b)** preto. Fluxo de calor (mW mg<sup>-1</sup>) versus temperatura (°C).

Ao comparar as entalpias endotérmicas dos compostos **(4b)**, **(3b)** e quitosana sintetizada evidencia-se para **(4b)** 88,50 °C ( $\Delta H = 14,56 \text{ J g}^{-1}$ ), **(3b)** 62,37 °C ( $\Delta H = 85,65 \text{ J g}^{-1}$ ) e quitosana sintetizada 95,26 °C ( $\Delta H = 43,34 \text{ J g}^{-1}$ ), logo é possível observar uma melhora na estabilidade térmica na adsorção de água e outros voláteis de **(4b)** em relação à **(3b)**. Assim, a inserção do cátion Ni<sup>II</sup> auxiliou nesta melhora de estabilidade, no entanto o composto **(4b)** é o que apresenta menor capacidade de adsorção de água, uma vez que os sítios de ligação na quitosana estão ocupados pela inserção do complexo **(2)**. Através da análise de MEV, Figuras 105 e 106, realizada com magnitude de 800 e 2000X, é possível observar que o composto **(4b)** apresenta superfície irregular bem como o composto **(4a)**, no entanto parece ser um pouco mais poroso o que não é esperado, uma vez que o DSC evidenciou maior capacidade de adsorção de água para o composto **(4a)**, então se esperava que este composto fosse mais poroso, com maior superfície de contato que o composto **(4b)**. Assim, é possível que os poros em **(4a)** sejam menores que 10  $\mu\text{m}$ .

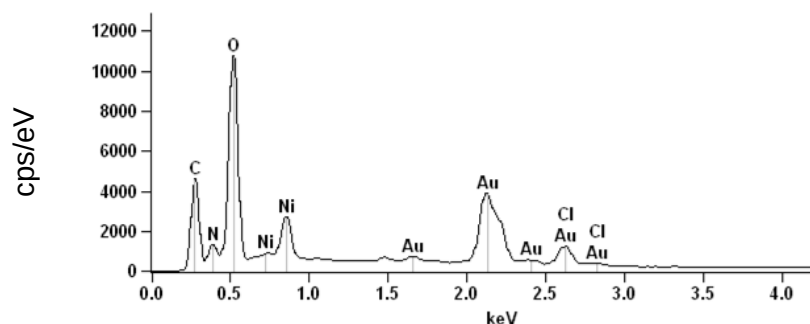


**Figura 105.** Micrografia do composto (4a).

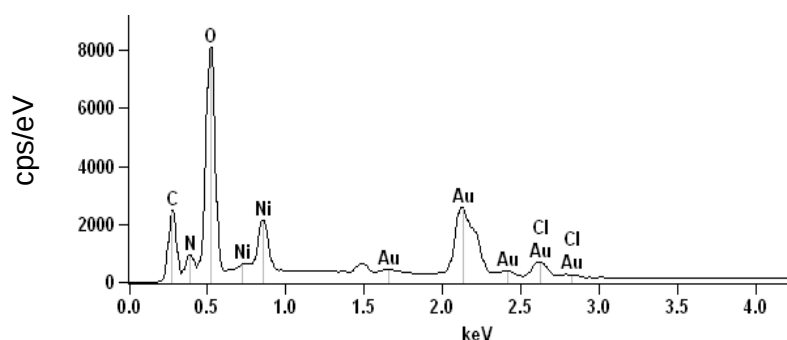


**Figura 106.** Micrografias do composto (4b).

A análise de EDS identificou qualitativamente e semi quantitativamente os átomos presentes nos compostos (4a) e (4b). As Figuras 107 e 108 evidenciam a presença dos constituintes esperados para os compostos: carbono, nitrogênio, oxigênio, níquel e cloro em 0,282; 0,392; 0,523; 0,849 e 2,622 keV, respectivamente. A presença do níquel comprova o suporte do composto (2) na quitosana, estando este na proporção atômica de 5,60 % para o composto (4a) e 6,86 % para o composto (4b). Observa-se que há uma maior porcentagem atômica de níquel no composto (4b), o que está de acordo com o que foi observado pelos termogramas de DSC que evidenciaram interação mais forte entre o composto (2) e a quitosana sintetizada, além de menor adsorção de água no composto (4b). A presença do cloro se dá pela utilização do reagente  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  na síntese *in situ* do composto (2) durante o preparo dos compostos (4a) e (4b).



**Figura 107.** Espectro de EDS do composto (**4a**). Intensidade (cps eV<sup>-1</sup>) versus energia (keV).



**Figura 108.** Espectro de EDS do composto (**4b**). Intensidade (cps eV<sup>-1</sup>) versus energia (keV).

A formação dos compostos (**4a**) e (**4b**) a partir do suporte de *bis*[1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazenido 1-óxido]Ni<sup>II</sup> (**2**) em quitosana comercial e sintetizada, respectivamente, ocorreu de forma inédita e com êxito.

A comparação entre os compostos (**4a**) e (**4b**) evidenciou pequenas diferenças em relação à morfologia e estabilidade térmica, mostrando que o composto (**4b**) formado a partir de quitosana sintetizada é uma alternativa promissora para utilização de resíduos de cascas de camarão na obtenção de materiais híbridos. Estes materiais como (**4a**) e (**4b**) são promissores para várias aplicações, entre elas na área da química podendo ser utilizados como catalisadores heterogêneos de reações orgânicas (GUIMARÃES et al., 2004; PERGHER et al., 2015).

## 6. Considerações Finais

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram o sucesso no suporte de 1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazeno 1-óxido (**1**) e de *bis*[1-metil-3-(*p*-carboxifenil)triazeno 1-óxido]Ni<sup>II</sup> (**2**) em quitosana comercial e sintetizada, na elaboração de materiais poliméricos orgânicos (**3a** e **3b**) e inorgânicos (**4a** e **4b**) inéditos.

A síntese da quitosana a partir das cascas de camarão rosa, através de planejamento fatorial para as três etapas (desmineralização, desproteinização e desacetilação) e caracterização comparativa à amostra comercial também evidenciaram sucesso. No entanto, a maior diferença entre a quitosana sintetizada e comercial ficou evidente no grau de desacetilação de 66 % e 94 %, respectivamente, sendo este o único fator que a diferencia das especificações de quitosana da marca Sigma de peso molecular médio. No entanto, a quitosana sintetizada leva certa vantagem sobre a quitosana comercial, uma vez que nela é possível modular as propriedades desejadas, como massa molecular e grau de desacetilação, a partir de suas condições de síntese.

Cada uma das amostras obtidas foi devidamente caracterizada por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia de energia dispersiva (EDS) acoplada a microscopia eletrônica de varredura (MEV) o que foi essencial para a caracterização comparativa da quitosana comercial e sintetizada com os compostos (**1**), (**2**), (**3a**), (**3b**), (**4a**) (**4b**) obtidos neste trabalho, sendo todos os compostos inéditos, com exceção do composto (**1**).

A análise por espectroscopia na região do IV foi a técnica mais importante utilizada, uma vez que foi através dela que se pôde inferir que as interações nos compostos (**3a**), (**3b**), (**4a**) e (**4b**) são eletrostáticas, sem caráter covalente, através dos deslocamentos observados nas bandas ou surgimento de ombros e bandas que caracterizavam a presença de grupos amino protonados da quitosana ou a inserção do composto desejado.



Assim, a imobilização de ligantes quelantes triazenos 1-óxido, bem a como a imobilização de complexos triazenidos 1-óxidos em quitosana abrem espaço a uma nova classe de compostos suportados em quitosana, com suas várias possibilidades de aplicação nas áreas da química, química de materiais, biotecnologia, entre outras.

## 7. Referências Bibliográficas

- ABDEL-RAHMAN R. M.; HRDINA R.; ABDEL-MOHSEN A. M.; FOU DA M. M. G.; SOLIMAN A. Y.; MOHAMED F. K.; MOHSIN K.; PINTO T. D. Chitin and chitosan from Brazilian Atlantic Coast: Isolation, characterization and antibacterial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 107-120, 2015.
- AFANAS'EVA N. V.; PETROVA V. A.; VLASOVA E. N.; GLADCHENKO S. V.; KHAYRULLIN A. R.; VOLCHEK B. Z.; BOCHEK A. M. Molecular mobility of chitosan and its interaction with montmorillonite in composite films: Dielectric spectroscopy and FTIR studies. **Polymer Science Series A**, v. 55, n. 12, p. 738-748, 2013.
- ALIZADEH K.; REZAEI B.; KHAZAEI E. A new triazene-1-oxide derivative, immobilized on the triacetylcellulose membrane as an optical  $Ni^{2+}$  sensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 193, p. 267-272, 2014.
- ALSARRA, I. A., BETIGERI, S. S., ZHANG, H.; EVANS, B. A.; NEAU, S. H. Molecular weight and degree of deacetylation effects on lipase-loaded chitosan bead characteristics. **Biomaterials**, v. 23, p. 3637-3644, 2002.
- ANTONINO N. A., Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundo da indústria pesqueira paraibana. Dissertação Mestrado, UFPB, João Pessoa, 2007.
- ANTONY R.; DAVID S. T.; SARAVANAN K.; KARUPPASAMY K.; BALAKUMAR S. Synthesis, spectrochemical characterization and catalytic activity of transition metal complexes derived from Schiff base modified chitosan. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 103, p. 423-430, 2013.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, <http://portal.anvisa.gov.br/legislacao/?inheritRedirect=true#/visualizar/27595>, acessado em março de 2015.
- ARANCIBIA M. Y.; ALEMÁN A.; LÓPEZ-CABELLERO M. E.; GÓMES-GUILLÉN M. C.; MONTERO P. Development of active films of chitosan isolated by mild extraction with added protein concentrate from shrimp waste. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 91-99, 2015.
- ARAÚJO E. L.; BARBOSA H. F. G.; DOCKAL E. R.; CAVALHEIRO E. T. G. Synthesis, characterization and biological activity of Cu(II), Ni(II) and Zn(II) complexes of biopolymeric Schiff bases of salicylaldehydes and chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 168-176, 2017.
- ASSIS A. S.; STAMFORD T. C. M.; STAMFORD T. L. M. Bioconversão de resíduo de camarão *Litopenaeus vannamei* (Booner, 1931) para a produção de biofilme de quitosana. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 9, n. 5, p. 480-491, 2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 16. Ed. Arlington: **AOAC**. v. 1. 1995.

AZEVEDO V. V. C.; CHAVES S. A.; BEZERRA B. C.; FOOK M. V. L.; COSTA A. C. F. M. Quitosana e quitina: Aplicações em biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, n. 3, p. 27-34, 2007.

BAJAJ M.; FREIBERG A.; WINTER J.; XU Y.; GALLERT C. Pilot-scale chitin extraction from shrimp waste by deprotonation and decalcification with bacterial enrichment cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 9835-9846, 2015.

BAJAJ M.; WINTER J.; GALLERT C. Effect of deproteination and deacetylation conditions on viscosity of chitin and chitosan extracted from *Crangoncrangon* shrimp waste. **Biochemical Engineering Journal**, v. 51, p. 51-62, 2011.

BARAN E. J. Spectroscopic investigation of the VO<sub>2</sub><sup>+</sup>/chitosan interaction. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 704-706, 2008.

BARBER P. S.; GRIGGS C. S.; BONNER J. R.; ROGERS R. D. Electrospinning of chitin nanofibers directly from an ionic liquid extract of shrimp shells. **Green Chemistry**, v. 15, p. 601-607, 2013.

BARON R.; SOCOL M.; ARHALIASS A.; BRUZAC S.; ROUX K. L.; PINO J. R.; BERGÉ, J. P.; KAAS R. Kinetic study of solid phase demineralization by weak acids in one-step enzymatic bio-refinery of shrimp cuticles. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 2215-2223, 2015.

BATTISTI M. V.; CAMPANA-FILHO S. P. Obtenção e caracterização de  $\alpha$ -quitina e quitosanas da casca de *Macrobrachium rosebergii*. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2014-2019, 2008.

BECK J.; HÖRNER M.; DITTMANN G. A. Macrocyclic bistriazene and its complexes with divalent metal ions. **European Journal of Inorganic Chemistry**, p. 4314-4319, 2009.

BECKER T.; SCHLAAK M.; STRASDEIT H. Adsorption of nickel(II), zinc(II) and cadmium(II) by new chitosan derivatives. **Reactive & Functional Polymers**, v. 44, p. 289-298, 2000.

BEKHEIT M. M.; NAWAR N.; ADDISON A. W.; ABDEL-LATIF D. A.; MONIER M. Preparation and characterization of chitosan-grafted-poly(2-amino-4,5-pentamethylene-thiophene-3-carboxylic acid N-acryloyl-hydrazide) chelating resin for removal of Cu(II), Co(II) and Ni(II) metal ions from aqueous solutions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, p. 558-565, 2011.

BHATNAGAR A.; SILLANPÄÄ M. Applications of chitin- and chitosan-derivatives for the detoxification of water and wastewater — A short review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 152, p. 26-28, 2009.

BIONDO C. E. G.; BIONDO P. B. F.; VISENTAINER J. V.; MUÑIZ G. I. B.; NEVES A. C.; BALLESTER E. L. C.; WIEST A. M.; ALVES H. J. Charred shrimp shells treated with potassium fluoride used as a catalyst for the transesterification of soybean oil with methanol. **Journal of Renewable and Sustainable Energy**, v. 7, n. 5, p. 1941-7012, 2015.

BEHERA B.; CHAKRAVORTY A. Some observations on triazene 1-oxide complexes of bivalent nickel, palladium and copper. **Inorganica Chimica Acta**, v. 4, p. 372-376, 1970.

BODDU V. M.; ABBURI K.; TALBOTT J. L.; SMITH E. D. Removal of Hexavalent Chromium from Wastewater Using a New Composite Chitosan Biosorbent. **Environmental Science & Technology**, v. 37, p. 4449-4456, 2003.

BRUGNEROTTO, J.; LIZARDI, J.; GOYCOOLEA, F.M.; ARGUELLAS-MONAL, W.; DESBRIÈRES, J.E.; RINAUDO, M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. **Polymer**, v. 42, p. 35-69, 2001.

BURUIANA E. C.; NICULESCU V.; BURUIANA T. Synthesis and properties of new polyurethane ionomers.I. Photosensitive cationomers with triazene units. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 88, p. 1203–1210, 2002.

CAMPANA-FILHO<sup>a</sup> S. P.; SIGININI R.; CARDOSO M. B. Propriedades e Aplicações de Quitosana. **Revista Processos Químicos da Faculdade de Tecnologia SENAI Roberto Mange**, v. 1, n. 2, ano 1, p. 9-20, julho/dezembro 2007.

CAMPANA-FILHO<sup>b</sup>, S. P.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R. L. Extração, estruturas e propriedades de  $\alpha$  e  $\beta$  quitina. **Química Nova**, v. 30, p. 644-650, 2007.

CHADRAN R.; WILLIAMS L.; HUNG A.; NOWLIN K.; LAJEUNESSE D. SEM characterization of anatomical variation in chitin organization in insect and arthropod cuticles. **Micron**, v. 82, p. 74-85, 2016.

CHEN P.; KUO T. Y.; LIU F. H.; HWANG I. H.; HO M.; WANG D. M.; LAI J.Y.; HSIEH H. J. Use of Dicarboxylic Acids to Improve and Diversify the Material Properties of Porous Chitosan Membranes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 9015-9021, 2008.

CHEN, R. H., HWA, H. D. Effect of molecular weight of chitosan with the same degree of deacetylation on the thermal, mechanical, and permeability properties of the prepared membrane. **Carbohydrate Polymers**, v. 29, p. 353-358, 1996.

CHORIT W.; PATTHANAMANEE W.; MANURAKCHINAKORN S. Use of response surface method for the determination of demineralization efficiency in fermented shrimp shells. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 6168-6173, 2008.

CIUNIK B. Z.; WOLNY J. A.; RUDOLF M. F. Structure of *bis*(1-ethyl-3-p-nitrophenyltriazene 1-oxide) nickel (II). **Acta Crystallographica**, v. C47, p. 2539-2541, 1991.

CIUNIK Z.; DRABENT K.; SZTERENBERG L. Molecular conformation *versus* C–H...Ph weak hydrogen bonds in 4-(4-H-1,2,4-triazol-4-yl)-2-X-phenylmethanimine (X=CH<sub>3</sub>; Cl; Br) crystals. **Journal of Molecular Structure**, v. 641, p. 175-182, 2002.

CORAZZARI I.; NISTICÒ R.; TURCI F.; FAGA M. G.; FRANZOSO F.; TABASSO S.; MAGNACCA G. Advanced physico-chemical characterization of chitosan by means of TGA coupled on-line with FTIR and GCMS: Thermal degradation and water adsorption capacity. **Polymer Degradation and Stability**, v. 112, p. 1-9, 2015.

CRAVEIRO A. A. CRAVEIRO A. C. QUEIROZ D.C. Quitosana: a fibra do futuro. Parque de desenvolvimento tecnológico – PADETEC, Fortaleza, Ceará, 124p., 1999.

DÁMARIS NÚÑEZ GÓMEZ, Potencial Da Casca De Camarão Para Remediação De Águas Contaminadas Com Drenagem Ácida Mineral Visando Seu Reuso Secundário Não Potável, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, pág 80-81, 2014.

DAMASCENO K. S. F. S. C.; ANDRADE S. A. C.; STAMFORD T. L. M. Aproveitamento do resíduo de camarão. **B-CEPPA**, v. 27, n. 2, p. 215-221, 2009.

DEMETGÜL C.; SERIN S. Synthesis and characterization of a new vic-dioxime derivative of chitosan and its transition metal complexes. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, p. 506-512, 2008.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEULEN, A.; DEBEVERE, J. Chitosan: Antimicrobial activity, Interactions with Food Components and Applicability as a Coating on Fruit and Vegetables. **Food Microbiology**, v. 21, p. 703-714, 2004.

DU J.; TAN E.; KIM H. J.; ZHANG A.; BHATTACHARYA R.; YAREMA K. J. Comparative evaluation of chitosan, cellulose acetate, and polyethersulfone nanofiber scaffolds for neural differentiation. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 483-490, 2014.

DWIVEDI G. L.; SRIVASTAVA R. C. The crystal and molecular structure of *bis*-(1-methyl-3-*o*-chlorophenyltriazene 1-oxide)nickel(II). **Acta Crystallographica Section B**, v. B32, p. 1446-1449, 1976.

EINBU A.; NAEISS S. N.; ELGSAETER A.; VÁRUM M. Solution properties of chitin in alkali. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 2048-2054, 2004.

ELKINS M.; HUNTER L. The azo-group as a chelating group. **Part III. Metallic Derivatives of Hydroxytriazens**, v. 252, p. 1346-1350, 1938.

ENDERS D.; RIJKSEN C.; BREMUS-KÖBBERLING E.; GILLNER A.; KÖBBERLING J. A triazene-based new photolabile linker in solid phase chemistry. **Tetrahedron Letters**, v. 45, p. 2839-2841, 2004.

FADZALLAH I.A.; MAJID S. R.; CAREEM M.A.; AROF A. K. A study on ionic interactions in chitosan–oxalic acid polymer electrolyte membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 463, p. 65-72, 2014.

FARINHA, I.; DUARTE, P.; PIMENTEL, A.; PLOTNIKOVA, E.; CHAGAS, B.; MAFRA, L.; GRANDFILS, C.; FREITAS, F.; FORTUNATO, E.; REIS, M. A. M. Chitin–glucan complex production by *Komagataella pastoris*: Downstream optimization and product characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 130, p. 455-464, 2015.

FEREYDUNI E.; ROFOUEI M. K.; KAMAEED M.; RAMALINGAMD S.; SHARIFKHANI S. M. Single crystal structure, spectroscopic (FT-IR, FT-Raman,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR) studies, physico-chemical properties and theoretical calculations of 1-(4-chlorophenyl)-3-(4-nitrophenyl)triazene. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 90, p. 193–201, 2012.

FU, M.; TANG, L.; ZHANG, P. and SHEN, D. Study on adsorption mechanism of Cr (VI) by CHT. *Gongcheng Kexueban*, (Journal of Sichuan Union University), v. 1, p. 8-13, 1997.

GALED, G.; MIRALLES, B.; PANÑS, I.; SANTIAGO, A.; HERAS, A. N-Deacetylation and depolymerization reactions of chitin/chitosan: Influence of the source of chitin. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, p. 316–320, 2005.

GHOLIVAND M. B.; MOHAMMADI M.; KHODADADIAN M.; ROFOUEI M. K. Novel platinum(II) selective membrane electrode based on 1,3-bis(2-cyanobenzene)triazene. **Talanta**, v. 78, p. 922-928, 2009.

GHORBEL-BELLAAJ O.; YOUNES I.; MAÑLEJ H.; HAJJI S., NASRI M. Chitin extraction from shrimp shell waste using *Bacillus* bacteria. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 1196-1201, 2012.

GHOSH A.; ALI M. A. Studies on physicochemical characteristics of chitosan derivatives with dicarboxylic acids. **Journal of Materials Science**, v. 47, p. 1196-1204, 2012.

GUIBAL, E. Heterogeneous catalysis on chitosan-based material: a review. **Progress in Polymer Science**, v.30, p. 71-109, 2005.

GUIMARÑES P. I. C., COUNTINHO F. M. B., MARIA L. C. S., COSTA M. A. S., JUNIOR L. C. F., Emprego de catalisadores a base de níquel para Homo-Copolimerização de Estireno, *Química Nova*, 27(6): 925-933, 2004.

GÜMÜSOGLU, T.; ARI, G.A.; DELIGÖZ, H. Investigation of salt addition and acid treatment effects on the transport properties of ionically cross-linked polyelectrolyte complex membranes based on chitosan and polyacrylic acid. **Journal of Membrane Science**, 376: 25-34, 2011

HAFSA J.; SMACH M. A.; CHARFEDDINE B.; LIMEM K.; MAJDOUB H.; ROUATBI S. Antioxidant and antimicrobial proprieties of chitin and chitosan extracted from *Parapenaeus Longirostris* shrimp shell waste. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 74, p. 27-33, 2016.

HAJJI S.; GHORBEL-BELLAAJ O.; YOUNES I.; JELLOULI K.; NASRI M. Chitin extraction from crab shells by *Bacillus* bacteria. Biological activities of fermented crab supernatants. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 167-173, 2015.

HAMDINE M.; HEUZEY M. C.; BÉGIN A. Viscoelastic properties of phosphoric and oxalic acid-based chitosan hydrogels. **Rheologica Acta**, v. 45, p. 659-675, 2005.

HAMDINE M.; HEUZEY M. C.; BÉGIN A. Effect of organic and inorganic acids on concentrated chitosan solutions and gels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 37, p. 134-142, 2006.

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

HENNIG, E. L. Utilização de quitosana obtida de resíduos de camarão para avaliar a capacidade de adsorção de íons  $\text{Fe}^{3+}$ . Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande – RS, 2009.

HÖRNER M.; GIGLIO V. F.; SANTOS A. J. R. W. A.; WESTPHALEN A. B.; IGLESIAS B. A.; MARTINS P. R.; AMARAL C. H.; MICHELOT T. M.; REETZ L. G. B.; BERTONCHELI C. M.; PARAGINSKI G. L.; HORNER R. Triazenos e atividade antibacteriana. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 441-449, 2008.

HÖRNER M.; OLIVEIRA J. S.; BORDINHAO J.; BECK J. trans-Bis[1-methyl-3-(p-nitrophenyl)triazenido 1-oxide-k<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O]dipyridine-nickel(II). **Acta Crystallographica**, v. C58, p. m586-m587, 2002.

HOSSAIN, M.S., IQBAL, A. Effect of shrimp chitosan coating on postharvest quality of banana (*Musa sapientum* L.) fruits **International Food Research Journal** v.23, n.1, p.277-283, 2016.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, [http://www.inmetro.gov.br/barreirastecnicas/pontofocal/..%5Cpontofocal%5Ctextos%5Cregulamentos%5CBRA\\_173\\_add\\_1.htm](http://www.inmetro.gov.br/barreirastecnicas/pontofocal/..%5Cpontofocal%5Ctextos%5Cregulamentos%5CBRA_173_add_1.htm), acessado em março 2015.

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry, <http://goldbook.iupac.org/html/U/U06554.html>, acessado em janeiro 2016.

JIANG, C. J.; XU, M. Q. Kinetics of heterogeneous deacetylation of  $\beta$ -chitin. **Chemical Engineering Technology**, v. 29 (4), p. 511-516, 2006.

JIANG, X.; CHEN, L.; ZHONG, W. (2003). A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, p. 457-463, 2003.

JIN J.; HASSANZADEH P.; PEROTTO G.; SUN W.; BRECKLE M. A.; OMENETTO F. G.; ROLANDI M. A biomimetic composite from solution self-assembly of chitin nanofibers in a silk fibroin matrix. **Advanced Materials**, p. 1-5, 2013.

KADOUCHE S.; LOUNICI H.; BENAOUMEUR K.; DROUCHE N.; HADIOUI M.; SHARROCK P. Enhancement of sedimentation velocity of heavy metals loaded hydroxyapatite using chitosan extracted from shrimp waste. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 20, p. 848-857, 2012.

KARMAKAR S.; CHOUDHURY S. B.; RAY D.; CHAKRAVORTY A. Thioether-ligated nickel, synthesis, x-ray crystal structure and redox behavior of complexes of hexadentate ligands incorporating thioether and triazene-1-oxide functions. **Polyhedron**, v. 12, n. 3, p. 291-296, 1993.

KAYA M.; AKATA I.; BARAN T.; MENTES A. Physicochemical properties of chitin and chitosan produced from medicinal fungus (*Fomitopsis pinicola*). **Food Biophysics**, v. 10, p. 162-168, 2014.

KAYA M.; BAUBLYS V.; SATKAUSKIENE I.; AKYUZ.; BULUT E.; TUBELYTE V. First chitin extraction from *Plumatella repens* (Bryozoa) with comparison to chitins of insect and fungal origin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 126-132, 2015.

KIA R.; A new tetranuclear copper(I) cluster of 1,3-bis(4-bromophenyl)triazene ligand: Synthesis, characterization, structural and computational studies. **Inorganica Chimica Acta**, v. 446, p. 32-40, 2016.

KOBAE Y.; KAWACHI M.; SAITO K.; KIKUCHI Y.; EZAWA T.; MAESHIMA M.; HATA S.; FOJIWARA T. Up-regulation of genes involved in N-acetylglucosamine uptake and metabolism suggests a recycling mode of chitin intraradical mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycorrhiza**, v. 25, p. 411-417, 2015.

KOUSHA M.; TAVAKOLI S.; DANESHVAR E.; VAZIRZADEH A.; BHATNAGAR A. Central composite design optimization of Acid Blue 25 dye biosorption using shrimp shell biomass. **Journal Biomolecular Liquids**, v. 207, p. 266-273, 2015.

KUMAR A.; EDRAH S. M. Spectral Studies of Some Triazenes 1-oxides. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 6, n. 8, p. 1096-1099, 2010.

KUMAR, M.N.V.R.; MUZZARELLI, R.A.A.; MUZZARELLI, C.; SASHIWA, H.; DOMB, A.J. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. **Chemical Reviews**, v.104, p.6017-6084, 2004.

KUMARI S.; RATH P.; KUMAR A. S.; TIWARI T. N. Extraction and characterization of chitin and chitosan from fishery waste by chemical method. **Environmental Technology & Innovation**, v. 3, p. 77-85, 2015.

KUMIRSKA J.; CZERWICKA M.; KACZYNSKY Z.; BYCHOWSKA A.; BRZOSOWSKY K.; THÖMIG J.; STEPNOWSKY P. Application of Spectroscopic Methods of Structural Analysis of Chitin and Chitosan. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1567-1636, 2010.

KYZAS G. Z.; KOSTOGLU M. Swelling-adsorption Interactions during mercury and nickel ions removal by chitosan derivatives. **Separation and Purification Technology**, v.; 149, p. 92-102, 2015.



LARANJEIRA, M. C. M.; FÁRVERE, V. T. Quitosana: Biopolímero Funcional com Potencial Industrial Biomédico. **Química Nova**, v. 32, p. 672-678, 2009.

LI W. Y.; LIU J.; CHEN H.; DENG Y.; ZHANG B.; WANG Z.; ZHANG X.; HONG S. Application of oxalic acid cross-linking activated alumina/chitosan biocomposites in defluoridation from aqueous solution. Investigation of adsorption mechanism. **Chemical Engineering Journal**, v. 225, p. 865-872, 2013.

LI, X.; ANTON, N.; ARPAGAU, C.; BLELLETEIX, F.; VANDAMME, T.F. Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90. **Journal of Controlled Release**, v. 147, p. 304-310, 2011.

LIAO B.; SUN W. Y.; GUO N.; DING S. L.; SU S. J. Equilibriums and kinetics studies for adsorption of Ni(II) ion on chitosan and its triethylenetetramine derivative. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 501, p. 32-41, 2016.

LIU R.; ZHANG H.; LIU S.; ZHANG X.; WU T.; GE X.; ZANG Y.; ZHAO H.; WANG G. Shrimp-shell derived carbon nanodots as carbon and nitrogen sources to fabricate three-dimensional N-doped porous carbon electrocatalysis for the oxygen reduction reaction. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 18, p. 4095-4101, 2016.

LOPES W. A.; FASCIO M., Equema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.

MAHDAVINIA G. R.; SOLEYMANI M.; NIKKHOO M.; FARNIA S. M. F.; AMINI M. Magnetic (chitosan/laponite)-immobilized copper(II) ions: an efficient heterogeneous catalyst for azide-alkyne cycloaddition. **New Journal of Chemistry**, v. 41, p. 3821-3828, 2017.

MARTINS, P. C. Quitosana como catalisador na transesterificação do óleo de soja para produção de biodiesel. Dissertação de Mestrado, PGQ- UNB, 2008.

MENDES A. A.; OLIVEIRA P. C.; CASTRO H. F.; GIORDANO R. de L. C. Application of chitosan as support for immobilization of enzymes of industrial interest. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

MENDHAM, R. C.; DENNEY, J. D.; BARNES E. M. J. K; THOMAS.VOGEL: Análise Química Quantitativa. 6ª Ed., Rio de Janeiro: LTC, 2002.

MI F. L.; WU S. J.; LIN F. M. Adsorption of copper(II) ions by a chitosan-oxalate complex biosorbent. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 136-144, 2015.

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

MOURA C.; MUSZINKISKI P.; SCHMID C.; ALMEIDA J.; PINTO L.; Quitosana e quitina produzidas a partir de resíduos de camarão e siri: Avaliação do processo em escala piloto. **Vetor**, v. 16, n. ½, p. 37-45, 2006.

MOURA J. M.; FARIAS B. S.; RODRIGUES D. A. S.; MOURA C. M.; DOTTO G. L.; PINTO L. A. A. Preparation of chitosan with different characteristics and its application for biofilms production. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 23, p. 470-477, 2015.

MOURA, C. M. Avaliação da reação de desacetilação da quitina e estudo da secagem de pellets de quitosana para a aplicação em filmes poliméricos. Dissertação de mestrado, PPGECA, Furg, 2008.

NAGIB S.; INOUE K.; YAMAGUCHI T.; TAMARU T. Recovery of Ni from a large excess of Al generated from spent hydrodesulfurization catalyst using picolylamine type chelating resin and complexane types of chemically modified chitosan. **Hydrometallurgy**, v. 51, p. 73-85, 1999.

NARANG, J.; CHAUHAN, N.; PUNDIR, C. S. Construction of triglyceride biosensor based on nickel oxide–chitosan/zinc oxide/zinc hexacyanoferrate film. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, p. 45-51, 2013.

NGUYEN M. L.; HUANG C.; JUANG R. S. Synergistic biosorption between phenol and nickel (II) from Binary mixtures chemically and biologically modified chitosan beads. **Chemical Engineering Journal**, v. 286, p. 68-75, 2016.

NIDHEESH T.; SURESH P. V. Optimization of condition for isolation of high quality chitin from shrimp processing raw byproduct its using response surface methodology and its characterization. **Journal Food Science Technology**, v. 52, n. 6, p. 3812-3823, 2015.

OSMAN Z.; AROF A. K. FTIR studies of chitosan acetate based polymer electrolytes. **Electrochimica Acta**, v. 48, p. 993-999, 2002.

PARAGINKI G. L.; SANTOS A. J. R. W. A.; HORNER M.; BECK J.; BACK D. F. 1-(2-biphenyl)-3-methyltriazene-N-oxide as a template for intramolecular copper(II)-arene- $\pi$  interactions. **Journal of Molecular Structure**, v. 1104, p. 79-84, 2016.

PAULINO A. T., SIMIONATO, J. I., GARCIA J. C., NOZAKI, J. Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides. **Carbohydrate Polymers**, v 64 p98-103, 2006.

PERCOT, A.; VITON, C.; DOMARD, A. Characterization of shrimp shell deproteinization. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 1380–1385, 2003.

PEREIRA A. E. S.; SANDOVAL-HERRERA I. E.; ZAVALA-BETANCOURT S. A.; OLIVEIRA H. C.; LEDEZMA-PÉREZ A. S.; ROMERO J.; FRACETO L. F. Gama-Polyglutamic acid/chitosan nanoparticles for the plant growthregulator gibberellic acid: Characterization and evaluation ofbiological activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1862-1873, 2017.

PERGHER S. B. C., GUSMÃO K. B., SOUZA R. F., NICOLA B. P., ROSSETTO E., Heterogeneous complexes of nickel (II) MCM-41 with  $\beta$ -diimine ligands: Applications in oleofin oligomerization, **Journal of Catalysis**, 45-54, 2015.

PIANA, C.F. de B.; MACHADO, A. de A.; SELAU, L. P. R. Estatística Básica. Pelotas: UFPel, Instituto de Física e Matemática. 2009.

PIVARCIOVA L.; ROSSKOPFOVÁ O.; GALAMBOS M.; RAJEC P. Sorption of nickel and chitosan. **Journal Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 300, p. 361-366, 2014.

QU J.; GENG C.; LV S.; SHAO G.; MAS S.; WU M. Nitrogen, oxygen and phosphorus decorated porous carbon derived from shrimp shells from supercapacitors. **Electrochemical Acta**, v. 176, p. 992-988, 2015.

RAJAN M.; MURUGANB M.; PONNAMMAC D.; SADASIVUNIC K. K.; MUNUSAMYD M. A. Poly-carboxylic acids functionalized chitosan nanocarriers for controlled and targeted anti-cancer drug delivery. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 83, p. 201-211, 2016.

RAMAPRASAD A. T.; VIJAYALAKSHMI R.; PRAVEENA M.; SANJEEV G.; RAMANANI S. P.; SABHARWAL S. Preparation of Crosslinked Chitosan by Electron Beam Irradiation in the Presence of  $\text{CCl}_4$  **Journal of Applied Polymer Science**, v. 111, n. 2, p. 1063-1068, 2008.

RAO W.; WANG H.; HAN J.; ZHAO S.; DUMBLETON J.; AGARWAL P.; ZHANG W.; ZHAO G.; YU J.; ZYNGER D. L.; LU X.; HE X. Chitosan-Decorated Doxorubicin-Encapsulated Nanoparticle Targets and Eliminates Tumor Reinitiating Cancer Stem-like Cells. **ACN Nano**, v. 9, n. 6, p. 5725-5740, 2015.

REGE, P. R.; GARMISE, R. J.; BLOCK, L. H. Spray-dried chitinosans Part I: preparation and characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 252, p. 41-51, 2003.

RHAZI, M.; DESBRIÈRES, J.; TOLAIMATE, A.; ALAGUI, A.; VOTTERO, P. Investigation of different natural sources of chitin: influence of the source and deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan, **Polymers International**, v. 49, p. 337-344, 2000.

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

RINAUDO, M.; MILAS, M.; DUNG, L. P., Characterization of chitosan. Influence os ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 15, p. 281-285, 1993.

RIOS-CALOCH G.; SANTES V.; ESCOBAR M.; VALLE-ORTA M.; BARRERA M. C.; HERNANDEZ-BARRERA M. Effect of chitosan addition on  $\text{NiMo/Al}_2\text{O}_3$  catalysts for dibenzothiophene hydrodesulfurization. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**, v. 10, n. 1, p. 1542-6580, 2012.

RITTHIDEJ G. C.; PHAECHAMUD T.; KOIZUMI T. Moist heat treatment on physicochemical change of chitosan salt films. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 232, p. 11-22, 2002.

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

RODRIGUES M. I. E LEMMA A. F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos – 2ª Ed. – Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2009.

ROFOUEI M. K., HEMATYAR M., GHOLIPOUR V., GHARAMALEKI J. A. Syntheses, structures, thermal behavior and solution studies of two types of Hg(II) complexes with [1,3-di(2-methoxy)benzene]triazene. **Inorganica Chimica Acta**, v. 362, p. 3777-3784, 2009.

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

SAGHEER F. A. A.; AL-SUGHAYER M. A.; MUSLIM S.; ELSABEE M. Z. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 410-419, 2009.

SAMANTA C.; MUKHERJEE A. K.; MUKHERJEE M. 3-(o-Carboxyphenyl)-l-ethyltriazene 1-Oxide **Acta Crystallographica**, v. c54, p. 1544-1546, 1998.

SANTOS A. J. R. W. A. Síntese e Arranjos Supramoleculares de Complexos *bis*(triazenido) Macrocíclicos e Triazenido 1-óxido com os Cátions Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>. Tese de doutorado, PPGQ, UFSM, 2010.

SANTOS A. J. R. W. A.; BERSCH P.; OLIVEIRA H. P. M.; HÖRNER M.; PARAGINSKI G. L. Triazene 1-oxide compounds: Synthesis, characterization and evaluation as fluorescence sensor for biological applications. **Journal of Molecular Structure**, v. 1060, p. 264-271, 2014.

SANTOS A. J. R. W. A.; HACKBART H. C. S.; GIACOMINI G. X.; BERSCH P.; PARAGINSKI L. G.; HÖRNER M. Inorganic and organic structures as interleavers among [bis(1-methyl-3-(p-carboxylatephenyl). **Journal of Molecular Structure**, v. 1125, p. 426-432, 2016.

SANTOS A. J. R. W. A.; HÖRNER R.; PARAGINSKI G. L.; MACHADO F. C.; HÖRNER M. Crystal Structure of 3-Phenyl-1-methyltriazene 1-oxide. **Analytical Sciences - The Japan Society for Analytical Chemistry**, v. 23, p. 251-252, 2007.

SANTOS A. J. R. W. A.; HÖRNER R.; PARAGINSKI G. L.; MACHADO F. C.; HÖRNER M. Crystal Structure of 3-Phenyl-1-methyltriazene 1-oxide. **Analytical Sciences**, v. 23, p. 251-252, 2008.

SANTOS J. E.; SOARES J. P.; DOCKAL E. R.; FILHO S. P. C.; CAVALHEIRO E. T. G. Caracterização de quitosana comercial de diferentes origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

SEREBRYANSKAYA T. V.; IVASHKEVICH L. S.; LYAKHOV A. S.; GAPONIK R. N.; IVASHKEVICH O. A. 1,3 *bis*(2-alkyltetrazol-5-yl)triazenes and their Fe(II), Co(II) and Ni(II) complexes: Synthesis, spectroscopy, and thermal properties. Crystal structure of Fe(II) and Co(II) 1,3-*bis*(2-methyltetrazol-5-yl)triazene complexes. **Polyhedron**, v. 29, n.14, p. 2844-2850, 2010.

SHANMUGAPRIYA A.; HEMALATHA M.; SCHOLASTICA B.; PRASAD A. A. T. Adsorption studies of lead (II) and nickel (II) ions on chitosan-G-polyacrylonitrile. **Der Pharma Chemica**, v. 5, p. 141-155, 2013.

SHAMOV M. V.; BRATSKAYA S. Y.; AVRAMENKO V. A. Interaction of Carboxylic Acids with Chitosan: Effect of Pk and Hydrocarbon Chain Length. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 249, p.316-321, 2002.

SHUSHIZADEH M. R.; POUR E. M.; ZARE A.; LASHKARI Z. Persian Gulf  $\beta$ -chitin extraction from *sepia pharaonis* sp. cuttlebone and preparation of its derivatives. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 6, p. 133-142, 2015.

SIGMA ALDRICH®, MSD de Quitosana de Peso Molecular Médio, Ref. 448877 <http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=BR&language=pt&productNumber=448877&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=%252Fcatalog%252Fsearch%253Fterm%253Dchitosan%2526interface%253DAll%2526N%253D0%2526mode%253Dpartialmax%2526lang%253Dpt%2526region%253DBR%2526focus%253Dproduc>, acessado em novembro de 2016.

SILVERSTEIN, R. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos, Tradução Ricardo Bicca de Alencastro, 7 eds. Rio de Janeiro, LTC, 2007.

SINGH J.; ROYCHOUDHURY A.; SRIVASTAVA M.; CHAUDHARY V.; PRASANNA R.; LEE D. W.; LEE S. H.; MALHOTRA B. D. Highly efficient bienzyme functionalized biocompatible nanostructured nickel ferrite–chitosan nanocomposite platform for biomedical application. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 117, p. 8491-8502, 2013.

SJAIFULLAH S.; SANTOSO A. B. Autolytic Isolation of Chitin from White Shrimp (*Penaues Vannamei*) Waste. **Procedia Chemistry**, v. 18, p. 49-52, 2016.

SKOOG D. A.; HOLLER F. J.; NIEMAN T. A. Princípios de Análise Instrumental, 5ª Ed. Bookman, Porto Alegre, RS, 2002.

SKOTUCKA-SZARY K.; RAMIEGA A.; PIASKOWSKA W.; JANICKI B.; GRALA M.; RIESKE P.; BARTCZAK Z.; PIASKOWSKI S. Synthesis and physicochemical characterization of chitin dihexanoate – A new biocompatible chitin derivative – In comparison to chitin dibutyrate. **Materials Science and Engineering C**, v. 60, p. 489-502, 2016.

SMIRNOV G. A.; GORDEEV P. B.; NIKITIN S. V.; LUK'YANOV O. A. Synthesis of 1[(nitroxyalkoxy)methoxy]1triazene 2oxides, new hybrid nitrogen monoxide donors. **Russian Chemical Bulletin**, v. 63, n. 2, p. 487-490, 2014.

SOLANKI P. R.; PATEL M. K.; ALI M. A.; MALHOTRA B. D. A chitosan modified nickel oxide platform for biosensing applications. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, p. 6698-6708, 2015.

SOLOMOS G. T. W.; FRYHLE C. B. Química Orgânica 1 e 2 – 7ª Ed. – São Paulo, SP: LTC Editora, 2006.

SORIANO-GARCÍA M.; RODRÍGUEZ-ROMERO A.; PANNEERSELVAM K.; DE A. Crystal Structure of 3-(o-Carboxyphenyl)-1-methyltriazene-1-oxide. **Analytical Sciences**, v. 12, p. 539-540, 1996.

SREENIVASAN K., Synthesis and characterization of poly(vinylalcohol)- $\beta$ -cyclodextrin copolymer. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 235, n. 1, p. 15-20, 1996.

SRIKET P.; BENJAKUL S.; VISESSANGUAN W.; KIJROONGROJANA K., Comparative studies on chemical composition and thermal properties of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and whit shrimp (*Penaeus vannamei*) meats. **Food Chemistry**, v. 103, n. 4, p. 1199-1207, 2007.

SUGIMOTO M.; MORIMOTO M.; SASHIWA H.; SAIMOTO H.; SHIGEMASA Y., Preparation and characterization of water-soluble chitin and chitosan derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 36, p. 49-59, 1998.

TANGPASUTHADOL, V.; PONGCHASIRIKUL, N.; HOVEN, V. P. Surface modification of chitosan films. Effects of hydrophobicity on protein adsorption. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 937-942, 2003.

TEÓFILO, R.F.; FERREIRA M.C. Quimiometria ii: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29:2 p. 338-350, 2006.

TETREAU G.; DITTMER N. T.; CAO X.; AGRAWAL S.; CHEN Y. R.; MUTHUKARISHNAN S.; HAobo J.; BLISSARD G. W.; KANOST M. R. Analysis of chitin-binding proteins from *Manduca sexta* provides new insights into evolution of peritrophin A-type chitin-binding domains in insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 62, p.; 127-141, 2015.

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

TRIMUKHE K. D.; VARMA A. J. A morphological study of heavy metal complexes of chitosan and crosslinked chitosans by SEM and WAXRD. **Carbohydrate Polymer**, v. 71, p. 698-702, 2008.

UNNITHAN A. R.; SASIKALA A. R. K.; PARK C. H.; KIM C. S. A unique scaffold for bone tissue engineering: An osteogenic combination of graphene oxide–hyaluronic acid–chitosan with simvastatin. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 46, p. 182-191, 2017.

VIJAYA Y.; POPURI S. R.; BODDU V. M.; KRISHNAIAH A. Modified chitosan and calcium alginate biopolymer sorbents for removal of nickel (II) through adsorption. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, p. 261-271, 2008.

WAN-CHI TSAIA, SONIA IBARRA-BUSCANOB, CHI-CHUAN KANG, CYBELLE MORALES FUTALAND, MARIA LOURDES P. DALIDAE, MENG-WEI WANF Removal of copper, nickel, lead, and zinc using chitosan-coated montmorillonite beads in single- and multi-metal system **Desalination and Water Treatment**, v. 57: 21, p. 9799-9812, 2015.

WESKA, R. F., MOURA, J. M., BATISTA, L. M., RIZZI, J.; PINTO, L. A. A. 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 J.; LIN H.; MEREDITH J. C. Poly (ethylene oxide) bionanocomposites reinforced with chitin nanofiber networks. **Polymer**, v. 84, p. 267-274, 2016.

XIAOLIN T; DAFENG T; ZHONGYAN M F. Synthesis and Evaluation of Chitosan-Vitamin C Complexes. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 114, p. 2986-2991, 2009.

XU Y.; ASGHAR S.; YANG L.; LI H.; WANG Z.; PING Q.; XIAO Y. Lactoferrin-coated polysaccharide nanoparticles based on chitosanhydrochloride/hyaluronic acid/PEG for treating brain glioma. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 419-428, 2017.

XU Y.; BAJAJ M.; SCHNEIDER R.; GRAGE S. L.; ULRICH A. S.; WINTER J.; GALLERT C. Transformation of the matrix structure of shrimp shells during bacterial deproteinization and demineralization. **Microbial Cell Factories**, v. 12, n. 90, p. 1-12, 2013.

YALÇINKAYA S.; DEMETGUL C.; TIMUR M.; COLAK N. Electrochemical synthesis and characterization of polypyrrole/chitosan composite on platinum electrode: Its electrochemical and thermal behaviors. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 908-913, 2010.

YANG J.; YU J. H.; STRICKLER J. R.; CHANG W. J.; GUNASEKARAN S. Nickel nanoparticle–chitosan-reduced graphene oxide-modified screen-printed electrodes for enzyme-free glucose sensing in portable micro fluidic devices. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 47, p. 530-538, 2013.

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

YOUNES I.; HAJJI S.; RINAUDO M.; CHAABOUNI M.; JELLOULI K.; NASRI M. Optimization of proteins and minerals removal from shrimp shells to produce highly acetylated chitin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 84, p. 246-253, 2016.

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

YUAN G.; ZHANG X.; TANG W.; SUN H. Effect of chitosan coating combined with green tea extract on the melanosis and quality of Pacific white shrimp during storage in ice. **Journal of Food**, v. 14, n. 1, p. 35-40, 2016.

YUDHASASMITA S.; NUGHOHO A. P. The use of chitosan os shrimp *Penaeus* sp. as cadmium adsorbent. **Environmental Chemistry Technology**, v. 96, n. 7, p. 1029-1033, 2015.

ZACHARIAS P. S.; JHONSON K. E. Spectral and magnetic behaviour of some nickel (II) and cobalt (II) complexes of triazene 1-oxides. **Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry**, v. 38, p. 1957-1962, 1976.

ZAWISZA B.; SITKO R. Pre-concentration procedure based on chitosan combined with ionic liquid for the determination of cobalt, nickel, and copper in water samples. **Applied Spectroscopy**, v. 67, n. 5, p. 536-541, 2013.

ZHANG H.; FANG J.; DENG Y.; ZHAO Y. Optimized production of *Serratia marcescens* B742 mutants for preparing chitin from shrimp shells powders. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 69, p. 319-328, 2014.

ZHANG H. L.; WU S. H.; TAO Y.; ZANG L. Q.; SU Z. Q. Preparation and characterization of water-soluble chitosan nanoparticles as protein delivery system. **Journal of Nanomaterials**, v. 2010, p.1-5, 2009.



## **ANEXOS**

## ANEXO A – ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Em todos os três planejamentos fatoriais a condição de tempo foi avaliada a fim de buscar um menor tempo de reação.

Para adequação dos planejamentos foram determinadas: as normalidades por Shapiro-Wilk, os efeitos pelo diagrama de Pareto, os efeitos via regressão, as análises de variância (ANOVA), as análises de superfície de resposta e as curvas de contorno através do programa *Statistica 7.0* (STATSOFT, EUA) utilizando um intervalo de confiança de 90%, ou seja,  $p < 0,10$  (TEÓFILO e FERREIRA, 2006; PIANA et al., 2009; RODRIGUES e LEMMA, 2009; AFSAH-HEJRI et al., 2011).

A validade dos resultados obtidos através de métodos paramétricos é fortemente dependente da normalidade dos dados analisados (RODRIGUES e LEMMA 2009; PIANA et al., 2009). A normalidade é o teste utilizado para verificar se a frequência com que um determinado acontecimento observado se desvia significativamente ou não da frequência com que ele é esperado. Quando o número de amostras é pequeno ( $5 < n < 50$ ), é utilizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk (RODRIGUES e LEMMA, 2009).

Já a análise dos efeitos realizados pelo diagrama de Pareto ordena a frequência das ocorrências em uma fácil visualização e identifica as causas ou problemas mais importantes, possibilitando a concentração de esforços sobre os mesmos (RODRIGUES e LEMMA 2009).

A análise do efeito via regressão também foi realizada e permite avaliar se um ou mais fatores estão relacionados um com o outro, bem como sua significância. Ambos os parâmetros estatísticos teste t e valor p foram utilizados para confirmar a significância dos fatores estudados. O teste t, que é a medida do quanto o coeficiente está relacionado com o desvio padrão, foi obtido pela divisão de cada coeficiente pelo desvio padrão. O valor de p é a chance de se obter um alto valor de t (em valores absolutos) apenas por casualidade. O valor do coeficiente de regressão provém da medida do quanto a variabilidade observada nos valores das respostas e pode ser explicado pelos fatores experimentais e suas interações. O coeficiente de regressão apresenta a

equação que descreve o relacionamento em termos matemáticos de primeira ou segunda ordem (TEÓFILO e FERREIRA, 2006; RODRIGUES e LEMMA 2009).

Por fim, as análises de variância descrevem a significância do modelo como um todo a partir dos testes F de Fisher em uma dada significância p, esse teste pode ser calculado pelas equações 10 a 16. Para verificar se os valores são preditivos, os resultados da análise devem ser correlacionados com o F crítico (tabelado), ou seja, pela tabela dos pontos de porcentagem dos graus de liberdade da regressão ( $GL_{Reg}$ ) e dos graus de liberdade do resíduo ( $GL_{Res}$ ) da distribuição F, numa significância p (1, 5 ou 10%) da Tabela de Fisher (Anexo B), se houver uma correção maior que 1, significa que o modelo é preditivo e significativo, ou seja, o modelo é uma função matemática capaz de avaliar um conjunto de fatores agrupados em uma resposta (RODRIGUES e LEMMA 2009), sendo estas, as superfície de resposta e curva de contorno para este estudo.

$$SQ_{Reg} = SQ_T - SQ_{Res} \quad \text{Equação 10}$$

$$SQ_{Res} = SQ_{FA} + SQ_{EP} \quad \text{Equação 11}$$

$$GL_{Reg} = GL_T - GL_{Res} \quad \text{Equação 12}$$

$$GL_{Res} = GL_{FA} + GL_{EP} \quad \text{Equação 13}$$

$$MQ_{Reg} = \frac{SQ_{Reg}}{GL_{Reg}} \quad \text{Equação 14}$$

$$MQ_{Res} = \frac{SQ_{Res}}{GL_{Res}} \quad \text{Equação 15}$$

$$F_{cal} = \frac{MQ_{Reg}}{MQ_{Res}} \quad \text{Equação 16}$$

onde:  $SQ$  é a soma quadrática;  $GL$  os graus de liberdade;  $MQ$  a média quadrática dos parâmetros: regressão ( $_{Reg}$ ), total ( $_T$ ), resíduo ( $_{Res}$ ), falta de ajuste ( $_{FA}$ ) e erro puro ( $_{EP}$ ) e valor de  $F$  calculado ( $F_{cal}$ ).

Em seguida é calculado o valor do predito, de acordo com a função matemática alcançada e o desvio padrão, de acordo com a equação 17.

$$D = \frac{Exp - P}{Exp} \times 100 \quad \text{Equação 17}$$

onde:  $D$  é o desvio padrão;  $Exp$  é o valor experimental e  $P$  é o valor predito calculado pela função matemática montada a partir dos coeficientes e regressão.

## ANEXO B – TABELA DE FISHER 10 %

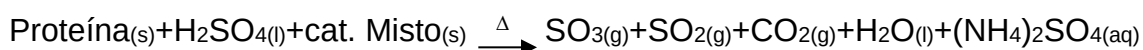
Tabela de pontos de porcentagem de distribuição F, 10% (RODRIGUES e LEMMA 2009).

Tabela 5 - Pontos de porcentagem da distribuição F, 10%.

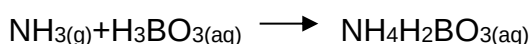
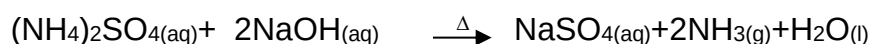
| $\frac{V_1}{V_2}$ | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 12    | 15    | 20    | 24    | 30    | 40    | 60    | 120   | $\infty$ |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|
| 1                 | 39,86 | 49,50 | 53,59 | 55,83 | 57,24 | 58,20 | 58,91 | 59,44 | 59,86 | 60,19 | 60,71 | 61,22 | 61,74 | 62,00 | 62,26 | 62,53 | 62,79 | 63,06 | 63,33    |
| 2                 | 8,53  | 9,00  | 9,16  | 9,24  | 9,29  | 9,33  | 9,35  | 9,37  | 9,38  | 9,39  | 9,41  | 9,42  | 9,44  | 9,45  | 9,46  | 9,47  | 9,47  | 9,48  | 9,49     |
| 3                 | 5,54  | 5,46  | 5,39  | 5,34  | 5,31  | 5,28  | 5,27  | 5,25  | 5,24  | 5,23  | 5,22  | 5,20  | 5,18  | 5,18  | 5,17  | 5,16  | 5,15  | 5,14  | 5,13     |
| 4                 | 4,54  | 4,32  | 4,19  | 4,11  | 4,05  | 4,01  | 3,98  | 3,95  | 3,94  | 3,92  | 3,90  | 3,87  | 3,84  | 3,83  | 3,82  | 3,80  | 3,79  | 3,78  | 3,76     |
| 5                 | 4,06  | 3,78  | 3,62  | 3,52  | 3,45  | 3,40  | 3,37  | 3,34  | 3,32  | 3,30  | 3,27  | 3,24  | 3,21  | 3,19  | 3,17  | 3,16  | 3,14  | 3,12  | 3,10     |
| 6                 | 3,78  | 3,46  | 3,29  | 3,18  | 3,11  | 3,05  | 3,01  | 2,98  | 2,96  | 2,94  | 2,90  | 2,87  | 2,84  | 2,82  | 2,80  | 2,78  | 2,76  | 2,74  | 2,72     |
| 7                 | 3,59  | 3,26  | 3,07  | 2,96  | 2,88  | 2,83  | 2,78  | 2,75  | 2,72  | 2,70  | 2,67  | 2,63  | 2,59  | 2,58  | 2,56  | 2,54  | 2,51  | 2,49  | 2,47     |
| 8                 | 3,46  | 3,11  | 2,92  | 2,81  | 2,73  | 2,67  | 2,62  | 2,59  | 2,56  | 2,54  | 2,50  | 2,46  | 2,42  | 2,40  | 2,38  | 2,36  | 2,34  | 2,32  | 2,29     |
| 9                 | 3,36  | 3,01  | 2,81  | 2,69  | 2,61  | 2,55  | 2,51  | 2,47  | 2,44  | 2,42  | 2,38  | 2,34  | 2,30  | 2,28  | 2,25  | 2,23  | 2,21  | 2,18  | 2,16     |
| 10                | 3,29  | 2,92  | 2,73  | 2,61  | 2,52  | 2,46  | 2,41  | 2,38  | 2,35  | 2,32  | 2,28  | 2,24  | 2,20  | 2,18  | 2,16  | 2,13  | 2,11  | 2,08  | 2,06     |
| 11                | 3,23  | 2,86  | 2,66  | 2,54  | 2,45  | 2,39  | 2,34  | 2,30  | 2,27  | 2,25  | 2,21  | 2,17  | 2,12  | 2,10  | 2,08  | 2,05  | 2,03  | 2,00  | 1,97     |
| 12                | 3,18  | 2,81  | 2,61  | 2,48  | 2,39  | 2,33  | 2,28  | 2,24  | 2,21  | 2,19  | 2,15  | 2,10  | 2,06  | 2,04  | 2,01  | 1,99  | 1,96  | 1,93  | 1,90     |
| 13                | 3,14  | 2,76  | 2,56  | 2,43  | 2,35  | 2,28  | 2,23  | 2,20  | 2,16  | 2,14  | 2,10  | 2,05  | 2,01  | 1,98  | 1,96  | 1,93  | 1,90  | 1,88  | 1,85     |
| 14                | 3,10  | 2,73  | 2,52  | 2,39  | 2,31  | 2,24  | 2,19  | 2,15  | 2,12  | 2,10  | 2,05  | 2,01  | 1,96  | 1,94  | 1,91  | 1,89  | 1,86  | 1,83  | 1,80     |
| 15                | 3,07  | 2,70  | 2,49  | 2,36  | 2,27  | 2,21  | 2,16  | 2,12  | 2,09  | 2,06  | 2,02  | 1,97  | 1,92  | 1,90  | 1,87  | 1,85  | 1,82  | 1,79  | 1,76     |
| 16                | 3,05  | 2,67  | 2,46  | 2,33  | 2,24  | 2,18  | 2,13  | 2,09  | 2,06  | 2,03  | 1,99  | 1,94  | 1,89  | 1,87  | 1,84  | 1,81  | 1,78  | 1,75  | 1,72     |
| 17                | 3,03  | 2,64  | 2,44  | 2,31  | 2,22  | 2,15  | 2,10  | 2,06  | 2,03  | 2,00  | 1,96  | 1,91  | 1,86  | 1,84  | 1,81  | 1,78  | 1,75  | 1,72  | 1,69     |
| 18                | 3,01  | 2,62  | 2,42  | 2,29  | 2,20  | 2,13  | 2,08  | 2,04  | 2,00  | 1,98  | 1,93  | 1,89  | 1,84  | 1,81  | 1,78  | 1,75  | 1,72  | 1,69  | 1,66     |
| 19                | 2,99  | 2,61  | 2,40  | 2,27  | 2,18  | 2,11  | 2,06  | 2,02  | 1,98  | 1,96  | 1,91  | 1,86  | 1,81  | 1,79  | 1,76  | 1,73  | 1,70  | 1,67  | 1,63     |
| 20                | 2,97  | 2,59  | 2,38  | 2,25  | 2,16  | 2,09  | 2,04  | 1,99  | 1,95  | 1,92  | 1,88  | 1,83  | 1,78  | 1,75  | 1,72  | 1,69  | 1,66  | 1,63  | 1,60     |
| 21                | 2,96  | 2,57  | 2,36  | 2,23  | 2,14  | 2,08  | 2,02  | 1,97  | 1,93  | 1,90  | 1,86  | 1,81  | 1,76  | 1,73  | 1,70  | 1,67  | 1,64  | 1,61  | 1,57     |
| 22                | 2,95  | 2,56  | 2,35  | 2,22  | 2,13  | 2,06  | 2,01  | 1,96  | 1,92  | 1,89  | 1,85  | 1,80  | 1,75  | 1,72  | 1,69  | 1,66  | 1,63  | 1,60  | 1,56     |
| 23                | 2,94  | 2,55  | 2,34  | 2,21  | 2,11  | 2,05  | 1,99  | 1,94  | 1,90  | 1,87  | 1,83  | 1,78  | 1,73  | 1,70  | 1,67  | 1,64  | 1,61  | 1,58  | 1,54     |
| 24                | 2,93  | 2,54  | 2,33  | 2,19  | 2,10  | 2,04  | 1,98  | 1,94  | 1,91  | 1,88  | 1,84  | 1,79  | 1,74  | 1,71  | 1,68  | 1,65  | 1,62  | 1,59  | 1,55     |
| 25                | 2,92  | 2,53  | 2,32  | 2,18  | 2,09  | 2,02  | 1,97  | 1,93  | 1,89  | 1,87  | 1,82  | 1,77  | 1,72  | 1,69  | 1,66  | 1,63  | 1,60  | 1,57  | 1,53     |
| 26                | 2,91  | 2,52  | 2,31  | 2,17  | 2,08  | 2,01  | 1,96  | 1,92  | 1,88  | 1,85  | 1,81  | 1,76  | 1,71  | 1,68  | 1,65  | 1,62  | 1,59  | 1,56  | 1,52     |
| 27                | 2,90  | 2,51  | 2,30  | 2,17  | 2,07  | 2,00  | 1,95  | 1,91  | 1,87  | 1,85  | 1,80  | 1,75  | 1,70  | 1,67  | 1,64  | 1,61  | 1,58  | 1,54  | 1,50     |
| 28                | 2,89  | 2,50  | 2,29  | 2,16  | 2,06  | 2,00  | 1,94  | 1,90  | 1,87  | 1,84  | 1,79  | 1,74  | 1,69  | 1,66  | 1,63  | 1,60  | 1,57  | 1,53  | 1,49     |
| 29                | 2,88  | 2,49  | 2,28  | 2,15  | 2,06  | 1,99  | 1,93  | 1,89  | 1,86  | 1,83  | 1,78  | 1,73  | 1,68  | 1,65  | 1,62  | 1,59  | 1,56  | 1,52  | 1,48     |
| 30                | 2,88  | 2,49  | 2,28  | 2,15  | 2,06  | 1,99  | 1,93  | 1,89  | 1,86  | 1,83  | 1,78  | 1,73  | 1,68  | 1,65  | 1,62  | 1,59  | 1,56  | 1,51  | 1,47     |
| 40                | 2,84  | 2,44  | 2,23  | 2,10  | 2,01  | 1,94  | 1,88  | 1,85  | 1,82  | 1,79  | 1,76  | 1,72  | 1,67  | 1,64  | 1,61  | 1,57  | 1,54  | 1,50  | 1,46     |
| 60                | 2,79  | 2,39  | 2,18  | 2,04  | 1,95  | 1,87  | 1,82  | 1,77  | 1,74  | 1,71  | 1,66  | 1,61  | 1,54  | 1,51  | 1,48  | 1,44  | 1,40  | 1,35  | 1,29     |
| 120               | 2,75  | 2,35  | 2,13  | 1,99  | 1,90  | 1,82  | 1,77  | 1,72  | 1,68  | 1,65  | 1,60  | 1,55  | 1,48  | 1,45  | 1,41  | 1,37  | 1,32  | 1,26  | 1,19     |
| $\infty$          | 2,71  | 2,30  | 2,08  | 1,94  | 1,85  | 1,77  | 1,72  | 1,67  | 1,63  | 1,60  | 1,55  | 1,49  | 1,42  | 1,38  | 1,34  | 1,30  | 1,24  | 1,17  | 1,00     |

## ANEXO C – DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

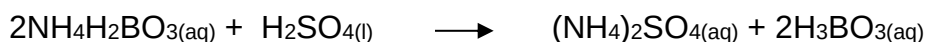
A explicação química da determinação de nitrogênio inicia-se com a digestão da amostra, onde ocorreu aquecimento desta amostra, com ácido sulfúrico concentrado ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) e catalisador misto ( $\text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), até a difgestão de todo carbono e parte do hidrogênio. Durante a digestão o carbono é transformado em dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e o hidrogênio em água ( $\text{H}_2\text{O}$ ). O nitrogênio de compostos como proteínas e pigmentos é transformado em sulfato de amônio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), conforme a reação abaixo.



Em seguida, com adição de solução de hidróxido de sódio 40% ( $\text{NaOH}$ ) e aquecimento, ocorreu a liberação da amônia gasosa ( $\text{NH}_3$ ) que foi separada da mistura por destilação. O gás amônia, então, reage com uma solução de ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), formando o borato de amônio ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3$ ), conforme reações abaixo.



O borato de amônio ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3$ ), caracterizado pela coloração verde da solução, foi titulado com uma solução de ácido sulfúrico 0,05 M ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), na presença de indicador fenolftaleína 1 %, conforme reação 4. Quanto maior o volume de ácido gasto na titulação maior a quantidade de nitrogênio presente na amostra. O ponto final da titulação é a permanência da coloração rosa, indicando meio básico devido à presença de íons amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) em solução na forma de sulfato de amônio, conforme reação abaixo.



## ANEXO D – DETERMINAÇÃO VISCOSIDADE

A medida da viscosidade é realizada com base no tempo de escoamento do solvente e das soluções diluídas do polímero. A viscosidade de uma solução de polieletrólito pode ser descrita como função da sua viscosidade intrínseca e de sua concentração, caso não ocorram interações entre as macromoléculas do sistema diluído. Assim, para chegar ao valor da viscosidade intrínseca, são necessárias várias etapas (ROBERTS e DOMSZY, 1982; KUMAR, 2000; ALSARRA et al.; 2002; CERVERA et al., 2004; GALED et al., 2005).

Primeiramente calculou-se a viscosidade relativa, onde foi medido o quanto a viscosidade da solução é maior do que a viscosidade do solvente, de acordo com a equação 18.

$$n_{rel} = \frac{t}{t_0} \quad \text{Equação 18}$$

onde:  $t$  é o tempo de escoamento da solução do biopolímero,  $t_0$  o tempo de escoamento do solvente e  $n_{rel}$  é a viscosidade relativa.

A partir disso, a viscosidade específica foi calculada, sendo que a mesma mede o quanto a diferença entre a viscosidade da solução é maior do que a viscosidade do solvente, de acordo com a equação 19.

$$n_{esp} = n_{rel} - 1 \quad \text{Equação 19}$$

Onde  $n_{rel}$  é a viscosidade relativa e  $n_{esp}$  é a viscosidade específica.

O próximo passo foi a determinação da viscosidade reduzida, onde se observa o ganho de viscosidade promovido por uma unidade de concentração do polímero, de acordo com a equação 20.

$$n_{red} = \frac{n_{esp}}{C} \quad \text{Equação 20}$$

onde:  $n_{esp}$  é a viscosidade específica,  $C$  a concentração mássica da solução do biopolímero e  $n_{red}$  é a viscosidade reduzida.

O penúltimo passo é a determinação da viscosidade inerente, que permite que tanto variações pequenas quanto variações grandes da viscosidade da solução em relação a do solvente possam ser expressas em um mesmo eixo, de acordo com a equação 21.

$$n_{ine} = \frac{\ln(n_{rel})}{C} \quad \text{Equação 21}$$

Onde  $n_{rel}$  é a viscosidade relativa,  $C$  é a concentração mássica da solução do biopolímero e  $n_{ine}$  é a viscosidade inerente.

E, por fim, a viscosidade intrínseca que indica o ganho de viscosidade promovido por unidade de concentração do polímero, na situação onde não há interação com outras moléculas de polímero, foi calculada de acordo com a equação 22 e corresponde a extrapolação das retas em direção ao eixo y com concentração igual a zero em um gráfico de  $\eta_{esp} \times C$  e  $\ln(\eta_{rel}) \times C$ .

$$[n] = \left| \frac{n_{esp}}{C} \right|_{c \rightarrow 0} = \left| \frac{\ln(n_{rel})}{C} \right|_{c \rightarrow 0} \quad \text{Equação 22}$$

onde:  $n_{esp}$  é a viscosidade específica,  $C$  a concentração mássica da solução do biopolímero,  $n_{rel}$  a viscosidade relativa e  $[n]$  é a viscosidade intrínseca.

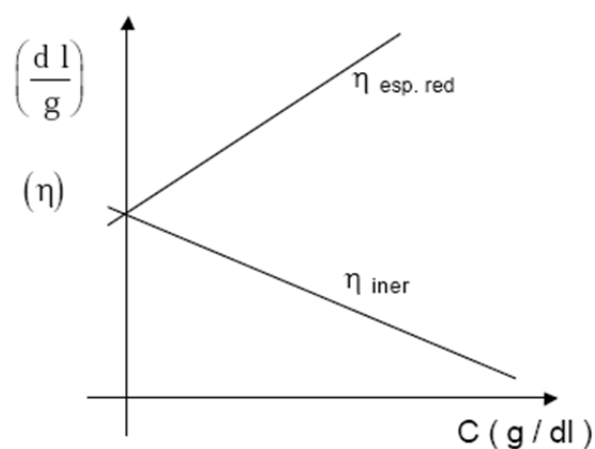
Em sistemas diluídos, a relação de Huggins, equação 23, é válida. A quitosana comporta-se como um polieletrólito catiônico, em soluções ácidas diluídas, e sua viscosidade, pode ser descrita pela equação de Huggins, desde que a solução esteja suficientemente diluída.

$$n_{red} = [n] + K_H \times [n]^2 + C \quad \text{Equação 23}$$



onde:  $\eta_{red}$  é a viscosidade reduzida,  $[\eta]$  é a viscosidade intrínseca,  $C$  é a concentração mássica da solução do biopolímero e  $K_H$  é o coeficiente de Huggins.

Desta maneira, a viscosidade intrínseca pode ser determinada pela extrapolação da reta resultante da aplicação da relação de Huggins para a condição de diluição infinita, de acordo com a Figura 110 onde  $C$  é a concentração ( $\text{g dL}^{-1}$ ) e  $(\eta)$  viscosidade intrínseca ( $\text{dL g}^{-1}$ ).



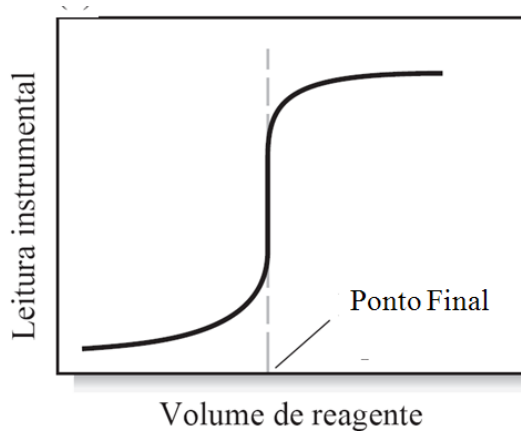
**Figura 109.** Gráfico da extrapolação da viscosidade reduzida e inerente para obtenção da viscosidade intrínseca. (MOURA et al., 2011).

## ANEXO E – TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA

As curvas de titulação visam a determinação do volume do ponto final e são construídas a partir dos sinais da propriedade (absorção molecular, pH, condutividade, etc) relacionada com a concentração do analito em função do volume de titulante. As curvas de titulação podem ser construídas manualmente ou de forma automática por meio de equipamentos adequados (MENDHAM et al., 2002; SKOOG et al., 2006).

A forma da curva depende de alguns fatores tais como: a reação de titulação, a espécie monitorada (indicador, titulante, analito ou produto formado), bem como a técnica instrumental escolhida (potenciometria, por exemplo). O volume do ponto final da titulação é assinalado por uma descontinuidade que ocorre numa determinada região da curva, nas proximidades do ponto de equivalência da mesma (MENDHAM et al., 2002).

Na curva de titulação do tipo sigmóide as observações importantes são confinadas a uma pequena região ao redor do ponto de equivalência (SKOOG et al., 2006). A Figura 111 ilustra uma curva sigmoide de titulação.



**Figura 110.** Curvas de titulação do tipo sigmóide (Adaptado de SKOOG et al., 2006).

O ponto final pode corresponder ao ponto de inflexão da curva de titulação. A determinação do ponto final de titulações potenciométricas de ácidos e bases geralmente está associada com a determinação do ponto de inflexão da curva de titulação obtida ao plotar-se o potencial medido como função do volume de titulante adicionado (MENDHAM et al., 2002).

O ponto de inflexão da curva foi determinado empregando o método derivativo (MENDHAM et al., 2002) onde foi calculada a primeira derivada ( $dmV/dV$ ) fornecendo o ponto de inflexão da curva de titulação com uma maior precisão. Como resultado, obtém-se uma curva em forma de pico cujo máximo ou mínimo corresponde geralmente ao ponto final da titulação (SKOOG et al., 2006).