

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 E QUITOSANA
TRIAZENÍDICA: FILMES E APLICAÇÕES

Adriane Röedel Hirdes

Pelotas, 2021

Adriane Röedel Hirdes

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE QUITOSANA E QUITOSANA
TRIAZENÍDICA: FILMES E APLICAÇÕES**

Defesa de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Aline Joana Rolina Wohlmuth Alves dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr. André Ricardo Fajardo

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

H668s Hirdes, Adriane Röedel

Síntese e caracterização de quitosana e quitosana triazenídica: filmes e aplicações / Adriane Röedel Hirdes ; Aline Joana Rolina Wohlmuth Alves do Santos, orientadora ; André Ricardo Fajardo, coorientador. — Pelotas, 2021.

270 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Imobilização. 2. Filmes. 3. Azo. 4. Triazeno. 5. Síntese. I. Santos, Aline Joana Rolina Wohlmuth Alves do, orient. II. Fajardo, André Ricardo, coorient. III. Título.

CDD : 540

Adriane Röedel Hirdes

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE QUITOSANA E QUITOSANA
TRIAZENÍDICA: FILMES E APLICAÇÕES**

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

Data da Defesa: 07 de outubro de 2021

Banca Examinadora:

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

.....
Adriana Castro Pinheiro
Dr^a. em Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Professora na Universidade Federal de Pelotas

.....
Wladimir Hernandez Flores
Dr. em Física pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Professor na Universidade Federal do Pampa

.....
André Gündel
Dr. em Física pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Professor na Universidade Federal do Pampa

Dedico este trabalho a meu esposo
Alessandro e aos meus amados filhos.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por me guiar e proteger sempre pelo melhor caminho.

Ao meu marido, Prof. Dr. Alessandro Carvalho Bica, companheiro de longa jornada, agradeço a paciência e incentivo, sempre me amparando e encorajando, o que muito contribuiu para acalantar a caminhada, que com sua experiência afagava meu coração além da sua excepcional contribuição teórica.

Aos meus filhos Amanda e Arthur que trilharam comigo as idas e vindas dessa jornada, e dividiram momentos de alegria e preocupações à espera dessa tese.

À minha mãe Sandra, sempre presente comigo, que com seu carinho e atenção sempre me incentivando a finalizar este trabalho. Ao meu pai João Carlos Hirdes, meu grande amigo e grande incentivador, que mesmo não estando mais entre nós, serviu como força motivadora para finalizar essa tese.

Aos meus irmãos e grandes amigos, que souberam entender que a ausência se fazia necessária, mas que nos momentos de presença traziam alegria e descontração fazendo recuperar o fôlego para a ausência. Agradeço a todos que de alguma forma se importaram comigo e com minha família.

À minha “família” de Bagé pelo carinho e apoio em todos os momentos dessa tese, em especial à Dinda Almerinda, sempre atenciosa, me aparando em suas orações além de guardar todas as datas de cada fase, em todos os momentos desta caminhada.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Aline Joana pela sua paciência e dedicação em todo o processo dessa jornada, pelas relevantes contribuições e por acreditar na minha capacidade.

Ao Prof. Dr. André Ricardo Fajardo pelo apoio e por suas valiosas contribuições.

Agradeço aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Unipampa, Campus Bagé, Flávio Pavan, Eduardo Ceretta, Alexandre Galio e em especial ao Wladimir Hernandez Flores e André Gundel pelo laboratório, disponibilidade, dedicação, ensinamentos e por valiosas contribuições para o enriquecimento desse trabalho.

Agradeço ao grande mestre baiano, Daniel Santana, amigos que a vida nos traz, por sua incansável dedicação e contribuição orgânica, colaborou para o enriquecimento orgânico dessa tese.

Agradeço aos alunos e professores do Laboratório de sólidos inorgânicos da UFPel, por toda a contribuição, pelos momentos de trabalho e de laser. Em especial à Isadora Atrib e Mariana Dupinski, brilhantes alunas e pesquisadoras, minhas colegas e amigas, parceiras de estudo e laboratório, agradeço pela ajuda incondicional, pelas horas de análises e trabalho árduo no amanhecer do campus Capão do Leão, pelos divertidos jantares de quarta antes da pandemia e pelo incansável apoio online para a finalização dessa tese.

Aos professores do Programa de pós graduação em Química (UFPel) pelos ensinamentos, apoio e aos que de alguma forma contribuíram para a realização dessa tese, em especial a querida Djanira pelo apoio burocrático.

À Universidade Federal do Pampa por ter me concedido o afastamento total para o estudo do doutorado e aos meus colegas da Unipampa por suprir minha ausência durante esse período.

Resumo

HIRDES, Adriane Röedel. **Síntese e caracterização de quitosana e quitosana triazenídica**: filmes e aplicações. 270 f. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

A quitina é o segundo biopolímero mais abundante depois da celulose e está presente no exoesqueleto de crustáceos, sendo a matéria-prima na síntese de quitosana. O presente estudo tem como um de seus objetivos produzir quitosana, a partir da quitina extraída de cascas de camarão-rosa oriundas da colônia Z-3, Pelotas/RS, para o desenvolvimento de filmes inéditos pela incorporação de compostos inéditos azo, sintetizados por diazotação de quitosana comercial e sintetizada, originando os compostos C-01 e C-02, respectivamente. A síntese de quitosana foi avaliada por metodologia tradicional de aquecimento com refluxo e por radiação de ultrassom e micro-ondas. As etapas de obtenção de quitosana (DS) foram avaliadas por meio da análise das amostras sólidas: granulometria, gravimetria de umidade e cinzas, nitrogênio total, espectroscopia na região do infravermelho (FT-IV), termogravimetria (TGA/DTG), microscopia de força atômica (AFM) e microscopia eletrônica de varredura acoplada à espectroscopia por energia dispersiva (MEV, EDS) e difração de raios X (DRX). As amostras de quitosana (DS) sintetizadas com uso de diferentes metodologias foram caracterizadas em comparação a uma amostra de quitosana obtida comercialmente (COM). O grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$) foi determinado por titulação potenciométrica e a massa molar viscosimétrica obtida pela análise de viscosidade intrínseca. A quitosana obtida por uso de micro-ondas destacou-se dentre as demais amostras por resultar em quitosana de alto grau de desacetilação (82,77%) e alta massa molar viscosimétrica (182,5 – 203,6 kDa), em síntese fazendo uso de menor tempo de desacetilação e menor gasto energético. Os compostos C-01 e C-02 foram caracterizados por ponto de fusão, FT-IV, MEV, EDS, TGA/DTA, já os filmes originados pela sua incorporação em quitosana, bem como os filmes de quitosana pura e àqueles com adição de $0,005 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de sais de cobre(II) e cobalto(II) foram caracterizados por: DRX, AFM, MEV, EDS, FT-IV, UV-Vis, TGA/DTA e análise mecânico dinâmica (AMD). O potencial antifúngico das soluções ácidas (0,25%) dos compostos C-01 e C-02, bem como das amostras de quitosana ($\text{DS}_{9\text{h}}$, DS_{MICRO} , DS_{ULTRA} , DS_{COM}) e das soluções filmogênicas de quitosana pura F-COM e F- $\text{DS}_{9\text{h}}$ e modificadas (F-COM/C-01 e F- $\text{DS}_{9\text{h}}$ /C-02), foi investigado *in vitro* contra o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* causador da antracnose em goiabeiras e comprovou a ação antifúngica conhecida para quitosana, no entanto a incorporação de C-01 e C-02 não melhorou a atividade dos filmes, pelo contrário; o aumento na concentração de nitrogênio incentivou o crescimento fúngico. Os filmes F-COM, F- $\text{DS}_{9\text{h}}$, F-COM/C-01 e F- $\text{DS}_{9\text{h}}$ /C-02 foram avaliados como adsorventes de íons Cu(II) e Co(II) em meio aquoso, em função do tempo de contato e a capacidade de adsorção desses íons até o equilíbrio foi determinada. Os melhores resultados na remoção de Cu(II) foram: 48,13% para F-COM/C-01. Os mesmos filmes sem cátions metálicos foram avaliados em reações catalíticas de acoplamento de Suzuki- Miyaura e mostraram-se

inicialmente promissores para auxílio da catálise realizada por paládio. Por fim, as sínteses, caracterizações e avaliações realizadas nesse trabalho mostraram-se adequadas para a síntese de quitosana com uso de radiação de micro-ondas e de maneira verde pelo reaproveitamento de resíduos, bem como promissoras para a síntese de filmes inéditos com aplicações diversificadas pela incorporação de quitosana triazenídica.

Palavras-chave: imobilização, azo, triazeno, filmes, cobre(II), cobalto(II), síntese, caracterização, atividade antifúngica, adsorção, catálise.

Abstract

HIRDES, Adriane Röedel. **Synthesis and characterization of chitosan and triazenide chitosan: films and applications**. 270 f. PhD Thesis – Postgraduate Program in Chemistry, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2021.

Chitin is the second most abundant biopolymer after cellulose and is present in the exoskeleton of crustaceans, being the raw material in the synthesis of chitosan. The present study has as one of its objectives to produce chitosan, from chitin extracted from pink shrimp shells from the Z-3 colony, Pelotas/RS, for the development of new films through the incorporation of new azo compounds, synthesized by diazotization (compounds C-01 and C-02). The chitin extraction processes by demineralization (DM) and deproteinization (DP) were standardized for the sample in question. The synthesis of chitosan was evaluated by traditional heating with reflux methodology and by ultrasound and microwave radiation. The steps of obtaining chitosan (DS) were evaluated through the analysis of solid samples: particle size, moisture and ash gravimetry, total nitrogen, infrared spectroscopy (FT-IR), thermogravimetry (TGA/DTG), microscopy of atomic force (AFM) and scanning electron microscopy coupled with energy dispersive spectroscopy (SEM/EDS) and X-ray diffraction (XRD). Chitosan (DS) samples synthesized using different methodologies were characterized in comparison to a commercially obtained chitosan sample (COM). The average degree of deacetylation ($\overline{GD}$) was determined by potentiometric titration and the viscosimetric molar mass obtained by intrinsic viscosity analysis.

The chitosan obtained by the use of microwaves stood out among the other samples for resulting in chitosan with a high degree of deacetylation (82.77%) and high viscosimetric molar mass (182.5 – 203.6 kDa), in synthesis by making use of shorter deacetylation time and lower energy expenditure.

The compounds C-01 and C-02 were characterized by melting point, FT-IV, MEV, EDS, TGA/DTA, as well as the films originated by their incorporation in chitosan, as well as the films of pure chitosan and those with the addition of 0.005 mol·L⁻¹ and 0.05 mol·L⁻¹ copper(II) and cobalt(II) salts were characterized by: DRX, AFM, SEM, EDS, FT-IV, UV-Vis, TGA/DTA and dynamic mechanical analysis (AMD). The antifungal potential of acidic solutions (0.25%) of compounds C-01 and C-02, as well as synthesized chitosan samples (DS_{9h}, DS_{MICRO}, DS_{SULTRA}) and commercial (DS_{COM}), of filmogenic solutions of pure chitosan F- COM and F-DS_{9h} and those with the incorporation of C-01 and C-02 (F-COM/C-01 and F-DS_{9h}/C-02), was investigated in vitro against the fungus *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose in guava trees and proved the antifungal action known for chitosan, however the incorporation of C-01 and C-02 did not improve the activity of the films, on the contrary; the increase in nitrogen concentration encouraged fungal growth. The films F-COM, F-DS_{9h}, F-COM/C-01 and F-DS_{9h}/C-02 were evaluated as adsorbents of Cu(II) and Co(II) ions in aqueous medium, as a function of contact time. The adsorption capacity of these ions until equilibrium was determined. The best results in Cu(II) removal were: 48.13% for F-COM/C-01. The same films without metallic cations were

evaluated in catalytic reactions of Suzuki-Miyaura coupling and initially showed to be promising for aiding catalysis performed by palladium. Finally, the syntheses, characterizations and evaluations carried out in this work proved to be adequate for the synthesis of chitosan using microwave radiation and in a green way by reusing waste, as well as promising for the synthesis of new films with diversified applications by the incorporation of triazenide chitosan.

Key-words: immobilization, azo, triazene, films, copper(II), cobalt(II), synthesis, characterization, antifungal activity, adsorption, catalysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura molecular da celulose (a) e da quitina (b).	37
Figura 2 – Estrutura polimórfica da quitina: α -quitina (esquerda), β -quitina (centro) e γ -quitina (direita), sendo que as camadas de setas representam as cadeias poliméricas.	38
Figura 3 – Reação de desproteínização de quitina. Fração azul representa a proteína, e a fração vermelha representa a quitina. Fonte: Autor	42
Figura 4 – Quitosana evidenciando as unidades poliméricas e os grupos acetamida e amina.	43
Figura 5 – Esquema da reação de desacetilação alcalina da quitina.	44
Figura 6 – Fluxograma do processo de obtenção da quitina e quitosana.	91
Figura 7 – Pré-Tratamento das cascas: catação e limpeza (a), cascas secas (b) e cascas trituradas (c)	91
Figura 8 – Extração da quitina desmineralizada (DM). R = rendimento.	92
Figura 9 – Extração da quitina purificada (DP). R = rendimento	93
Figura 10 – Síntese de quitosana por diferentes métodos.	93
Figura 11 – Síntese de quitosana por diferentes métodos químicos. (a) DS _{9h} . (b) DS _{MICRO} . (c) DS _{SULTRA}	94
Figura 12 – Foto do Microscópio de força atômica (esquerda); preparo da amostra no porta amostra (central); foto da ponteira visualizada pelo <i>software</i> acoplado ao AFM no início da digitalização (direita).	105
Figura 13 – Curvas de viscosidade reduzida e inerente <i>versus</i> concentração da solução da quitosana comercial e das soluções de quitosanas sintetizadas (DS _{9h} ; DS _{MICRO} ; DS _{SULTRA}).	121
Figura 14 – Curva de titulação potenciométrica quitosanas sintetizadas (DS _{9h} ; DS _{MICRO} ; DS _{SULTRA}) e para a quitosana comercial.	125
Figura 15 – Espectros FT-IV para a casca (magenta), quitina desmineralizada (DM) (ciano) e da quitina desproteínizada (DP) (verde) evidenciando a estrutura química da quitina.	128
Figura 16 – Espectro de FT-IV para a quitina purificada (DP – verde), quitosana sintetizada (DS _{MICRO} – vermelho) e a quitosana comercial (preto) evidenciando a estrutura química da quitosana.	131

Figura 17 – Espectro FT-IV para as quitosanas sintetizadas (DS _{9h} – azul, DS _{MICRO} – vermelho, DS _{ULTRA} – amarelo) e para a quitosana comercial (preto).	132
Figura 18 – Termogramas: TGA (esquerda) e DTA (direita), (a) quitina: casca de camarão (magenta), DM (ciano), DP (verde). (b) quitosanas: DS _{9h} (azul), DS _{MICRO} (vermelho), DS _{ULTRA} (amarelo), DS _{COM} (preto). Perda de massa (%) <i>versus</i> Temperatura (°C).	133
Figura 19 – Difrátogramas: casca (magenta), quitina DM (ciano), quitina DP (verde), quitosana DS _{9h} (azul), quitosana comercial (preto), (▲) planos e as posições angulares da quitina Ioelovich (2014) estão identificados por triângulos.	135
Figura 20 – Difrátogramas de raios X para quitosana: DS _{9h} (d), DS _{COM} (e), DS _{MICRO} (f), DS _{ULTRA} (g).....	136
Figura 21 – Difrátograma de raios X para a quitina (DM), Resultado experimental (a), Dados após subtração do background e correção (b), Dados após subtração da contribuição amorfa (c).....	137
Figura 22 – Topografia em 3D da superfície com área de varredura 10x10 µm ² e altura máxima (SZ) no eixo z. (esquerda). Dados da superfície (direita): rugosidade (RMS) no eixo z (preto, a), coeficiente de assimetria (SSK) (azul, b), coeficiente de curtose (SK) (verde).	140
Figura 23 – Variação inversa dos parâmetros rugosidade (■) e entropia (●), da superfície representada no eixo y e eixo z, respectivamente, em relação à superfície da amostra, eixo x.....	145
Figura 24 – Micrografias com magnitude de 2000x (10 µm) e espectros de EDS (Intensidade (cps eV ⁻¹) <i>versus</i> energia (keV), das amostras de cada etapa da extração da quitina, casca (a), DM (b) e DP (c) e das quitosanas DS _{9h} (d), DS _{MICRO} (e), DS _{ULTRA} (f) e DS _{COM} (g)	148
Figura 25 – Imagens comparativas obtidas por MEV representando as micrografias com magnitude 2000x (10 µm) (esquerda) e AFM representando as imagens em deflexão (centro) e topografia (direita) da superfície com área de varredura 10x10 µm ² das amostras de cada etapa da extração da quitina, casca (a), DM (b) e DP (c) e das quitosanas DS _{9h} (d), DS _{MICRO} (e), DS _{ULTRA} (f) e DS _{COM} (g).....	150
Figura 26 – Proposta de mecanismo para a formação do composto diazônico e o triazeno derivado da quitosana.	163

Figura 27 – Proposta de representação molecular da quitosana azo-modificada (A) e quitosana triazenídica (B).	164
Figura 28 – Filme de quitosana F-COM (esquerda) e DS _{9h} (direita)	165
Figura 29 – Filme de quitosana modificada F-COM/C-01 (esquerda) e DS _{9h} /C-02 (direita)	166
Figura 30 – Soluções 0,005 mol.L ⁻¹ localizam-se à esquerda em cada imagem e 0,05 mol.L ⁻¹ à direita. (a e b) Sulfato de cobre(II). (a' e b') Sulfato de cobalto(II) (a'). (a e a') Filmes F-DS _{9h} . (b e b') Filmes F-DS _{9h} /C-02..	167
Figura 31 – Analisador mecânico-dinâmico (AMD) Q800TM (esquerda). Suporte de tração com a amostra de filme em destaque (direita).	171
Figura 32 – Filmes de quitosana após adsorção em solução de sulfato de cobre(II)	174
Figura 33 - Reação entre o ácido fenilborônico e 4-bromobenzonitrila e formação de 4-cianobifenila	176
Figura 34 – Espectros FT-IV. Amostras em pó (esquerda): DS _{9h} (vermelho) e C-02 (laranja), DS _{COM} (preto), e C-01 (verde) com destaque para a quitosana triazenídica. Filmes de quitosana (direita): F-DS _{9h} (vermelho) e F-DS _{9h} /C-02 (laranja), F-COM (preto) e F-COM/C-01 (verde).	177
Figura 35 – Espectros na região do IV destaque para a região entre 1800 – 1200 cm ⁻¹ . (a) F-DS _{9h} – vermelho, (b) F-DS _{9h} /C-02 – laranja, (c) F-COM – preto, (d) F-COM/C-01 – verde. Filmes contendo CuSO ₄ 0,005 mol.L ⁻¹ (ciano), CuSO ₄ 0,05 mol.L ⁻¹ (azul), CoSO ₄ 0,005 mol.L ⁻¹ (rosa claro), CoSO ₄ 0,05 mol.L ⁻¹ (magenta).	178
Figura 36 – Espectros de UV-Vis das soluções filmogênica de quitosana F-DS _{9h} (azul) e F-COM (preto), F-DS _{9h} /C-02 (ciano), F-COM/C-01 (verde).	181
Figura 37 – Termogramas TGA (esquerda) e DTG (direita) das amostras de quitosana em pó DS _{9h} (vermelho) e COM (preto) e dos produtos inéditos C-02 (laranja) e C-01 (verde).	182
Figura 38 - Termogramas TGA (esquerda) e DTG (direita) para os filmes de quitosana puros F-DS _{9h} (vermelho) e F-COM (preto) e os modificados com o produto inédito F-DS _{9h} /C-02 (laranja) e F-COM/C-01 (verde).	182
Figura 39 – Termogramas TGA (esquerda) e DTG (direita). (a) F-DS _{9h} – vermelho. (b) F-DS _{9h} /C-02 – laranja. (c) F-COM – preto. (d) F-COM/C-01 –	

verde). Soluções CuSO_4 0,005 mol.L ⁻¹ (ciano), CuSO_4 0,05 mol.L ⁻¹ (azul), CoSO_4 0,005 mol.L ⁻¹ (rosa claro), CoSO_4 0,05 mol.L ⁻¹ (magenta).	184
Figura 40 – Difractogramas. Quitosana em pó (esquerda): DS _{9h} (vermelho) e COM (preto). ; Filmes de quitosana (direita): F-DS _{9h} (vermelho) e F-DS _{9h} /C-02 (laranja), F-COM (preto) e F-COM/C-01 (verde).	186
Figura 41 – Difractogramas. (a) F-DS _{9h} – vermelho. (b) F-COM – preto. (c) F-DS _{9h} /C-02 - laranja. (d) F-COM/C-01 – verde. Soluções metálicas: CuSO_4 0,005 mol.L ⁻¹ (ciano), CuSO_4 0,05 mol.L ⁻¹ (azul), CoSO_4 0,005 mol.L ⁻¹ (rosa claro), CoSO_4 0,05 mol.L ⁻¹ (magenta).	187
Figura 42 – Topografia em 3D da superfície (esquerda) com área de varredura 10x10 μm ² e altura máxima (SZ) no eixo z. Dados da superfície (direita): rugosidade (RMS) (preto) no eixo z, coeficiente de assimetria (SSK) (azul), coeficiente de curtose (SK) (verde). (a) F-DS _{9h} . (b) F-DS _{9h} /C-02. (c) F-COM. (d) F-COM/C-01 (d).	190
Figura 43 – Topografia em 3D da superfície (esquerda) com área de varredura 10x10 μm ² e altura máxima (SZ) no eixo z. Dados da superfície (direita): rugosidade (RMS) (preto) no eixo z, coeficiente de assimetria (SSK) (azul), coeficiente de curtose (SK) (verde). (a) F-DS _{9h} (b) em presença de CuSO_4 0,005 mol.L ⁻¹ . (c) em presença de CuSO_4 0,05 mol.L ⁻¹ . (d) em presença de CoSO_4 0,005 mol.L ⁻¹ . (e) em presença de CoSO_4 0,05 mol.L ⁻¹	193
Figura 44 – Topografia em 3D da superfície (esquerda) com área de varredura 10x10 μm ² e altura máxima (SZ) no eixo z. Dados da superfície (direita): rugosidade (RMS) (preto) no eixo z, coeficiente de assimetria (SSK) (azul), coeficiente de curtose (SK) (verde). (a) F-COM (b) em presença de CuSO_4 0,005 mol.L ⁻¹ . (c) em presença de CuSO_4 0,05 mol.L ⁻¹ . (d) em presença de CoSO_4 0,005 mol.L ⁻¹ . (e) em presença de CoSO_4 0,05 mol.L ⁻¹	194
Figura 45 – Topografia em 3D da superfície (esquerda) com área de varredura 10x10 μm ² e altura máxima (SZ) no eixo z. Dados da superfície (direita): rugosidade (RMS) (preto) no eixo z, coeficiente de assimetria (SSK) (azul), coeficiente de curtose (SK) (verde). (a) F-DS _{9h} /C-02 (b) em presença de CuSO_4 0,005 mol.L ⁻¹ . (c) em presença de CuSO_4 0,05 mol.L ⁻¹ . (d) em presença de CoSO_4 0,005 mol.L ⁻¹ . (e) em presença de CoSO_4 0,05 mol.L ⁻¹	195
Figura 46 – Topografia em 3D da superfície (esquerda) com área de varredura 10x10 μm ² e altura máxima (SZ) no eixo z. Dados da superfície (direita):	

rugosidade (RMS) (preto) no eixo z, coeficiente de assimetria (SSK) (azul), coeficiente de curtose (SK) (verde). (a) F-COM/C-01. (b) em presença de CuSO_4 $0,005 \text{ mol.L}^{-1}$. (c) em presença de CuSO_4 $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$. (d) em presença de CoSO_4 $0,005 \text{ mol.L}^{-1}$. (e) em presença de CoSO_4 $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$	196
Figura 47 – Variação inversa dos parâmetros rugosidade (■) e entropia (●), da superfície dos filmes representada no eixo y e eixo z, respectivamente.....	197
Figura 48 – Micrografias com magnitude de $2000\times$ ($10\mu\text{m}$) e espectros de EDS (Intensidade cps eV^{-1}) <i>versus</i> energia (keV) das amostras de quitosana em pó DS _{9h} (a), COM (b) e dos produtos inéditos C-02 (c), C-01 (d).....	198
Figura 49 – Micrografias com magnitude de $2000\times$ ($10\mu\text{m}$) e espectros de EDS Micrografias com magnitude de $2000\times$ ($10\mu\text{m}$) e espectros de EDS (Intensidade cps eV^{-1}) <i>versus</i> energia (keV) dos filmes de quitosana puros F-DS _{9h} (a), F-COM (b), F-DS _{9h} /C-02 (c), F-COM/C-01 (d).	200
Figura 50 – Micrografias com magnitude de $2000\times$ ($10\mu\text{m}$) e espectros de EDS Micrografias com magnitude de $2000\times$ ($10\mu\text{m}$) e espectros de EDS (Intensidade cps eV^{-1}) <i>versus</i> energia (keV) dos filmes F-DS _{9h} (a), F-DS _{9h} /Cu ^A (b), F-DS _{9h} /Cu ^B (c), F-DS _{9h} /Co ^A (d), F-DS _{9h} /Co ^B (e)	204
Figura 51 – Micrografias com magnitude de $2000\times$ ($10\mu\text{m}$) e espectros de EDS Micrografias com magnitude de $2000\times$ ($10\mu\text{m}$) e espectros de EDS (Intensidade cps eV^{-1}) <i>versus</i> energia (keV) dos filmes F-COM (a), F-COM/Cu ^A (b), F-COM/Cu ^B (c), F-COM/Co ^A (d), F-COM/Co ^B (e)	205
Figura 52 – Micrografias com magnitude de $2000\times$ ($10\mu\text{m}$) e espectros de EDS Micrografias com magnitude de $2000\times$ ($10\mu\text{m}$) e espectros de EDS (Intensidade cps eV^{-1}) <i>versus</i> energia (keV) dos filmes F-DS _{9h} /C-02 (a), F-DS _{9h} /C-02 /Cu ^A (b), F-DS _{9h} /C-02 /Cu ^B (c), F-DS _{9h} /C-02/Co ^A (d) F-DS _{9h} /C-02/Co ^B (e).....	206
Figura 53 – Micrografias com magnitude de $2000\times$ ($10\mu\text{m}$) e espectros de EDS Micrografias com magnitude de $2000\times$ ($10\mu\text{m}$) e espectros de EDS (Intensidade cps eV^{-1}) <i>versus</i> energia (keV) dos filmes F-COM/C-01 (a), F-COM/C-01/Cu ^A (b), F-COM/C-01/Cu ^B (c), F-COM/C-01/Co ^A (d) F-COM/C-01/Co ^B (e).	207
Figura 54 – Imagens comparativas obtidas por MEV representando as micrografias (esquerda) e AFM representando as imagens por deflexão (centro) e topografia (direita) dos filmes F-DS _{9h} (a), F-COM (b), F-DS _{9h} /C-02 (c) e F-COM/C-01 (d).....	208

Figura 55 – Imagens comparativas obtidas por MEV representando as micrografias (esquerda) e AFM representando as imagens por deflexão (centro) e topografia (direita) dos filmes F-DS _{9h} (a), F-DS _{9h} /Cu ^A (b), F-DS _{9h} /Cu ^B (c), F-DS _{9h} /Co ^A (d), F-DS _{9h} /Co ^B (e).....	209
Figura 56 – Imagens comparativas obtidas por MEV representando as micrografias (esquerda) e AFM representando as imagens por deflexão (centro) e topografia (direita) dos filmes F-COM (a), F-COM/Cu ^A (b), F-COM/Cu ^B (c), F-COM/Co ^A (d), F-COM/Co ^B (e).	210
Figura 57 – Imagens comparativas obtidas por MEV representando as micrografias (esquerda) e AFM representando as imagens por deflexão (centro) e topografia (direita) dos filmes F-DS _{9h} /C-02 (a), F-DS _{9h} /C-02/Cu ^A (b), F-DS _{9h} /C-02/Cu ^B (c), F-DS _{9h} /C-02/Co ^A (d), F-DS _{9h} /C-02/Co ^B (e).....	211
Figura 58 – Imagens comparativas obtidas por MEV representando as micrografias (esquerda) e AFM representando as imagens por deflexão (centro) e topografia (direita) dos filmes F-COM/C-01 (a), F-COM/C-01/Cu ^A (b), F-COM/C-01/Cu ^B (c), F-COM/C-01/Co ^A (d), F-COM/C-01.....	212
Figura 59 – Curvas do ensaio de tração dos filmes de quitosana F-DS _{9h} (vermelho), F-DS _{9h} /C-02 (laranja), F-COM (preto) e F-COM/C-01 (verde). ...	213
Figura 60 – Curvas de tração. F-DS _{9h} /Co (vermelho), F-DS _{9h} /C-02/Co (laranja), F-COM/Co (preto) e F-COM/C-01/Co (verde). Linha contínua = 0,005 mol.L ⁻¹ . Linha tracejada = 0,05 mol.L ⁻¹	215
Figura 61 – Curvas de tração. F-DS _{9h} /Cu (vermelho), F-DS _{9h} /C-02/Cu (laranja), F-COM/Cu (preto) e F-COM/C-01/Cu (verde). Linha contínua = 0,005 mol.L ⁻¹ . Linha tracejada = 0,05 mol.L ⁻¹	215
Figura 62 – Diagrama representando o módulo de elasticidade dos filmes. Destaque para os filmes de quitosana puros e modificados F-DS _{9h} (vermelho), F-DS _{9h} /C-02 (laranja), F-COM (preto) e F-COM/C-01 (verde).	217
Figura 63 – Média do crescimento micelial, a partir de 24h de incubação até 72 h (terceiro dia) para as amostras F-DS _{9h} , C-02, F-DS _{9h} /C-02, F-COM, C-01, F-COM/C-01. Controle negativo indicado em azul.	218
Figura 64 – Espectros de absorção no UV-Vis soluções aquosas de CuSO ₄ (esquerda) e CoSO ₄ (direita). Concentração 0,1 mol.L ⁻¹ (verde), 0,075 mol.L ⁻¹ (ciano), 0,05 mol.L ⁻¹ (magenta) e 0,025 mol.L ⁻¹ (preto).	220

Figura 65 – Ajuste linear da curva de calibração soluções aquosas de CuSO_4 (esquerda) relativo a 800 nm e de CoSO_4 (direita) relativo à 520 nm.	221
Figura 66 – Capacidade de adsorção de Cu^{2+} (esquerda) e remoção percentual de Cu^{2+} (direita) pelos filmes de quitosana em função do tempo de contato.	222
Figura 67 – Capacidade de adsorção de Co^{2+} (esquerda) e remoção percentual de Co^{2+} (direita) pelos filmes de quitosana em função do tempo de contato.	222
Figura 68 – Filmes de quitosana após adsorção em solução de sulfato de cobalto(II)	226
Figura 69 – Filmes de quitosana após adsorção em solução de sulfato de cobre(II)	226
Figura 70 – Espectro de IVs dos filmes F-COM e F-DS _{9h} . Filme <i>in natura</i> (preto) e impregnado com Pd(II) (vermelho) e com Pd(0) (verde) após sua exposição ao agente redutor borohidreto de sódio (NaBH_4).	227
Figura 71 – Espectros de IV dos filmes F-COM/C-01 e F-DS _{9h} /C-02 . Filme <i>in natura</i> (preto) e impregnado com Pd(II) (vermelho) e com Pd(0) (verde) após sua exposição ao agente redutor borohidreto de sódio (NaBH_4).	227
Figura 72 – Produto isolado da reação 4-cianobifenila	228
Figura 73 – Espectro de RMN de ^1H do produto da reação e confere com sendo 4-cianobifenila.	229
Figura 74 – Espectro de RMN de ^{13}C do produto da reação e confere com sendo 4-cianobifenila.	229

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparativo de condições de extração de quitina.	41
Tabela 2 – Comparação das condições de síntese de quitosana em diferentes métodos de acordo com a literatura	51
Tabela 3 – Principais técnicas utilizadas para a determinação da <i>MV</i> e métodos adotado para a síntese de quitosana.	54
Tabela 4 – Principais técnicas utilizadas na determinação do % <i>GD</i> e métodos de síntese de quitosana.	56
Tabela 5 – Principais características da técnica de AFM.	64
Tabela 6 – Aplicações de quitosana e quitosana modificada.	72
Tabela 7 – Especificações da quitosana Sigma-Aldrich®	90
Tabela 8 – Descrição da síntese de quitosana por diferentes métodos químicos	94
Tabela 9 – Caracterizações, equipamentos e referências utilizadas para a análise das amostras.	95
Tabela 10 – Reações de digestão da matéria orgânica (1-4), reações de destilação (5-7) e reação de titulação (8)	98
Tabela 11 – Definições das viscosidades calculadas.....	100
Tabela 12 – Especificações do coeficiente de assimetria (S_{SK}) conforme a distribuição das alturas na superfície. Por favor confere se as informações me verde na tabela estão corretas, se não estão invertidas.	106
Tabela 13 – Especificações do coeficiente de curtose (S_K) conforme a distribuição das alturas na superfície	107
Tabela 14 – Rendimentos totais e parciais para a síntese de quitosana,	112
Tabela 15 – Consumo energético da reação de desacetilação.....	113
Tabela 16 – Resultados obtidos na determinação do teor de umidade.....	114
Tabela 17 – Resultados obtidos na determinação do teor de cinzas.	115
Tabela 18 – Resultados obtidos na determinação do teor de nitrogênio.....	117
Tabela 19 – Avaliação granulométrica	118
Tabela 20 – Dados das viscosidades para as amostras de quitosana sintetizadas e comercial.	120
Tabela 21 – Estudo das equações das curvas de viscosidade para as quitosanas sintetizadas (DS_{9h} ; DS_{MICRO} ; DS_{ULTRA}) e para a quitosana comercial	120

Tabela 22 – Dados comparativos das amostras de quitosana para os valores de massa molar viscosimétrica (M_v).	122
Tabela 23 – Valores de pH obtidos na titulação potenciométrica.....	124
Tabela 24 – Dados da segunda derivada da curva de titulação potenciométrica (pH), aplicando o método dos mínimos quadrados.	126
Tabela 25 – Principais bandas na região do infravermelho para quitina	129
Tabela 26 – Principais bandas na região do infravermelho para quitosana ...	132
Tabela 27 – Resultados de TGA/DTA para a decomposição térmica das amostras.....	133
Tabela 28 – Planos característicos e valores de 2θ , áreas calculadas (A), grau de cristalinidade (X) e grau de desacetilação (GD)	138
Tabela 29 – Parâmetros topológicos das amostras	142
Tabela 30 – Análise semiquantitativa do percentual atômico por EDS	146
Tabela 31 – Avaliação do crescimento micelial <i>in vitro</i> de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	153
Tabela 32 – Esporulação de <i>C. gloeosporioides</i>	153
Tabela 33 - Caracterizações realizadas	168
Tabela 34 - Aplicações realizadas.....	172
Tabela 35 – Principais bandas na região do infravermelho para as amostras de quitosana e produtos inéditos em pó, filmes de quitosana e quitosana modificada e filmes de quitosana em presença de Cu(II) e Co(II).	180
Tabela 36 – Resultados de TGA/DTG para a decomposição térmica das amostras.....	185
Tabela 37 – Parâmetros topológicos das amostras	191
Tabela 38 – Análise semiquantitativa do percentual atômico.....	199
Tabela 39 – Análise semiquantitativa do percentual atômico por EDS.	202
Tabela 40 – Propriedades de tração dos ensaios. $A = 0,005 \text{ mol.L}^{-1}$. $B = 0,05 \text{ mol.L}^{-1}$	216
Tabela 41 – Descrição das amostras avaliadas	218
Tabela 42 – Esporulação de <i>C. gloeosporioides</i>	220
Tabela 43 – Dados das curvas de calibração das soluções metálicas utilizadas no estudo de adsorção.....	221
Tabela 44 – Dados do estudo de adsorção do íon Cu^{2+} em função do tempo de contato para os filmes de quitosana.....	224

Tabela 45 – Dados do estudo de adsorção do íon Co^{2+} em função do tempo de contato para os filmes de quitosana.....	225
Tabela 46 – Rendimento de 4-cianobifenila obtido na reação de Suzuki-Miyaura empregando diferentes catalisadores e agentes redutores.....	228

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Reação de desmineralização.....	40
Equação 2 – Determinação do índice de cristalinidade	62
Equação 3 – Determinação do grau de cristalinidade	62
Equação 4 – Energia livre.....	64
Equação 5 – Cálculo do teor de umidade	96
Equação 6 – Cálculo do teor de cinzas.....	96
Equação 7 – Determinação de nitrogênio total	98
Equação 8 – Percentual de amostra retida na peneira.....	99
Equação 9 – Cálculo da massa molar viscosimétrica (Mark-Houwink)	100
Equação 10 – Cálculo do grau de desacetilação.....	101
Equação 11 – Cálculo do grau de acetilação.....	101
Equação 12 – Determinação do grau de cristalinidade	103
Equação 13 – Energia livre.....	107
Equação 14 – Reação de formação do ácido nitroso	162
Equação 15 – Reação de formação do íon nitrosônio	162
Equação 16 – Determinação do módulo de elasticidade	171
Equação 17 – Capacidade de adsorção no equilíbrio	174
Equação 18 – Remoção de metal.....	175

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

$\overline{M}_v$ – Massa molar viscosimétrica

$\overline{GD}$ – Grau Médio de Desacetilação

$\overline{GA}$ – Grau Médio de Acetilação

DM – Processo de Desmineralização

DP – Processo de Desproteínização

DS – Processo de Desacetilação

MO – Micro-ondas

ULTRA – Ultrassom

AOAC – do inglês *Association of Official Analytical Chemists*

FT-IV – Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

ATR – Refletância Total Atenuada

TGA – Análise Termogravimétrica

AMD – Análise Mecânica-Dinâmica

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

EDS – Espectroscopia por Energia Dispersiva

AFM – Microscopia de Força Atômica

UV-VIS – Espectroscopia na região do Ultravioleta e Visível

DR-X – Difração de Raios X

$\bar{X}$ – Grau médio de cristalinidade

I_{CR} – Índice de cristalinidade

I_{am} – Intensidade do espalhamento amorfo

I_o – Intensidade do espalhamento cristalino

C. gloeosporioides – *Colletotrichum gloeosporioides*

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	28
OBJETIVOS	33
Objetivo Geral	33
Objetivos Específicos	33
REVISÃO DA LITERATURA	36
Quitina	36
Quitosana	43
Propriedades dos polímeros de quitina e quitosana e caracterizações	52
Modificações na estrutura da quitosana.....	68
Quitosana e sua atividade antifúngica.....	72
Quitosana modificada como suporte para o catalisador de paládio em síntese orgânica	74
Quitosana como adsorvente de cobre (II) e cobalto (II)	77
CAPÍTULO 1	83
1.1 INTRODUÇÃO	84
1.2 METODOLOGIA	90
1.2.1 Reagentes	90
1.2.2 Síntese de quitosana por diferentes métodos	91
1.2.3 Caracterizações	95
1.2.3.1 Determinação do teor de umidade	96
1.2.3.2 Determinação do teor de cinzas.....	96
1.2.3.3 Determinação de nitrogênio total	97
1.2.3.4 Granulometria	98
1.2.3.5 Determinação da massa molar viscosimétrica média	99
1.2.3.6 Determinação do grau médio de desacetilação	101
1.2.3.7 Espectroscopia na região do Infravermelho (FT-IV).....	102

1.2.3.8 Medidas Termogravimétricas (TGA/DTG).....	103
1.2.3.9 Difração de Raio X e determinação do grau de cristalinidade.....	103
1.2.3.10 Microscopia de força atômica (AFM).....	104
1.2.3.11 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia de energia dispersiva (EDS).....	108
1.2.3.12 Atividade antifúngica	109
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	111
1.3.1 Determinação do teor de umidade	113
1.3.2 Determinação do teor de cinzas.....	114
1.3.3 Determinação de nitrogênio	116
1.3.4 Granulometria.....	118
1.3.5 Determinação da massa molar viscosimétrica média	119
1.3.6 Determinação do grau médio de desacetilação	123
1.3.7 Espectroscopia na região do infravermelho (FT-IV)	127
1.3.8 Medidas termogravimétricas (TGA/DTG)	132
1.3.9 Determinação do grau de cristalinidade por difração de raios X	134
1.3.10 Microscopia de força atômica (AFM).....	138
1.3.11 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia de energia dispersiva de raio x (EDS).....	145
1.3.12 Avaliação do potencial antifúngico	151
1.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	154
CAPÍTULO 2	155
2.1 INTRODUÇÃO.....	156
2.2 METODOLOGIA	160
2.2.1 Reagentes.....	160
2.2.2 Síntese de quitosana triazenídica	161
2.2.3 Síntese de filmes de quitosana	165
2.2.4 Filmes contendo íons cobre (II) e cobalto (II)	166

2.2.5 Caracterizações	167
2.2.5.1 Espectroscopia na região do infravermelho (FT-IV)	168
2.2.5.2 Espectroscopia na região do ultravioleta (UV-Vis)	169
2.2.5.4 Difração de raios X (DRX)	169
2.2.5.5 Microscopia de força atômica (AFM)	169
2.2.5.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia de energia dispersiva (EDS).....	170
2.2.5.7 Análise mecânico dinâmica (AMD) – Ensaios de tração	170
2.2.6 Aplicações	171
2.2.6.1 Atividade antifúngica	172
2.2.6.2 Avaliação da adsorção de Cu(II) e Co(II)	174
2.2.6.3 Avaliação como adjuvante de catálise.....	175
2.3 RESULTADOS.....	176
2.3.1 Caracterizações	176
2.3.1.2 Espectroscopia na região do infravermelho (FT-IV)	176
2.3.1.3 Espectroscopia na região do ultravioleta (UV-Vis)	180
2.3.1.4 Medidas termogravimétricas (TGA/DTG)	181
2.3.1.5 Difração de raios X (DRX)	185
2.3.1.6 Microscopia de força atômica (AFM)	187
2.3.1.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS).....	197
2.3.1.8 Análise Mecânico-Dinâmica (AMD)	213
2.3.2 Aplicações	217
2.3.2.1 Avaliação do potencial antifúngico	217
2.3.2.2 Avaliação da adsorção de Cu(II) e Co(II)	220
2.3.2.3 Avaliação preliminar em processo catalítico.....	227
2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	230
CONCLUSÕES	232

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	233
APÊNDICE	258
Apêndice A – Titulação Potenciométrica (mV) e condutimétrica.....	259
Apêndice B – Parâmetros topológicos resultante das análises de AFM	264

INTRODUÇÃO

A geração de resíduos durante o processamento de alimentos é inevitável e o descarte pode ser um dos maiores problemas para a indústria e para a sociedade. Principalmente se não for realizado um descarte correto, podendo causar impactos negativos sobre o meio ambiente e a saúde humana. Nesse contexto, o reaproveitamento destes resíduos é uma tentativa de criar processos de recuperação relevantes, agregando valor ao subproduto (HAMED; ÖZOGUL; REGENSTEIN, 2016).

Os principais materiais de origem marinha podem ser distribuídos em três grupos principais, polissacarídeos, proteínas e lipídios. Entre os diversos polissacarídeos que podem ser obtidos no ambiente marinho, a quitina é a que se destaca pela sua disponibilidade, além de ser o segundo polímero natural mais abundante após a celulose e por ser um material de baixo custo, visto que pode ser obtido a partir de recursos naturais de rejeitos da casca de camarão. (HAMED; ÖZOGUL; REGENSTEIN, 2016; IOELOVICH, 2014; MUXIKA et al., 2017).

A constante busca por tecnologias de caráter ambientalmente correto e mais ecológico possível, tem despertado cada vez mais o interesse em pesquisa por polímeros de base biológica, devido às suas excelentes propriedades físicas e biológicas, por exemplo, maior biodegradabilidade e funcionalidade comparado à um polímero sintético (KAYA et al., 2017; MUJTABA et al., 2020; SOON et al., 2018).

Milhões de toneladas de resíduos da manufatura de camarões são produzidos todos os anos e esses resíduos são considerados como um potencial recurso com alto valor agregado, por conter principalmente, proteínas, minerais e quitina. A quitina e seu derivado, a quitosana, têm despertado grande interesse comercial em virtude das possibilidades de aplicações (DAMASCENO; ANDRADE; STAMFORD, 2009; EL KNIDRI et al., 2018; KAYA et al., 2017).

Os estudos de biopolímeros como quitina e quitosana levam em consideração, não apenas a versatilidade de aplicações do material para uso em escala industrial, mas também a abundância da matéria-prima obtida nos rejeitos de casca de camarão, tendo em vista que a cabeça e a casca de camarões

correspondem a aproximadamente 40% do peso total. Nesse contexto, o grande desafio é minimizar os resíduos gerados que contribuem com a poluição ambiental, sendo assim o processo de extração da quitina têm sido amplamente estudado (DAMASCENO; ANDRADE; STAMFORD, 2009; FONSECA, 2016).

Este trabalho utilizou como matéria-prima os rejeitos da casca de camarão oriundas da Colônia Z-3, uma colônia de pescadores que está localizada a 20 km do município de Pelotas, situada às margens da Laguna dos Patos, no Estado do Rio Grande do Sul, onde residem cerca de 6000 pessoas. As estimativas de uma boa safra na colônia Z-3 apontam que podem ser pescados cerca de quatro mil toneladas de camarão em período ideal da pesca do crustáceo (MICHEL, 2018).

A versatilidade da quitina e da quitosana têm sido avaliadas por pesquisadores das mais diversas áreas, gerando um amplo acervo na literatura, sobre processos para obtenção de quitosana a partir da quitina extraída de crustáceos, no entanto a parte mais desafiadora para a pesquisa tem sido obter materiais à base de quitosana com propriedades físicas e químicas equivalentes às daquelas de produtos totalmente sintéticos, como os plásticos como uma alternativa mais ecológica (ABDULKARIM et al., 2013; EL KNIDRI et al., 2018; HAMED; ÖZOGUL; REGENSTEIN, 2016; KUMARI et al., 2015; LOPES et al., 2017).

A modificação química desse polímero resulta em melhor solubilidade em água ou solventes orgânicos, o que favorece o desenvolvimento contínuo de suas aplicações como novos biomateriais funcionais. A presença dos grupos hidroxila e amino na cadeia polimérica tornam a quitosana altamente hidrofílica, o que também proporciona uma capacidade de interação excelente com íons metálicos e com reticulantes (GEROMEL-COSTA et al., 2018; KYZAS; KOSTOGLU, 2015; MUJTABA et al., 2019).

A quitosana tem sido avaliada como um promissor adsorvente na remoção de cobre e cromo, como biorremediador na agricultura (GEROMEL-COSTA et al., 2018); para adsorção de mercúrio e níquel em tratamento de efluentes industriais (KYZAS; KOSTOGLU, 2015); na indústria de alimentos (HOMEZ-JARA et al., 2018) e desenvolvimento de embalagens bioativas (SIVASELVI; GHOSH, 2017); como agente bactericida (AL-MANHEL; AL-HILPHY; NIAMAH, 2018); como veículo de fármacos (MORAN et al., 2018).

Portanto, este polímero é muito atraente para vários campos e o amplo painel de propriedades químicas e materiais processados dá a este polissacarídeo um futuro bastante promissor como biomaterial (KUMAR; MUKHERJEE; DUTTA, 2020; MUJTABA et al., 2020; NATARAJ et al., 2018; PAL et al., 2021).

A quitosana pode ser encontrada em várias formas e produzidas por diferentes tecnologias, pó (OZAKI et al., 2020; ZHANG et al., 2021a), flocos (PADILLA-RODRÍGUEZ et al., 2015; WANI; MASOODI; AKHTER, 2021), fibras (BATISTA et al., 2020; MAO et al., 2020), hidrogel (CHUYSINUAN et al., 2020; THONGCHAI et al., 2020), compósitos (SHENVI; ISMAIL; ISLOOR, 2014; TYLINGO et al., 2016), membranas (CEYLAN, 2021; DU et al., 2020) e filmes (ALI; TIAMA; ISMAIL, 2021; BIBI et al., 2018; HUO et al., 2021; MARQUES et al., 2019; MUJTABA et al., 2019).

A quitosana ainda pode ser convertida em microesferas (GEROMEL-COSTA et al., 2018; WANG, 2018; ZHANG et al., 2020) ou em nanoescala na forma de nanopartículas (DE CARLI et al., 2018; SHAHID-UL-ISLAM; BUTOLA; VERMA, 2019; TIWARI et al., 2013), nanofibras (LARBI et al., 2018; ZIA et al., 2020) e em partículas magnéticas (SHAIKH; PAMIDIMUKKALA, 2021; ZHANG; ZHUANG; WANG, 2020).

A crescente pesquisa para a produção de filmes poliméricos a partir de materiais biológicos vai ao encontro da necessidade de redução ou substituição dos filmes sintéticos por filmes biodegradáveis numa perspectiva mais sustentável e biodegradável à plásticos sintéticos (MUJTABA et al., 2019).

A produção de filmes a partir de rejeitos da casca do camarão também contribui para a utilização de matéria-prima abundante e renovável, principalmente proveniente de resíduos da pesca. Além de atuarem como uma alternativa mais sustentável e biodegradável comparado à plásticos sintéticos eles ainda podem ser aplicados no tratamento de águas residuárias, como fungicidas e catalisadores, como é o objetivo desse estudo (GARCIA et al., 2020).

Desde o reconhecimento da adsorção como um dos métodos mais convenientes para o tratamento de águas residuais, os pesquisadores têm se concentrado continuamente no desenvolvimento de adsorventes baratos, eficazes, ambientalmente amigáveis e de fácil reprodução. Nesse contexto, a

quitosana e seus derivados têm ganhado muita atenção e, portanto, suas propriedades de adsorção estão sendo amplamente pesquisadas (BEGUM et al., 2021; PAL et al., 2021; SARODE et al., 2019; UPADHYAY et al., 2021; VIDAL; MORAES, 2019).

A quitosana já é aplicada para o tratamento de água, como remoções de metais pesados devido à sua comprovada capacidade de ligar metais de transição. No entanto, a quitosana precisa ser modificada, para torná-la adequada para adsorção, pois melhoram significativamente seu desempenho na adsorção. É evidente na literatura a diversidade de estudos existentes, diversos autores discutem avanços alcançados para adsorção de metais, métodos de tratamento, poluentes orgânicos mais comuns, remoção de corantes, entre outros (ARAMESH; BAGHERI; BILAL, 2021; PAL et al., 2021; SARODE et al., 2019; UPADHYAY et al., 2021; VAKILI et al., 2019).

O uso de filmes de quitosana modificadas são eficientes adsorventes para a remoção de metais pesados de águas contaminadas por exemplo, por Cu (II) e Co (II) de águas residuárias. Diversos pesquisadores estudaram a eficiência da remoção do íon Cu (II) de soluções aquosas (ANBINDER et al., 2019; KULKARNI et al., 2020; SAHEBJAMEE et al., 2019) e do íon Co (II) de soluções aquosas (ISLAM et al., 2018; NEGM et al., 2015; ZHANG; ZHUANG; WANG, 2020).

Entre as diversas modificações da quitosana para a adsorção, a química do sal de diazônio pode ser um método simples e altamente eficiente para acoplar diferentes espécies químicas partindo de grupamentos amina (BECK; HÖRNER; DITTMANN, 2009; HÖRNER et al., 2004; PARAGINSKI et al., 2016; SANTOS et al., 2014, 2016).

A presença do grupo amino reativo na molécula da quitosana, entre outras vantagens, permite o acoplamento à quitosana modificada, ou associada a outros compostos no tratamento de água (PEREIRA, 2016), biomedicina (LI et al., 2021), fármacos (DI MARTINO et al., 2017).

Diante de versatilidade e das vantajosas propriedades funcionais, a quitosana modificada têm atraído considerável atenção dos estudos que envolvem o desenvolvimento de sistemas catalíticos, como suporte de catalisadores à base de paládio, capazes de promover reações de acoplamento de Suzuki, para uma gama de substratos com excelente rendimentos em uma

perspectiva mais eco-sustentável satisfazendo os quesitos da química verde (JOO et al., 2020; MCCARTHY; BRADDOCK; WILTON-ELY, 2021; SHAIKH; PAMIDIMUKKALA, 2021).

A quitosana tem excelente propriedade antibacteriana e antifúngica para proteção de alimentos, e está ganhando importância, especialmente na aplicação de embalagens de alimentos para a fabricação de filmes e revestimento devido à sua atividade antimicrobiana inerente, capacidade de formação de filme e biodegradabilidade (BAKSHI et al., 2020; MUJTABA et al., 2019). O uso de filmes de quitosana como revestimentos comestíveis em frutas afeta positivamente suas propriedades físico-químicas, melhora a aparência e aumenta o tempo de prateleira, além de melhorar a qualidade microbiológica e processos bioquímicos durante o armazenamento pós-colheita das frutas (DE OLIVEIRA et al., 2017, 2020; DOS PASSOS BRAGA et al., 2019; MAHDY SAMAR et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2018).

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Esse estudo tem como objetivo **sintetizar quitosana** a partir da quitina extraída de **rejeitos da casca de camarão-rosa** (*Farfantepenaeus brasiliensis*) **oriundos da colônia Z-3 de Pelotas/RS, fazendo uso de metodologias diversas e, com esta matéria prima, produzir filmes de quitosana suportando quitosana triazenídica sintetizada nesse trabalho e íons cobre(II) e cobalto(II) e, por fim, caracterizar os materiais obtidos, de acordo com suas especificidades, por meio de análises químicas e físicas, avaliar sua aplicabilidade antifúngica, na complexação e adsorção de íons de cobre(II) e cobalto(II) e em reações de catálise de síntese orgânica promovidas por nanopartículas de paládio(0).**

Objetivos Específicos

Capítulo I – Processamento de casca de camarão, extração de quitina, síntese de quitosana por metodologias diversas, caracterização estrutural e avaliação de atividade antifúngica em amostras de quitosana

- ✓ Fazer reaproveitamento de matéria prima de rejeitos de cascas de camarão oriundas da colônia Z3 da cidade de Pelotas/RS;
- ✓ Extrair e purificar quitina a partir de cascas de camarão fazendo uso de processos de desmineralização e desproteínização;
- ✓ Sintetizar quitosana, partindo de quitina purificada, por meio de método químico de hidrólise básica
- ✓ Avaliar a síntese química de quitosana por três diferentes métodos, síntese convencional com sistema de refluxo e aquecimento, síntese via energia de micro-ondas e síntese via ultrassom;
- ✓ Caracterizar por métodos físicos e químicos os produtos de cada etapa de extração de quitina e síntese de quitosana, além de analisar comparativamente as quitosanas sintetizadas em relação a uma amostra de quitosana comercial da marca Sigma Aldrich®;

- ✓ Avaliar a granulometria e o teor de umidade em todas as etapas do processo de extração de quitina e síntese de quitosana;
- ✓ Utilizar os dados da análise gravimétrica de cinzas como indicativo de um processo de desmineralização eficiente;
- ✓ Utilizar o método Kjeldahl para determinação do nitrogênio total como indicativo de um processo eficiente de desproteínização,
- ✓ Avaliar a presença dos principais grupos funcionais em todas as amostras do processo de extração de quitina e síntese de quitosana por meio de FT-IV, como indicativo de não degradabilidade da amostra a cada processo químico;
- ✓ Avaliar a qualidade das amostras de quitosana e suas características intrínsecas por meio de titulação potenciométrica para determinação do grau médio de desacetilação ($\% \overline{GD}$) e por meio de medida viscosimétrica utilizando viscosímetro capilar Cannon-Fenske (Ostwald) para determinação da massa molar viscosimétrica ($\overline{M}_v$);
- ✓ Avaliar a estabilidade térmica de quitina e quitosana por meio de TGA/DTG e o grau de cristalinidade dos sólidos por meio DRX;
- ✓ Caracterizar a morfologia e a rugosidade da superfície das amostras sólidas por AFM, MEV e EDS;
- ✓ Avaliar quesitos da Química Verde nos processos realizados a exemplo de menores gastos energéticos, além da otimização do tempo de reação, tudo isso sem deixar de lado a avaliação sobre a eficiência e reprodutibilidade dos métodos empregados;
- ✓ Investigar *in vitro* o potencial antifúngico das amostras de quitosana sintetizadas nesse Capítulo I contra o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* causador da antracnose em goiabeiras, utilizando a quitosana comercial da marca Sigma Aldrich® como amostra de padrão comparativo.

Capítulo II – Síntese e caracterização de quitosana triazenídica, suporte em filmes de quitosana, avaliação na adsorção e complexação de cobre(II) e cobalto(II), atividade antifúngica e em reações de catálise em síntese orgânica

- ✓ Sintetizar filmes de quitosana (F-DS_{9h} e F-COM) com amostra sintetizada no Capítulo 1 (DS_{9h}) e com a amostra obtida comercialmente (COM);
- ✓ Propor de maneira inédita o uso de quitosana na síntese de compostos da classe “azo compostos”, chamados nessa tese de quitosana triazenídica, compostos C-01 (a partir de quitosana comercial – COM) e C-02 (a partir de quitosana sintetizada – DS_{9h}) e caracterizá-los por ponto de fusão, FT-IV, MEV, EDS e TGA/DTG;
- ✓ Suportar os azo compostos (C-01 e C-02) em filmes de quitosana na obtenção de materiais/filmes inéditos (F-COM/C-01 e F-DS_{9h}/C-02) e avaliar por FT-IV a presença dos principais grupos funcionais como indicativo do sucesso do suporte;
- ✓ Caracterizar os filmes F-DS_{9h}, F-DS_{9h}/C-02, F-COM e F-COM/C-01 por meio de TGA/DTG, DRX, AFM, MEV, EDS e AMD;
- ✓ Inserir cobre (II) e cobalto (II) nos filmes de quitosana (F-DS_{9h}, F-DS_{9h}/C-02, F-COM, F-COM/C-01), fazendo uso de soluções 0,005 mol·L⁻¹ e 0,05 mol·L⁻¹ de sulfato de cobre (II) e sulfato de cobalto (II) e avaliar esses filmes por DRX, AFM, FT-IV, TGA/DTG, MEV, EDS e AMD;
- ✓ Investigar *in vitro* o potencial antifúngico dos compostos inéditos, C-01 e C-02 e das soluções filmogênicas dos filmes F-DS_{9h}, F-DS_{9h}/C-02, F-COM e F-COM/C-01 contra o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* causador de antracnose em goiabeiras;
- ✓ Determinar a capacidade de adsorção dos íons Cu(II) e Co(II) em F-DS_{9h}, F-DS_{9h}/C-02, F-COM, F-COM/C-01, e o tempo necessário para sua saturação;
- ✓ Avaliar a influência de F-DS_{9h}, F-DS_{9h}/C-02, F-COM, F-COM/C-01 em reações de acoplamento cruzado de Suzuki-Miyaura em presença de nanopartículas de paládio(0) suportadas.

REVISÃO DA LITERATURA

Quitina

A quitina é o segundo biopolímero mais abundante depois da celulose estando presente não só no exoesqueleto de crustáceos, insetos e moluscos, mas também em uma variedade de fungos, cogumelos, algas verdes, paredes celulares e leveduras. Sua estrutura é composta de amino-polissacarídeo linear consistindo principalmente de unidades β -(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-(2-desoxi-D-glucopiranoose) e no processo de desacetilação conduz à quitosana, poli- β -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-(2-desoxi-D-glucopiranoose) (EL KNIDRI et al., 2018; FARIAS, 2009; KUMARI et al., 2015).

O termo quitina deriva da palavra grega “*khitón*” que significa carapaça. Em 1811 Henri Broconnot descobriu a quitina, no entanto o material apresentava muitas impurezas que deixavam inconsistências na estrutura da molécula. Em 1823, Odier denominou a quitina, mediante as diversas discussões acerca de certificar se o material era realmente novo ou derivado da celulose. Somente em 1943, Payen identificou a presença de nitrogênio na estrutura da quitina (MATHUR; NARANG, 1990; MUZZARELLI, 1977; ROBERTS, 1992).

Na natureza, a quitina está associada a proteínas, pigmentos e lipídeos, não é encontrada em sua forma pura, sendo necessários processos de purificação para remover os compostos indesejados (HAMED; ÖZOGUL; REGENSTEIN, 2016; MOURA et al., 2011; YOUNES; RINAUDO, 2015).

A produção comercial da quitina provém principalmente das carapaças de caranguejo, mexilhão, lagosta e de camarão. Entre esses, o camarão é o que contém a maior quantidade de quitina, obtendo uma composição aproximada de 20-30% de quitina, 30-40% de proteínas e 30-50% de sais inorgânicos, principalmente carbonato de cálcio além de alguns pigmentos incluindo carotenoides. No entanto a composição da casca de camarão varia dependendo da fonte e da espécie do camarão da qual a quitina foi isolada (ABDULKARIM et al., 2013; EL KNIDRI et al., 2018; HAMED; ÖZOGUL; REGENSTEIN, 2016; KUMARI et al., 2015).

A quitina é um polissacarídeo que representa a mais abundante fonte de nitrogênio encontrada nos oceanos e sua extração não causa problemas ao ecossistema além de possuir todas as vantagens dos polissacarídeos, sendo um

biopolímero compatível com tecidos animais e biodegradável. Em seu estado puro, é branca ou amarelada, inodora e insípida. Possui baixa toxidez e é altamente hidrofóbica, portanto, é insolúvel em água e até mesmo na maioria dos solventes orgânicos (HAMED; ÖZOGUL; REGENSTEIN, 2016; RINAUDO, 2006; YOUNES; RINAUDO, 2015).

Acredita-se que a baixa solubilidade da quitina seja devido à limitação por novas ligações de hidrogênio, que fazem da quitina um material rígido, solubilizando em apenas alguns solventes como os organoclorados, hexafluoroisopropanol, hexafluoroacetona e cloroálcoois em conjunto com soluções aquosas de ácidos minerais e dimetilacetamida contendo 5% de cloreto de lítio (HAMED; ÖZOGUL; REGENSTEIN, 2016; KUMAR DUTTA; DUTTA; TRIPATHI, 2004).

A estrutura molecular da quitina é muito semelhante à da celulose ambos estão representadas na Figura 1, sendo que se diferenciam apenas pela substituição do grupo hidroxila no carbono 2 (C-2) do anel piranosídico por um grupo acetamida.

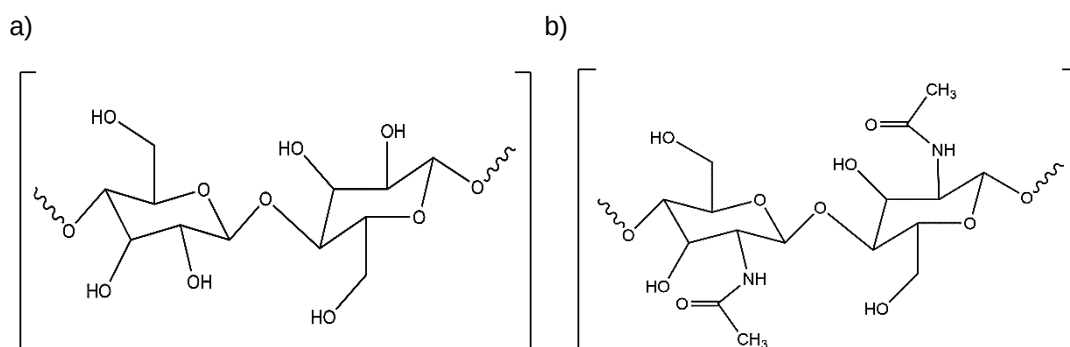


Figura 1 – Estrutura molecular da celulose (a) e da quitina (b).

A semelhança das estruturas remete à aplicação destes biopolímeros como materiais de revestimento, estruturas e defesa, em geral associados às proteínas. (BAXTER et al., 1992; POKHREL; YADAV; ADHIKARI, 2015; RINAUDO, 2006).

Estudos indicam que a quitina pode ocorrer nas formas α , β e γ dependendo da fonte. As diferenças entre os polimorfos de quitina são devidas ao arranjo das cadeias nas regiões cristalinas: a α -quitina possui uma estrutura de cadeias em camadas com mesma direção e sentido enquanto as camadas adjacentes tem direções opostas e antiparalelas; a β -quitina as camadas são

paralelas e com mesma direção e a γ -quitina possui estruturas paralelas e antiparalelas. Devido a essas diferenças, cada polimorfo de quitina possui propriedades diferentes específicas (EL KNIDRI et al., 2018; KUMIRSKA et al., 2010; “On chemistry of γ -chitin”, 2017; ROY et al., 2017).

As formas alomórficas α , β e γ da quitina podem ser evidenciados por estudos de difração de raios-X conforme esquematizado na Figura 2 em que as setas representam as camadas no arranjo das cadeias da quitina (EL KNIDRI et al., 2018; “On chemistry of γ -chitin”, 2017; ROY et al., 2017).

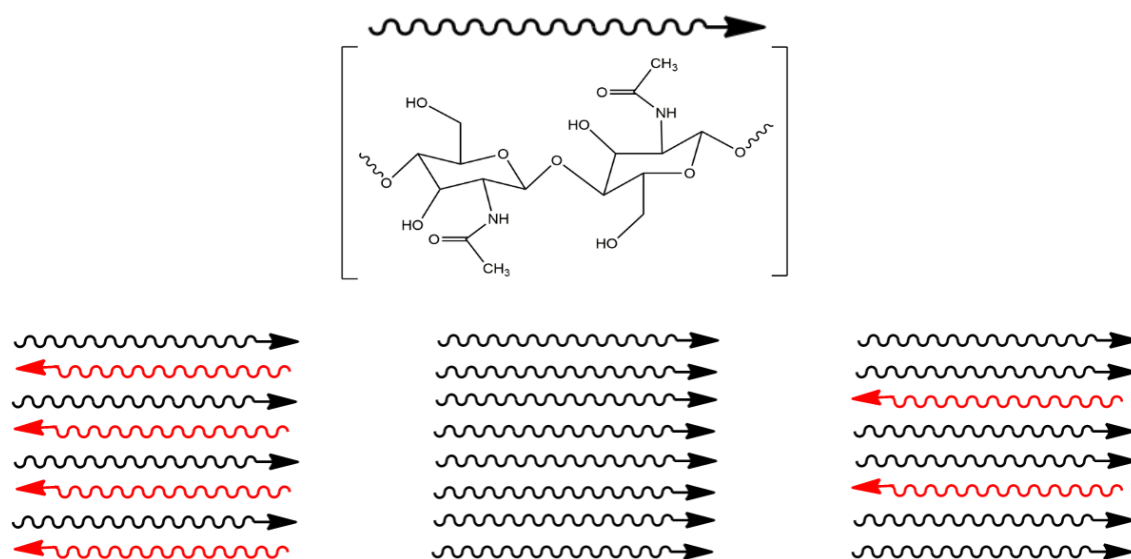


Figura 2 – Estrutura polimórfica da quitina: α -quitina (esquerda), β -quitina (centro) e γ -quitina (direita), sendo que as camadas de setas representam as cadeias poliméricas.

A α -quitina é a forma mais abundante, estável e corresponde a um empacotamento denso apresentado numa cela ortorrômbica compactada e é encontrada em estruturas resistentes geralmente obtida do exoesqueleto de crustáceos, paredes celulares de leveduras e cutículas de artrópodes em geral.

A estrutura de empacotamento antiparalelo da α -quitina é fortemente estabilizada por numerosas ligações de hidrogênio ao longo do eixo das três células unitárias devido ao arranjo antiparalelo de suas cadeias dentro das folhas de polímero, enquanto o arranjo paralelo observado na β -quitina impede o estabelecimento de ligações de hidrogênio intra-folha (BIROLI; DELEZUK; CAMPANA-FILHO, 2016).

A estrutura das cadeias unitárias de α -quitina (Figura 2) estão dispostas de maneira antiparelela e as cadeias adjacentes estão sempre em direção oposta favorecendo a existência de numerosas ligações de hidrogênio intercadeia e intra-cadeia da mesma lamela ou lamelas vizinhas (EL KNIDRI et al., 2018; KAYA et al., 2017; KUMIRSKA et al., 2010; ROY et al., 2017). Devido à alta estabilidade termodinâmica desse isomorfo a α -quitina pode ser formada por processos de recristalização a partir de solução de quitina, biossíntese in vitro ou polimerização enzimática (YOUNES; RINAUDO, 2015).

A β -quitina é mais solúvel e mais reativa em relação aos seus isomorfos; também é mais suscetível ao intumescimento do que a α -quitina e pode ser convertida na forma α -quitina por tratamento alcalino. O arranjo das cadeias na conformação β -quitina resulta de uma estrutura monoclinica e seu empacotamento possui menor densidade, dificultando o estabelecimento de ligações hidrogênio intermoleculares envolvendo cadeias de lamelas adjacentes (IOELOVICH, 2014; KAYA et al., 2017; KUMIRSKA et al., 2010).

Uma terceira forma é γ -quitina, que parece ser uma combinação das formas α e β ; é uma variante do arranjo α , pois as cadeias de duas lamelas em disposição paralela são intercaladas por camadas com cadeias antiparalelas (KAYA et al., 2017; ROY et al., 2017).

Muitos métodos foram propostos na literatura para extração da quitina. No entanto, nenhum método padrão foi adotado devido à diversidade da matéria-prima (MOURA et al., 2015; YOUNES; RINAUDO, 2015).

A extração da quitina em geral ocorre por processos de desproteínização e desmineralização e podem ser realizados utilizando tratamentos químicos ou enzimáticos, iniciando pela desmineralização ou pela desproteínização da quitina ou ainda as reações podem ser realizadas ao mesmo tempo, de maneira simultânea (HAMED; ÖZOGUL; REGENSTEIN, 2016; POKHREL; YADAV; ADHIKARI, 2015; YOUNES; RINAUDO, 2015).

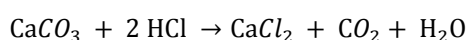
Independentemente do tratamento selecionado, a extração da quitina começa com a seleção da matéria-prima. No caso desse trabalho, as cascas de camarão foram escolhidas, limpas, secas e moídas. Especificamente, para os camarões, a parede da casca é mais fina, portanto o isolamento da quitina é mais fácil se comparado às carapaças de outros crustáceos, como o caranguejo e o siri (HAMED; ÖZOGUL; REGENSTEIN, 2016; YOUNES; RINAUDO, 2015).

Diversos processos são relatados na literatura (Tabela 1) para a extração da quitina por métodos químicos, que em sua maioria envolvem três etapas: desmineralização, desproteínização e descoloração. Para a desmineralização soluções de ácido clorídrico são preferidas para remover os constituintes minerais como o carbonato de cálcio e fosfato de cálcio entre outros, em curto tempo de reação. Na etapa da desproteínização da quitina é realizado tratamento alcalino, sendo as soluções de hidróxido de sódio as mais utilizadas para a remoção de proteínas. Alguns autores ainda relatam a necessidade de uma etapa de descoloração para obter um produto branco conforme a espécie da matéria-prima e o objetivo pretendido, utilizando solventes orgânicos (ABDULKARIM et al., 2013; AL-MANHEL; AL-HILPHY; NIAMAH, 2018; EL KNIDRI et al., 2018; HAMED; ÖZOGUL; REGENSTEIN, 2016; KUMARI et al., 2015; QU et al., 2015).

As condições das reações no processo de desmineralização e desproteínização podem variar consideravelmente em cada estudo, conforme o tamanho da partícula, tempo de extração, temperatura, proporção massa de produto em relação ao volume de solução e conforme a concentração do solvente utilizado e o método adotado (ABDULKARIM et al., 2013; AL-MANHEL; AL-HILPHY; NIAMAH, 2018; EL KNIDRI et al., 2016; KUMARI et al., 2015; YOUNES et al., 2012; ZVEZDOVA, 2010).

A extração da quitina foi realizada pela primeira vez, fazendo uso de radiação de micro-ondas, por Knidri et al., (2016), em substituição à extração convencional. Todas as etapas, desde a extração da quitina até a síntese de quitosana, foram realizadas por meio de radiação de micro-ondas, obtendo excelentes resultados. A etapa de desmineralização (Equação 1) consiste na remoção de minerais, principalmente do carbonato de cálcio pela formação de sais minerais solúveis em água e liberação do ácido carbônico (GÓMEZ-RÍOS; BARRERA-ZAPATA; RÍOS-ESTEPA, 2017).

Equação 1 – Reação de desmineralização



Equação 1

Tabela 1 – Comparativo de condições de extração de quitina.

Fonte	PQ*	Desmineralização				Desproteínização				Autores
		HCl**	Proporção (m:v)***	T (°C)	t (h)	NaOH**	Proporção (m:v)***	T (°C)	t (h)	
Escamas de peixe	C	1	1:20	20	2	0,5	1:20	20	18	(KUMARI et al., 2015)
Concha de mexilhão	C	0,68	1:10	20	6	0,62	1:10	20	16	(ABDULKARIM et al., 2013)
Casca de camarão	C	0,9	1:10	20	24	0,25	1:10	60	24	(ZVEZDOVA, 2010)
Casca de camarão	C	3	1:10	75	2	0,25	1:10	80	2	(EL KNIDRI et al., 2016)
Casca de camarão	C	3	1:15	20	6	12,5	1:10	50	6	(AL-MANHEL; AL-HILPHY; NIAMAH, 2018)
Casca de camarão	C	0,75	1:30	20	1	1,5	1:30	70	1	(OLIVEIRA et al., 2016)
Casca de camarão	C	1,5	1:10	50	6	1,25	1:10	80	4	(YOUNES et al., 2012)
Casca de camarão	C	1,5	1:10	20	48	2,5	1:10	80	72	(ABREU et al., 2013)
Casca de camarão	C	2	1:40	50	4	5	1:30	80	2	(NOURI et al., 2016)
Casca de camarão	C	0,05	1:20	60	2	3	1:20	80	2	(BIROLI; DELEZUK; CAMPANA-FILHO, 2016)
Casca de camarão	M	2,5	1:10	100	0,06	1,25	1:10	100	0,1	(EL KNIDRI et al., 2019)

*Processo Químico: Convencional por aquecimento em banho de óleo e sistema de refluxo acoplado (C) ou por radiação de micro-ondas (M).

**Concentração molar(mol.L⁻¹.)

***Proporção (m:v) entre massa de quitosana e volume de solução

Outros constituintes minerais da matéria-prima também podem reagir com a solução ácida, formando sais solúveis em água por meio de uma reação de dupla troca, a exemplo da Eq. 1. (EL KNIDRI et al., 2018; HAMED; ÖZOGUL; REGENSTEIN, 2016; YOUNES; RINAUDO, 2015; ZVEZDOVA, 2010).

A etapa da desproteínização compreende a remoção de proteínas obtendo a quitina purificada e ocorre simultaneamente em duas etapas (Figura 3). A etapa A mostra a síntese de quitosana diretamente, em conjunto com a reação de desproteínização em meio básico. Já a etapa B mostra a etapa de desproteínização, apenas, com formação de quitina pura.

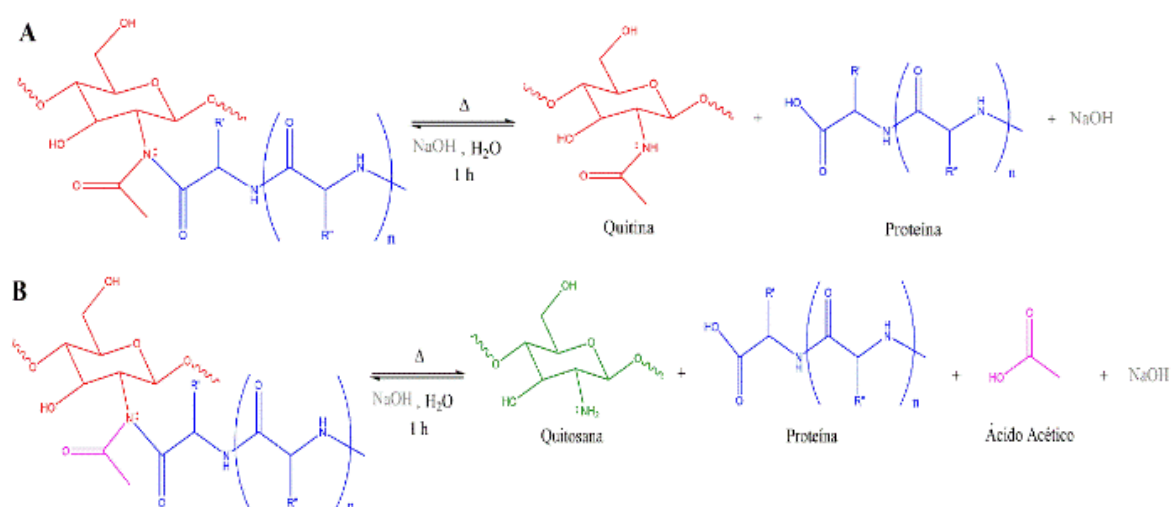


Figura 3 – Reação de desproteínização de quitina. Fração azul representa a proteína, e a fração vermelha representa a quitina. Fonte: Autor

O processo de desproteínização representa a etapa mais crítica para extração da quitina purificada devido à ruptura das ligações químicas entre a quitina e as proteínas. O rompimento dessas ligações em geral é realizado de forma heterogênea (YOUNES; RINAUDO, 2015) usando produtos químicos básicos (NaOH, Na₂CO₃, NaHCO₃, KOH, K₂CO₃, Ca(OH)₂, etc), que podem despolimerizar o biopolímero. A remoção completa das proteínas é especialmente importante para aplicações biomédicas, uma vez que uma porcentagem da população humana é alérgica a moluscos, sendo o principal culpado o componente proteico (EL KNIDRI et al., 2018; YOUNES; RINAUDO, 2015). Nessa etapa, com o uso de NaOH, ocorre também, inevitavelmente, a desacetilação parcial da quitina (síntese de quitosana) e a hidrólise do biopolímero diminuindo seu peso molecular; por isso é necessário trabalhar em

condições controladas nessa etapa, a fim de evitar estas consequências (ABDULKARIM et al., 2013; EL KNIDRI et al., 2018; HAMED; ÖZOGUL; REGENSTEIN, 2016).

Quitosana

A quitosana é um polímero linear (Figura 4) sendo constituído por unidades de $\beta(1\rightarrow4)$ -2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose e $\beta(1\rightarrow4)$ -2-acetoamido-2-desoxi-D-glicopirranose interligadas entre si dependendo do grau de desacetilação ($\overline{GD}$) e da massa molar viscosimétrica (M_v) (MATHUR; NARANG, 1990; ROBERTS, 1992; YOUNES; RINAUDO, 2015).

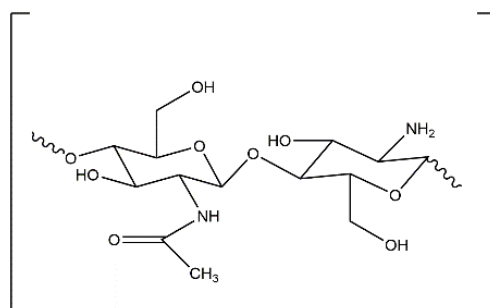


Figura 4 – Quitosana evidenciando as unidades poliméricas e os grupos acetamida e amina.

A estrutura da quitosana, representada na Figura 4 permite evidenciar a presença de quatro grupos funcionais característicos, grupamentos hidroxila primários e secundários, bem como grupos amina e acetamida. Esses grupos funcionais permitem à quitosana sofrer modificações químicas e físicas, sendo o grupo amina responsável pela solubilidade do polímero em meio ácido (EL KNIDRI et al., 2018; MUXIKA et al., 2017; YOUNES; RINAUDO, 2015).

A quitosana foi descoberta por Rougeut em 1859. Ao adicionar uma amostra de quitina à uma solução de hidróxido de sódio quente, obteve um derivado solúvel. No entanto, as pesquisas com o biopolímero somente tiveram início no século seguinte. O termo quitosana foi dado ao composto da quitina desacetilada, em 1894, por Hoppe-Seyler (MATHUR; NARANG, 1990; RINAUDO, 2006; SIGNINI; CAMPANA FILHO, 1998).

A produção de quitosana pode ser feita por método químico ou enzimático. O tratamento químico é o mais utilizado pela possibilidade de produções em alta escala e pelo baixo custo (YOUNES; RINAUDO, 2015). A

remoção dos grupamentos acetil ocorre no processo de desacetilação da quitina desproteínizada e desmineralizada (ou seja, quitina purificada), e se refere à despolimerização com quebra das ligações de hidrogênio presentes do grupo acetil ($\text{N}-\text{H}\cdots\text{O}$ e $\text{O}-\text{H}\cdots\text{O}$), desestabilizando o polímero. A massa molecular é reduzida nesta etapa, em meio alcalino, sob condições severas de concentração e temperatura (ROBERTS, 1992; ROY et al., 2017).

A reação geral de desacetilação alcalina da quitina desmineralizada e desproteínizada pode ser observada na Figura 5, adaptado de Barbosa (2011).

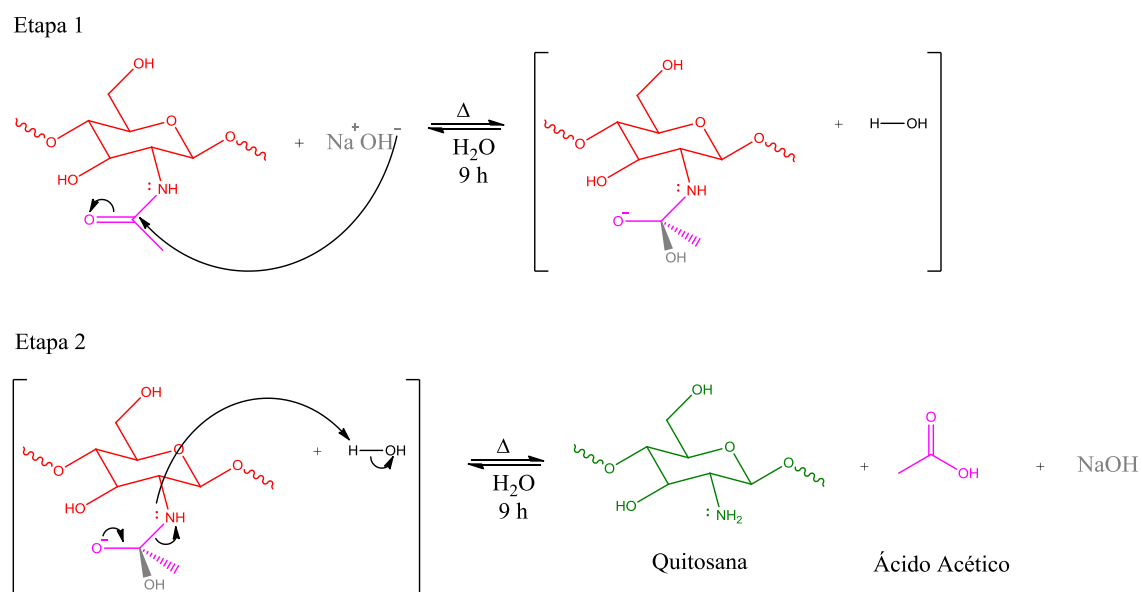


Figura 5 – Esquema da reação de desacetilação alcalina da quitina.

A reação de desacetilação (Figura 5) ocorre pela hidrólise básica da amida em meio aquoso em que a hidroxila da base ataca a carbonila do grupo acetamida, ao mesmo tempo em que rompe uma das ligações duplas ao oxigênio ($=\text{O}$), gerando o ânion ($-\text{O}^-$). O carbono tetraédrico do grupo acetamida, por sua vez torna-se vulnerável a sofrer uma fissão, ocorre o rompimento da ligação com o nitrogênio, que atua como base de Lewis, na ligação com o hidrogênio da água formando o grupo amino e, dando origem à quitosana. O ácido acético é formado ao final da reação e hidróxido de sódio que atuou como catalisador é recuperado (GÓMEZ-RÍOS; BARRERA-ZAPATA; RÍOS-ESTEPA, 2017; SOLOMONS; FRYHLE; SNYDER, 2018).

A quitosana é caracterizada principalmente pelo grau de desacetilação ($\overline{GD}$) e a massa molar viscosimétrica (M_v). Esses parâmetros afetam diretamente as propriedades funcionais (biocompatibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade, etc.) e as propriedades físico-químicas e biológicas da quitosana (solubilidade, hidrofiliabilidade, cristalinidade, etc.) e, variam conforme varia a fonte da matéria-prima utilizada na síntese da quitosana (RINAUDO, 2006; ZVEZDOVA, 2010). (CZECHOWSKA-BISKUP et al., 2012; EL KNIDRI et al., 2018).

O grau de desacetilação é empregado basicamente para diferenciar a quitina da quitosana, e a presença de grupos amina confere melhor solubilidade à quitosana em soluções ácidas (BUMGARDNER; JENNING, 2016; YOUNES; RINAUDO, 2015).

A relação glicosamina/N-acetilglicosamina, aumenta conforme a quitina é convertida em quitosana. Portanto, quando a porcentagem de grupamentos amina livres presentes (glicosamina) é maior que a dos grupos acetamida (N-acetilglicosamina) o composto é chamado quitosana (EL KNIDRI et al., 2018; HAMED; ÖZOGUL; REGENSTEIN, 2016; MATHUR; NARANG, 1990; MUJTABA et al., 2019; YOUNES; RINAUDO, 2015).

Para o grau de acetilação ($\overline{GA}$) maior que 50% o polímero é chamado de quitina, e quando for inferior a 50%, o polímero é chamado quitosana desde que apresente solubilidade em soluções levemente ácidas (ABDULKARIM et al., 2013; CZECHOWSKA-BISKUP et al., 2012; EL KNIDRI et al., 2018; RINAUDO; MILAS; LE DUNG, 1993; YOUNES; RINAUDO, 2015; ZHUANG; ZHONG; ZHAO, 2019).

O grau de desacetilação superior a 50% melhora a solubilidade da quitosana devido à presença dos grupos amina protonados que determinam repulsões eletrostáticas entre a cadeia da quitosana (intra e inter-cadeias) e as ligações de hidrogênio com a solução, resultando na solubilidade em soluções ácidas (ROY et al., 2017; YOUNES; RINAUDO, 2015).

O aumento do grau de desacetilação acarreta a diminuição no tamanho do polímero de quitosana conforme relata Roy et al., (2017). A solubilidade também é influenciada pela massa molar do polímero, pelo pH ácido do meio e pelo efeito da força iônica e temperatura (ROY et al., 2017).

Em meio ácido, os grupos amina no esqueleto de quitosana aumentam a ionização, formando o cátion $-NH_3^+$ que aumenta a capacidade de efetuar

ligações de hidrogênio como o solvente. Já em pH mais alto ($> \text{pH } 6,0$) o polissacarídeo precipita (BEMILLER, 2006; CZECHOWSKA-BISKUP et al., 2012; ROY et al., 2017; YOUNES; RINAUDO, 2015).

Além do grau de desacetilação a massa molar viscosimétrica também influencia nas alterações conformacionais e na solubilidade da quitosana. A solubilidade da quitosana em pH ácido aumenta com a diminuição do peso molecular. Além das ligações de hidrogênio, as interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals também auxiliam na solubilidade da quitosana (GONSALVES et al., 2011; KUMARI et al., 2015; MOURA et al., 2011; YOUNES; RINAUDO, 2015).

As características da quitosana diferem conforme a fonte, a espécie da matéria-prima e o método de extração. Autores relatam que os processos químicos que usam alta temperatura, aumentam o grau de desacetilação e consequentemente a solubilidade, mas pode ocorrer a degradação térmica da quitosana e decompor as cadeias poliméricas, diminuindo sua massa molecular (EL KNIDRI et al., 2018; KUMARI et al., 2015; YOUNES; RINAUDO, 2015).

Na literatura uma infinidade de processos químicos já foi relatada para a desacetilação da quitina purificada. Geralmente, a quitina é suspensa em soluções aquosas concentradas de hidróxido de sódio (40 – 60%), durante diferentes tempos (horas ou dias) e temperaturas relativamente altas em banho de óleo e sistema acoplado a refluxo (50 – 140 °C) acarretando alto consumo energético, devido à demora da reação. A alta temperatura, a concentração elevada da solução de hidróxido de sódio, o longo tempo de duração da reação e consumo de energia são desvantagens impactantes no processo (ABREU et al., 2013; ALISHAHI et al., 2011; EL KNIDRI et al., 2016, 2018, 2019).

Na literatura podemos verificar nos diversos trabalhos publicados no que tange a desacetilação da quitina, e nos diversos métodos utilizados, que a desacetilação da quitina não é um processo tão simples ou fácil, devido as variabilidades da matéria-prima e dos métodos utilizados. A problemática da síntese se dá quando se busca por uma quitosana com alto grau de desacetilação, que é um dos principais parâmetros de qualidade e de aplicação do produto final, não sendo um método de fácil reprodutibilidade (EL KNIDRI et al., 2018; SURAT; JAUHARI; DESAK, 2012; ZHAO et al., 2019a).

A literatura revela a quitina e a quitosana sendo obtidas por processo de aquecimento convencional como método químico e por processos biológicos. Pesquisadores vêm estudando uma grande variedade de técnicas como eletroquímica, fotoquímica, sonoquímica, enzimática e método de síntese por micro-ondas ou radiofrequência, para encontrar um método alternativo de extração de quitina e síntese de quitosana, que seja eficiente, rápido e mais amigável ao meio ambiente, de acordo com o princípios da Química Verde (BIROLI; DELEZUK; CAMPANA-FILHO, 2016; EL KNIDRI et al., 2018; FIAMINGO et al., 2016; MUJTABA et al., 2019; SEDAGHAT et al., 2017; SURAT; JAUHARI; DESAK, 2012).

A utilização da radiação de micro-ondas tem apresentado excelentes resultados na síntese de quitosana e pode ser usada como uma alternativa aos processos químicos convencionais em escala industrial. As principais vantagens do processo de extração por micro-ondas são a alta qualidade dos produtos e o menor custo frente aos processos químicos convencionais (EL KNIDRI et al., 2019; NOURI et al., 2016; ZHAO et al., 2019a; ZHUANG; ZHONG; ZHAO, 2019).

A tecnologia de micro-ondas pode ser usada como uma excelente alternativa ao aquecimento térmico convencional, pois oferece taxas de reação aumentadas, tempos de reação mais curtos, rendimentos mais altos, economia de energia e redução de reações paralelas (EL KNIDRI et al., 2016; SURAT; JAUHARI; DESAK, 2012; ZHAO et al., 2019a).

Micro-ondas são uma forma de energia eletromagnética localizada no espectro eletromagnético entre 300 e 300.000 MHz; uma região que fica entre o infravermelho e as radiofrequências. Fornos de micro-ondas domésticos operam a uma frequência de 2,45 GHz ou cerca de 900 MHz (BANIK; BANDYOPADHYAY; GANGULY, 2003).

O aquecimento por micro-ondas é baseado na habilidade de alguns líquidos e sólidos possuem em transformar energia eletromagnética em calor e revolucionou o cozimento e a química. O aquecimento micro-ondas pode, portanto, ser descrito como uma forma de conversão de energia em vez de uma forma de aquecimento; à medida que a energia eletromagnética é convertida em calor (BANIK; BANDYOPADHYAY; GANGULY, 2003; BARBOZA et al., 2001; SURAT; JAUHARI; DESAK, 2012).

Barboza et al. (2001) descreve em seu estudo, a taxa de aquecimento no micro-ondas de diferentes solventes que apresentam comportamento térmicos diferentes de acordo com seu momento dipolo e a capacidade calorífica.

A produção de calor é afetada pela quantidade de calor produzido e, portanto, depende da constante dielétrica, do tamanho da molécula e da viscosidade. No entanto, a dissipação de energia, que leva a produção de calor também varia com a temperatura e com a frequência da micro-onda utilizada (BARBOZA et al., 2001; SURAT; JAUHARI; DESAK, 2012).

A radiação por micro-ondas substituiu o aquecimento convencional usando o aquecimento tridimensional da massa; ocasionando em transformações químicas, em minutos ao invés de horas ou dias (EL KNIDRI et al., 2016, 2019; HAYES; HAYES, 2015; SEBASTIAN et al., 2019; SURAT; JAUHARI; DESAK, 2012).

Diversos estudos revelam que a tecnologia de micro-ondas é uma tecnologia mais barata, mais ecológica e rentável para a síntese de quitosana em larga escala. Estudos demonstram diferentes condições reacionais, variando a concentração da solução de NaOH (30-70%), a razão soluto e solvente (m:v), o tempo de reação e a potência de radiação aplicada (EL KNIDRI et al., 2016, 2019; ZHAO et al., 2019a).

A radiação de ultrassom também vem sendo pesquisada e utilizada para a síntese de quitosana. O ultrassom é uma onda de pressão sonora oscilante com uma frequência maior que o limite superior da faixa de audição humana (> 20 kHz). O uso do ultrassom, com baixa e alta potência (20–100 kHz), já foi aplicado nos campos de alimentos e biotecnologia, na extração e ajuste das características físicas e químicas dos materiais, bem como na atividade de enzimas (CHANDRAPALA et al., 2012; SORIA; VILLAMIEL, 2010).

A síntese de quitosana foi realizada com o uso da radiação do ultrassom por diversos autores. Entretanto, eles relatam que o ultrassom causa um impacto na massa molar viscosimétrica e no grau de desacetilação da quitosana devido a despolimerização da molécula e confirmam em seus estudos que a exposição prolongada de soluções contendo macromoléculas à radiação de ultrassom diminui a viscosidade das soluções como resultado dos processos de despolimerização (BIBI et al., 2018; COSTA et al., 2021; CRAVOTTO et al.,

2005; DELEZUK et al., 2011; DUONG; NGHIA, 2017; KUMIRSKA et al., 2010; WU et al., 2008).

A desacetilação da quitina assistida por radiação de ultrassom de alta intensidade foi relatada como um processo eficiente para produzir quitosana, em que não ocorreu despolimerização da quitosana. Os autores demonstram que mesmo realizando a reação em menor tempo e temperatura mais baixa foi possível manter a qualidade da quitosana, com alto grau de desacetilação e alta massa molar média (BIROLI; DELEZUK; CAMPANA-FILHO, 2016; FIAMINGO et al., 2016; ZHU et al., 2018).

A ação da radiação ultrassônica pode melhorar a eficiência da reação, aumentando a acessibilidade aos sítios reativos através do fenômeno da cavitação que aumenta a área de superfície da partícula em decorrência da energia liberada e do impacto das violentas colisões que provoca (FIAMINGO et al., 2016).

A sonicação pode melhorar a eficiência da reação, aumentando a acessibilidade aos sítios reativos através do fenômeno da cavitação que aumenta a área de superfície da partícula em decorrência da energia liberada e do impacto das violentas colisões que provoca, o que facilita a taxa de reação e reduz significativamente o tempo (ALMEIDA; DELEZUK; CAMPANA-FILHO, 2019).

A radiação do ultrassom é capaz de aliviar a gravidade das condições da reação (temperatura, tempo, produtos químicos), melhorar a qualidade dos produtos, além de reduzir os custos (BIROLI; DELEZUK; CAMPANA-FILHO, 2016; DUONG; NGHIA, 2017; FIAMINGO et al., 2016). Do ponto de vista da química verde, o método de extração química convencional por refluxo para a síntese de quitosana desperdiça energia relativamente em comparação a outros métodos, tais como via radiação de micro-ondas e ultrassom. Nesse sentido, a utilização de micro-ondas foi impulsionada pela facilidade do uso e reprodutibilidade do método, capacidade de produção em alta escala, entre outras vantagens, para o desenvolvimento de abordagens mais ecológicas e econômicas para a produção de quitosana (ANWAR; ANGGRAENI; AMIN, 2017; BIROLI; DELEZUK; CAMPANA-FILHO, 2016; EL KNIDRI et al., 2018, 2019; FIAMINGO et al., 2016; ZHU et al., 2018).

Atualmente, na busca de eficiência e baixo consumo energético, a tecnologia com uso de radiação de micro-ondas e de ultrassom tem sido aplicada para síntese de quitosana em condições de reação diversas e até similar às condições reacionais do método convencional e os resultados têm sido satisfatórios. A diferença entre os métodos de síntese da quitosana está resumido na Tabela 2.

Todos os autores relatam que a quitosana obtida passa por filtração e lavagem até pH neutro com água destilada e posterior secagem em estufa (40-80°C) por 24 a 72h (Tabela 2).

Podemos observar a relação existente entre as condições reacionais na desacetilação e da fonte da matéria-prima de quitina. No método convencional, quando utilizou-se alta concentração da solução de hidróxido de sódio (25 mol.L⁻¹), tempo de 20h e temperatura de 75° C, obteve-se % $\overline{GD}$ de 60%, quando a fonte da quitina purificada eram conchas de mexilhão (Tabela 2). Porém quando a fonte da quitina purificada eram as escamas de peixe foi obtido praticamente o mesmo (% $\overline{GD}$) usando a metade da concentração de solução de hidróxido de sódio (12,5 mol.L⁻¹), com aumento da temperatura e, redução do tempo de reação para 6h.

As condições reacionais (tempo, temperatura, tamanho de partícula, método) e a fonte da quitina influenciam diretamente no grau de desacetilação ($\overline{GD}$) e na massa molar viscosimétrica média ($\overline{M}_v$), que são os principais parâmetros para avaliar a qualidade da quitosana e sua perspectiva futura de aplicação.

Em geral, os autores utilizaram condições semelhantes para a solução de hidróxido de sódio entre (10-15mol.L⁻¹) e a temperatura (80-140°C), variando o tempo de reação, a razão da (quitina/solução de NaOH), o método de reação e o % $\overline{GD}$ obtido. Maiores valores de % $\overline{GD}$ foram obtidos pelo método de micro-ondas (89,3%) e pelo ultrassom (88%), no entanto o método com uso do ultrassom necessitou do dobro de tempo para manter praticamente o mesmo rendimento do método com micro-ondas (Tabela 2).

Tabela 2 – Comparação das condições de síntese de quitosana em diferentes métodos de acordo com a literatura

Fonte da quitina purificada	Desacetilação da quitina purificada						Autores
	Método*	NaOH (mol.L ⁻¹)	T(°C)	t(h)	Razão** (m:v)	($\overline{GD}$)%	
Escamas de peixe	C	12,5	120	6,0	1:20	61,0	(KUMARI et al., 2015)
Conchas de mexilhão	C	25,0	75	20,0	1:10	60,0	(ABDULKARIM et al., 2013)
Casca de camarão	C	12,5	80	8,0	1:30	79,8	(ZVEZDOVA, 2010)
Casca de camarão	C	12,5	100	2,5	1:20	81,5	(EL KNIDRI et al., 2016)
Casca de camarão	C	12,5	100	5,0	1:10	75,0	(AL-MANHEL; AL-HILPHY; NIAMAH, 2018)
Casca de camarão	C	12,5	140	4,0	1:10	78,0	(YOUNES et al., 2012)
Casca de camarão	MO	12,5	120	0,5	1:5	77,0	(ABREU et al., 2013)
Casca de camarão	MO	12,5	120	0,5	1:30	89,3	(NOURI et al., 2016)
Casca de camarão	MO	12,5	120	0,4	1:20	82,7	(EL KNIDRI et al., 2016)
Casca de camarão	MO	10,0	120	0,2	1:20	76,6	(EL KNIDRI et al., 2019)
Casca de camarão	U	10,0	80	1,0	1:10	88,0	(FIAMINGO et al., 2016)
Casca de camarão	U	10,0	90	1,0	1:20	78,0	(BIROLI; DELEZUK; CAMPANA-FILHO, 2016)
Casca de camarão	U	15,0	100	1,0	1:10	74,2	(ANWAR; ANGGRAENI; AMIN, 2017)

* Método de síntese C (convencional), MO (micro-ondas) e U (ultrassom). ** Razão (m:v) – razão de massa de quitina purificada em relação ao volume de solução de hidróxido de sódio

As principais vantagens do processo de síntese de quitosana por micro-ondas relatadas na literatura são o menor tempo de reação, a alta qualidade dos produtos, menor custo quando comparado aos processos químicos convencionais, além de ser de fácil reprodutibilidade e implementação, portanto, respeita os princípios de Química Verde (ABREU et al., 2013; EL KNIDRI et al., 2016, 2019; NOURI et al., 2016). Logo, a tecnologia de micro-ondas pode ser usada como uma excelente alternativa ao aquecimento térmico convencional, com excelentes resultados. Nesse contexto pode realizar transformações químicas em minutos, em vez de horas ou dias (ALISHAHI et al., 2011; EL KNIDRI et al., 2016, 2018, 2019; SURAT; JAUHARI; DESAK, 2012; ZHANG et al., 2020; ZHAO et al., 2019a), sendo que essas transformações podem modificar ou melhorar as propriedades funcionais, físico-químicas e biológicas da quitosana (ANWAR; ANGGRAENI; AMIN, 2017; CRAVOTTO et al., 2005; DELEZUK et al., 2011; SORIA; VILLAMIEL, 2010; ZHU et al., 2018).

Diante da problemática do tempo de extração da quitina e síntese de quitosana, o desenvolvimento de novos métodos alternativos que sejam mais rápido, seguros, reprodutíveis, eficientes e sustentáveis têm atraído grande interesse. No entanto os autores destacam a necessidade de uma padronização da amostra comercial mediante sua caracterização, além de um maior detalhamento quanto à matéria-prima de partida e outras propriedades (FONSECA, 2016; HACKBART, 2017; KUMARI et al., 2015; MUXIKA et al., 2017). A quitosana produzida industrialmente pode ser adquirida conforme o grau de desacetilação ($\overline{GD}$) desejado, variando entre 70 e 95% e conforme sua massa molecular, entre 10^4 e 10^6 g.mol⁻¹. Em geral, o fabricante apresenta a ficha de especificação indicando, além do grau de desacetilação e massa molecular, a fonte da matéria-prima e propriedades como densidade (SIGMA-ALDRICH, 2019).

Propriedades dos polímeros de quitina e quitosana e caracterizações

Análises físico-químicas são muito aplicadas para acompanhar a eficiência do processo de extração de quitina e síntese de quitosana, como por exemplo, umidade, cinzas e nitrogênio (ABDULKARIM et al., 2013; AL-MANHEL; AL-HILPHY; NIAMAH, 2018; ALISHAHI et al., 2011; COCOLETZI et al., 2009;

GÓMEZ-RÍOS; BARRERA-ZAPATA; RÍOS-ESTEPA, 2017; HOSSAIN; IQBAL, 2014; KUMARI et al., 2015; MAREI et al., 2016; NOURI et al., 2016; POERIO et al., 2020; SOON et al., 2018; TRUNG et al., 2020; YOUNES et al., 2012).

A viscosimetria, embora seja um método não absoluto, é um dos processos mais utilizados para a determinação da massa molar de polímeros. As medidas são feitas com base no tempo de escoamento do solvente e das soluções diluídas do polímero, utilizando-se um viscosímetro (SANTOS; SOARES; DOCKAL, 2003).

A massa molar viscosimétrica média ($\overline{M}_V$) geralmente é calculada a partir da viscosidade intrínseca (menor impacto de pequenas frações de agregados) usando a relação de Mark-Houwink. Os parâmetros K, α e $\overline{M}_V$ podem ser determinados por diversos métodos, como o uso de dispersão de luz (DLS), cromatografia de permeação em gel (GPC), no entanto o resultado obtido geralmente pode estar superestimado devido à alta sensibilidade e à formação de agregados. Essas desvantagens podem ser omitidas, por exemplo, pela utilização de uma solução tampão de ácido acético 0,3 mol.L⁻¹/acetato de sódio 0,2 mol.L⁻¹ (pH = 4,5) como solvente que não forma agregados (RINAUDO; MILAS; LE DUNG, 1993; YOUNES; RINAUDO, 2015).

Rinaudo (2006) relata em seu artigo que o tempo de armazenamento e a temperatura ambiente influenciam diretamente na viscosidade das soluções ácidas de quitosana. O sistema solvente adotado de solução de ácido acético 0,3 mol.L⁻¹ e acetato de sódio 0,2 mol.L⁻¹ (1:1 v/v) (pH = 4,5) foi utilizado por diversos autores (ABREU et al., 2013; BIROLI; DELEZUK; CAMPANA-FILHO, 2016; FIAMINGO et al., 2016; FONSECA, 2016; KUMARI et al., 2017; NOURI et al., 2016; ZHAO et al., 2019a).

A técnica de viscosimetria capilar é a mais simples, de baixo custo, acessível e pode ser o método de determinação mais preciso (RINAUDO, 2006; YOUNES; RINAUDO, 2015). No entanto existem outras técnicas para a determinação da massa molar viscosimétrica média ($\overline{M}_V$) a partir da viscosidade intrínseca, sendo que as principais técnicas estão resumidas na Tabela 3.

A variação da massa molar viscosimétrica média ($\overline{M}_V$) observada nos diversos estudos (Tabela 3), pode ser causado pela diferença no grau de desacetilação ou pelas diferentes fontes de quitina. Além disso, diversos fatores

decorrentes do processo de extração da quitina e síntese de quitosana, tais como variações: no tratamento prévio da quitina, na fonte de energia empregada, na temperatura de tratamento, na concentração do álcali e no tempo de reação, podem influenciar na massa molar viscosimétrica média ($\overline{M}_v$).

Tabela 3 – Principais técnicas utilizadas para a determinação da $\overline{M}_v$ e métodos adotado para a síntese de quitosana.

Síntese	Técnica	Referências
DS _{CONVENIONAL}	Viscosimetria capilar	33 kDa (ABREU et al., 2013); 48,2 kDa (FONSECA, 2016); 21,2 kDa (ANTONINO, 2007); 36,8 (HACKBART, 2017); 47,7 kDa (GÓMEZ-RÍOS; BARRERA-ZAPATA; RÍOS-ESTEPA, 2017); 62,2 kDa (KUMARI et al., 2017); 45 kDa (MA; XIN; TAN, 2015); 105 kDa (HOSSAIN; IQBAL, 2014); 40 kDa (ZHU et al., 2018); 109 kDa (SEBASTIAN et al., 2019).
	GPC ¹	(161 – 451) kDa (TRUNG et al., 2020).
	DLS ²	165 kDa (EL KNIDRI et al., 2016).
DS _{MICRO}	Viscosimetria capilar	41,3 kDa (ABREU et al., 2013); 37,4 kDa (ALISHAHI et al., 2011); 80,6 kDa (NOURI et al., 2016); 128 kDa (SEBASTIAN et al., 2019) 33 kDa (ZHAO et al., 2019a).
	DLS ²	165 kDa (EL KNIDRI et al., 2016); 165 kDa (EL KNIDRI et al., 2019).
DS _{ULTRA}	Viscosimetria capilar	110 – 200 kDa (BIROLI; DELEZUK; CAMPANA-FILHO, 2016); 150 – 400 kDa (ZHU et al., 2018); 392 kDa (DUONG; NGHIA, 2017). 900 – 1200 kDa (FIAMINGO et al., 2016); 40 kDa (WU et al., 2008); 40 kDa (DELEZUK et al., 2011).

¹ – Cromatografia de permeação em gel

² – Técnica de espalhamento dinâmico de luz

Trung et al., (2020) sintetizaram quitosana por método convencional, em diferentes condições, e, além disso, avaliaram a eficiência de um pré-tratamento com solução de ácido clorídrico que antecede a limpeza das cascas de camarão com o intuito de preservar a matéria-prima por maior tempo durante o fluxo de uma produção em grande escala de quitosana. A massa molar viscosimétrica média ($\overline{M}_v$) da quitosana foi determinada por GPC, obtendo-se resultados de $\overline{M}_v$ na faixa de (161 – 451 kDa).

A síntese de quitosana obtida via radiação de ultrassom apresentou os maiores resultados para $\overline{M}_v$, entre os estudos mais recentes (FIAMINGO et al., 2016). O estudo descreve que, o uso da radiação de ultrassom em três etapas

intermitentes, é possível obter alta massa molecular média (Tabela 3). O equipamento de ultrassom necessita que a amostra fique acondicionada em um reator de vidro cilíndrico de parede dupla com controle de temperatura e pressão. Nesse sentido, representa esse método se caracteriza por ser o mais elaborado e de maior custo quando comparado aos demais. Estudos vêm demonstrando que a síntese de quitosana assistida por micro-ondas pode ser um excelente método de escolha para a produção de quitosana com massa molar viscosimétrica média ($\overline{M}_v$) média e alta (ABREU et al., 2013; EL KNIDRI et al., 2016; SEBASTIAN et al., 2019), além das outras vantagens relativas ao uso da radiação do micro-ondas (ALISHAHI et al., 2011; EL KNIDRI et al., 2019; NOURI et al., 2016; SEBASTIAN et al., 2019).

Outra propriedade importante para polímeros de quitosana é grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$), permite evidenciar parâmetros como solubilidade, viscosidade, hidrofiliidade, características estruturais e ópticas. O $\% \overline{GD}$ desempenha um papel importante na avaliação da aplicação de quitina, quitosana e seus derivados, e o grau varia de acordo com o método de preparação e a fonte da qual a quitina foi extraída. As principais técnicas reportadas na literatura para determinação do $\% \overline{GD}$ de quitosana sintetizada por diferentes métodos de síntese estão resumidos na Tabela 4.

Autores que compararam resultados de $\% \overline{GD}$ obtidos por meio de titulação ácido-base aos obtidos por ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H) e por FT-IV observaram que não houve diferenças significativas nos resultados obtidos (ANTONINO, 2007; CZECHOWSKA-BISKUP et al., 2012; ZHANG et al., 2005).

Assim, a titulação potenciométrica pode ser considerada um método simples, barato e bastante confiável para a determinação do $\% \overline{GD}$ de amostras de quitosana (BIROLI; DELEZUK; CAMPANA-FILHO, 2016; CZECHOWSKA-BISKUP et al., 2012; EL KNIDRI et al., 2018; RINAUDO, 2006), desde que as amostras de quitosana sejam totalmente solúveis na solução aquosa de ácido clorídrico previamente padronizada (GARCIA, 2020; GONSALVES et al., 2011; RAYMOND; MORIN; MARCHESSAULT, 1993).

O princípio básico das titulações potenciométricas consiste na neutralização do ácido da solução seguida da neutralização de prótons do grupo

amino presentes na quitosana (BAXTER et al., 1992; CZECHOWSKA-BISKUP et al., 2012; FONSECA, 2016).

Tabela 4 – Principais técnicas utilizadas na determinação do $\overline{GD}$ e métodos de síntese de quitosana.

Síntese	Técnica	Referências
DS _{CONVENCIONAL}	Titulação	79,80% (ZVEZDOVA, 2010); 82,00% (NOURI et al., 2016); 64,00% (COCOLETZI et al., 2009); 89% (ANTONINO, 2007); 76,65% (CZECHOWSKA-BISKUP et al., 2012); 81,50% (EL KNIDRI et al., 2016); 74% (FONSECA, 2016); 76,50% (FRICK et al., 2018); 85,2% (ZHANG et al., 2017); 89% (GÓMEZ-RÍOS; BARRERA-ZAPATA; RÍOS-ESTEPA, 2017); 81% (SOON et al., 2018); 91,2% (POERIO et al., 2020); 88,10% (ZHUANG; ZHONG; ZHAO, 2019); 76,2% (GARCIA, 2020); 81,24% (HOSSAIN; IQBAL, 2014); 94,5% (MA; XIN; TAN, 2015); 78% (ZHANG et al., 2005); 45% (KUMARI et al., 2015)
	FT-IV	60,69% (ABDULKARIM et al., 2013); 87,80 (TRUNG et al., 2020); 76,61% (CZECHOWSKA-BISKUP et al., 2012); 61% (KUMARI et al., 2015); 78% (KUMARI et al., 2017);
	RMN	79,72% (CZECHOWSKA-BISKUP et al., 2012); 89,6% (ANTONINO, 2007); 86,4% (ZHANG et al., 2005)
DS _{MICRO}	Titulação	77% (ABREU et al., 2013); 82,73% (EL KNIDRI et al., 2016); 87,5% (ALISHAHI et al., 2011); 88,6% (NOURI et al., 2016);
	FT-IV	81% (ABREU et al., 2013); 80,2% (EL KNIDRI et al., 2019); 92,8% (ALISHAHI et al., 2011);
	RMN	81% (EL KNIDRI et al., 2019); 89,1% (ALISHAHI et al., 2011)
DS _{ULTRA}	Titulação	81,8% (BIROLI; DELEZUK; CAMPANA-FILHO, 2016); 81,4% (ZHU et al., 2018)
	FT-IV	73% (ANWAR; ANGGRAENI; AMIN, 2017); 82,9% (ZHU et al., 2018)
	RMN	78% (BIROLI; DELEZUK; CAMPANA-FILHO, 2016); 80% (FIAMINGO et al., 2016);

A desvantagem na titulação potenciométrica está no tempo gasto na coleta de dados durante a titulação. O $\overline{GD}$ obtido pelo método de titulação potenciométrica é bastante confiável quando as soluções de HCl 0,1 mol L⁻¹ e NaOH 0,1 mol L⁻¹ estão padronizadas e as amostras de quitosana estão

totalmente solúveis (CZECHOWSKA-BISKUP et al., 2012; FONSECA, 2016; FRÁGUAS et al., 2015; GARCIA, 2020).

Assim, $\overline{M}_V$ e $\%GD$ são indicadores importantes para avaliar a quitosana. A quitosana com alto grau de desacetilação pode se dissolver melhor em ácido e sua alta massa molar viscosimétrica média facilita a formação de filmes. Outras caracterizações de material polimérico incluem análises estruturais, morfológicas e térmicas.

A espectroscopia de infravermelho (IR) é uma das técnicas analíticas mais importantes e amplamente utilizadas por cientistas em diversas áreas, para diferentes produtos, assim como é amplamente utilizado nos estudos da quitina e quitosana. A análise se baseia nas vibrações dos átomos de uma molécula (SKOOG; HOLLER; NILMAN, 2009).

Uma das grandes vantagens da espectroscopia de infravermelho é que pode ser estudada qualquer amostra, em qualquer estado físico. A literatura contempla amostras líquidas, em solução, pastas, pós, filmes, hidrogel, entre outras, no entanto a amostra examinada deve passar por uma escolha criteriosa de amostragem (BARBOSA, 2007).

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IV) melhorou drasticamente a qualidade dos espectros infravermelhos e minimizou o tempo necessário para obter dados. Atualmente, o espectro total é analisado por um processo de interferência e convertido em frequência ou faixa de números de onda por meio de um processo matemático conhecido como transformada de Fourier (BARBOSA, 2007; WROBEL; BHARGAVA, 2018).

O espectro infravermelho é comumente obtido pela passagem da radiação eletromagnética infravermelha através de uma amostra que possui um momento dipolo induzido ou permanente, sendo que é determinada qual fração da radiação incidente é absorvida em uma determinada energia. A energia de cada pico (banda) em um espectro de absorção corresponde à frequência de vibração de uma parte da molécula, permitindo assim a identificação qualitativa de certos tipos de ligações na amostra. Assim, um espectrômetro de infravermelho geralmente registra a energia da radiação eletromagnética que é transmitida através de uma amostra em função do número de onda ou frequência (BISPO; MANSUR; MANSUR, 2009; SKOOG; HOLLER; NILMAN, 2009).

A espectroscopia na região do infravermelho é uma das técnicas utilizadas para acompanhamento da eficiência do processo de extração da quitina e da síntese da quitosana, devido à possibilidade de identificar as principais bandas na região do infravermelho que caracterizam estes biopolímeros (EL KNIDRI et al., 2016, 2019; KUMARI et al., 2015, 2017; MAREI et al., 2016).

A técnica de FT-IV também permite identificar modificações estruturais ocasionadas na estrutura da quitosana pela adição de reticulante como TPP e glutaraldeído (FRICK et al., 2018; GABRIEL PAULRAJ et al., 2017; SHENVI; ISMAIL; ISLOOR, 2014; SHENVI et al., 2013), ou pela inserção de outros compostos ao filme ou gel de quitosana (BHATT et al., 2017; CHUYSINUAN et al., 2020; MOHAMMADZADEH PAKDEL; PEIGHAMBARDoust, 2018; NASRIN et al., 2017; TASHAKKORIAN et al., 2020).

Como observado anteriormente, o grau de desacetilação de quitina e quitosana pode ser determinado pela técnica de FT-IV (CZECHOWSKA-BISKUP et al., 2012; EL KNIDRI et al., 2019; KUMARI et al., 2017). Outra técnica pode ser utilizada para determinar o grau de desacetilação é a espectroscopia de UV-Vis (CZECHOWSKA-BISKUP et al., 2012; NOSAL et al., 2005).

Como certos grupos funcionais presentes em moléculas orgânicas absorvem luz em comprimentos de onda característicos na região do UV-Vis, essa técnica é aplicada qualitativamente para identificar a presença desses grupos nas amostras e dar suporte a informações estruturais obtidas de outros métodos espectroscópicos (KUMIRSKA et al., 2010).

A Espectroscopia de Absorção Molecular na Região do Ultravioleta e Visível (UV-vis) estuda o comportamento da matéria quando exposta à radiação eletromagnética na faixa em torno de 100 a 400 nm (ultravioleta) e 400 a 750 nm (visível) (SKOOG; HOLLER; NILMAN, 2009).

A técnica se baseia em medidas de transmitância ou absorbância, principalmente de compostos em solução, e possui grande aplicação em determinações quantitativas de uma grande variedade de espécies orgânicas e inorgânicas (HOUSECROFT; SHARPE, 2013; SKOOG; HOLLER; NILMAN, 2009).

A espectroscopia de ultravioleta visível (UV-Vis) é útil como técnica analítica principalmente por duas razões: pode ser usado para identificar certos

grupos funcionais em moléculas e pode ser usado para ensaios quantitativos. A espectroscopia de UV-Vis envolve a absorção de radiação eletromagnética na faixa de 200–800 nm e a subsequente excitação de elétrons para estados de energia mais elevados (HOUSECROFT; SHARPE, 2013; SKOOG; HOLLER; NILMAN, 2009).

A absorção da luz ultravioleta visível por moléculas orgânicas é restrita a certos grupos funcionais (cromóforos) que contêm elétrons de valência de baixa energia de excitação, sendo possível investigar transferências de elétrons entre orbitais ou bandas de átomos, íons e moléculas existentes nas fases gasosa, líquida e sólida (SKOOG; HOLLER; NILMAN, 2009).

O espectro UV-Vis é complexo e pode aparecer como uma banda de absorção contínua porque a sobreposição de transições rotacionais e vibracionais nas transições eletrônicas fornece uma combinação de linhas sobrepostas (SKOOG; HOLLER; NILMAN, 2009).

Os espectros de UV-Vis de quitosana são geralmente registrados em solução aquosa ácida (ácido acético, ácido clorídrico, entre outros), em uma célula de quartzo de 1,0 cm e à temperatura ambiente. Com esta técnica é possível caracterizar as interações dos polímeros quitina e quitosana com outros compostos alvo (KUMIRSKA et al., 2010; NOSAL et al., 2005; POERIO et al., 2020; SHAHID-UL-ISLAM; BUTOLA; VERMA, 2019), tais como íons aquosos de cobre(II) (ANBINDER et al., 2019) e de cobalto(III) (WANG, 2018).

A determinação de íons metálicos é possível pois pequenas partículas de metal (ou nanopartículas), a exemplo de cobre, exibem absorção de ondas eletromagnéticas visíveis pela oscilação coletiva de elétrons de condução na superfície o que permite a caracterização do compósito (NITHYA et al., 2017; TIWARI et al., 2013; WANG et al., 2014a).

A molécula da quitosana apresenta os grupos cromóforos, N-acetil-glucosamina e glucosamina, como resultado, seus coeficientes de extinção para comprimentos de onda menores que aproximadamente 225 nm são diferentes de zero. Como esses resíduos cromóforos não mostram nenhuma evidência de interação intra-cadeia, as unidades de monômero contribuem de uma maneira simples e aditiva para a absorbância total desses polímeros em um comprimento de onda particular. Os espectros de UV somente do resíduo N-acetil-glucosamina são bastante semelhantes aos espectros de quitosana, sendo que

o comprimento de onda máximo ($\lambda_{\max}$) é evidenciado em 201 nm, em solução de HCl 0,1 M (KUMIRSKA et al., 2010; NOSAL et al., 2005).

Em geral, as técnicas espectroscópicas citadas anteriormente são muito úteis e importantes na análise estrutural de quitina, quitosana e seus derivados, embora seja necessário mencionar que existem muitos outros métodos analíticos espectroscópicos e não espectroscópicos que são amplamente usados, a exemplo da titulação potenciométrica e medição de viscosidade, citados anteriormente, além de análises térmicas como termogravimetria (TGA/DTA), difração de raios X em pó (DRX), microscopia de força atômica (AFM), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de dispersão eletrônica (EDS), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IV), espectroscopia de ultravioleta (UV-Vis), Análise Mecânico dinâmica (AMD).

A análise termogravimétrica consiste em acompanhar uma quantidade de massa de determinada amostra, sob atmosfera controlada, com registro contínuo em função do tempo ou temperatura, enquanto a temperatura é aumentada (geralmente linearmente com o tempo). Ao final da análise é obtido um gráfico de massa ou porcentagem de massa em função do tempo, chamado de termograma ou curva de decomposição térmica (SHRIVER; ATKINS, 2008; SKOOG; HOLLER; NILMAN, 2009).

Autores relatam que as amostras de quitina apresentam diferentes temperaturas de degradação térmica máxima, conforme a organização estrutural da quitina. A temperatura de degradação máxima da α -quitina é geralmente superior a 350° C, enquanto o valor de para β -quitina é geralmente inferior a 350° C (KAYA et al., 2017; POERIO et al., 2020).

Estudos sobre a estabilidade térmica da quitina comparada à quitosana, indicam que a quitina tem maior estabilidade térmica do que a quitosana correspondente, devido à formação de interações moleculares intra e inter-cadeias (ABDOU; NAGY; ELSABEE, 2008; ANUSH; CHANDAN; VISHALAKSHI, 2019; ISA et al., 2008; KUMARI et al., 2015).

A análise dos termogramas (TGA/DTA) de uma quitosana obtida comercialmente, em geral, apresenta dois estágios, o primeiro estágio térmico aponta para uma perda de massa, na faixa de (25–250° C) devido, principalmente, à perda de água livre e da água ligada na quitosana, mais

precisamente, ligada aos grupos aminos, por meio de ligações de hidrogênio. O segundo estágio térmico, na faixa de (250–400° C) corresponde à perda de massa devido à clivagem da cadeia principal da quitosana obtendo taxas de perda de massa de entre 40 e 60%, para uma amostra proveniente da casca de camarão e com alto grau de desacetilação (ABDOU; NAGY; ELSABEE, 2008; ANUSH; CHANDAN; VISHALAKSHI, 2019; FRICK et al., 2018; KUMARI et al., 2015; MA; XIN; TAN, 2015; NITHYA et al., 2017).

A caracterização estrutural por difração de raios X (DRX) é um método prático e conveniente para a identificação de compostos cristalinos, determina as posições dos átomos e íons que constituem um composto iônico ou molecular, descreve suas estruturas detalhando por exemplo o comprimento de ligação, planos de difração, ângulos e posições dos átomos presentes em uma amostra monocristalina. Os dados estruturais são interpretados em termos de raio atômicos e iônicos, o que permite prever estruturas e explicar as tendências em muitas propriedades (SHRIVER; ATKINS, 2008; SKOOG; HOLLER; NILMAN, 2009). Cada substância cristalina gera um padrão único de DRX, em termos de posições e intensidades de reflexões observadas, em que cada fase cristalina presente contribui para o padrão de difração com seu próprio e único conjunto de linhas, e as intensidades relativas dos conjuntos de linhas da mistura dependem das quantidades presentes e da capacidade das estruturas de espalharem os raios X (SHRIVER; ATKINS, 2008).

A cristalinidade de um polímero define suas propriedades físicas e químicas. A determinação da razão cristalino-amorfo por meio da difração de raios X em pó consiste em usar métodos quantitativos levando em conta, tanto a altura do pico de difração quanto a área do pico para calcular o percentual de cristalinidade de um material (CANEVAROLO, 2007). Ioelovich (2014) sugere que a avaliação das características estruturais de quitina e quitosana, em termos de conteúdo da fase cristalina para cálculo grau médio de cristalinidade ($\bar{X}$) é duvidoso quando se leva em conta apenas o índice de cristalinidade (I_{CR}) com base no cálculo da razão da intensidade dos picos, dado pela Equação 1, em que I_o é a intensidade do pico cristalino e I_{am} é a intensidade do espalhamento amorfo.

Equação 2 – Determinação do índice de cristalinidade

$$I_{CR} = \left[\frac{I_o - I_{am}}{I_o} \right] \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

O I_{CR} mostra o conteúdo comparativo da fração cristalina de uma amostra e indica o quão alto ou baixo é a cristalinidade do material, mas não está de acordo com o conceito de grau de cristalinidade, que se refere à massa da fração cristalina no polímero, por isso o I_{CR} leva a resultados de cristalinidade inconclusivos para a quitina e quitosana.

Algumas condições essenciais para um resultado adequado da análise quantitativa da cristalinidade de quitina e quitosana, por meio de difratogramas de raios X foram identificadas por Ioelovich (2014): a amostra deve estar na forma de pó, o background deve ser extraído, a correção do difratograma deve ser feita separando as áreas de espalhamento relacionadas aos domínios cristalinos e amorfo, e a intensidade integrada (área) do espalhamento cristalino e amorfo deve ser usada para calcular o grau de cristalinidade. O grau de cristalinidade ($\bar{X}$) representa a fração cristalina presente na amostra após correções (Equação 3), onde I_o é a intensidade total do difratograma corrigido depois da subtração do background; I_{CR} é a intensidade do espalhamento cristalino; F_{CR} é a área do espalhamento cristalino; F_{am} é a área do espalhamento amorfo (Ioelovich, 2014).

Equação 3 – Determinação do grau de cristalinidade

$$X = \int I_{CR} d\theta / \int I_o d\theta = F_{CR} / (F_{CR} + F_{am}) \quad \text{Equação 3}$$

Poucos estudos envolvendo DRX calculam o grau de cristalinidade, tendo em vista a complexidade do cálculo, em geral, apresentam apenas o índice de cristalinidade (I_{CR}) com base nos cálculos da razão da intensidade dos picos. O índice de cristalinidade pode indicar quem tem maior ou menor cristalinidade, comparando amostras entre si (FONSECA, 2016; IOELOVICH, 2014).

A literatura (EL KNIDRI et al., 2016, 2019; KAYA et al., 2017; KUMARI et al., 2017; MAREI et al., 2016; POERIO et al., 2020; SOON et al., 2018; ZHANG et al., 2017, 2005; ZHAO et al., 2019a; ZHU et al., 2018) trata os conceitos de grau de cristalinidade e índice de cristalinidade de forma um tanto confusa, pois

relatam a determinação do grau de cristalinidade e no entanto para isso, usaram os dados da intensidade dos picos, o que é um equívoco. Em contraponto, há autores que relatam DRX para amostras de quitina e quitosana moídas com determinação do grau de cristalinidade adequadamente, com base na relação entre a intensidade das áreas integradas dos domínios cristalino e amorfo (FONSECA, 2016; IOELOVICH, 2014; LARBI et al., 2018; NOURI et al., 2016).

A análise de DRX para amostras de quitina e quitosana mostram a relação inversa entre o grau de desacetilação e o índice de cristalinidade, isto é, quanto maior o índice de cristalinidade menor será o grau de desacetilação, já que é característica das quitinas possuírem elevado grau de cristalinidade (IOELOVICH, 2014; ZHANG et al., 2005), o que é atribuído a existência de domínios cristalinos maiores e em maior número para a quitina em comparação com a quitosana (BIROLLI; DELEZUK; CAMPANA-FILHO, 2016; EL KNIDRI et al., 2016, 2019; LARBI et al., 2018). Outra análise usual realizada em polímeros é a microscopia de força atômica (AFM). É uma técnica versátil que consiste em analisar a estrutura da superfície de materiais e tornou-se um dos equipamentos mais adequados para o estudo de materiais em micro e nano-escala (BHATT et al., 2017; SAZANOVA et al., 2016; VICARO et al., 2002). A Tabela 5 destaca algumas das principais características da técnica de AFM.

A técnica de AFM é um método adequado para pesquisa de polímeros, não apenas devido à alta qualidade das resoluções, mas também por que seus dados combinados a *softwares* específicos, que permitem a obtenção de informações tridimensionais quantitativas sobre a topografia de superfície (qualitativa) como: rugosidade, altura, coeficientes de assimetria e curtose, ângulo de inclinação de estruturas topográficas entre outros parâmetros, além de permitir a avaliação da estrutura da superfície quantitativamente (HULUBEI et al., 2014; STOICA et al., 2013).

Tabela 5 – Principais características da técnica de AFM.

Vantagens	Não requer preparo de amostra
	Realiza medidas em ar e em meio líquido
	Amostra sólida ou fixada quimicamente
	Análise de estruturas na escala nanométrica
	Custo operacional baixo
	Não causa dano ao filme em estudo
	Resultados em formato digital permitindo tratar os dados posteriormente
	Permite análise quantitativa e qualitativa
Desvantagens	Imagens de alta resolução
	Associação com outras técnicas e softwares
	Necessidade de analista treinado ao uso do software

A rugosidade pode ser caracterizada por vários parâmetros como, por exemplo, os de amplitude RMS, rugosidade quadrática média e R_a rugosidade média, espaçamento e híbridos (área, volume, inclinações), sendo os parâmetros de amplitude mais significativos (BAJPAI; BHATT; KATARE, 2016; BHATT et al., 2017; MUNZ, 2013; SAZANOVA et al., 2016; STOICA et al., 2013).

A entropia, embora seja um dos termos da equação termodinâmica para a energia livre, em termos de superfície ela é discutida separado da energia, visto que a termodinâmica descreve sistemas em equilíbrio, no entanto estudos descrevem experimentos de tração de molécula única a fim de demonstrar que a entropia não é bem descrita pela equação da energia livre:

Equação 4 – Energia livre

$$\Delta G = \Delta H - T \times \Delta S$$

Equação 4

Onde, (ΔG) é a energia livre, (ΔH) é a variação da entalpia e $(T \times \Delta S)$ é o produto da variação da entropia pela temperatura).

A entropia dos polímeros diminui progressivamente conforme eles se movem livres em solução por meio de ligações covalentes para a síntese de monômeros ou na união de monômeros para formar oligômeros e polímeros maiores (cadeia polimérica) (HANSMA, 2010; THOMPSON et al., 2002).

O tratamento dos dados da análise de AFM são os requisitos básicos durante o estudo da topografia da superfície de um material, em geral a literatura reporta estudos relacionados a filmes composto por diversos materiais

(CHOLANT et al., 2020; MORI, 2014; PITHAN, 2011; ZHUANG; ZHONG; ZHAO, 2019).

A estrutura da superfície de filmes à base de quitosana é amplamente estudada com o intuito de prever propriedades operacionais do polímero. A amplitude, os parâmetros estatísticos e espaciais, incluindo perfis de imagem em linha, 2D e 3D das superfícies de filmes de quitosana preparados com poli-(álcool vinílico) (PVA) e reticulado com glutaraldeído foram examinados por AFM (BHATT et al., 2017).

Além disso, filmes de quitosana, com diferentes graus de desacetilação e concentração, foram preparados usando o sistema de pulverização eletrostática e caracterizados por AFM, sendo que a rugosidade dos filmes foi examinada e comparada à análise obtida por MEV (ZHUANG; ZHONG; ZHAO, 2019).

A determinação dos parâmetros de amplitude da rugosidade, como, a altura máxima, coeficiente de assimetria e de curtose e o parâmetro espacial de entropia, são realizados por meio da análise dos perfis de linha, imagens 3D e 2D da superfície dos materiais, em diferentes áreas de varredura (BAJPAI; BHATT; KATARE, 2016; BHATT et al., 2017; MUNZ, 2013; SAZANOVA et al., 2016; STOICA et al., 2013).

Em complementação, estudos de AFM são descritos para amostras com metais, tais como partículas magnéticas revestidas com hidrogel à base de quitosana (PEREIRA et al., 2020). Além disso, a literatura também destaca hidrogel à base de quitosana usado na remoção de cobre e caracterizado por AFM (MILOSAVLJEVIĆ et al., 2011) e a avaliação da estabilidade da superfície em copolímeros de quitosana, por meio de métodos de estatísticos (SAZANOVA; OTVAGINA; VOROTYNTSEV, 2018).

Nesse contexto, técnicas como a AFM são ferramentas fundamentais para realização de análise complexa da morfologia e das propriedades estruturais em micro e nano-escala. Esta técnica tem sido amplamente utilizada no estudo de polímeros, por fornecer informações que não eram possíveis de se obter com o uso apenas de MEV, como a obtenção de imagens de superfície sob condições variadas (ar, vácuo e em meio líquido) e por não requerer preparo de amostra, o que diminui o custo operacional (KLAPETEK; NEČAS; CHRISTOPHER, 2020; YACOOT; KOENDERS, 2008).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma importante técnica utilizada na caracterização de superfícies, sozinha ou em complementação com a técnica de AFM. A MEV permite avaliar a morfologia da superfície de um material a partir de imagens de alta resolução com base na topografia da superfície ou diferenças de composição química entre regiões de uma mesma amostra (EL KNIDRI et al., 2016; MAREI et al., 2016; SHRIVER; ATKINS, 2008; SKOOG; HOLLER; NILMAN, 2009).

Estudos recentes relataram que a morfologia da superfície da quitina e seus derivados obtidos de caranguejo, camarão, insetos e fungos são bastante diferentes (EL KNIDRI et al., 2016; KAYA et al., 2017; KUMARI et al., 2015, 2017; MAREI et al., 2016; POERIO et al., 2020; ZHUANG; ZHONG; ZHAO, 2019). Esses estudos apontam cinco tipos de morfologias da superfície de quitina e quitosana: superfície áspera e dura sem poros e nanofibras, estrutura apenas com nanofibras, estrutura com poros e nanofibras, estrutura com dois tipos de poros e com nanofibras e estrutura apenas poros.

A morfologia da superfície de diferentes fontes de quitina como o caranguejo (α), moluscos (β) e casulo de mariposa (γ) foram caracterizadas, sendo que a morfologia da superfície da γ -quitina foram observadas e discutida pela primeira vez (KAYA et al., 2017). Esse estudo relata que a γ -quitina apresenta microfibras longas, enquanto a superfície de α -quitina e β -quitina são compostas de nanofibras claramente visíveis e nanofibras visíveis com menor definição, respectivamente. Neste caso, a AFM foi utilizada como um método complementar à MEV e, como esperado, permitiu uma visão melhor e mais clara das diferentes amostras de quitina.

A análise de MEV da superfície de quitina extraída de uma espécie de cigarras exibiu uma morfologia rugosa, numa organização lamelar intercalada com algum material granular, provavelmente devido à presença de minerais e proteínas. A superfície granulada tende a diminuir conforme ocorre a extração e purificação da quitina, permanecendo apenas uma estrutura lamelar plana. Esta modificação da estrutura pode indicar a eficiência da remoção de minerais e proteínas da matéria-prima (POERIO et al., 2020).

A MEV tem sido utilizada para caracterizar a morfologia de superfície durante o processo de síntese de quitosana, obtida a partir de diferentes fontes de quitina, como: cigarras (*Cicada orni*) (POERIO et al., 2020), larvas de

besouros (SOON et al., 2018), escamas de peixes (KUMARI et al., 2015), cascas de camarão (ZHAO et al., 2019; KNIDRI et al., 2016; KUMARI et al., 2017) e fontes diversas (ZHUANG et al., 2019; MAREI et al., 2016), relatam a observação de estrutura superficial composta de nanofibras densas para quitosana de camarão, gafanhoto e besouro e superfície áspera e dura para quitosana de abelha melífera.

Tanto amostras sólidas de pó de quitosana quanto filmes de quitosana podem ter sua superfície avaliada. Assim, a literatura também relata filmes de quitosana reticulados ou puros investigados por MEV, antes e depois da ligação ao metal, com intuito de observar mudanças na morfologia (EL KNIDRI et al., 2016; MAREI et al., 2016; POERIO et al., 2020; ZHUANG; ZHONG; ZHAO, 2019).

Outra análise interessante para amostras sólidas é a EDS, geralmente realizada acoplada à MEV. Essa técnica espectroscópica permite realizar uma microanálise qualitativa e semiquantitativa de elementos químicos presentes na amostra, como uma microanálise elementar. Um feixe de elétrons ao interagir com a amostra, desloca elétrons das camadas mais internas dos átomos, ionizando-os. Os elétrons, ao voltarem para o estado fundamental, emitem raios X característicos e, assim, é possível identificar a composição elementar do material (SKOOG; HOLLER; NILMAN, 2009).

A EDS tem sido utilizada amplamente para observar a presença de elementos químicos característicos da composição química da quitina e da quitosana, apresentando um percentual qualitativo para cada composto identificado (EL KNIDRI et al., 2016; POERIO et al., 2020). Assim, essa técnica é reportada na literatura, entre outras demandas, para comprovar a reticulação ocorrida na estrutura da quitosana (arcabouços) e para confirmar a presença de metal ou outras moléculas orgânicas adsorvidas e/ou ligadas à superfície de quitosana (pó ou filme) (ANUSH; CHANDAN; VISHALAKSHI, 2019; BORBA DA CRUZ et al., 2016; WANG, 2018).

A literatura reporta inúmeras pesquisas que estudam a possibilidade de substituir as embalagens plásticas convencionais originadas do petróleo, por exemplo, por embalagens biodegradáveis, comestíveis o que resolveria a questão ambiental de acúmulo e poluição (FONSECA, 2015; MUJTABA et al., 2019; NATARAJ et al., 2018). Nesse contexto, o estudo das propriedades

mecânicas dos filmes pode fornecer informações valiosas a respeito da interação dos materiais, e mostrar o comportamento dos filmes relativo à sua resistência mecânica e térmica (MUJTABA et al., 2019).

A análise mecânico-dinâmica (AMD) é uma técnica sensível e versátil, que avalia as propriedades mecânicas de um material e determina sua capacidade de medir o módulo de elasticidade, resistência com controle de parâmetros como o tempo, a frequência de oscilação e a temperatura durante a análise (HOUSECROFT; SHARPE, 2013; SKOOG; HOLLER; NIMAN, 2002).

As propriedades mecânicas de filmes de quitosana modificados ou não são amplamente estudados, para avaliar os efeitos das modificações na melhoria das propriedades operacionais do filme e seu potencial para prever propriedades operacionais de um produto polimérico (NATARAJ et al., 2018). Ensaio de resistência à tração foram realizados com filmes de quitosana e polímeros sintéticos, como poliácridonitrila e poliestirenos (SAZANOVA; OTVAGINA; VOROTYNTSEV, 2018); Filmes de quitosana com diferentes grau de desacetilação foram reticulados com glicerol (ZHUANG; ZHONG; ZHAO, 2019), glutaraldeído (FRICK et al., 2018), galactomanana (ALMEIDA; DELEZUK; CAMPANA-FILHO, 2019).

Modificações na estrutura da quitosana

A quitosana pura é solúvel somente em solução ácida diluída, o que limita suas amplas aplicações. Além disso, várias desvantagens, como baixa resistência mecânica, baixa resistência térmica e baixa seletividade de adsorção, também dificultam seu uso prático e justificam as modificações estruturais (QU; LUO, 2020; SIVASELVI; GHOSH, 2017).

A quitosana possui cadeia polimérica constituída pelos grupos funcionais aminos e hidroxilas, que são os sítios reativos e permitem diferentes modificações na molécula. Esses sítios são bastante versáteis para modificações químicas, por meio da inserção de novos grupos funcionais, conferindo aos seus derivados as características desejadas para as aplicações de interesse (MUXIKA et al., 2017; NATARAJ et al., 2018).

O processo de reticulação das cadeias poliméricas de quitosana, também denominado de reação de entrecruzamento, é um tipo de modificação química

que visa unir suas cadeias poliméricas, ou ainda, ligar suas cadeias às de outros polímeros gerando redes poliméricas (FRICK et al., 2018; SIVASELVI; GHOSH, 2017).

A modificação da quitosana pode ocorrer por reações químicas ou por interações físicas, e têm sido bastante utilizadas na funcionalização da molécula para a obtenção de novos materiais (MUJTABA et al., 2019). A quitosana pode ser modificada quimicamente ou fisicamente por reação enzimática ou química e copolimerização (POON; WILSON; HEADLEY, 2014; WANG et al., 2016; YOUNES; RINAUDO, 2015).

Os grupos funcionais da quitosana podem facilitar as reações entre os segmentos de uma mesma cadeia ou entre cadeias poliméricas vizinhas destacando as reações de formação de base de Schiff (ANTONY et al., 2013; DEMITRI et al., 2016) e as reações de reticulação (FRICK et al., 2018; GONSALVES et al., 2011; SHENVI et al., 2013; SIVASELVI; GHOSH, 2017).

A quitosana pode ser modificada de diferentes maneiras, tanto física quanto quimicamente. A partir da literatura, pelos resultados satisfatórios na reticulação da quitosana pode-se perceber que se destacam entre os demais são: o glutaraldeído (FRICK et al., 2018; SHENVI et al., 2013; SIVASELVI; GHOSH, 2017), Tripolifosfato de sódio penta hidratado (TPP) (GABRIEL PAULRAJ et al., 2017; SHENVI; ISMAIL; ISLOOR, 2014; WANG et al., 2014b), epicloridrina (ECH) (DANG; GUO; TAN, 2012; SANTOS, 2004; VIEIRA, 2008), o glicerol (MENEZES et al., 2020; PRIYADARSHI et al., 2018), e a gelatina (AGARWAL et al., 2016; HOSSEINI et al., 2015; TYLINGO et al., 2016).

A possibilidade da quitosana modificada formar filmes torna essa característica importante num grande conjunto de aplicações. Cada aplicação requer um tipo de filme com propriedades físico-químicas e biológicas específicas, incluindo propriedades térmicas, mecânicas, de solubilidade e, antimicrobiana (FARIAS, 2009; FRICK et al., 2018; MUJTABA et al., 2019).

Os grupamentos amina (NH_2) da quitosana por serem altamente reativos permitem diferentes aplicações e modificações à molécula. As aminas alifáticas primárias podem reagir com o ácido nitroso gerado *in situ*, através da reação de diazotação para levar ao sal de diazônio (BECK; HÖRNER; DITTMANN, 2009; BLANK; HIRDES; SANTOS, 2019; HÖRNER et al., 2004; PARAGINSKI et al., 2016; SANTOS et al., 2014, 2016, 2019).

A diazotação de aminas alifáticas primárias pode ser facilmente usada para gerar carbocátion em água, ácido acético e outros solventes (BARBOSA, 2011; SOLOMONS; FRYHLE, 2006).

Sais de diazônio acoplados com diversos compostos aromáticos ou alifáticos dão origem aos azocompostos que são compostos que apresentam em sua estrutura a unidade ($-N=N-$). Eles são normalmente coloridos e constituem uma parte importante da indústria de corantes (BARBOSA, 2011). Já sais de diazônio acoplados a grupos amina e hidroxiaminas origina, respectivamente, triazenos ($-N=N-N(H)-$) e hidroxitriazenos ($-N=N-N(OH)-$) (BECK; HÖRNER; DITTMANN, 2009; HÖRNER et al., 2004; PARAGINSKI et al., 2016; SANTOS et al., 2014, 2016).

Da Li e colaboradores (2021) em estudo recente, revisaram uma série de exemplos de funcionalização de nanopartículas, entre elas, nanopartículas de quitosana funcionalizadas por sais de diazônio foram usadas para diferentes aplicações biomédicas, como: entrega de drogas, biossensores, imagens e antibacterianas. E destacaram que os sais de diazônio permitem o enxerto de uma grande variedade de nanopartículas em biomoléculas.

Quitosana reticulada com ácido polilático serviu como um revestimento para nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com sais de diazônio, e os resultados superaram a qualidade da amostra sem quitosana, devido ao aumento da estabilidade das nanopartículas e da capacidade de carga do fármaco, prolongando sua liberação e melhorando a citotoxicidade *in vitro* do fármaco (DI MARTINO et al., 2017).

Quitosana e grafeno foram funcionalizados por sais de diazônio para avaliação biológica, obtendo maior atividade antimicrobiana do que a quitosana pura (HUANG; YIN; WU, 2020).

Pereira (2016) descreve modificações estruturais feitas na cadeia lateral da quitosana modificada (bases de Schiff) acoplado a diferentes sais de diazônio produzindo uma nova classe de compostos poli-azóicos a partir da quitosana, para investigar a influência de diferentes substituintes na complexação de metais.

A quitosana tem sido considerada um polímero multifuncional, devido à sua versatilidade, biocompatibilidade, completa biodegradabilidade, baixa toxicidade aliado ao baixo custo, o que justifica sua aplicação em um vasto

número de reações de modificação estrutural. A quitosana modificada pode apresentar-se em diferentes conformações tais como: fibras, pós, filmes, esponjas, microesferas, soluções, géis entre outros. Diversos artigos de revisão discutem as mais variadas áreas de aplicação em que o biopolímero modificado é empregado, desde área ambiental até biomédica (BAKSHI et al., 2020; EL KNIDRI et al., 2018; MUJTABA et al., 2019; MUXIKA et al., 2017; QU; LUO, 2020; YOUNES; RINAUDO, 2015). Algumas aplicações de quitosana modificada são reportadas na literatura Tabela 6.

O processo de reticulação das cadeias poliméricas de quitosana, também denominado de reação de entrecruzamento, é um tipo de modificação química que visa unir suas cadeias poliméricas, ou ainda, ligar suas cadeias às de outros polímeros gerando redes poliméricas (FRICK et al., 2018; SIVASELVI; GHOSH, 2017). Estudos acerca de modificações físicas em quitosana demonstram diferentes formas, tais como: flocos ou grânulos (WANG, 2018), membranas ou matrizes (ANBINDER et al., 2019; WANG et al., 2014a), nanopartículas ou nanocompósito (BIBI et al., 2018; MUJTABA et al., 2020; NITHYA et al., 2017; TIWARI et al., 2013), hidrogel (CHUYSINUAN et al., 2020; MOHAMMADZADEH PAKDEL; PEIGHAMBARDOUST, 2018; PEREIRA et al., 2020), filmes (MUJTABA et al., 2019; NATARAJ et al., 2018; ZHUANG; ZHONG; ZHAO, 2019), sempre com base na consideração da estrutura ideal necessária para a aplicação específica.

Tabela 6 – Aplicações de quitosana e quitosana modificada.

Área	Exemplo de aplicação	Referência
Alimentos	Embalagens, bactericida	(DEMITRI et al., 2016); (HOMEZ-JARA et al., 2018); (SIVASELVI; GHOSH, 2017); (HARISH PRASHANTH; THARANATHAN, 2007)
Farmacêutico	Fármacos	(MORAN et al., 2018);
Biomaterial	Microesferas	(DENG et al., 2020; HULUBEI et al., 2014; MONTEIRO et al., 2015; ZENG et al., 2015; ZHANG et al., 2020)
Têxtil	Nanopartículas	(DE OLIVEIRA CRUZ et al., 2020; SHAHID-UL-ISLAM; BUTOLA; VERMA, 2019; WANG et al., 2014b)
Biomedicina	Suportes poliméricos	(FRANK et al., 2020; MUJTABA et al., 2019; PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009; SIVASELVI; GHOSH, 2017; WANG et al., 2016; ZHU et al., 2018)
Agricultura	Defensivo	(DOS PASSOS BRAGA et al., 2019; MUJTABA et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2018; QU; LUO, 2020; RAMOS BERGER et al., 2018; ZENG; LUO; TU, 2012)
Cosméticos	Hidrogel	(AGARWAL et al., 2016; CHUYSINUAN et al., 2020; ESCOBAR-SIERRA et al., 2017; PEREIRA et al., 2020; THONGCHAI et al., 2020)
Industrial	Tratamento de efluentes	(MOHAMMADZADEH PAKDEL; PEIGHAMBARDoust, 2018; QU; LUO, 2020; SARODE et al., 2019; UPADHYAY et al., 2021; WAN NGAH; TEONG; HANAFIAH, 2011)
	Remoção de metais	(GEROMEL-COSTA et al., 2018; HUSSEIN et al., 2012; KYZAS; KOSTOGLU, 2015; MARQUES et al., 2019; VAKILI et al., 2019; ZHANG; ZENG; CHENG, 2016; ZIA et al., 2020)

Quitosana e sua atividade antifúngica

A produção de frutas climatéricas são um desafio pois são altamente perecíveis, como por exemplo, a goiaba, manga e mamão, e portanto, são muito suscetíveis a infecções fúngicas pós-colheita, e afetam negativamente a qualidade, vida útil e valor de mercado (DOS PASSOS BRAGA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2018).

A antracnose é uma das infecções fúngicas pós-colheita mais frequentes em frutas tropicais, levando a grandes perdas econômicas causadas

principalmente por espécies de *Colletotrichum* (ESPAÑA et al., 2017; KONG et al., 2010; LIU et al., 2001).

O *Colletotrichum gloeosporioides* é o principal microrganismo causador da antracnose na goiaba, mamão, manga entre outras frutas. Para o controle do fungo e preservação dessas frutas tradicionalmente conta com a aplicação de fungicidas sintéticos (KERCH, 2015; KUMAR; MUKHERJEE; DUTTA, 2020).

Os fungicidas sintéticos trazem preocupações biológicas, quanto aos efeitos indutores de resistência sobre fungos patógenos e os efeitos prejudiciais à saúde humana. No entanto, existe uma perspectiva mais ecológica e saudável da população atual, buscando por produtos orgânicos (sem agrotóxicos). Essas demandas reforçam a Os fungicidas sintéticos trazem preocupações biológicas, quanto aos efeitos indutores de resistência sobre fungos patógenos e os efeitos prejudiciais à saúde humana. No entanto, existe uma perspectiva mais ecológica e saudável da população atual, buscando por produtos orgânicos (sem agrotóxicos). Essas demandas reforçam a necessidade de estratégias alternativas de controle de fitopatógenos (DOS PASSOS BRAGA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2018).

Muitos pesquisadores têm se dedicado ao desenvolvimento de filmes de quitosana associados a substâncias naturais não tóxicas, como os óleos essenciais e o ácido cítrico, para o revestimento de frutas como uma tecnologia viável para a preservação do fruto pois retardam a decomposição após a colheita, inibem da antracnose, uma das infecções fúngicas pós-colheita mais frequentes em frutas tropicais, causadas principalmente por espécies de *Colletotrichum* em frutas minimamente processada e ainda reduzem o uso de fungicidas sintéticos (DE OLIVEIRA et al., 2017, 2020; DOS PASSOS BRAGA et al., 2019; GOY; DE BRITTO; ASSIS, 2009; MAHDY SAMAR et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2018).

Por ser biocompatível, biodegradável e não tóxico e por ter alta capacidade de formar filmes, a quitosana foi aprovada como aditivo alimentar pela Food and Drug Administration dos EUA e é amplamente utilizada como cobertura de frutas (MAHDY SAMAR et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2020; PAL et al., 2021).

A constante busca por preservar frutas minimamente processadas, diversos métodos já foram estudados, incluindo o uso de radiação ionizante,

cloreto de cálcio e o revestimentos comestíveis (amido, quitosana, celulose e proteína do leite) destacando-se entre as demais, por ser uma das tecnologias mais populares para reduzir as perdas pós-colheita (ESPAÑA et al., 2017; KUMAR; MUKHERJEE; DUTTA, 2020; MUJTABA et al., 2019; NASCIMENTO et al., 2020).

A literatura tem mostrado a eficiência de filmes de quitosana como revestimentos e óleos essenciais na inibição e no desenvolvimento da antracnose em diversas frutas (BAKSHI et al., 2020; KUMAR; MUKHERJEE; DUTTA, 2020; MAHDY SAMAR et al., 2013; MUJTABA et al., 2019; NASCIMENTO et al., 2020). Filmes de quitosana como revestimento associado a substâncias naturais (ecológicas) foram aplicados no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, como tecnologias alternativas e emergentes para proteger a fruta de infecções por fungos patógenos pós-colheita (HAGGAG, 2010; KERCH, 2015).

Diversas formulações de quitosana são relatadas na literatura por atuarem contra a antracnose em goiabeiras: quitosana e ácido cítrico (NASCIMENTO et al., 2020) e quitosana e óleos essenciais, tais como de capim limão (DE OLIVEIRA et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2018). Formulações de quitosana contra antracnose em outras frutas também são relatadas: em mamão (DOS PASSOS BRAGA et al., 2019) e em manga (DE OLIVEIRA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2018).

O uso desses revestimentos pode reduzir a quantidade de fungicidas sintéticos usados no controle de doenças pós-colheita, aumentam a vida útil dos frutos, além de outras vantagens tecnológicas como aparência melhorada, efeitos antimicrobianos e antioxidantes e propriedades atóxicas (DE OLIVEIRA et al., 2020; DOS PASSOS BRAGA et al., 2019; KUMAR; MUKHERJEE; DUTTA, 2020; MAHDY SAMAR et al., 2013; MUJTABA et al., 2019).

Quitosana modificada como suporte para o catalisador de paládio em síntese orgânica

O paládio é muito útil para reações de substituições aromáticas, que representam uma classe de reação muito importante para as indústrias de química fina, agroquímica e farmacêutica principalmente na pesquisa durante o

desenvolvimento de produtos (DAS; LINERT, 2016; DEVENDAR et al., 2018; TORBORG; BELLER, 2009).

A reação de Suzuki catalisado por paládio é uma das ferramentas sintéticas mais versáteis e bem-sucedidas para formar ligações carbono-carbono e carbono-heteroátomo, extremamente importantes na síntese orgânica durante as últimas décadas, visto que emprega como reagentes organometálicos derivados de organoboro que não são tóxicos, são tolerantes ao ar e à umidade e amplamente disponíveis em grande variedade e com custo razoável (DONG et al., 2021; MIESSLER; FISCHER; TARR, 2014).

Como um exemplo industrializado, a reação de Suzuki catalisada por paládio foi aplicada com sucesso na produção de compostos da Merck, um anti-hipertensivo como o losartan, (DEVENDAR et al., 2018; LIU et al., 2012; TORBORG; BELLER, 2009).

É evidente na literatura a diversidade de estudos para melhorar o desempenho e a eficiência da reação Suzuki-Miyaura, principalmente na busca por condições de reação amigáveis ambientalmente (JOO et al., 2020; SHAIKH; PAMIDIMUKKALA, 2021).

Nesse contexto, o paládio (Pd) têm sido frequentemente empregado em sistemas catalíticos heterogêneos na forma de catalisador suportado, e já foram utilizados uma variedade de suportes, por exemplo, em combinação com sílica porosa, polímeros, biomateriais, zeólitos, óxidos e materiais à base de carbono e utilizados para catalisar reações de acoplamento Suzuki-Miyaura (DAS; LINERT, 2016; JOO et al., 2020; LIU et al., 2012; MCCARTHY; BRADDOCK; WILTON-ELY, 2021).

Entre os diversos biopolímeros usados como suporte para estabilizar o paládio, a quitosana provou ser um suporte eficiente e ecológico para o sistema de catalisador de paládio devido à sua ocorrência natural, baixo custo, abundância e fácil interação com solventes ecológicos, atóxicos (SHAIKH; PAMIDIMUKKALA, 2021).

Os biopolímeros funcionalizados são designados como suportes, por que criam mais locais de ancoragem para capturar o paládio para a preparação de catalisadores altamente eficientes. Nesse sentido, a quitosana tem se destacado pela sua versatilidade e capacidade de ser facilmente modificado e explorado

como uma matriz eficaz para produzir os catalisadores heterogêneos (DONG et al., 2021; SHAIKH; PAMIDIMUKKALA, 2021).

Matrizes de ligantes baseados em nitrogênio tem muitas vantagens e têm sido empregados com sucesso em reações de Suzuki-Miyaura, Pankaj et al. (2016) relata em seu estudo de revisão, dentre os ligantes baseados em nitrogênio, destaca os avanços na aplicação de ligantes de base de Schiff em reações de Suzuki-Miyaura catalisadas por Pd, em substituição das fosfinas, principalmente pela possibilidade de modificação na estrutura nos grupos funcionais aminas e aldeídos e por estabilizar metais em vários estados de oxidação.

As características do suporte exercem um papel crucial no desempenho de um sistema catalítico na catálise heterogênea. A literatura traz uma infinidade de novos catalisadores heterogêneos de Pd suportados em quitosana, por exemplo, catalisadores de Pd para a reação de acoplamento Suzuki-Miyaura já foram preparados como nanopartículas de paládio suportado em nanotubos de carbono modificados com quitosana-piridina (JOO et al., 2020); como nanoestruturas suportado em quitosana magnética (SHAIKH; PAMIDIMUKKALA, 2021); imobilizado em quitosana funcionalizada com vanilina e base de Schiff (DONG et al., 2021); suportado em quitosana funcionalizada com vanilina e base Schiff do tipo imidazol (ALKABLI et al., 2021); nanocompósito de amido-quitosana (biopolímero duplo) magnética (VEISI et al., 2021); suporte de quitosana funcionalizada com bases Schiff magnéticas (NAGHIPOUR; FAKHRI, 2016).

Contudo, mesmo após as últimas décadas, o avanço no desenvolvimento de uma abordagem altamente eficiente para o sistema de catalisador de Pd para melhorar o desempenho e a eficiência da reação Suzuki-Miyaura, ainda é um desafio. No que tange à uma perspectiva mais limpa, da química verde, o desenvolvimento de catalisadores de paládio heterogêneo ainda se faz necessário, principalmente na busca por agentes químicos e suportes mais ecológicos com o intuito de tornar as condições reacionais mais amigáveis ambientalmente (DAS; LINERT, 2016; DEVENDAR et al., 2018; MCCARTHY; BRADDOCK; WILTON-ELY, 2021).

Portanto, a busca por novos catalisadores continua ser o foco de pesquisa científica, o desenvolvimento de métodos sintéticos ambientalmente benignos,

curtos e eficientes são necessários frente aos métodos tradicionais de produção que utilizam a fosfina na reação de Suzuki-Miyaura.

Quitosana como adsorvente de cobre (II) e cobalto (II)

A problemática da contaminação por metais pesados é originada do uso de várias tecnologias, como médicas, agrícolas e industriais, que agravaram a poluição por metais no meio ambiente, juntamente com seus impactos negativos para a comunidade. Os íons metálicos lançados no meio ambiente constituem uma das principais causas da poluição ambiental e entram no corpo humano através da cadeia alimentar e ingestão de água contaminada. Os metais se acumulam no corpo e ambiente pois não são biodegradáveis causando graves problemas de saúde. Assim, a necessidade de sua remoção efetiva (despoluição) torna-se cada vez mais crucial (ANUSH; CHANDAN; VISHALAKSHI, 2019; NITHYA et al., 2017).

Os principais exemplos de metais pesados que causam impactos negativos são: mercúrio, cádmio, cromo, chumbo, cobalto, ferro, cobre e níquel (ANBINDER et al., 2019; BIBI et al., 2018; KYZAS; KOSTOGLU, 2015; MARQUES et al., 2019; SOUZA; ZAMORA; ZAWADZKI, 2010; VARGHESE; DAS; DAS, 2016; WANG, 2018).

Embora uma concentração mínima de alguns desses metais (cobre, ferro, cobalto, cromo) seja necessária para o corpo, exceder os limites é nocivo aos seres humanos. O grau de toxicidade desses metais depende de alguns fatores como: a rota de entrada e sua forma hidrofílica ou hidrofóbica, o tempo de exposição aos metais e a dose absorvida dos metais (AL-SAYDEH; EL-NAAS; ZAIDI, 2017; HOUSECROFT; SHARPE, 2013; UPADHYAY et al., 2021).

A legislação ambiental em vigor define um valor máximo permitido apenas para o cobre de 2,0 mg/L. No entanto, cita que a exposição ocupacional ao cobre e cobalto representam riscos à saúde com potencial para desenvolver doenças de trato respiratório, digestivo graves (BRASIL, 2017).

Estudos apontam relação de contaminação por cobre e cobalto à doenças neurológicas degenerativas (AL-SAYDEH; EL-NAAS; ZAIDI, 2017; LEGGETT, 2008; LI et al., 2020; SQUITTI et al., 2017; ZHENG et al., 2021).

O cobre e o cobalto são amplamente utilizados na indústria na galvanoplastia, eletroeletrônicos, têxtil, catalisadores, mineração, entre outras. O cobalto ainda é utilizado na fabricação de baterias, materiais magnéticos, pigmentos, e ainda como radioisótopos (^{60}Co), nas usinas nucleares e na medicina nuclear. Portanto, se descartados de maneira incorreta, são encontrados em águas residuais e no meio ambiente (ARAMESH; BAGHERI; BILAL, 2021; QAMAR et al., 2020; SHETH et al., 2021; ZHANG; ZHUANG; WANG, 2020).

Estudo recente revisa o comportamento biológico do cobalto inorgânico em humanos e animais, suas aplicações e destaca a preocupação mundial com o potencial poluidor do cobalto, representando uma ameaça ao meio ambiente e à saúde humana. E ressalta a importância, do desenvolvimento de métodos eficazes para remover cobalto de águas residuais, mas ainda considera um grande desafio para um futuro próximo (ZHANG; ZHUANG; WANG, 2020).

Extensas investigações são encontradas na literatura sobre a tecnologia de remoção de metais pesados em soluções aquosas. Os métodos mais relatados na literatura para remoção de íons de metais são: coagulação, precipitação química, evaporação, adsorção, filtração por membrana, eletrólise, oxidação, tratamento biológico, troca iônica, fotocatalise e adsorção (PAL et al., 2021; QAMAR et al., 2020; QU; LUO, 2020; SARODE et al., 2019; SEENUVASAN; SAROJINI; DINESHKUMAR, 2020; TANG et al., 2021; UPADHYAY et al., 2021; VAKILI et al., 2019).

Dados da literatura mostram que o método de adsorção têm sido o mais conveniente para o tratamento de águas e seus efeitos promissores nos últimos anos ganhou popularidade, por ser considerado o mais eficiente, ter fácil emprego, bem como devido sua capacidade de neutralizar os efeitos nocivos e tóxicos dos poluentes, produzindo efluentes tratados de alta qualidade com menor custo operacional (UPADHYAY et al., 2021; VAKILI et al., 2019; ZHANG et al., 2017).

Nesse sentido estudos que envolvem o desenvolvimento de adsorventes baratos, eficazes, amigáveis ao meio ambiente e reprodutíveis tem sido o foco de vários pesquisadores (MARQUES et al., 2019; MUJTABA et al., 2020; QU; LUO, 2020; UPADHYAY et al., 2021; VAKILI et al., 2019; VARGHESE; DAS; DAS, 2016). A adsorção é um processo de separação de equilíbrio bem

conhecido; é um método eficaz, eficiente e econômico não só para o tratamento de água, mas também para técnicas de separação analítica em pequena e grande escala (VIDAL; MORAES, 2019).

A adsorção é uma técnica já reconhecida, como conveniente para o tratamento de águas assim como a quitosana como um eficiente adsorvente para remoção de metais pesados, tendo destaque principalmente por seu baixo custo, praticidade, eficácia e ambientalmente amigável. Nesse sentido, diversas revisões recentes são reportados na literatura com foco no desenvolvimento de adsorventes a base de quitosana (SARODE et al., 2019; SEENUVASAN; SAROJINI; DINESHKUMAR, 2020; UPADHYAY et al., 2021; VAKILI et al., 2019; VIDAL; MORAES, 2019).

Segundo o estudo de Upadhyay e colaboradores (2021), a quitosana tem seu destaque com adsorvente na remoção de metais pesados de águas residuárias. O estudo discute ainda o desempenho de adsorventes derivados e modificados de quitosana para a remoção de íons metálicos e destacam que entre vários métodos, a reticulação e o enxerto são os métodos mais populares para a preparação de adsorventes. A quitosana já é amplamente utilizada para purificação de água, no entanto, ainda há avanços para torná-la mais eficiente no processo de remoção. Pode ser usado como floculante e coagulante, como adsorvente para remover contaminantes como metais pesados, corantes, pesticidas, antibióticos, contaminantes biológicos de águas residuais (PAL et al., 2021).

A adsorção é uma técnica já reconhecida, como conveniente para o tratamento de águas assim como a quitosana como um eficiente adsorvente para remoção de metais pesados, tendo destaque principalmente por seu baixo custo, praticidade, eficácia e ambientalmente amigável. Nesse sentido, diversas revisões recentes são reportados na literatura com foco no desenvolvimento de adsorventes a base de quitosana (SARODE et al., 2019; SEENUVASAN; SAROJINI; DINESHKUMAR, 2020; UPADHYAY et al., 2021; VAKILI et al., 2019; VIDAL; MORAES, 2019).

Segundo o estudo de Upadhyay e colaboradores (2021), a quitosana tem seu destaque com adsorvente na remoção de metais pesados de águas residuárias. O estudo discute ainda o desempenho de adsorventes derivados e modificados de quitosana para a remoção de íons metálicos e destacam que

entre vários métodos, a reticulação e o enxerto são os métodos mais populares para a preparação de adsorventes.

A quitosana já é amplamente utilizada para purificação de água, no entanto, ainda há avanços para torná-la mais eficiente no processo de remoção. Pode ser usado como floculante e coagulante, como adsorvente para remover contaminantes como metais pesados, corantes, pesticidas, antibióticos, contaminantes biológicos de águas residuais (PAL et al., 2021).

A quitosana é reconhecida como um biopolímero catiônico que possui a capacidade de se ligar a macromoléculas carregadas negativamente para formar filmes e na quelação de íons metálicos (SEENUVASAN; SAROJINI; DINESHKUMAR, 2020). A quitosana tem sido amplamente estudada como adsorvente de íons metálicos devido ao seu alto potencial de adsorção, o que pode estar relacionado à sua alta hidrofilicidade em decorrência da presença de grupos funcionais ($-OH$ e $-NH_2$), que atuam como sítios ativos com comprovada afinidade aos metais, além de ser um polímero biodegradável, barato e de estrutura flexível (ROY et al., 2017; UPADHYAY et al., 2021; VAKILI et al., 2019).

No entanto, a quitosana solubiliza em meio ácido, sendo essa sua principal desvantagem pois dificulta sua aplicação direta. Nesse sentido várias técnicas de modificações podem potencializar o desempenho da quitosana como adsorvente, diversas pesquisas bem sucedidas têm sido realizadas com a quitosana (BEGUM et al., 2021; QU; LUO, 2020; RUBINA et al., 2020; UPADHYAY et al., 2021; VIDAL; MORAES, 2019; ZENG et al., 2015; ZIA et al., 2020).

Autores destacam que a reticulação pode aumentar a estabilidade da quitosana, mas pode diminuir a capacidade de adsorção. A complexação é o principal mecanismo pelo qual a quitosana funciona como um adsorvente, devido à presença preferencialmente do grupo amina mas também do grupo hidroxila (SARODE et al., 2019; UPADHYAY et al., 2021).

Os grupamentos amina (NH_2) e hidroxila (OH) servem como locais de coordenação na formação de complexos com vários íons de metais pesados removendo-os de forma eficaz, o que torna a quitosana um excelente adsorvente natural. Porém, o grupamento amina é destacado como sítio ativo preferencial (ANBINDER et al., 2019; GUIBAL, 2004; PAL et al., 2021; SARODE et al., 2019; ZHANG et al., 2021b).

Em quitosana modificada pela inserção de cadeias de nitrogênios no grupo amino da quitosana, tais como azo compostos do tipo triazenos, espera-se uma complexação de cátions metálicos justamente no grupo (-N=N-N-) desprotonado tal como descrito na literatura (BECK; HÖRNER; DITTMANN, 2009; HÖRNER et al., 2004; PARAGINSKI et al., 2016; SANTOS et al., 2014, 2016). Adsorventes na forma de filmes de quitosana têm destaque na literatura devido à facilidade de remoção após tratamento comparado a outras formas disponíveis, evitando processos de separação adicionais (uso de flocos, pós, esponjas, fibras) além de melhorar a capacidade de adsorção, dependendo das suas propriedades mecânicas também poder ser reutilizado (FAJARDO et al., 2012; HUO et al., 2021; MARQUES et al., 2019; VIEIRA, 2008).

Filmes de quitosana modificado com álcool polivinílico (PVA) foram aplicados para a adsorção de cobre (II) em solução aquosa em diversos estudos. A eficiência da adsorção de cobre em filmes de quitosana foi superior ao carvão ativado (SAHEBJAMEE et al., 2019). Além disso, a literatura destaca a eficiência de remoção de cobre da solução e a capacidade de adsorção de filmes de quitosana/PVA (KARAER; KAYA, 2017) e de filmes de quitosana sem modificação (KULKARNI et al., 2020). Em adição, o efeito dos íons cobre adsorvidos na microestrutura dos filmes de quitosana foi avaliado e a interação entre os íons metálicos e os grupos funcionais da quitosana são discutidos na literatura (ANBINDER et al., 2019).

Filmes de quitosana foram aplicados como sorventes modificados com glicina e com ácido cloroacético na remoção de cobre e cobalto de soluções aquosas e os resultados de adsorção foram satisfatórios comparados ao filme de quitosana puro. A eficiência de remoção dos íons em diferentes pH foi avaliada (NEGM et al., 2015).

Islam et al. (2018) investigaram informações atualizadas sobre o uso de adsorventes para íons Co (II) da água ambiental, no entanto a quitosana não foi citada como adsorvente. Na literatura ainda existem poucos estudos, sobre a adsorção de cobalto em águas, que utilizaram filmes ou outras formas de quitosana modificada como adsorvente, quando comparado ao cobre (II), apesar do destaque atribuído ao cobalto (II) como potencial poluidor ambiental, em diversos estudos de revisão sobre tratamento de água e remoção de metais

pesados (BEGUM et al., 2021; SARODE et al., 2019; UPADHYAY et al., 2021; VAKILI et al., 2019).

O cobalto (II) foi removido da solução aquosa com filmes de quitosana modificados com Montmorilonita (MMT) e o seu desempenho de adsorção foi avaliado (WANG et al., 2014a). A remoção de Co (II) foi realizada usando quitosana magnética modificada com cianoetil e a capacidade de adsorção foi estudada (ZHANG; ZHUANG; WANG, 2020). Autores revelam que o grupo amino da quitosana desempenha papel importante na absorção de cobre e cobalto e os estudos MEV e EDS contribuíram para confirmar a formação do complexo metálico com o grupo amino ($-NH_2$). Entretanto, o grupo hidroxila também tem sua participação como sítio ativo (ANBINDER et al., 2019; KULKARNI et al., 2020; SARODE et al., 2019; WANG et al., 2014a; ZHANG; ZHUANG; WANG, 2020).

A capacidade de adsorção do adsorvente à base de quitosana modificada sofre forte influência do pH da solução na remoção de íons metálicos, cobre (II) e cobalto (II), e estudos relatam um ajuste acerca de $pH = 7,0$ para evitar modificações estruturais devido à diferentes protonações na quitosana em meio ácido, principalmente ao trabalhar com testagem de mais de um íon (ANBINDER et al., 2019; NITHYA et al., 2017; WANG et al., 2014a; WANG, 2018). Vários artigos de revisão que envolvem adsorção de metais destacam a necessidade de explorar mais mecanismos precisos auxiliam em uma compreensão completa do processo real que está ocorrendo no nível molecular, além de servir como suporte em pesquisas futuras, elaboração de lei, comercialização e etc (AL-SAYDEH; EL-NAAS; ZAIDI, 2017; BEGUM et al., 2021; SHETH et al., 2021; UPADHYAY et al., 2021; VIDAL; MORAES, 2019).

CAPÍTULO 1

Processamento de casca de camarão, extração de quitina, síntese de quitosana por metodologias diversas, caracterização estrutural e avaliação de atividade antifúngica em amostras de quitosana

1.1 INTRODUÇÃO

A quitina é o segundo polímero mais comum depois da celulose na terra, e as cascas de camarão, são uma das principais fontes entre os crustáceos. As cascas do camarão contém cerca de 20-40% de quitina, além de 30-40% de proteínas, 30-50% de carbonato de cálcio e fosfato na sua composição (KUMIRSKA et al., 2010), mas a composição varia conforme a fonte, a espécie e o método de extração da quitina (EL KNIDRI et al., 2018; KAYA et al., 2017).

Nesse contexto, os rejeitos do camarão-rosa (*Farfantepenaeus brasiliensis*) utilizados nesse estudo como fonte de quitina para a síntese de quitosana representam um recurso potencial de alto valor agregado. A quitina é extraída em geral, por método químico com um tratamento ácido seguido de tratamento alcalino para eliminação de carbonatos de cálcio e proteínas, respectivamente (EL KNIDRI et al., 2019; KUMARI et al., 2017; SOON et al., 2018).

O processo de extração da quitina e a síntese de quitosana pode ser realizado por método biológico, porém em geral apresentam longo tempo de reação e elevado custo, o que torna o método químico mais utilizado (HASSAINIA; SATHA; BOUFI, 2018; KACZMAREK et al., 2019; SEDAGHAT et al., 2017; YOUNES et al., 2012).

O processo de síntese de quitosana parte da quitina purificada e consiste na conversão da quitina em quitosana pela remoção do grupo acetila. A reação de desacetilação via método químico utiliza bases fortes e pode ser empregada de diferentes formas, em geral por aquecimento em banho de óleo acoplado à um sistema de refluxo sob um longo tempo reacional (AL-MANHEL; AL-HILPHY; NIAMAH, 2018; EL KNIDRI et al., 2016; NOURI et al., 2016).

A desacetilação é a principal etapa envolvida no processo de síntese de quitosana, durante o qual os grupos acetil são removidos da quitina para produzir a quitosana. A síntese de quitosana é geralmente realizada por tratamento com solução aquosa e concentrada de hidróxido de sódio à temperatura elevada. Após a reação, o material produzido é lavado várias vezes com água destilada até a neutralidade e, em seguida, seco em estufa por 18 – 24 h (AL-MANHEL; AL-HILPHY; NIAMAH, 2018; KUMARI et al., 2017; TRUNG et al., 2020).

A quitosana é geralmente sintetizada por processo convencional, método químico, usando um aquecimento convencional, que consome muito tempo e energia. Esse método convencional utiliza o aquecimento em banho-maria acoplado a um sistema de refluxo, álcalis altamente concentrados, alta temperatura e longo tempo de reação (EL KNIDRI et al., 2019; GÓMEZ-RÍOS; BARRERA-ZAPATA; RÍOS-ESTEPA, 2017; SEBASTIAN et al., 2019).

A síntese de quitosana a partir da quitina purificada pelo método convencional é amplamente discutido na literatura, no entanto, a diversidade de quitina (fonte, origem, espécie) disponível utilizada como matéria-prima, dificulta sua reprodutibilidade mantendo os parâmetros de qualidade da quitosana satisfatórios (AL-MANHEL; AL-HILPHY; NIAMAH, 2018).

Nesse contexto, o camarão foi utilizado como matéria-prima para obtenção de quitina e síntese de quitosana pelo método convencional, e a reação de desacetilação ocorreu nas seguintes condições: NaOH 12,5 mol.L⁻¹ à 100 °C por 5 h (AL-MANHEL; AL-HILPHY; NIAMAH, 2018); Já Knidri et al. (2016) utilizou as mesmas condições e obteve excelentes resultado com 2,5 h de reação; Temperatura mais baixa foi utilizada por Zvezdova (2010), 80 °C e NaOH 12,5 mol.L⁻¹ por 8 h de reação. Maior concentração relatada foi de 18 mol.L⁻¹ e maior tempo de reação, 24 h em temperatura ambiente e 7 h à 90 °C (MA; XIN; TAN, 2015).

Nesse sentido, muitos autores abordam a problemática das severas condições reacionais para encontrar métodos alternativos de síntese de quitosana mais ecológico, mais eficiente, com redução de custos e tempo de reação e que produza quitosana de qualidade (EL KNIDRI et al., 2018; MUXIKA et al., 2017; NOURI et al., 2016).

A tecnologia de radiação de micro-ondas não foi apenas utilizada em síntese orgânica, mas mais recentemente penetrou em vários campos, como ciências de materiais, síntese de polímeros, nanotecnologia e processos bioquímicos. Geralmente, esta técnica pode ser muito útil para sintetizar boas propriedades funcionais da quitosana com química rápida, segura e verde (EL KNIDRI et al., 2018; SURAT; JAUHARI; DESAK, 2012).

O uso do micro-ondas para síntese de quitosana no emprego de método químico têm atraído grande interesse, por ser um método fácil, de baixo custo e rápido, atendendo a requisitos da Química verde (EL KNIDRI et al., 2018, 2019).

Além disso, esse método de síntese pode ser utilizado para melhorar a funcionalidade da quitosana, promover modificações químicas e controlar melhor suas propriedades físico-químicas (SURAT; JAUHARI; DESAK, 2012; ZHAO et al., 2019b).

Knidri et al. (2016) substituiu o método convencional por micro-ondas em todas as etapas de extração e purificação da quitina e síntese da quitosana. No entanto a radiação de micro-ondas foi mais utilizada no final do processo de síntese da quitosana, especificamente na etapa de desacetilação (ABREU et al., 2013; ALISHAHI et al., 2011; NOURI et al., 2016; SEBASTIAN et al., 2019).

A preferência pela solução de hidróxido de sódio para a reação de desacetilação da quitina em diferentes concentrações é evidente na literatura. A destilação foi realizada nas mesmas condições desse estudo, em micro-ondas doméstico, com NaOH 12,5 mol.L⁻¹ foi utilizado para a reação de desacetilação em com potência de 350 W por 8 minutos (EL KNIDRI et al., 2016); Nouri et al. (2016) utilizou a mesma concentração por 20 minutos com uma potência de 720 W; Potência de 400 W por 30 minutos na mesma concentração (ALISHAHI et al., 2011).

A extração assistida por micro-ondas é um método reprodutível, pois os resultados obtidos são excelentes, além de ser muito eficaz na remoção de carbonatos de cálcio, proteínas e na desacetilação da quitina, em tempos de reação muito curtos (EL KNIDRI et al., 2016, 2019).

Na reação de desacetilação promovida por radiação de micro-ondas os reagentes são ativados e se ligam diretamente às moléculas de toda a mistura de reação, levando a um rápido aumento da temperatura (SURAT; JAUHARI; DESAK, 2012).

Portanto, o uso da extração assistida por micro-ondas com altas potências leva a uma redução drástica no tempo de desacetilação e na conservação de energia, ao contrário do método convencional em que os reagentes são ativados lentamente por uma fonte de calor externa convencional (EL KNIDRI et al., 2019).

O princípio por trás do aquecimento em forno de micro-ondas é devido à interação da partícula carregada do material de reação com o comprimento de onda eletromagnético de determinada frequência (BANIK; BANDYOPADHYAY; GANGULY, 2003). As ondas eletromagnéticas da radiação por micro-ondas

atuam diretamente na maioria das moléculas que possuem momento dipolar ou condutividade iônica, levando a um rápido aumento na temperatura (HAYES; HAYES, 2015).

A aceleração das reações químicas resulta das interações entre o material e campo eletromagnético levando aos efeitos térmicos e não térmicos (ALISHAHI et al., 2011; EL KNIDRI et al., 2019; HAYES; HAYES, 2015; SURAT; JAUHARI; DESAK, 2012).

Na perspectiva de melhorar o método de extração assistido por micro-ondas, bem como, para a sua aplicação em laboratório ou em escala industrial as potencialidades do método foram estudadas do ponto de vista da eficiência, reprodutibilidade e facilidade de implementação para a extração de quitina e síntese de quitosana (EL KNIDRI et al., 2019; NOURI et al., 2016; SEBASTIAN et al., 2019; ZHAO et al., 2019b).

A tecnologia de radiação de micro-ondas também pode ser muito eficaz na despolimerização de quitosana, celulose e outros biopolímeros, podendo ser usada como método promissor para a geração de quitosanas de baixo peso molecular podendo ser despolimerizada a partir da quitosana de alto peso molecular sob irradiação de micro-ondas (SEBASTIAN et al., 2019; ZHAO et al., 2019b).

As vantagens mais destacadas na literatura para uso de radiação de micro-ondas são reações rápidas, alta pureza dos produtos, menor produtos colaterais, rendimentos aprimorados, maior eficiência energética, reprodutibilidade e seguro. Como desvantagem, ressaltam, dificuldade de controle da força de calor, evaporação de água e a impossibilidade de utilizar um recipiente fechado em um micro-ondas comum, porque pode estourar (SURAT; JAUHARI; DESAK, 2012).

Além da radiação de micro-ondas, no contexto de uma síntese verde, a utilização do ultrassom, também conhecida como sonicação, surge como promissor. O ultrassom de alta intensidade tem se destacado como um processo eficiente para realizar modificações em quitosana e na produção de nanomateriais à base de quitina e quitosana (ANWAR; ANGGRAENI; AMIN, 2017; BIROLI; DELEZUK; CAMPANA-FILHO, 2016; FIAMINGO et al., 2016).

O mecanismo do ultrassom fundamenta-se nas ondas de alta energia que criam cavitações na solução líquida, e é versátil por que as condições de

sonicação podem ser alteradas conforme as características do sistema, manipulação do ciclo de trabalho das ondas, tempo de exposição, pulsação, amplitude e potência acústica do sistema ultrassônico (ALMEIDA; DELEZUK; CAMPANA-FILHO, 2019; DUONG; NGHIA, 2017).

A ação da radiação ultrassônica pode melhorar a eficiência da reação, aumentando a acessibilidade aos sítios reativos através do fenômeno da cavitação que aumenta a área de superfície da partícula em decorrência da energia liberada e do impacto das violentas colisões que provoca (CRAVOTTO et al., 2005).

Relatos sobre a síntese de quitosana assistida por radiação de ultrassom de alta intensidade demonstram que a eficiência do método e a redução do tempo está diretamente ligada às características da sonda do ultrassom (ANWAR; ANGGRAENI; AMIN, 2017; CRAVOTTO et al., 2005).

Estudos utilizaram um ultrassom de alta intensidade com uma frequência de 24 kHz, e sonda de ultrassom com 22 mm de diâmetro e 100 mm de comprimento acoplada a um reator em sistema fechado o que difere desse trabalho (BIROLLI; DELEZUK; CAMPANA-FILHO, 2016; DELEZUK et al., 2011; FIAMINGO et al., 2016). No entanto, o método para radiação de ultrassom desse estudo resulta de uma adaptação de Birolli et al. (2016) e Delezuk et al. (2011) à nossa realidade, em sistema aberto.

Na literatura não foi evidenciado estudos de síntese de quitosana em sistema aberto, no entanto as condições experimentais do ultrassom são recorrentes, em geral, irradiação intermitente, amplitude de irradiação alta (75%) e pulso de 1 segundo (IP = 1 s) (ANWAR; ANGGRAENI; AMIN, 2017; BIROLLI; DELEZUK; CAMPANA-FILHO, 2016; DELEZUK et al., 2011; FIAMINGO et al., 2016).

A reação de desacetilação da quitina por radiação de ultrassom de alta intensidade foi utilizada por Fiamingo et al. (2016) com NaOH 10 mol.L⁻¹ produzindo quitosana com alto grau de desacetilação e alto peso molecular em temperatura de 80 °C por 1 h; Birolli et al. (2016) e Delezuk et al. (2011) utilizaram as mesmas condições para produção de quitosana com excelentes propriedades.

O objetivo geral desse estudo, no Capítulo 1, foi extrair quitina de cascas de camarão obtidos na Colônia Z3 de Pelotas-RS como resíduos de pesca e,

partir disso, sintetizar quitosana em reação de desacetilação pelo método convencional com aquecimento e sistema de refluxo (DS_{9h}), com uso de radiação de micro-ondas (DS_{MICRO}) e com uso de radiação ultrassom (DS_{ULTRA}). As amostras de quitosana sintetizadas devem apresentar qualidade de uma amostra obtida comercialmente, em relação as suas propriedades físicas e químicas, por isso a comparação também é objetivada. Por fim, objetivou-se a avaliação antifúngica das amostras de quitosana contra estruturas vegetativas e reprodutivas do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, causador da doença antracnose em goiabeiras.

1.2 METODOLOGIA

O procedimento experimental desse trabalho inicia com a síntese de quitosana obtida da quitina extraída a partir da casca de camarão-rosa (*Farfantepenaeus brasiliensis*) provenientes da Colônia Z3 da cidade de Pelotas/RS, seguido da caracterização química e física das amostras obtidas, bem como de sua avaliação antifúngica.

1.2.1 Reagentes

Os reagentes químicos de grau analítico (PA) foram utilizados sem tratamento prévio. A água utilizada no preparo de soluções e nas análises químicas foi obtida a partir de um destilador tipo pilsen, marca Marte e/ou deionizador por osmose reversa da marca Quimis Q342.

Foram utilizados os seguintes reagentes: acetato de sódio, brometo de potássio, hidróxido de amônio, verde de bromocresol, vermelho de metila, sulfato de potássio, iodeto de potássio (Synth); ácido sulfúrico, ácido acético, Ácido clorídrico Hidróxido de sódio (Vetec); quitosana de médio peso molecular lote ST9F3507 (Sigma-Aldrich).

A quitosana comercial da marca Sigma-Aldrich® foi utilizada como referência para comparação com a quitosana sintetizada no LASIR. As especificações da quitosana comercial constam na Tabela 7, conforme consta em sua ficha técnica.

Tabela 7 – Especificações da quitosana Sigma-Aldrich®

Propriedade	Especificação
Cinzas totais	< 1,0%
Umidade	< 10,0%
Densidade	0,15 - 0,30 g.cm ⁻³
Solubilidade	10 mg.mL ⁻¹ em ácido acético 1 Mol.L ⁻¹
pH	6,3
Grau de desacetilação	75 – 85%
Massa Molar	190 – 310 kDa

Fonte: (SIGMA-ALDRICH, 2019)

1.2.2 Síntese de quitosana por diferentes métodos

O procedimento para extração de quitina a partir de cascas de camarão e para a síntese de quitosana está baseado em diversos trabalhos descritos na literatura e, no entanto, é preciso uma adaptação do método conforme as necessidades do laboratório e características da matéria-prima disponível. (ANTONINO, 2007; BERGER, 2013; EL KNIDRI et al., 2018; FONSECA, 2016; KUMARI et al., 2015; MUXIKA et al., 2017; SANTOS, 2004; YOUNES; RINAUDO, 2015).

No processo realizado neste trabalho, a meta era sintetizar amostras de quitosana com grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$) adequadas a proporcionar solubilidade em ácido acético 1%, em solução tampão de ácido acético 0,3 mol.L⁻¹/acetato de sódio 0,2 mol.L⁻¹ (pH~4,5) e em solução aquosa de ácido clorídrico 0,1 mol.L⁻¹, que seriam as soluções de trabalho, de maneira equivalente à amostra comercial da marca Sigma-Aldrich. O processo de extração da quitina e síntese da quitosana passou pela seguinte sequência, apresentada na Figura 6:



Figura 6 – Fluxograma do processo de obtenção da quitina e quitosana.

A etapa de pré-tratamento (Figura 7) compreendeu as etapas de limpeza manual das cascas com água potável para retirada de areia e resíduos, seguido de secagem em estufa, em bandejas de inox, à 60 °C, por 24 h. sendo posteriormente moídas em liquidificador e dispostas em dessecador.



Figura 7 – Pré-Tratamento das cascas: catação e limpeza (a), cascas secas (b) e cascas trituradas (c)

Na etapa da desmineralização (DM), 60 g de casca secas e moídas foram suspensas em 1,8 L de solução aquosa de ácido clorídrico 1,6 mol.L⁻¹, na proporção 1:30 (m/v). O sistema foi mantido à temperatura ambiente sob agitação constante por 1 h. O rendimento desta etapa foi de 44% a partir da casca limpa. Os equipamentos utilizados foram béquer de vidro e agitador magnético, como mostra a Figura 8.

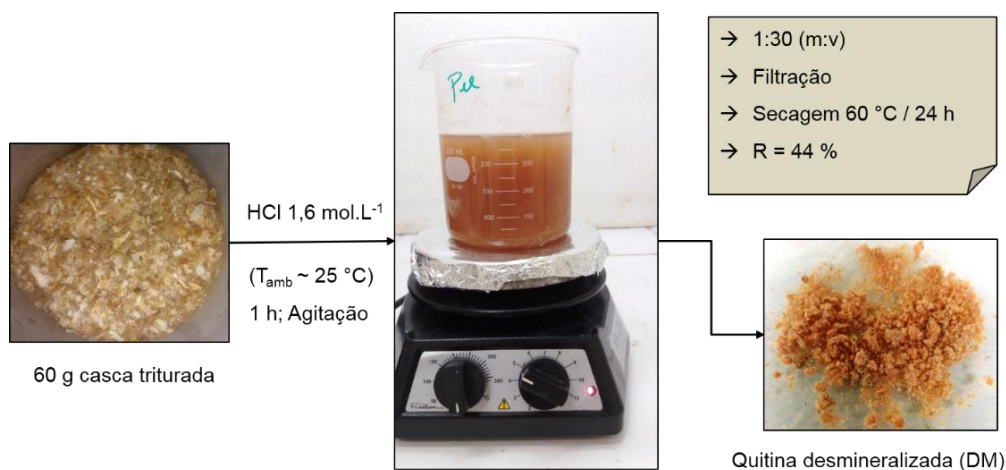


Figura 8 – Extração da quitina desmineralizada (DM). R = rendimento.

Para a etapa da desproteíntização (DP) pesou-se 60 g de quitina desmineralizada e adicionou-se 1,8 L de solução aquosa de NaOH 0,75 mol.L⁻¹, na proporção 1:30 (m/v). O sistema foi mantido a uma temperatura de 70 ± 5 °C, sob constante agitação por 1 h. O rendimento desta etapa foi de 68% a partir da quitina desmineralizada. Os equipamentos utilizados foram béquer de vidro, termômetro e agitador magnético com aquecimento, como mostra a Figura 9.

Nesse estudo a quitosana foi sintetizada a partir da quitina purificada, por diferentes métodos químicos (Figura 10), buscando um método alternativo ao aquecimento convencional, mais ecológico e eficiente, com menor custo e tempo de reação e de fácil reprodutibilidade, que produzisse quitosana de qualidade comparativa à quitosana obtida comercialmente da marca Sigma-Aldrich. O ponto final de cada reação era identificado pela solubilidade das amostras nas soluções aquosas de ácido acético 1% e de ácido clorídrico 0,1 mol.L⁻¹.

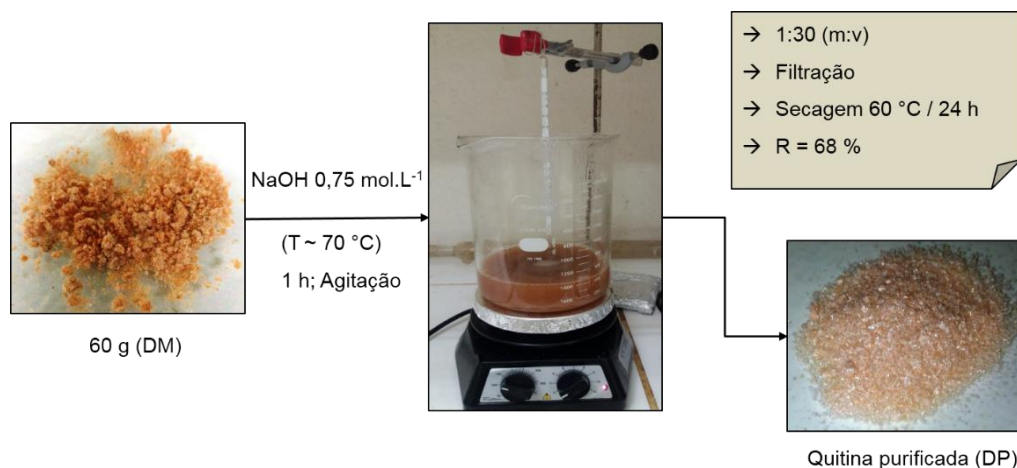


Figura 9 – Extração da quitina purificada (DP). R = rendimento

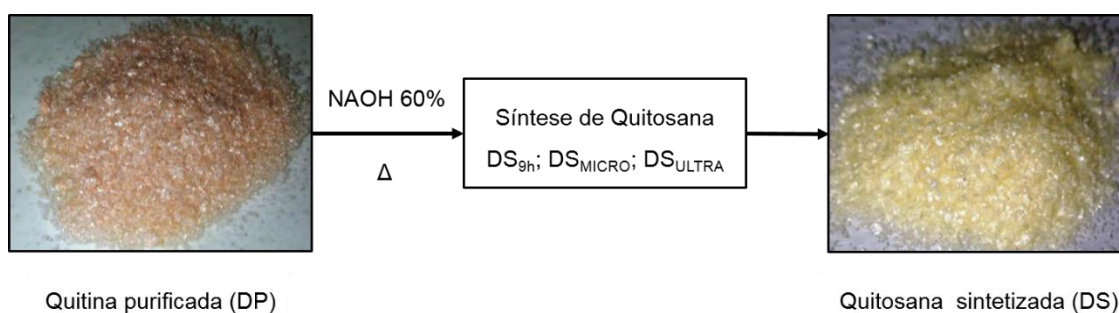


Figura 10 – Síntese de quitosana por diferentes métodos.

A descrição dos métodos de síntese de quitosana empregados estão apresentados na Tabela 8 e as fotos das reações de desacetilação na Figura 11. Dentre as três metodologias, a mais complexa foi a com uso da radiação de ultrassom. O béquer foi acoplado em um banho-maria contendo álcool etílico 95%, que foi disposto no interior da caixa de isolamento acústico do equipamento de ultrassom. A sonda do ultrassom utilizada possui 9 mm de diâmetro e 100 mm de comprimento. A sonda foi imersa na suspensão de beta-quitina com 2/3 submerso na solução e submetida à irradiação intermitente de ultrassom, amplitude de irradiação alta (75%) e pulso de 1 segundo (IP = 1 s). Ao final, a reação foi interrompida vertendo o meio reacional em béquer (contendo gelo moído) imerso em banho.

O procedimento da reação de desacetilação via radiação de ultrassom foi adaptado de Birolli et al. (2016) e Delezuk et al. (2011).

Tabela 8 – Descrição da síntese de quitosana por diferentes métodos químicos

Descrição	Síntese de quitosana a partir da quitina purificada		
	DS _{9h}	DS _{MICRO}	DS _{SULTRA}
Vidrarias	Balão de vidro em banho de óleo, termômetro	Béquer de plástico	Béquer de vidro
Equipamentos	Agitador magnético com aquecimento e sistema de refluxo	Micro-ondas Eletrolux (doméstico) ME28S 900 W v=60 Hz	Sonic Vibra Cell VCX 130 Mod.130 W, v=20 kHz
Temperatura (°C)	120 (controlada)	120 (medida)	90 (medida)
Potência (W)	1100	360	130
Reagentes	Solução aquosa de NaOH 15 mol.L ⁻¹ (60%)		
Condições reacionais	1:30 (m/v) de quitina: solução de NaOH 15 mol.L ⁻¹ , (soluções preparadas com antecedência e deixadas em <i>overnight</i>)		
Massa inicial de quitina (g)	30	30	2
Tempo de reação	9 h	1h e 15 min	2 h
Filtração e Lavagem	Funil de Büchner acoplado à bomba de vácuo e lavagem com água destilada até pH 7		
Secagem	Estufa de secagem à 45 °C por 48 h		
Rendimento a partir da DP (%)	54,5	64	58
Rendimento global a partir das cascas limpas e trituradas (%)	13	19	17
Local da síntese	Lasir/UFPel	Lasir/UFPel	Unipampa/Bagé

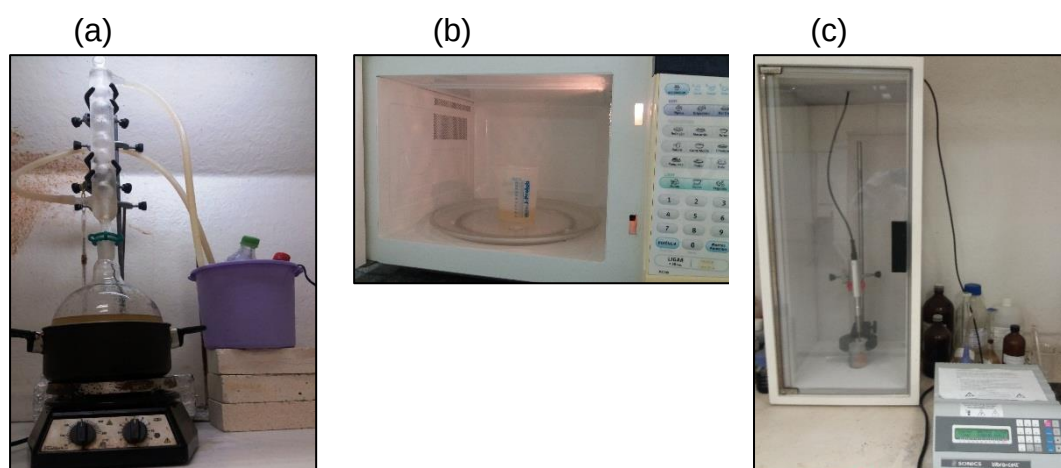


Figura 11 – Síntese de quitosana por diferentes métodos químicos. (a) DS_{9h}. (b) DS_{MICRO}. (c) DS_{SULTRA}.

1.2.3 Caracterizações

Todas as amostras obtidas em cada etapa do processo de extração da quitina e síntese de quitosana foram caracterizadas com o intuito de avaliar o desempenho e eficiência das etapas e manter a reprodutibilidade do processo (Tabela 9).

Tabela 9 – Caracterizações, equipamentos e referências utilizadas para a análise das amostras.

Caracterização	Equipamentos	Amostras^(a)	Referência
Umidade	Estufa Solab SL 100/150; Balança analítica Shimadzu AUW220D		(AOAC nº 935.28, 1995)
Cinzas	Forno Mufla Jung Mod.2310; Balança analítica Shimadzu AUW220D	Casca, DM, DP, DS _{9h} , DS _{MICRO} , DS _{SULTRA} e DS _{COM}	(AOAC nº 923.03, 1995)
Nitrogênio Total (Kjeldahl)	Bloco Digestor Solab SL 25 Destilador Solab SL 74		(AOAC nº 920.87, 1995)
Granulometria	Peneiras e agitador Bertel; Balança analítica Shimadzu AUW220D		(FONSECA, 2016)
Massa Molar Viscosimétrica	Viscosímetro de Ostwald nº 250	DS _{9h} , DS _{MICRO} , DS _{SULTRA} e DS _{COM}	(FONSECA, 2016)
Grau de desacetilação	Phmetro Quimis Q450A	DS _{9h} , DS _{MICRO} , DS _{SULTRA} e DS _{COM}	(CZECHOWSKA-BISKUP et al., 2012)
Espectroscopia de Infravermelho (FT-IV)	Shimadzu – IRAffinity-1	Casca, DM, DP, DS _{9h} , DS _{MICRO} , DS _{SULTRA} e DS _{COM}	(EL KNIDRI et al., 2016; FRICK et al., 2018)
Termogravimetria (TGA/DTA)	Shimadzu – TA-60WS	Casca, DM, DP, DS _{9h} , DS _{MICRO} , DS _{SULTRA} e DS _{COM}	(HOMEZ-JARA et al., 2018; KUMARI et al., 2015)
Difração de Raio X (DRX)	Rigaku – Modelo ULTIMA IV	Casca, DM, DP, DS _{9h} , DS _{MICRO} , DS _{SULTRA} e DS _{COM}	(EL KNIDRI et al., 2019; IOELOVICH, 2014)
Microscopia de Força Atômica (AFM)	Agilent Technologies modelo 5500	Casca, DM, DP, DS _{9h} , DS _{MICRO} , DS _{SULTRA} e DS _{COM}	(BHATT et al., 2017; SAZANOVA; OTVAGINA; VOROTYNTSEV, 2018)
Microscopia Eletrônica de Varredura/ Espectroscopia de Energia Dispersiva (MEV/EDS)	Jeol, JSM – 6610LV	Casca, DM, DP, DS _{9h} , DS _{MICRO} , DS _{SULTRA} e DS _{COM}	(EL KNIDRI et al., 2016; POERIO et al., 2020)

^a Quitina desmineralizada (DM), quitina desproteínizada (DP), quitosanas sintetizadas (DS_{9h}, DS_{MICRO}, DS_{SULTRA}) e quitosana comercial (DS_{COM}).

1.2.3.1 Determinação do teor de umidade

Os cadinhos de alumínio foram previamente tarados em estufa por 5 h, a $100 \pm 5^\circ \text{C}$ e pesados (P_1). Pesou-se aproximadamente 0,05 g das amostras, (P_a), em seguida, os cadinhos contendo as amostras foram secos em estufa por 4 h a $100 \pm 5^\circ \text{C}$ e depois acondicionados em dessecador até atingir temperatura ambiente. Na sequência, os cadinhos foram pesados em intervalos de 1 h até a massa permanecer constante (P_2). Todas as análises de umidade foram realizadas em triplicata, no LASIR - UFPel. Os cálculos foram realizados de acordo com a Equação 5.

Equação 5 – Cálculo do teor de umidade

$$U = \left(\frac{P_2 - P_1}{P_a} \right) \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

Onde: U é a porcentagem de umidade presente na amostra; P_1 representa a massa do cadinho; P_2 , a massa do cadinho contendo a amostra após a dessecação em estufa, e P_a , a massa da amostra inicial.

1.2.3.2 Determinação do teor de cinzas

Pesou-se aproximadamente 0,06 g das amostras em cadinhos de porcelana previamente pesados e tarados em mufla, a $550 \pm 2^\circ \text{C}$, durante 4 h. Inicialmente, as amostras, nos cadinhos de porcelana, foram carbonizadas até formar uma massa carvão, usando um maçarico no interior da capela de exaustão. Em seguida, esses cadinhos foram colocados na mufla durante 5 h a $550 \pm 2^\circ \text{C}$. Na sequência, os cadinhos foram retirados e colocados em dessecador até que atingissem a temperatura ambiente. Todas as análises de cinzas foram realizadas em triplicata no LASIR – UFPel. Os cálculos foram realizados de acordo com a Equação 6.

Equação 6 – Cálculo do teor de cinzas

$$U = \left(\frac{P_2 - P_1}{P_a} \right) \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

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

1.2.3.3 Determinação de nitrogênio total

O método de micro-Kjeldahl foi empregado, onde aproximadamente 0,2 g de amostra foram pesadas no tubo de micro-Kjeldahl. Adicionou-se ao tubo 1,0 g de mistura catalítica (sulfato de potássio e sulfato de cobre (II) pentahidratado na proporção 10:1 m/m) e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Os tubos foram aquecidos lentamente em bloco digestor, aumentando gradativamente 100° C a cada hora até que atingissem 400° C, onde permaneceram por mais 1 h. O ciclo de digestão foi finalizado quando o nitrogênio foi convertido a sulfato de amônio (reações 1-4 da Tabela 10), e a amostra no tubo mostrava-se sem resíduos. Os tubos foram retirados do bloco digestor e aguardou-se atingir temperatura ambiente para adicionar 10 mL de água destilada em cada.

Em seguida, os tubos contendo as amostras digeridas foram adaptados ao destilador de nitrogênio, onde se adicionou 10 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio 50%. As amostras foram destiladas por arraste a vapor, sendo que o destilado foi coletado em erlenmeyer contendo 10 mL de ácido bórico 4% e 3 gotas de indicador misto 0,1% (verde de bromocresol e vermelho de metila 2:1 m/m em álcool etílico 95%) até o volume aproximado de 100 mL. O nitrogênio foi destilado na forma de hidróxido de amônio e coletado na forma de borato de amônio no erlenmeyer (reações 5-7 da Tabela 10).

Para a quantificação do teor de nitrogênio total, as amostras foram tituladas com ácido sulfúrico 0,05 mol.L⁻¹ previamente padronizado com carbonato de sódio 0,05 mol.L⁻¹ até a viragem do indicador, isto é, até que a coloração do meio de reação mudasse de verde para violeta, indicando a formação de sulfato de amônio e liberação de ácido bórico (reação 8 da Tabela 10).

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 nos Laboratórios de Ensino de Química da Unipampa no campus. Os cálculos foram realizados de acordo com a Equação 7.

Tabela 10 – Reações de digestão da matéria orgânica (1-4), reações de destilação (5-7) e reação de titulação (8)

Etapas	Reações
1	$\text{Massa inicial}_{(s)} \rightarrow \text{SO}_{2(g)} + \text{CO}_{2(g)} + \text{H}_2\text{O}_{(l)} + \text{R-NH}_{2(aq)} + \text{R-CONH}_{2(aq)}$
2	$\text{R-NH}_{2(aq)} + \text{H}_2\text{O}_{(l)} \rightarrow \text{R-OH}_{(aq)} + \text{NH}_{3(g)}$
3	$\text{R-CONH}_{2(aq)} + \text{H}_2\text{O}_{(l)} \rightarrow \text{R-COOH}_{(aq)} + \text{NH}_{3(g)}$
4	$2 \text{NH}_{3(g)} + \text{H}_2\text{SO}_{4(aq)} \rightarrow (\text{NH}_4)_2\text{SO}_{4(aq)}$
5	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_{4(aq)} + 2 \text{NaOH}_{(aq)} \rightarrow 2 \text{NH}_4\text{OH}_{(aq)} + \text{Na}_2\text{SO}_{4(aq)}$
6	$\text{NH}_4\text{OH}_{(aq)} \rightarrow \text{NH}_{3(g)} + \text{H}_2\text{O}_{(l)}$
7	$3 \text{NH}_{3(g)} + \text{H}_3\text{BO}_{3(aq)} \rightarrow (\text{NH}_4)_3\text{BO}_{3(aq)}$
8	$(\text{NH}_4)_3\text{BO}_{3(aq)} + \text{H}_2\text{SO}_{4(aq)} \rightarrow \text{H}_3\text{BO}_{3(aq)} + (\text{NH}_4)_2\text{SO}_{4(aq)}$

Equação 7 – Determinação de nitrogênio total

$$NT = \frac{(V_g) \times F \times N \times 0,014 \times 100}{P_a} \quad \text{Equação 7}$$

Onde: NT é a porcentagem de nitrogênio total; V_g é o volume de solução de ácido sulfúrico gasto na titulação; F é o fator de correção da solução de ácido sulfúrico; N corresponde à normalidade teórica da solução de ácido sulfúrico (ou seja, molaridade multiplicada por 2); 0,014 é o valor do miliequivalente grama do nitrogênio e P_a é a massa da amostra em gramas.

1.2.3.4 Granulometria

A análise granulométrica foi realizada por peneiramento para identificar a distribuição percentual do tamanho da partícula para a casca do camarão, quitina desproteinizada (DP), quitosanas sintetizadas (DS_{9h} , DS_{MICRO} , DS_{ULTRA}) e quitosana comercial. Para a quitina desmineralizada (DM) não foi realizado ensaio granulométrico visto que o foco é a comparação de tamanho das partículas de casca, quitina purificada e quitosana,

Para esta caracterização física foi utilizado um jogo de peneiras (2,00; 1,00; 0,500; 0,250; 0,106 mm), agitador de peneiras localizado no laboratório Labmequi – UFPel. A massa de 5 g de amostra foi transferida para a peneira de 2,0 mm, acoplada às demais peneiras e presa ao agitador. O tempo de agitação foi de 30 minutos numa intensidade de 5 vibrações (reostato). Com base na Equação 8 foi possível calcular o percentual em massa das frações separadas pelas peneiras. O cálculo foi efetuado para 6 faixas: maior que 2 nm, menor que

2 nm e maior que 1 nm, menor que 1 nm e maior que 0,5 nm, menor que 0,5 nm e maior que 0,25 nm, menor que 0,25 nm e maior que 0,106 nm, menor que 0,106 nm.

Equação 8 – Percentual de amostra retida na peneira

$$(\%) = \frac{m_{retida}}{m_{inicial}} \times 100 \quad \text{Equação 8}$$

Onde: (%) é a porcentagem de partícula na faixa de tamanho específico entre cada peneira, m_{retida} é a massa retida na peneira e $m_{inicial}$ é a massa seca inicial utilizada para o ensaio.

1.2.3.5 Determinação da massa molar viscosimétrica média

Para determinação da viscosidade intrínseca $[\eta]$, foi utilizado um viscosímetro capilar do tipo Cannon-Fenske (Ostwald) e em seguida foi calculada da massa molar viscosimétrica média.

As medidas viscosimétricas das amostras de quitosana comercial e quitosanas sintetizadas (DS_{9h}, DS_{MICRO}, DS_{ULTRA}) foram determinadas imediatamente após as amostras serem solubilizadas e, com os resultados foram plotadas as curvas viscosimétricas.

Optou-se pela utilização da solução tampão de ácido acético 0,3 mol.L⁻¹ / acetato de sódio 0,2 mol.L⁻¹ (1:1 v/v; pH = 4,5) pois esse solvente não forma agregados de quitosana de acordo com a literatura (RINAUDO; MILAS; LE DUNG, 1993; YOUNES; RINAUDO, 2015).

Foram adicionados 0,25 g de amostra em 100 mL da solução tampão. As soluções foram filtradas em papel qualitativo e as diluições foram preparadas de forma seriada, tal que suas viscosidades relativas, η_{rel} , fossem superior a 1,2 e inferior a 1,6 (Tabela 12) (RINAUDO; MILAS; LE DUNG, 1993).

As medições iniciaram pelo escoamento da solução tampão e na sequência as soluções diluídas iniciando a partir da solução de menor concentração para a solução de maior concentração de cada amostra. O tempo de escoamento foi medido com auxílio de um cronômetro à temperatura ambiente controlada de $25 \pm 1^\circ \text{C}$. Foram feitas no mínimo quatro leituras para o cálculo da média do tempo de escoamento de cada solução para o cálculo das médias. As análises realizadas no LASIR – UFPel.

Os termos sobre viscosimetria capilar e suas respectivas equações estão apresentados na Tabela 11. Conforme as definições e equações detalhadas foram determinadas a viscosidade relativa, específica, reduzida, inerente e intrínseca de cada amostra. A massa molar viscosimétrica foi obtida utilizando a Equação 9, sendo as constantes α e K utilizadas, as mesmas daquelas obtidas por Roberts e Domszy (1982), uma vez que foi utilizado o mesmo sistema de solventes e condição de temperatura (RINAUDO; MILAS; LE DUNG, 1993; ROBERTS; DOMSZY, 1982; YOUNES; RINAUDO, 2015).

Equação 9 – Cálculo da massa molar viscosimétrica (Mark-Houwink)

$$[\eta] = k \cdot M_v^\alpha$$

Equação 9

Onde: $[\eta]$ é a viscosidade intrínseca; M_v é a massa molar média viscosimétrica, $\alpha = 0,76$ e $k = 0,074$ são constantes que dependem do sistema solvente-polímero adotados neste trabalho (RINAUDO; MILAS; LE DUNG, 1993).

Tabela 11 – Definições das viscosidades calculadas

Viscosidade	Símbolo	Unidade	Fórmula	Definição
Relativa	η_{rel}	adimensional	$\eta_{rel} = t/t_0$	Mede o quanto a viscosidade da solução é maior do que a viscosidade do solvente puro (t e t_0 são o tempo de escoamento da solução e do tampão respectivamente).
Específica	η_{esp}	adimensional	$\eta_{esp} = \eta_{rel} - 1$	Mede o quanto a diferença de viscosidade entre a solução e o solvente é maior do que a viscosidade do solvente puro.
Reduzida	η_{red}	$[c^{-1}] = dL/g$	$\eta_{red} = \eta_{esp}/C$	Indica o ganho de viscosidade promovido por unidade de concentração do polímero.
Inerente	η_{inh}	$[c^{-1}] = dL/g$	$\eta_{inh} = \ln(\eta_{rel})/C$	Permite que variações pequenas e muito grandes da viscosidade da solução possam ser expressas em um mesmo eixo em relação ao solvente. e $\ln$ é logaritmo neperiano.
Intrínseca	$[\eta]$	$[c^{-1}] = dL/g$	$[\eta] = \eta_{red} (C \rightarrow 0)$ e $\eta_{inh} (C \rightarrow 0)$.	Indica a faixa de viscosidade quando η_{red} e η_{inh} tendenciam a concentração à zero ($C \rightarrow 0$).

Fonte: Adaptado de FONSECA, 2016

1.2.3.6 Determinação do grau médio de desacetilação

A titulação potenciométrica foi utilizada para a determinação do grau de desacetilação ($\overline{GD}$) para amostras de quitosana comercial (DS_{COM}) e quitosanas sintetizadas (DS_{9h}, DS_{MICRO} e DS_{SULTRA}).

Optou-se por realizar a titulação potenciométrica, pois em experimentos anteriores foi observado que ambas titulações potenciométrica e condutimétrica apresentam desempenho semelhante. O procedimento para determinação do $\overline{GD}$ foi adaptado de Raymond e colaboradores (1993), sendo que já foi empregado por outros autores (ANTONINO, 2007; COCOLETZI et al., 2009; FONSECA, 2016; GARCIA, 2020; HACKBART, 2017; KUMARI et al., 2015).

A solução aquosa de ácido clorídrico (aproximadamente 0,1 mol.L⁻¹) (diluente) foi previamente padronizada com solução aquosa de carbonato de sódio 0,05 mol.L⁻¹. A solução aquosa de hidróxido de sódio (aproximadamente 0,1 mol.L⁻¹) (titulante) foi previamente padronizada com uma solução aquosa de ácido clorídrico 0,1 mol.L⁻¹.

Para a titulação foram dissolvidas 25 mg de quitosana em 5 mL de solução ácida de HCl 0,1076 mol.L⁻¹, sob agitação constante e lenta. Em seguida, a solução viscosa foi diluída com 10 mL de água deionizada e titulada com uma solução aquosa de NaOH 0,099 mol.L⁻¹. No decorrer da titulação manteve-se constante a agitação e a temperatura ambiente controlada (25 ± 1° C).

As variações de pH foram coletadas ao longo da titulação. Os dados foram utilizados para construção das curvas de titulação: pH *versus* o volume gasto de titulante. O cálculo do grau de desacetilação $\overline{GD}$ foi obtido a partir da Equação 10 e o grau de acetilação ($\overline{GA}$) a partir da Equação 11 apresentadas abaixo:

Equação 10 – Cálculo do grau de desacetilação

$$\% \overline{GD} = \frac{16,1 \times [M_{\text{base}}] \times (V_2 - V_1) \times 100}{m} \quad \text{Equação 10}$$

Equação 11 – Cálculo do grau de acetilação

$$\% \overline{GA} = 100\% - \overline{GD} \quad \text{Equação 11}$$

Onde: $\% \overline{GD}$ é o grau médio de desacetilação; 16,1 é a fração molar da quitosana relacionada ao volume em mL; V_1 é o volume em mL de base necessário para neutralização somente da solução de ácido clorídrico; V_2 é o

volume em mL de base necessário para neutralização do polímero em solução ácida; $(V_2 - V_1)$ é o volume necessário para neutralizar os grupos amino presentes na quitosana e é obtido entre os dois pontos de equivalência na curva de titulação; M_{base} corresponde à molaridade da solução de NaOH $0,099 \text{ mol.L}^{-1}$ (titulante), m é a massa em gramas da amostra e $\% \overline{GA}$ é o grau médio de acetilação.

Para validação estatística dos dados coletados durante a titulação e para minimizar os erros (operador, equipamento, etc) que possam ter ocorrido no experimento optou-se por utilizar o estudo das derivadas das curvas e o método dos mínimos quadrados para a titulação potenciométrica cujas variações de pH (ΔpH) foram coletadas. A projeção dos pontos obtidos na primeira derivada ($\Delta pH/\Delta V$), relacionando variações de pH e de volume de titulante foi avaliada pela formação de picos, onde os maiores picos apontam para os pontos de equivalência (V_1 e V_2), evidenciando assim os resultados com maior precisão.

A projeção dos pontos obtidos na segunda derivada da curva [$\Delta(\Delta pH/\Delta V)$] relacionam a variação da primeira derivada e permite confirmar os pontos de equivalência.

O método dos mínimos quadrados ajusta com maior precisão o volume de titulante gasto no ponto de equivalência, na tentativa de minimizar os erros obtidos por aproximações e medidas. Utilizou-se este método para encontrar as equações da reta $y = ax + b$, sendo que a e b podem ser obtidos pelos pontos máximos e mínimos, respectivamente, indicados na projeção da segunda derivada da curva. Conforme a literatura este é um método de baixo custo e eficiente, no entanto o tratamento dos dados é necessário. (MENDHAM et al., 2002; SKOOG; HOLLER; NIMAN, 2002). As análises foram realizadas no LASIR - UFPel.

1.2.3.7 Espectroscopia na região do Infravermelho (FT-IV)

Os espectros na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IV) foram registrados em um intervalo de varredura de 400 a 4000 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} . As amostras, previamente seca em estufa a 40°C por 12 h, foram trituradas e homogeneizadas em 100 mg de brometo de potássio (KBr), previamente seco em estufa a 100°C por 12 h, na proporção de 1:10 (massa de

amostra: massa de KBr). Amostra e KBr foram homogeneizados em um gral de ágata com o auxílio de um pistilo. Em seguida, as pastilhas foram confeccionadas com auxílio de uma prensa hidráulica Shimadzu. Essa análise foi realizada na Central Analítica do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA), UFPel. Os dados foram plotados em espectros de transmitância (u.a.) *versus* número de onda (nm).

1.2.3.8 Medidas Termogravimétricas (TGA/DTG)

A análise termogravimétrica (TGA/DTG) foi realizada utilizando o analisador TGA/DTA simultâneo usando massa de cada amostra em pó (S, DM, DP, DS_{9h}, DS_{MICRO}, DS_{SULTRA}, DS_{COM}) entre 2,0 – 10 mg em cadinho de platina, no intervalo de temperatura de 20° C a 500° C, razão de aquecimento de 10° C.min⁻¹, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio gasoso (vazão 50 mL.min⁻¹). Os termogramas das amostras foram obtidos para verificar o perfil da decomposição e estabilidade térmica. Esta análise foi realizada na Central Analítica do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA), UFPel.

1.2.3.9 Difração de Raio X e determinação do grau de cristalinidade

O grau de cristalinidade das amostras (S, DM, DP, DS_{9h}, DS_{MICRO}, DS_{SULTRA}, DS_{COM}) foram avaliados por meio de difratogramas de raios X em pó obtidos usando um difratômetro de raios X com radiação da linha CuK_α (λ=1,54 Å) e potência de 40kV/20mA. A geometria utilizada é foi a de Bragg-Brentano com varredura em 2θ no intervalo de 2° a 70° e tempo de integração de 1s com passo de 0,05°. As medidas foram realizadas no Laboratório de Raios X (Grupo Nanoestruturados – PPCEM) da Unipampa, campus Bagé.

O grau de cristalinidade ($\bar{X}$) foi calculado utilizando a Equação 10 com base na determinação da área definida pelas linhas de base nos difratogramas das amostras após a subtração do background e correções (Ioelovich, 2014).

Equação 12 – Determinação do grau de cristalinidade

$$\bar{X} = \frac{\int I_{CR} d\theta}{\int I_0 d\theta} = F_{CR} / (F_{CR} + F_{am}) \quad \text{Equação 12}$$

Onde: I_0 é a intensidade total do difratograma corrigido depois da subtração do background; I_{cr} é a intensidade do espalhamento cristalino; F_{cr} é a área do espalhamento cristalino; F_{am} é a área do espalhamento amorfo (Ioelovich, 2014).

As medidas foram realizadas no Laboratório de Raios X (Grupo Nanoestruturados – PPCEM) da UNIPAMPA, campus Bagé.

1.2.3.10 Microscopia de força atômica (AFM)

Imagens topográficas de alta resolução foram obtidas por Microscopia de Força Atômica (AFM), à temperatura ambiente e realizadas no modo contato (Contact Mode), pontas PPP-Cont da Nanosensors. Constante de mola de 0,2 N/m foi utilizado para adquirir simultaneamente a topografia da superfície e imagens de fase.

Fragmentos de cada amostra no estado sólido: casca (S), quitina desmineralizada (DM), quitina desproteínizada (DP) e quitosana (DS_{9h}), (DS_{MICRO}), (DS_{ULTRA}) de tamanho 0,5 cm² foram fixados ao porta amostras usando uma fita adesiva dupla face e limpos com álcool etílico (Figura 12).

A quitosana comercial (DS_{COM}), por ser pulverizada, foi analisada com o auxílio de uma lâmina de mica como substrato. O pó da amostra DS_{COM} foi diluído com ácido acético 3% e gotas da solução formada foram gotejadas sobre a mica clivada. A mica é usada por ser extremamente plana, com sua superfície sendo composta por planos atômicos, sendo útil na identificação de materiais depositados sobre ela. Após a evaporação da solução, a amostra foi analisada por AFM.

A correção automática do ruído linear foi aplicada durante a digitalização. Para fins de verificação da reprodutibilidade as imagens AFM foram produzidas em diferentes locais das amostras estudadas, digitalizando a área de varredura da amostra em 100 µm² para cada amostra, sendo que as varreduras são matrizes de dados com uma dimensão de 512×512 pixels.

O software *Picoview 1.14.4* permite o controle do microscópio, aquisição e edição dos dados digitalizados. Os dados da imagem topográfica processados

foram analisados posteriormente pelo *software Gwyddion 2.54* com auxílio do *Origin 7.0*.



Figura 12 – Foto do Microscópio de força atômica (esquerda); preparo da amostra no porta amostra (central); foto da ponteira visualizada pelo *software* acoplado ao AFM no início da digitalização (direita).

As características morfológicas e os parâmetros de textura da superfície (parâmetros de amplitude, parâmetros espaciais) foram caracterizados para uma melhor compreensão das modificações que ocorrem na superfície das amostras durante todo o processo, desde a extração da quitina até a síntese de quitosana por diferentes métodos.

O tratamento de dados são os requisitos básicos ao estudar a topografia de uma superfície, para tal, nesse trabalho, 2 categorias foram organizadas: (1) parâmetros de amplitude: rugosidade quadrática média da raiz (RMS), altura máxima (S_z), coeficiente de assimetria (S_{sk}) e coeficiente de curtose (S_k); (2) parâmetro espacial: entropia (H). A combinação de todos esses parâmetros é capaz de descrever as principais propriedades funcionais da superfície de um material, e para tal algumas definições são necessárias e são descritas a seguir.

Rugosidade média da raiz quadrada (RMS) compreende a média dos desvios de altura medidos, dentro do comprimento de avaliação e medidos a partir da linha média, ou seja, é o desvio padrão da distribuição das alturas da superfície. RMS é uma medida que compreende medidas tanto dos picos quanto dos vales que se afastam da média. Essa medida não define a forma das irregularidades, pois são elevadas ao quadrado, no entanto melhora sua

determinação, o que foi considerado mais significativo para esse trabalho, comparado à rugosidade média (R_a). Resumindo, RMS é a média das irregularidades de altura de uma superfície, já para calcular R_a usamos apenas os parâmetros de amplitude (GADELMAWLA et al., 2002; KLAPETEK; NEČAS; CHRISTOPHER, 2020; YACOOT; KOENDERS, 2008).

Ainda analisando a categoria 1, a altura máxima (S_z) é o valor absoluto entre os picos mais alto e mais baixo corresponde a altura máxima do perfil, ou seja, é a medida de pico a pico em um vale. Já o coeficiente de assimetria (S_{sk}) mede a simetria do perfil da linha em relação a sua média e indica a porosidade da superfície. A avaliação do S_{sk} representa o grau de simetria na distribuição das alturas na superfície referente ao plano médio e suas especificações estão apresentadas abaixo na Tabela 12 (BAJPAI; BHATT; KATARE, 2016; KIM; WHITE, 2004; KLAPETEK; NEČAS; CHRISTOPHER, 2020; MAHMOUDI et al., 2020; MUNZ, 2013).

Tabela 12 – Especificações do coeficiente de assimetria (S_{sk}) conforme a distribuição das alturas na superfície. Por favor confere se as informações em verde na tabela estão corretas, se não estão invertidas.

Coeficiente de Assimetria		Distribuição de altura da superfície
$S_{sk}=0$		Simétrica
$S_{sk} > 0$	Assimétrica	Abaixo da média de simetria; mais picos do que vales
		Apresenta picos altos projetados acima da media
$S_{sk} < 0$	Assimétrica	Acima da média de simetria; poucas ondulações
		Vales predominam em um platô mais suave

Por fim, o último parâmetro a ser analisado na categoria 1 é o coeficiente de curtose (S_k) que mede a pontualidade do perfil de linha e indica a textura da área, ou seja, a distribuição das alturas e variação dos grãos na superfície pelo valor 3. O parâmetro S_k foi investigado nesse trabalho porque é significativo para indicar a presença de defeitos de pico ou vale, que podem ocorrer em uma superfície.

A Tabela 13 apresenta as características das distribuições na superfície conforme o coeficiente de curtose (S_k) determinado (BHATT et al., 2017; HULUBEI et al., 2014; KLAPETEK; NEČAS; CHRISTOPHER, 2020).

Tabela 13 – Especificações do coeficiente de curtose (S_k) conforme a distribuição das alturas na superfície

Coeficiente de Curtose	Características das distribuições nas superfícies	Classificação
$S_k=3$	Amplitude gaussiana	Mesocúrtica
$S_k>3$	Relativamente pouca área acima ou abaixo do plano médio	Leptocúrtica
	Afunilada, mais alta	
	Mais saliências espalhadas	
$S_k<3$	Relativamente uniforme de alturas acima ou abaixo do plano médio	Platicúrtica
	Achatada (mais que a normal)	
	Vales largos (solavancos)	
$S_k<0$	Agrupamentos de grãos, altamente irregular	NC (Não possui classificação específica.)

Na categoria 2, o parâmetro espacial, entropia (H) mede a complexidade da estrutura determinante na morfologia que se inter-relaciona fortemente com os graus de ordem ou desordem na distribuição da estrutura do grão. A entropia embora seja um dos termos da equação termodinâmica para a energia livre de Gibbs (ΔG) (Equação 13) (SKOOG; HOLLER; NILMAN, 2009), em termos de superfície, é discutida separadamente, visto que a termodinâmica descreve sistemas em equilíbrio (THOMPSON et al., 2002).

Equação 13 – Energia livre

$$\Delta G = \Delta H - T \times \Delta S \quad \text{Equação 13}$$

Onde: (ΔG) é a energia livre, (ΔH) é a variação da entalpia e ($T \times \Delta S$) é o produto da variação da entropia pela temperatura).

Entropia (H) está intimamente associado ao fator de rugosidade, que é uma quantificação da complexidade do tamanho da forma. Quanto maior o valor da entropia mais complexa e desordenada é a imagem. As entropias são exibidas sem unidade, pois são quantidades logarítmicas (ANDRAUD; BEGHDADI; LAFAIT, 1994; PIASECKI, 2000).

A topografia da superfície das amostras (Casca, DM, DP, DS_{9h} , DS_{MICRO} , DS_{ULTRA} e DS_{COM}), foram avaliadas nesse trabalho, conforme as 2 categorias organizadas: (1) parâmetros de amplitude: rugosidade quadrática média da raiz (RMS), altura máxima (S_z), coeficiente de assimetria (S_{sk}) e coeficiente de curtose (S_k); (2) parâmetro espacial: entropia (H).

As medidas foram realizadas no Laboratório de Microscopia de Força Atômica (LabAFM) da UNIPAMPA, campus Bagé.

1.2.3.11 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

Para a EDS, os filmes foram previamente preparados utilizando "*sputtering*" de ouro (Denton Vacuum Desk V), para melhorar a condutibilidade; foi utilizada uma corrente de 20 mA, por 120 s. A MEV foi realizada com uma voltagem de aceleração de 10 kV e a faixa de magnificação variou de 30 a 300.000 vezes. As imagens (micrografias) foram obtidas com resolução de 512 x 384 pixels, tamanho de 0,24 μm e uma ampliação de 2000x (CEME-SUL – FURG).

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi realizada para observar a morfologia da superfície. A amostra foi previamente preparada utilizando "*sputtering*" de ouro (Denton Vacuum Desk V), para melhorar a condutibilidade. Foi utilizada uma corrente de 20 mA, por 120 s.

O espectrômetro de raio X de energia dispersiva (EDS), é um detector, acoplado ao MEV, que possibilita 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.

A espectroscopia de EDS é uma medida rápida e versátil, visto que é acoplado ao microscópio. A amostra é a mesma preparada previamente para o MEV, que quando excitada por uma fonte de energia (feixe de elétrons do MEV) dissipa parte da energia absorvida ejetando um elétron da camada central. O elétron de camada externa de energia mais alta então prossegue para preencher seu lugar, liberando a diferença de energia como um raio X que tem um espectro característico baseado em seu átomo de origem. A posição dos picos no espectro identifica o elemento, enquanto a intensidade do sinal corresponde à concentração do elemento. Conforme a amostra é varrida pela sonda de elétrons, raios x são emitidos e medidos, o espectro EDS registrado é mapeado para uma posição específica na amostra, que pode ser escolhida durante a análise do MEV (simultaneamente).

1.2.3.12 Atividade antifúngica

A Linhagem de *Colletotrichum gloeosporioides* foi obtida da coleção de microrganismos de interesse ao controle biológico de pragas, vinculada a Embrapa Clima Temperado, com código de acesso CPACT 651, oriunda de frutos de goiabeira infectados com antracnose. A colônia foi mantida em meio de cultura BDA (batata, dextrose, ágar), à 4° C até sua utilização no ensaio em questão.

O potencial de toxicidade das soluções filmogênicas de quitosana (DS_{9h}, DS_{MICRO}, DS_{ULTRA}) e quitosana comercial (COM) foi avaliado contra estruturas vegetativas e reprodutivas do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, com base em bioensaio *in vitro* destinado a avaliar o crescimento fúngico e a esporulação *in vitro*. Quitosana comercial (COM) foi utilizada para efeito comparativo, como controle positivo antifúngico, pois já é relatado na literatura seu potencial antifúngico (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2003; EL GHOUTH et al., 1994) e a solução de ácido acético 0,25% (AAc) foi considerado como controle negativo antifúngico.

A concentração de quitosana empregada nas avaliações foi previamente definida na proporção de 0,6% (m:v) em solução em ácido acético 0,25% (v:v) (Fráguas et al., 2015). Tween 80 foi adicionado na proporção de 0,046% (v:v) para melhor emulsificação, sob agitação constante.

Para avaliação do crescimento micelial fúngico, procedeu-se à deposição individual de alíquotas de 100µL de cada solução de quitosana preparada na superfície de meio de cultura (BDA) solidificado contido em placas de Petri de 9 cm de diâmetro (Seixas et al., 2011). Água esterilizada foi utilizada como controle negativo. Os ensaios foram realizados em capela de fluxo laminar para manutenção das condições de assepsia. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, constituído de seis repetições, sendo cada parcela representada por uma placa de Petri. Os dados foram comparados com o controle negativo e com a quitosana comercial.

Após secagem da superfície do meio de cultura, um disco de micélio de 5 mm de diâmetro, obtido de colônia de *C. gloeosporioides* cultivada no mesmo meio de cultura em condições de demanda bioquímica de oxigênio (BOD) por 20 dias, à 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, foi depositado na porção central de cada

placa de Petri. Estas foram, a seguir, vedadas e mantidas em BOD, à 25 °C, sob fotoperíodo diário de 12 horas.

As avaliações de cada placa foram realizadas por meio de medições diárias do diâmetro das colônias em dois eixos ortogonais (média das duas medidas diametralmente opostas), iniciadas após 24 horas de incubação, e perduraram até o quarto dia, momento em que as colônias fúngicas em desenvolvimento no controle negativo (água esterilizada) atingiram 2/3 da superfície total do meio de cultivo.

No décimo oitavo dia de incubação procedeu-se à avaliação da produção de esporos por *C. gloeosporioides* em cada uma das placas. De cada placa, foram retirados três discos de micélio (5 mm de diâmetro) da região periférica da colônia fúngica e eles foram transferidos para tubos contendo 9 mL de água estéril. Após vigorosa agitação em *vortex*, a concentração de esporos da solução foi estimada em câmara de Neubauer (MARQUES; MONTEIRO; PEREIRA, 2004).

Para análise da atividade antifúngica, foi ajustado um modelo linear para representar o crescimento micelial esperado em cada solução de quitosana, observando cada uma das seis repetições, durante o período de avaliação. Avaliou-se o coeficiente angular de cada reta, obtido pelo método dos mínimos quadrados. Na sequência, os resultados, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, nos casos onde o valor de F foi significativo, utilizou-se o teste de Tukey à 5% de probabilidade.

Para análise de esporulação do patógeno, os resultados foram avaliados pelo método não-paramétrico de Kruskal-Wallis, o qual pressupõe que os dados não têm distribuição normal e a comparação é baseada no *ranking* dos dados (CAMPOS et al., 2012).

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

No sentido de obter um polímero de média massa molecular ($10^4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) e alto grau de desacetilação ($>70\%$), nesse estudo foi necessário adequar procedimentos descritos na literatura à matéria-prima disponível e às condições laboratoriais existentes, mantendo a reprodutibilidade de todo o processo químico. As quitosanas sintetizadas ($\text{DS}_{9\text{h}}$, DS_{MICRO} , DS_{ULTRA}) apresentaram solubilidade em soluções aquosas levemente ácidas como: ácido acético 1%, solução tampão ($\text{pH} \sim 4,5$) (ácido acético $0,3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e acetato de sódio $0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e ácido clorídrico $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Neste caso, apresentando características físicas e químicas semelhantes à quitosana comercial da marca Sigma-Aldrich®.

A desacetilação assistida por micro-ondas desenvolvida neste estudo parte de mesma quantidade de amostra que a reação convencional por aquecimento e sistema de refluxo, sendo que obteve uma redução significativa no tempo de desacetilação da quitina passando de 9 h de reação para 1,25 h, ou seja, reduziu 7,2 vezes o tempo de reação, esse método se demonstrou eficiente para a extração do biopolímero quitosana a partir da quitina. Comparado à extração convencional, a síntese por micro-ondas permitiu reduzir drasticamente o tempo de reação, aumentando o rendimento. O rendimento da reação convencional foi de 13% enquanto o rendimento da reação por micro-ondas foi de 19% aproximadamente.

A reação com uso de ultrassom resultou em excelente rendimento (17%), no entanto a baixa quantidade de amostra inicial, limitada pelo equipamento é um fator que impediria reações em maior escala.

O rendimento das reações de síntese de quitosana é demonstrado na Tabela 14. A quitosana DS_{MICRO} apresentou melhor rendimento global e parcial que as demais amostras.

A quitina foi extraída por processo químico convencional a partir de reação com solução ácida à temperatura ambiente e com solução básica em aquecimento de 70°C . A etapa da desmineralização da quitina (DM) teve um rendimento 44% (partiu-se de 30 g de casca seca) e de 68% na etapa da desproteinização da quitina (DP), resultando em um rendimento de 29,9% de quitina purificada (DM e DP) a partir da casca. O rendimento de extração da quitina foi excelente e de acordo com os rendimentos relatados por Younes et

al., (2012) de 24,5% da matéria seca, 26,95% por Knidri et al. (2016) ou 17,36% por Hossain e Iqbal (2014).

Já era esperado que reações de síntese de quitosana produzidas por aquecimento por micro-ondas apresentassem um alto grau de desacetilação em um menor tempo de reação, alto peso molecular e alta cristalinidade (KNIDRI, 2019; KNIDRI, 2016; KNIDRI, 2018; ABREU, 2013; SEBASTIAN et al., 2019; ZHANG et al., 2019), o que foi comprovado nos experimentos desse trabalho.

Tabela 14 – Rendimentos totais e parciais para a síntese de quitosana,

Síntese de quitosana (Desacetilação)	Rendimento (%)		
	Parcial ^(a)	Total ^(b)	Rendimento/Referência
DS _{9h}	54,5	13,00	12,93 ^(b) (AL-MANHEL et al., 2018); 15,14 ^(b) (ABDULKARIM et al., 2013)
DS _{MICRO}	64,0	18,86	18,47 ^(b) (NOURI et al., 2016); 17,8 ^(b) (EL KNIDRI et al., 2019)
DS _{ULTRA}	58,0	17,11	60,0 ^(a) (BIROLI et al., 2016); 63,71 ^(a) (ANWAR et al., 2017)

a) Rendimento calculado a partir da quitina purificada;

b) Rendimento calculado a partir da casca de camarão.

Outro aspecto em destaque é que a reação de desacetilação química da quitina é extremamente perigosa, pois utiliza solução aquosa de hidróxido de sódio com elevada concentração, sendo que a diminuição do tempo de reação com o uso da radiação por micro-ondas minimiza os riscos. A reação de desacetilação com uso de micro-ondas, além da redução de tempo de reação, também proporcionou diminuição da quantidade energética e dos custos, já que o equipamento de micro-ondas utilizado era de uso doméstico.

A energia elétrica consumida durante a reação de desacetilação da quitina purifica está descrita na Tabela 15.

Os resultados relativos ao consumo energético comparativo aos diferentes métodos de síntese de quitosana apresentados neste estudo estão de acordo com os resultados apresentados por Sebastian e col. (2019) e Abreu (2013) de que a radiação por micro-ondas reduziu o consumo energético comparado ao método convencional, reforçando a eficiência do método frente ao convencional.

Tabela 15 – Consumo energético da reação de desacetilação

Parâmetros $E = (P \times t)/1000$	DS _{9h} *	DS _{MICRO} *	DS _{SULTRA} **
P - Potência (W)	1100	360	130
t - Tempo (h)	9	1,15	2
E - Energia (kWh)	9,9	0,45	0,26
Energia (kJ)	35640	1620	936

* Considerando-se 30 g de amostra de quitina inicial;

** Considerando-se 2 g de amostra de quitina inicial.

As amostras resultantes das etapas do processo de extração da quitina e síntese das diferentes quitosanas foram acompanhadas pelas seguintes análises: determinação do teor de umidade, teor de cinzas, teor de nitrogênio, granulometria, determinação da massa molar viscosimétrica por viscosidade e determinação do grau de desacetilação por titulação, espectroscopia na região do infravermelho, termogravimetria, difração de raios x em pó, microscopia de força atômica, microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva (Tabela 9).

1.3.1 Determinação do teor de umidade

A avaliação do teor de umidade garante a qualidade da amostra, já que a umidade pode ser um fator favorável à degradação por fungos ou bactérias.

O teor de umidade é uma análise de baixo custo e tem relação com a concentração de minerais na amostra, uma vez que a umidade aumenta quando as concentrações de materiais inorgânicos na amostra são maiores. Também apresenta relação com a capacidade do material em fazer ligações de hidrogênio, como o caso da quitosana. Os grupos amino favorecem a hidratação pela formação de ligações de hidrogênio. A maior hidratação da quitosana também pode ter relação com a inserção de sais de sódio presentes nas etapas de desproteínização e desacetilação, que por consequência aumenta o teor de umidade. Na Tabela 16 estão apresentados os resultados obtidos na determinação do teor de umidade.

Tabela 16 – Resultados obtidos na determinação do teor de umidade

Amostra	P _{cadinho} (g)	P _{amostra} (g)	P _{final} (g)	% U	Umidade (%)*
Casca	1,9389	0,0501	1,9861	5,79	5,59 ± 0,12
	1,9445	0,0501	1,9918	5,59	
	1,9372	0,0502	1,9846	5,58	
Quitina DM	1,9452	0,0503	1,9948	1,39	1,58 ± 0,11
	1,9484	0,0507	1,9983	1,58	
	1,9391	0,0504	1,9887	1,59	
Quitina DP	1,9507	0,0501	2,0001	1,40	1,20 ± 0,12
	1,9515	0,0502	2,0011	1,20	
	1,9464	0,0503	1,9961	1,19	
Quitosana DS _{9h}	4,2754	0,0510	4,3244	3,92	3,92 ± 0,04
	4,2393	0,0504	4,2877	3,97	
	4,2933	0,0515	4,3428	3,88	
Quitosana DS _{MICRO}	4,3134	0,0500	4,3615	3,80	3,80 ± 0,14
	4,2743	0,0500	4,3224	3,80	
	4,2186	0,0506	4,2674	3,56	
Quitosana DS _{ULTRA}	4,1986	0,0502	4,2457	6,18	6,00 ± 0,10
	4,3467	0,0500	4,3937	6,00	
	4,1847	0,0501	4,2318	5,99	
Quitosana Comercial	1,9347	0,0501	1,9817	6,19	6,30 ± 0,08
	1,9377	0,0504	1,9849	6,35	
	1,9450	0,0508	1,9926	6,30	

*média das triplicatas

A quitosana DS_{ULTRA} apresentou teor de umidade próximo da quitosana comercial. As amostras de quitosanas (DS_{9h}; DS_{MICRO}; DS_{ULTRA}) estão de acordo com a amostra comercial, cujo teor de umidade deve ser inferior a 10% (SIGMA-ALDRICH, 2019). Além disso, o teor de umidade encontrado está de acordo com os teores de umidade que vem sendo reportados na literatura para quitosana obtida a partir da casca de camarão, como para Al-Manhel et al., (2018) que relata 7,84% de teor de umidade, 7,96% por Hossain e Iqbal (2014) e 4,45% por Gómez-Ríos et al., (2017).

1.3.2 Determinação do teor de cinzas

A análise do teor de cinzas indica a eficiência da etapa de desmineralização da quitina. A composição mineral, principalmente, de

carbonato de cálcio (CaCO_3) da casca do camarão varia conforme a espécie e origem do camarão. Os resultados obtidos na determinação do teor de cinzas estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 – Resultados obtidos na determinação do teor de cinzas.

Amostra	P _{cadinho} (g)	P _{amostra} (g)	P _{final} (g)	% Cinza	Cinza (%)*
Casca	9,1877	0,0605	9,2033	25,79	25,64 ± 0,17
	8,7294	0,0600	8,7448	25,67	
	9,5268	0,0605	9,5422	25,45	
Quiutina DM	8,2301	0,0601	8,2307	1,00	0,94 ± 0,10
	8,1751	0,0603	8,1756	0,83	
	8,9789	0,0601	8,9795	1,00	
Quitina DP	10,4678	0,0605	10,4694	2,64	2,48 ± 0,16
	9,9631	0,0602	9,9645	2,33	
	9,7390	0,0604	9,7405	2,48	
Quitosana DS _{9h}	10,8041	0,0607	10,8046	0,82	0,88 ± 0,09
	10,3443	0,0607	10,3449	0,99	
	11,1661	0,0604	11,1666	0,83	
Quitosana DS _{MICRO}	10,4330	0,0605	10,4336	0,99	0,77 ± 0,19
	11,1598	0,0604	11,1602	0,66	
	11,2940	0,0605	11,2944	0,66	
Quitosana DS _{ULTRA}	11,0272	0,0604	11,0275	0,50	0,44 ± 0,10
	10,8588	0,0601	10,8591	0,50	
	10,7095	0,0605	10,7097	0,33	
Quitosana Comercial	11,4232	0,0603	11,4234	0,33	0,50 ± 0,17
	10,4989	0,0604	10,4992	0,50	
	10,9000	0,0600	10,9004	0,67	

*média das triplicatas

A matéria inorgânica está presente em maior quantidade na casca do camarão e foi evidenciado no teor de cinzas de 25,64% para a casca, o que está de acordo com o relatado por Abdulkarim (2013), entre 20-30% e 33,2% por Younes et al., (2012). Na etapa de desmineralização (DM) o teor de cinzas diminuiu consideravelmente para 0,94% evidenciando a eficiência da desmineralização. Já a etapa de desproteínização (DP) demonstra um aumento no teor de cinzas, 2,48%, justificado pela utilização de hidróxido de sódio na reação, o que indica a permanência de sódio na amostra após a desproteínização e sua interação com os grupos acetil da quitina.

O teor de cinzas reduziu na etapa de desacetilação (DS_{9h}; DS_{MICRO}; DS_{ULTRA}) ficando semelhante ao resultado da amostra de quitosana comercial (0,50%), o que está de acordo com a ficha técnica da quitosana comercial que indica teor de cinzas inferior a 1% (SIGMA-ALDRICH, 2019). A literatura vem apontando teores de cinzas muito semelhante ao resultado obtido neste trabalho para quitosana sintetizada a partir da casca de camarão, conforme reportado por Al-Manhel et al., (2018) (0,75%), Trung et al. (2020) (0,73%) Younes et al., (2012) (1,40%) e Cocolletzi et al., (2009) (1,40%).

1.3.3 Determinação de nitrogênio

A determinação do teor de nitrogênio é uma análise que permite avaliar a eficiência do processo de desproteínização da quitina, na obtenção de uma amostra sem interferentes de proteínas e pigmentos nitrogenados. Na Tabela 18 estão apresentados os resultados obtidos na determinação do teor de nitrogênio.

Pode-se observar que a casca de camarão apresentou um teor de nitrogênio de 4,92%, o que foi mais próximo ao valor de 5,32% obtido por Qu et. al (2015). Outros valores para a casca de camarão foram obtidos por Cocolletzi et al., (2009) (8,9%) e por Abdulkarim et al., (2013) (9,99%). Na análise destes valores, deve-se levar em consideração, como dito anteriormente, a espécie e o habitat do camarão, o que justifica a variação dos valores em comparação com a literatura. O baixo teor de nitrogênio da casca em comparação com as demais amostras analisadas (DM, DP, DS) tem relação com sua proporção no material, assim na casca, a maior proporção é de minerais e consequentemente a proporção de nitrogênio é reduzida comparada com a de sais inorgânicos nas amostras de cascas.

A eficiência da etapa de desproteínização (DP) da quitina pode ser observada pela redução do teor de nitrogênio quando comparada à quitina desmineralizada (DM), pela redução de 11,43% (DM) para 7,79% (DP). A redução no teor de nitrogênio na purificação da quitina também foi relatada por Antonino (2007).

Tabela 18 – Resultados obtidos na determinação do teor de nitrogênio

Amostra	P _{amostra} (g)	V _{gasto} (mL)	% N	Nitrogênio (%)*
Casca	0,2000	7,5	4,86	4,92 ± 0,10
	0,1997	7,5	4,86	
	0,2012	7,8	5,03	
DM	0,2008	17,60	11,43	11,43 ± 0,10
	0,2005	17,40	11,42	
	0,2030	17,50	11,34	
DP	0,2006	12,00	7,83	7,79 ± 0,14
	0,2020	11,80	7,64	
	0,2003	12,10	7,91	
DS	0,2000	12,30	6,32	8,03 ± 0,04
	0,2002	12,20	6,26	
	0,2001	12,30	6,43	
DS _{MICRO}	0,2018	13,60	8,84	8,90 ± 0,11
	0,2004	13,80	9,03	
	0,2016	13,60	8,85	
DS _{ULTRA}	0,2026	13,70	8,87	8,91 ± 0,09
	0,2001	13,50	8,85	
	0,1079	7,50	9,00	
COM	0,2034	12,60	8,11	8,22 ± 0,10
	0,2004	12,70	8,30	
	0,2003	12,60	8,24	

*média das triplicatas

O teor de nitrogênio apresentou um aumento para a quitosana sintetizada (DS_{9h}; DS_{MICRO}; DS_{ULTRA}) em comparação com a quitina purificada (DP), como era esperado, devido ao processo de desacetilação, que subtrai da amostra carbono, oxigênio e hidrogênio, ou seja, ocorre a substituição dos grupos acetamida por grupos aminos na cadeia polimérica. Assim, a proporção de nitrogênio nas amostras (DS_{9h}; DS_{MICRO}; DS_{ULTRA}) aumenta. A subtração, principalmente, de carbono e oxigênio no processo de desacetilação diminui a massa total da molécula e, assim, aumenta a proporção de nitrogênio. Soon et al., (2018), Trung et al., (2020) e Abdulkarim et al., (2013) também relataram o aumento no teor de nitrogênio após a desacetilação.

As amostras de quitosana sintetizadas (DS_{9h}; DS_{MICRO}; DS_{ULTRA}) apresentaram teor de nitrogênio semelhante à quitosana comercial. Esses

resultados estão de acordo ao teor de nitrogênio relatado por Soon et al., (2018) que foi de 7,92% e por Antonino (2007), de 6,76 - 8,12% para quitosanas obtidas a partir da casca de camarão.

1.3.4 Granulometria

A análise granulométrica permitiu caracterizar o tamanho das partículas (Tabela 19).

Tabela 19 – Avaliação granulométrica

Amostras		Percentual retido (%)				
Peneiras (mm)	2,00	1,00	0,500	0,250	0,106	Fundo
Casca	3,80	21,90	44,60	21,50	7,06	0,60
Quitina* DM e DP	11,53	31,95	42,16	10,42	3,79	0,15
Quitosana DS _{9h}	3,90	38,80	45,80	10,80	0,60	0,10
Quitosana DS _{MICRO}	0	4,86	13,22	34,57	38,97	8,38
Quitosana DS _{ULTRA}	0	3,06	8,63	36,34	32,17	19,80
Quitosana Comercial	0	0,10	7,40	27,40	37,60	24,90

*Quitina purificada = desmineralizada e desproteínizada.

A casca apresentou partículas na sua maioria de 1-0,250 mm, com 44,6% da amostra com tamanho entre 1-0,5 mm. Já ao finalizar os processos de extração da quitina, com obtenção de quitina purificada, observa-se um aumento da proporção de partículas maiores, inclusive aumentando a proporção de partículas maiores que 2,00 mm. Este aumento tem relação com sua organização polimérica e descompactação resultante da retirada de minerais, proteínas e pigmentos.

A amostra de quitosana comercial evidenciou partículas menores, em sua maioria inferiores a 0,250 mm. A amostra DS_{9h} apresentou partículas maiores, o que deve ser resultante da etapa de trituração da casca no início do processo. Além disso, a análise dessa amostra foi dificultada devido a interações eletrostáticas que resultaram na formação de aglomerados.

As amostras DS_{MICRO} e DS_{ULTRA} apresentaram a maioria de suas partículas de 0,250 – 0,106 mm. A amostra DS_{ULTRA} apresentou 19,80% de partículas inferior à 0,106 mm, o que está de acordo com o esperado para o processo de ultrassom, isto é, redução do tamanho da partícula.

As amostras deste trabalho foram trituradas e não pulverizada, como a quitosana comercial, visando à obtenção de polímeros de quitosana de maior massa molar, além de facilitar os processos de filtração nas etapas de desmineralização, desproteinização e desacetilação.

1.3.5 Determinação da massa molar viscosimétrica média

A massa molar viscosimétrica média ($\overline{M}_v$) das amostras de quitosana sintetizada (DS) e quitosana comercial foram determinadas por viscosimetria capilar por ser um método simples e de baixo custo (RINAUDO; MILAS; LE DUNG, 1993; ROBERTS; DOMSZY, 1982).

A viscosidade das amostras em solução foi avaliada em comparação com o tempo de escoamento da solução pura (branco) (tampão de ácido acético 0,3 mol.L⁻¹ e acetato de sódio 0,2 mol.L⁻¹ (1:1 v/v)) (RINAUDO; MILAS; LE DUNG, 1993; YOUNES; RINAUDO, 2015). O tempo de escoamento do branco foi de 5,87 s. As diluições das amostras de quitosana foram avaliadas nas seguintes concentrações: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mg.L⁻¹ (Tabela 20). As soluções foram preparadas de forma seriada, tal que a viscosidade relativa, η_{rel} , fosse superior a 1,2 e inferior a 1,6, conforme proposto por Rinuado et al., (1993), Fonseca, 2016 e (FIAMINGO et al., 2016).

Os dados da viscosidade inerente (η_{inh}) e da viscosidade reduzida (η_{red}) foram utilizados para construir os gráficos da viscosidade *versus* concentração, e a partir daí foi obtida a viscosidade intrínseca (η) (Tabela 20).

A viscosidade intrínseca (η) foi obtida pela extrapolação das retas na região da linearidade à diluição infinita em que a concentração tende a zero ($C \rightarrow 0$). O estudo das retas da viscosidade reduzida e da viscosidade inerente pode ser observado na Tabela 21.

Tabela 20 – Dados das viscosidades para as amostras de quitosana sintetizadas e comercial.

DS	Concentração (g/dL)	Tempo* (s)	η_{rel}	η_{esp}	η_{red} (dL/g)	η_{inh} (dL/g)
DS _{9h}	0,00050	9,14	1,56	0,56	1114,14	889,372
	0,00100	14,27	2,43	1,43	1431,01	887,891
	0,00150	21,13	3,60	2,60	1733,11	853,956
	0,00200	30,91	5,27	4,27	2132,88	831,015
	0,00250	43,32	7,38	6,38	2551,96	799,509
DS _{MICRO}	0,00050	9,05	1,47	0,47	943,089	772,625
	0,00100	13,02	2,12	1,12	1117,07	750,035
	0,00150	18,16	2,95	1,95	1301,9	721,846
	0,00200	24,79	4,03	3,03	1515,45	696,994
	0,00250	32,45	5,28	4,28	1710,57	665,299
DS _{ULTRA}	0,00050	10,24	1,77	0,77	1537,13	1140,339
	0,00100	16,8	2,90	1,90	1901,55	1065,247
	0,00150	26,34	4,55	3,55	2366,15	1009,971
	0,00200	37,52	6,48	5,48	2740,07	934,371
	0,00250	48,67	8,41	7,41	2962,35	851,572
DS _{COM}	0,00050	8,4	1,46	0,46	921,739	758,064
	0,00100	12,02	2,09	1,09	1090,43	737,372
	0,00150	16,71	2,91	1,91	1270,72	711,205
	0,00200	22,53	3,92	2,92	1459,13	682,824
	0,00250	29,42	5,12	4,12	1646,61	652,990

*Tempo de escoamento: média das triplicatas

Tabela 21 – Estudo das equações das curvas de viscosidade para as quitosanas sintetizadas (DS_{9h}; DS_{MICRO}; DS_{ULTRA}) e para a quitosana comercial

Amostras	Viscosidade	Equação da reta	Coefficiente de correlação (R ²)	Viscosidade Intrínseca (η)
DS _{9h}	Reduzida	$y = 357,75x + 719,36$	0,9944	719,36 – 923,33
	Inerente	$y = -23,66x + 923,33$	0,9514	
DS _{MICRO}	Reduzida	$y = 193,33x + 737,62$	0,9986	737,62 – 801,67
	Inerente	$y = -26,77x + 801,67$	0,9971	
DS _{ULTRA}	Reduzida	$y = 368,89x + 1194,8$	0,98795	1194,8 – 1212,8
	Inerente	$y = -70,84x + 1212,8$	0,9959	
DS _{COM}	Reduzida	$y = 181,84x + 732,20$	0,9995	732,20 – 787,91
	Inerente	$y = -26,47x + 787,91$	0,9995	

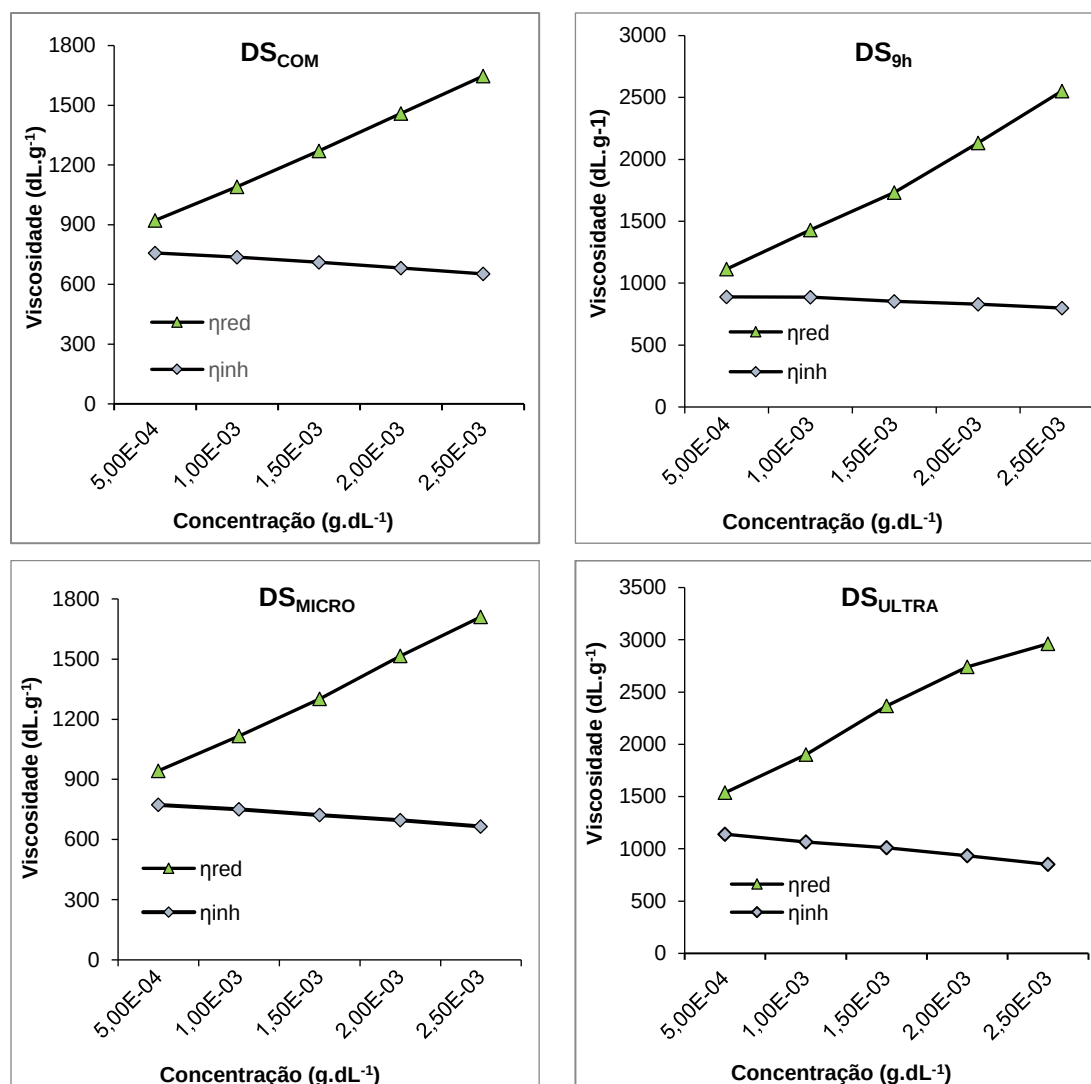


Figura 13 – Curvas de viscosidade reduzida e inerente *versus* concentração da solução da quitosana comercial e das soluções de quitosanas sintetizadas (DS_{9h}; DS_{MICRO}; DS_{ULTRA}).

As retas obtidas apresentaram excelentes coeficientes de correlação entre os pontos experimentais, pois R^2 obtidos foram superiores a 0,9 para as viscosidades reduzida (η_{red}) e inerente (η_{inh}). Conforme a literatura valores de R^2 superior a 0,9 são considerados excelentes e indicam que soluções de boa qualidade foram obtidas pela dissolução das amostras de quitosana (SANTOS; SOARES; DOCKAL, 2003; SIGNINI; CAMPANA FILHO, 1998).

A partir das equações das retas das viscosidades η_{inh} e η_{red} , com base na extrapolação das retas quando a concentração tende a zero, foram obtidas as viscosidades intrínsecas $[\eta]$ e estes pontos foram utilizados para determinar a massa molar viscosimétrica média (M_v) a partir da de Mark-Houwink. As constantes que dependem do sistema solvente-polímero adotadas foram $K =$

0,074 (constante dependente da temperatura e do solvente e característica do polímero) e $\alpha = 0,76$ (constante característica da geometria da molécula) (RINAUDO; MILAS; LE DUNG, 1993).

A quitosana comercial utilizada como referência neste trabalho apresentou um valor de massa molar viscosimétrica média ($\overline{M}_V$) na faixa de $18,76 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$ (180,76 kDa) a $19,91 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$ (199,10 kDa), o que está na faixa mínima da especificação da massa molar viscosimétrica informada pelo fabricante de 190 – 310 kDa (Tabela 7) (SIGMA-ALDRICH, 2019).

Os resultados obtidos na análise de viscosidade para as amostras de quitosanas sintetizadas e para a comercial estão apresentados na Tabela 22.

Tabela 22 – Dados comparativos das amostras de quitosana para os valores de massa molar viscosimétrica (M_V).

Quitosana	% $\overline{GA}$	$[\eta]$	K	α	$\overline{M}_V \times 10^4$ (g.mol ⁻¹)	$\overline{M}_V$ (kDa)
(DS _{9h})	19,54	663,05 – 680,73	0,074	0,76	15,64 – 16,23	158,64 – 164,23
(DS _{MICRO})	17,31	737,62 – 801,67			18,25 – 20,36	182,5 – 203,6
(DS _{SULTRA})	19,40	1194,8 – 1212,8			34,43 – 35,11	344,3 – 351,1
Comercial	16,48	732,20 – 787,91			18,08 – 19,91	180,8 – 199,1

* O grau de acetilação será discutido no próximo tópico deste trabalho.

As massas molares viscosimétricas média ($\overline{M}_V$) encontradas para as amostras de quitosana avlaçadas estão de acordo com o que vêm sendo reportado por diversos autores, Trung et al., (2020) (161 kDa), Knidri et al., (2019) (165 kDa) e Knidri et al., (2016) (141 kDa). A $\overline{M}_V$ para amostras de quitosana apresentam valores na faixa de $10^4 - 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$. Essa variação é decorrente das condições da reação, do processo adotado e da fonte da quitina utilizada para a síntese de quitosana (ABREU et al., 2013; EL KNIDRI et al., 2018; SIGMA-ALDRICH, 2019).

A DS_{SULTRA} apresentou maior $\overline{M}_V$ entre as amostras, mantendo a ordem de grandeza ($\overline{M}_V = 344,6 - 351,1 \text{ kDa}$). Valores semelhantes de $\overline{M}_V$ foram obtidos para quitosana produzida via ultrassom por Zhu et al., (2018) que destaca o método como eficaz para produção de quitosana de alta $\overline{M}_V$ para aplicações biomédicas na faixa de 150 – 400 kDa.

Em contraponto, diversos estudos relatam que os efeitos do ultrassom de alta intensidade causam um forte impacto no peso molecular da quitosana,

reduzindo o polímero (CRAVOTTO et al., 2005; DELEZUK et al., 2011; DELEZUK, 2009; WU et al., 2008). No entanto, estudos mais recentes, com alterações no processo que variam quanto ao tempo de irradiação, temperatura, pulso de irradiação, entre outros, produziram quitosana de médio peso molecular, na faixa de 110 – 200 kDa (BIROLI et al., 2016). Já Fiamingo et al., (2016) produziram quitosana com alto peso molecular na faixa de 900 – 1200 kDa.

1.3.6 Determinação do grau médio de desacetilação

O grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$) é definido como o número de grupos amino em relação aos grupos amida na cadeia polimérica, podendo ser determinado entre outros métodos por titulação ácido-base mensurada por condutimetria ou potenciometria (CZECHOWSKA-BISKUP et al., 2012; RAYMOND; MORIN; MARCHESSAULT, 1993). Neste texto o foco será dado para os dados obtidos por titulação potenciométrica (pH). No Apêndice A são apresentados os resultados da análise de determinação do grau de desacetilação realizado por titulação condutimétrica e por titulação potenciométrica (mV) para a amostra de quitosana comercial e DS_{9h}, realizados num primeiro momento para a validação dos métodos entre si.

A titulação potenciométrica (pH) é um método volumétrico que consiste na medição da variação do potencial do pH entre dois eletrodos (eletrodo de referência e indicador) como função do volume do titulante adicionado. O princípio básico das titulações potenciométricas consiste na neutralização do ácido seguida da neutralização de prótons do grupo amino presentes na molécula da quitosana (BAXTER et al., 1992).

Vale ressaltar que a quitosana comercial utilizada como referência neste trabalho é uma amostra definida pelo fabricante com grau médio de desacetilação ($\% \overline{GD}$) entre 75 – 85% (SIGMA-ALDRICH, 2019).

Para validação estatística dos dados coletados durante a titulação e para minimizar os erros (operador, equipamento etc.) que possam ter ocorrido no experimento optou-se por utilizar o estudo das derivadas das curvas. A Tabela 23 apresenta os dados de pH coletados na análise de titulação potenciométrica,

os dados da projeção da primeira derivada ($\Delta\text{pH}/\Delta V$) e da segunda derivada $\Delta(\Delta\text{pH}/\Delta V)$.

Os valores de V_1 e V_2 evidenciam os pontos de equivalência e os valores de $(V_2 - V_1)$ evidenciam a diferença de volume de titulante entre esses dois pontos, sendo que isso corresponde à quantidade de base necessária para neutralizar os grupos aminos protonados da quitosana (COCOLETZI et al., 2009; CZECHOWSKA- BISKUP et al., 2012).

Fazendo uso das informações de V_1 e V_2 , o cálculo do grau de desacetilação ($\overline{GD}$). Comparando os dados obtidos para o ($\overline{GD}$) das amostras, pode-se concluir que não houve alteração na medida do parâmetro $(V_2 - V_1)$ com a análise estatística das derivadas, implicando que apenas a medida simples do pH já obtém o dado preciso, exceto para DS_{ULTRA} que mostrou uma diferença em torno de 3%.

Tabela 23 – Valores de pH obtidos na titulação potenciométrica

Quitosana	Massa (g)	Valores de pH				Primeira derivada ($\Delta\text{pH}/\Delta V$)				Segunda derivada $\Delta(\Delta\text{pH}/\Delta V)$			
		V_1	V_2	$V_2 - V_1$	$\% \overline{GD}$	V_1	V_2	$V_2 - V_1$	$\% \overline{GD}$	V_1	V_2	$V_2 - V_1$	$\% \overline{GD}$
DS _{9h}	0,0213	4,0	5,0	1,0	81,2	4,0	5,0	1,0	81,2	4,2	5,2	1,0	81,2
DS _{MICRO}	0,0214	3,6	4,6	1,0	80,1	3,6	4,6	1,0	80,1	3,8	4,8	1,0	80,1
DS _{ULTRA}	0,0204	3,8	4,8	1,0	80,6	3,8	4,8	1,0	83,9	4,0	5,0	1,0	83,9
Comercial	0,0200	4,6	5,6	1,0	79,7	4,8	5,8	1,0	79,7	4,8	5,8	1,0	80,4

V_1 = ponto de equivalência para a titulação da solução ácida, dado em mL.

V_2 = ponto de equivalência para a neutralização dos grupos amino protonados da quitosana, dado em mL.

A projeção (Figura 13) dos pontos obtidos na primeira derivada ($\Delta\text{pH}/\Delta V$) (cinza) demonstra picos, onde os maiores picos apontam diretamente para os pontos de equivalência. Já com uso da projeção dos pontos obtidos na segunda derivada $\Delta(\Delta\text{pH}/\Delta V)$ (azul), sendo que os pontos de equivalência correspondem aos valores exatos que cruzam a abcissa (V de NaOH), considerando os maiores picos, obtêm-se dados com maior precisão aos valores de V_1 e V_2 . É possível perceber que a projeção dos pontos obtidos na primeira e segunda derivadas da curva confirmaram os volumes gastos para os dois pontos de equivalência na curva de pH (preto) para as amostras de quitosanas sintetizadas e quitosana comercial.

Para uma maior exatidão do volume de titulante gasto no ponto de equivalência utilizou-se o método dos mínimos quadrados (Tabela 24) a partir dos dados dos pontos de equivalência referentes à curva da segunda derivada. Utilizou-se este método para encontrar as equações da reta $y = a x + b$, sendo que a e b podem ser obtidos pelos pontos máximos e mínimos indicados na curva e assim calcular o valor de x quando cruza o eixo da abscissa ($y = 0$), que corresponde exatamente ao volume gasto no ponto de equivalência (HARRIS, 2005; MENDHAM et al., 2002; SKOOG; HOLLER; NILMAN, 2009).

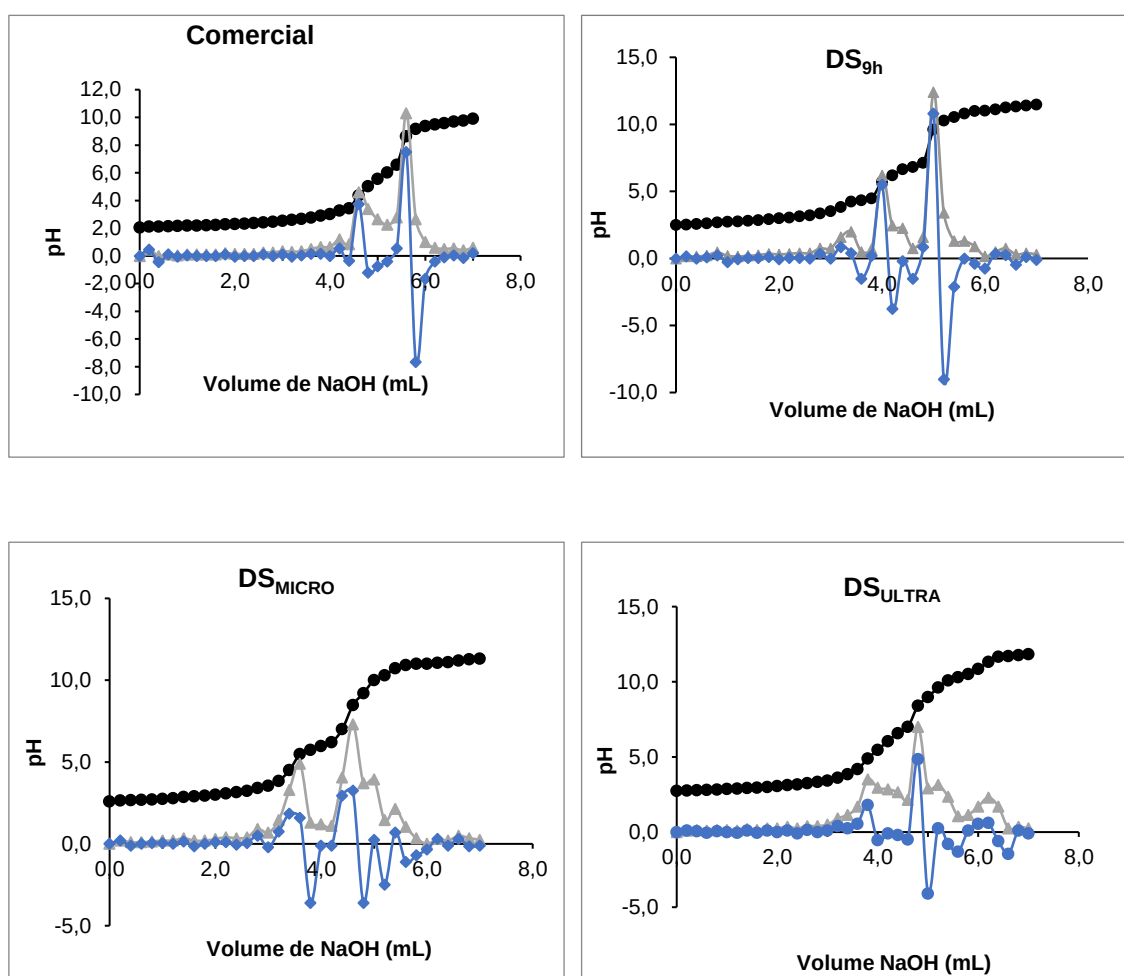


Figura 14 – Curva de titulação potenciométrica quitosanas sintetizadas (DS_{9h}; DS_{MICRO}; DS_{ULTRA}) e para a quitosana comercial.

Tabela 24 – Dados da segunda derivada da curva de titulação potenciométrica (pH), aplicando o método dos mínimos quadrados.

Quitosana	Método dos mínimos quadrados - $\Delta(\Delta\text{pH}/\Delta\text{V})$					
	Equação da reta ¹	V ₁	Equação da reta ²	V ₂	V ₂ – V ₁	% $\overline{GD}$
DS _{9h}	Y = - 46,25x + 190,5	4,12	Y = - 99x + 505,80	5,11	0,99	80,46
DS _{MICRO}	Y = -26x + 95,20	3,661	Y = -34,25x + 160,80	4,695	1,034	82,77
DS _{ULTRA}	Y = -11,75x + 46,45	3,953	Y = -44,75x + 219,65	4,908	0,955	80,19
Comercial	Y = - 24,75x + 117,6	4,751	Y = - 76,5x + 443,60	5,799	1,048	83,52

V₁ = ponto de equivalência para a titulação da solução ácida, dado em mL.

V₂ = ponto de equivalência para a neutralização dos grupos amino protonados da quitosana, dado em mL.

Então, como dado mais preciso para as amostras avaliadas neste trabalho, pode-se citar o grau de desacetilação apresentado na Tabela 24. A quitosana comercial obteve maior % $\overline{GD}$, 83,52%, o que está de acordo com o especificado em sua ficha técnica. O % $\overline{GD}$ para as quitosanas sintetizadas (DS_{9h}, DS_{MICRO}, DS_{ULTRA}) estão de acordo com a amostra padrão e com os resultados que vem sendo apontados na literatura para determinação do grau de desacetilação por titulação potenciométrica.

A DS_{9h} obteve o menor % $\overline{GD}$ de 80,46% em concordância com diversos autores para o mesmo método reacional e matéria-prima (camarão), com o % $\overline{GD}$ de 79,80% (ZVEZDOVA, 2010); 82,00% (NOURI et al., 2016); 76,65% (CZECHOWSKA-BISKUP et al., 2012); 81,5% (EL KNIDRI et al., 2016); 74% (FONSECA, 2016); 76,5% (FRICK et al., 2018).

O % $\overline{GD}$ para a DS_{MICRO} foi de 82,77% o que está de acordo com o que vem sendo destacado na literatura por autores que utilizaram a titulação para determinar o % $\overline{GD}$ para quitosanas obtidas a partir da casca de camarão, como: 81% (ABREU et al., 2013); 80,2% (EL KNIDRI et al., 2019); 92,8% (ALISHAHI et al., 2011). A DS_{ULTRA} obteve um % $\overline{GD}$ de 80,19% o que está similar ao reportado para determinação de % $\overline{GD}$ por titulação como 81,8% (BIROLLI; DELEZUK; CAMPANA-FILHO, 2016); 81,4% (ZHU et al., 2018).

Autores que compararam resultados do % $\overline{GD}$ obtidos por titulação potenciométrica aos obtidos por RMN de ¹H observaram que não houve diferenças significativas entre os métodos. O % $\overline{GD}$ descrito pelos autores variou entre 78 e 92%. Assim, a titulação potenciométrica pode ser considerada um

método simples, não destrutivo, de baixo custo, baseado em reagentes e aparelhos acessíveis e bastante confiável para a determinação do $\overline{GD}$ de amostras de quitosana, tendo como desvantagem o tempo gasto na coleta de dados durante a titulação (BIROLI; DELEZUK; CAMPANA-FILHO, 2016; CZECHOWSKA-BISKUP et al., 2012; KUMARI et al., 2015; RINAUDO, 2006).

A quitosana sintetizada DS_{MICRO} apresentou o maior grau de desacetilação entre as demais, o que é um excelente indício pois apresenta um alto grau de desacetilação e é um método mais limpo e de menor custo, portanto foi adotado como método padrão no seguimento do trabalho de síntese de quitosana a partir da casca de camarão no LASIR/UFPel.

1.3.7 Espectroscopia na região do infravermelho (FT-IV)

A espectroscopia na região do infravermelho foi uma das técnicas utilizadas para acompanhar a eficiência do processo de extração da quitina e da síntese da quitosana devido à possibilidade de identificar as principais bandas na região do infravermelho que caracterizam estes biopolímeros.

Os espectros de quitina e quitosana apresentam bandas características atribuídas ao estiramento $\nu[-OH]$ (3450 cm^{-1}); estiramento $\nu[-CH]$ (2920 cm^{-1}); estiramento $\nu[C=O]$ (1650 cm^{-1}) denominada amida I; deformação angular $\delta[N-H]$ no plano sobreposto ao estiramento $\nu[-CN]$ denominada amida II (1560 cm^{-1}); deformação angular simétrica $\delta[CH_3]$ (1420 cm^{-1}) e estiramentos $\nu[-C-O-C-]$ e $\nu[C-O]$ ($1074 - 1134\text{ cm}^{-1}$) das ligações glicosídicas (BRUGNEROTTO et al., 2001; EL KNIDRI et al., 2016; FRICK et al., 2018; ISA et al., 2008; SILVERSTEIN et al., 2014).

Os espectros na região do infravermelho evidenciaram os perfis apresentados na Figura 15 – Espectros FT-IV para a casca (magenta), quitina desmineralizada (DM) (ciano) e da quitina desproteínizada (DP) (verde) evidenciando a estrutura química da quitina.

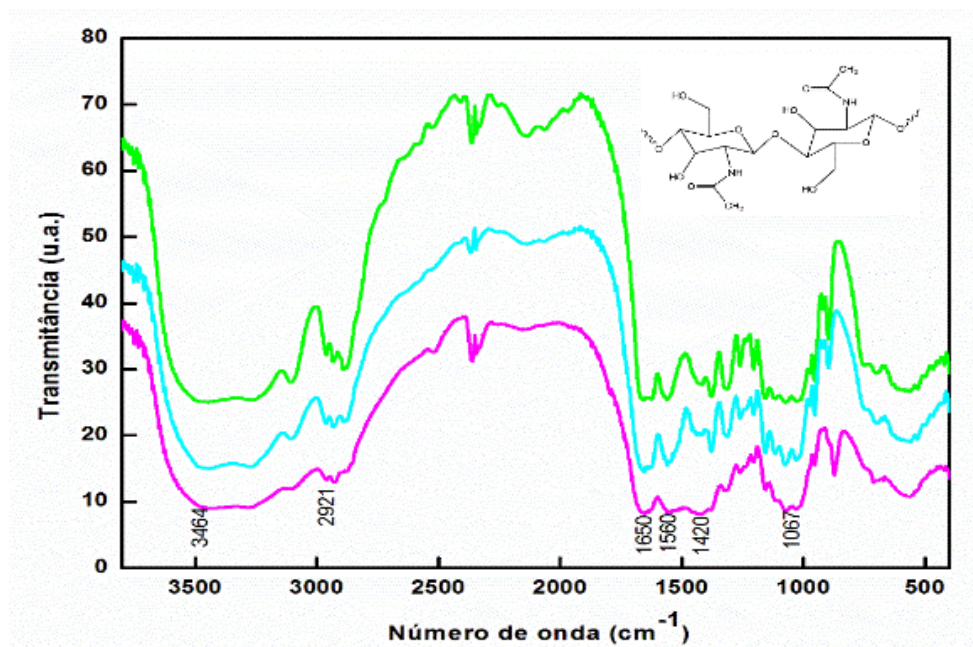


Figura 15 – Espectros FT-IV para a casca (magenta), quitina desmineralizada (DM) (ciano) e da quitina desproteínizada (DP) (verde) evidenciando a estrutura química da quitina.

A amostra de quitina DM obtida manteve-se íntegra após a desmineralização, pois apresenta bandas semelhantes à casca de camarão, o que mostra desmineralização adequada sem degradação da quitina. As mesmas bandas características de quitina foram observadas para a quitina DP evidenciando integridade da quitina purificada obtida após os processos de desmineralização e desproteínização empregados na sequência.

Ao analisar os espectros da Figura 15, observam-se as bandas características. Uma banda larga na região de 3464 cm^{-1} devido às vibrações de estiramento $\nu[\text{-OH}]$ sobreposta à banda de estiramento de $\nu[\text{N-H}]$ presentes na quitina. Esta banda larga entre 3500 a 3070 cm^{-1} vem sendo relatada por Fonseca (2016) e El Knidri et al., (2016). As bandas na região de 2921 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento $\nu[\text{-CH}]$ e podem ser observadas com forte intensidade em todas as amostras destacadas por Kaya et al., (2017) e El Knidri et al., (2016).

As quatro bandas intensas observadas entre 1700 cm^{-1} e 1300 cm^{-1} são bem características da quitina. A banda em 1650 cm^{-1} é atribuída ao estiramento

$\nu[\text{C=O}]$ característico da presença do grupo acetil, denominada amida I. A banda observada em 1560 cm^{-1} corresponde à mistura de dois modos vibracionais e é atribuída à deformação angular $\delta[\text{N-H}]$ no plano sobreposta ao estiramento $\nu[\text{-CN}]$ é chamada de amida II e conforme observado por El Knidri et al., (2016) corresponde aos grupos amida ou amina secundário. A banda observada em 1420 cm^{-1} é atribuída à deformação angular simétrica $\delta[\text{CH}_3]$ do grupo acetamida e foi considerada por Brugnerotto et al., (2001). Pode-se ainda observar a banda larga na região de 1067 cm^{-1} referente aos estiramentos $\nu[\text{-C-O-C-}]$ de estruturas polissacarídeas destacados por Fonseca (2016) e Andrade (2007) e Kaya et al., (2017). (SILVERSTEIN et al., 2007; SKOOG; HOLLER; NIMAN, 2002) A Tabela 25 apresenta as principais bandas obtidas na análise de FT-IV, sendo que todas as bandas observadas para as amostras do processo de extração da quitina (casca, DM e DP) são semelhantes às relatadas na literatura para quitina obtida a partir da casca de camarão.

A Tabela 25 apresenta as principais bandas obtidas na análise de FT-IV para as amostras de casca, quitina desmineralizada (DM), quitina desproteínizada (DP) incluindo os autores referenciados na literatura.

Tabela 25 – Principais bandas na região do infravermelho para quitina

Amostra	Atribuição e número de onda (cm^{-1})					
	$\nu[\text{-OH}]$	$\nu[\text{-CH}]$	$\nu[\text{C=O}]$	$\delta[\text{N-H}]$	$\delta[\text{CH}_3]$	$\nu[\text{-C-O-C-}]$
Casca	3464	2921	1650	1560	1420	1067
DM	3454	2926	1651	1558	1417	1074
DP	3458	2924	1656	1558	1419	1074
(EL KNIDRI et al., 2016)	3434	2921	1654	1550	1422	1065
(FONSECA, 2016)	3467	2921	1660	1580	1420	1038
(KAYA et al., 2017)	3450	2920	1652	1552	1420	1066
(ANTONINO, 2007)	3450	2900	1655	1560	1390	1045

Além disso, a eficiência do processo síntese de quitosana pela desacetilação da quitina purificada foi avaliada por FT-IV, conforme apresentado na Figura 16. Nesse sentido, deu-se destaque à amostra de DS_{MICRO} em comparação à amostra comercial, pois a quitosana DS_{MICRO} , de acordo com as análises anteriores mostrou-se como a mais promissora.

Para a quitosana DS_{MICRO} observou-se uma banda larga na região de 3450 cm^{-1} devido às vibrações de estiramento axial $\nu[-OH]$ sobreposta à banda de estiramento de $\nu[N-H]$; A banda na região de 2920 cm^{-1} é atribuída ao estiramento $\nu[-CH]$. Esta banda aparece com intensidade forte desde a casca e vai alargando com o processo de desacetilação e síntese da quitosana, fato também destacado por El Knidri et al., (2018) e por Fonseca (2016).

As quatro bandas intensas observadas entre 1700 cm^{-1} e 1300 cm^{-1} características de quitina, são também evidenciadas no espectro da quitosana, principalmente quando a quitosana tem um baixo grau de desacetilação, com destaque para a banda em 1656 cm^{-1} atribuída ao estiramento de $\nu[C=O]$, (SILVERSTEIN et al., 2014).

O desaparecimento das bandas específicas da quitina em 1651 cm^{-1} $[\nu C=O]$ (amida I) e 1560 cm^{-1} $[\nu_s N-H]$ (amida II) e o surgimento de uma banda larga em 1656 cm^{-1} , comprova a desacetilação da quitina, o que é observado para DS_{MICRO} e quitosana comercial.

A banda em 1566 cm^{-1} que corresponde à mistura de dois modos vibracionais, $\delta[N-H]$ e $\nu[-C-N]$, denominada amida II é observada na quitosana, no entanto, conforme a eficiência do processo de desacetilação essa banda tende ao desaparecimento (EL KNIDRI et al., 2016; FRICK et al., 2018).

Pode-se ainda observar a banda de deformação angular simétrica $\delta[CH_3]$ dos grupos acetamida remanescentes (em observada em 1421 cm^{-1} (BRUGNEROTTO et al., 2001), bem como as bandas características da estrutura sacarídea na região entre 1100 cm^{-1} por estiramentos $\nu[-C-O-C-]$ e vibrações de estiramento $\nu[C-O]$ (SILVERSTEIN et al., 2014).

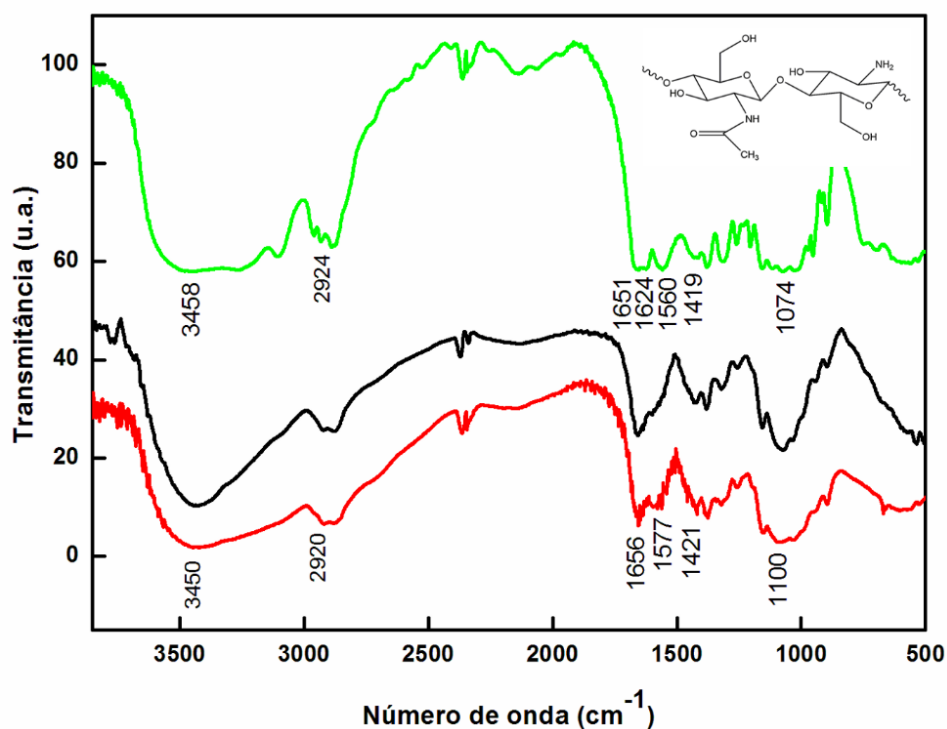


Figura 16 – Espectro de FT-IV para a quitina purificada (DP – verde), quitosana sintetizada (DS_{MICRO} – vermelho) e a quitosana comercial (preto) evidenciando a estrutura química da quitosana.

Os espectros de FT-IV comparativos para as amostras de quitosana podem ser observados na Figura 17.

Com base na Figura 17 e Tabela 26 é possível observar semelhanças entre as amostras de quitosana. A banda em 1566 cm^{-1} (amida II), cujo desaparecimento é um indicativo da eficiência do processo de desacetilação, é mais evidente nas amostras de quitosana sintetizadas que na quitosana comercial, o que está de acordo com o%GD obtido de 80,19% (DS_{ULTRA}), 80,46% (DS_{9h}) e 82,77% (DS_{MICRO}), sendo menores que o% GD para quitosana comercial (83,52%). (BRUGNEROTTO et al., 2001; EL KNIDRI et al., 2016; FONSECA, 2016; FRICK et al., 2018; KUMIRSKA et al., 2010; RINAUDO, 2006; SILVERSTEIN et al., 2007)

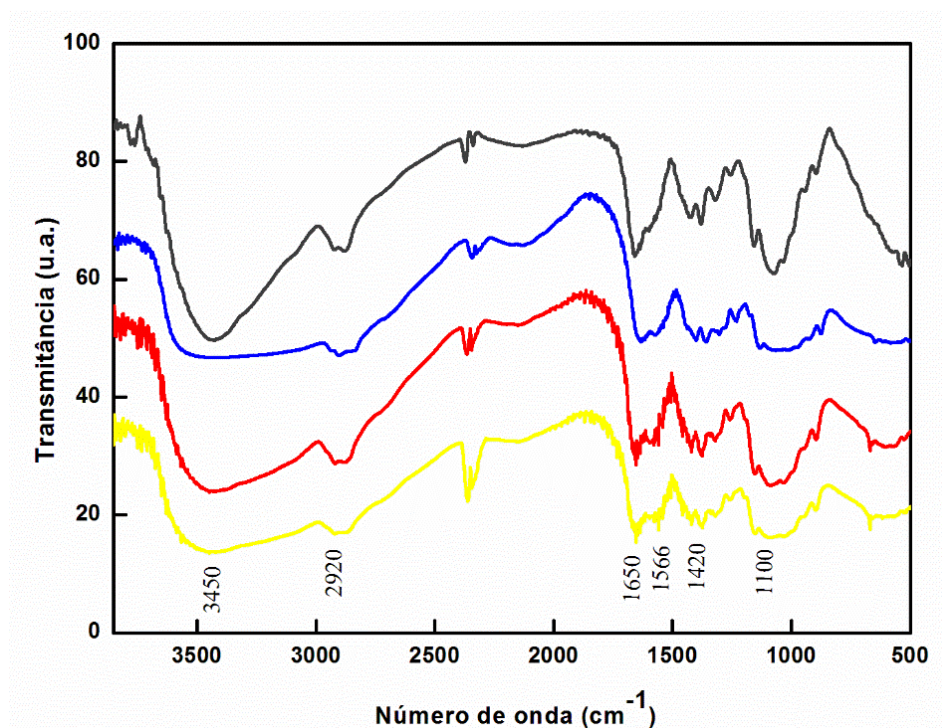


Figura 17 – Espectro FT-IV para as quitosanas sintetizadas (DS_{9h} – azul, DS_{MICRO} – vermelho, DS_{ULTRA} – amarelo) e para a quitosana comercial (preto).

Tabela 26 – Principais bandas na região do infravermelho para quitosana

Amostra	Atribuição e número de onda (cm ⁻¹)					
	ν [-OH]	ν [-CH]	ν [C=O]	δ [N-H]	δ [CH ₃]	ν [-C-O-C-]
DS _{9h}	3450	2933	1654	1564	1427	1064
DS _{MICRO}	3450	2920	1656	1577	1421	1100
DS _{ULTRA}	3450	2920	1650	1566	1420	1087
Comercial	3445	2920	1657	1553	1421	1078
(EL KNIDRI et al., 2016)	3400	2940	1654	1550	1422	1065
(FONSECA, 2016)	3450	2928	1620	1560	1420	1000
(FRICK et al., 2018)	3450	2900	1650	1550	1376	1150

1.3.8 Medidas termogravimétricas (TGA/DTG)

A análise termogravimétrica (TGA/DTG) foi realizada para verificar o perfil da decomposição e estabilidade térmica das amostras, sendo observado na Figura 18 e Tabela 27.

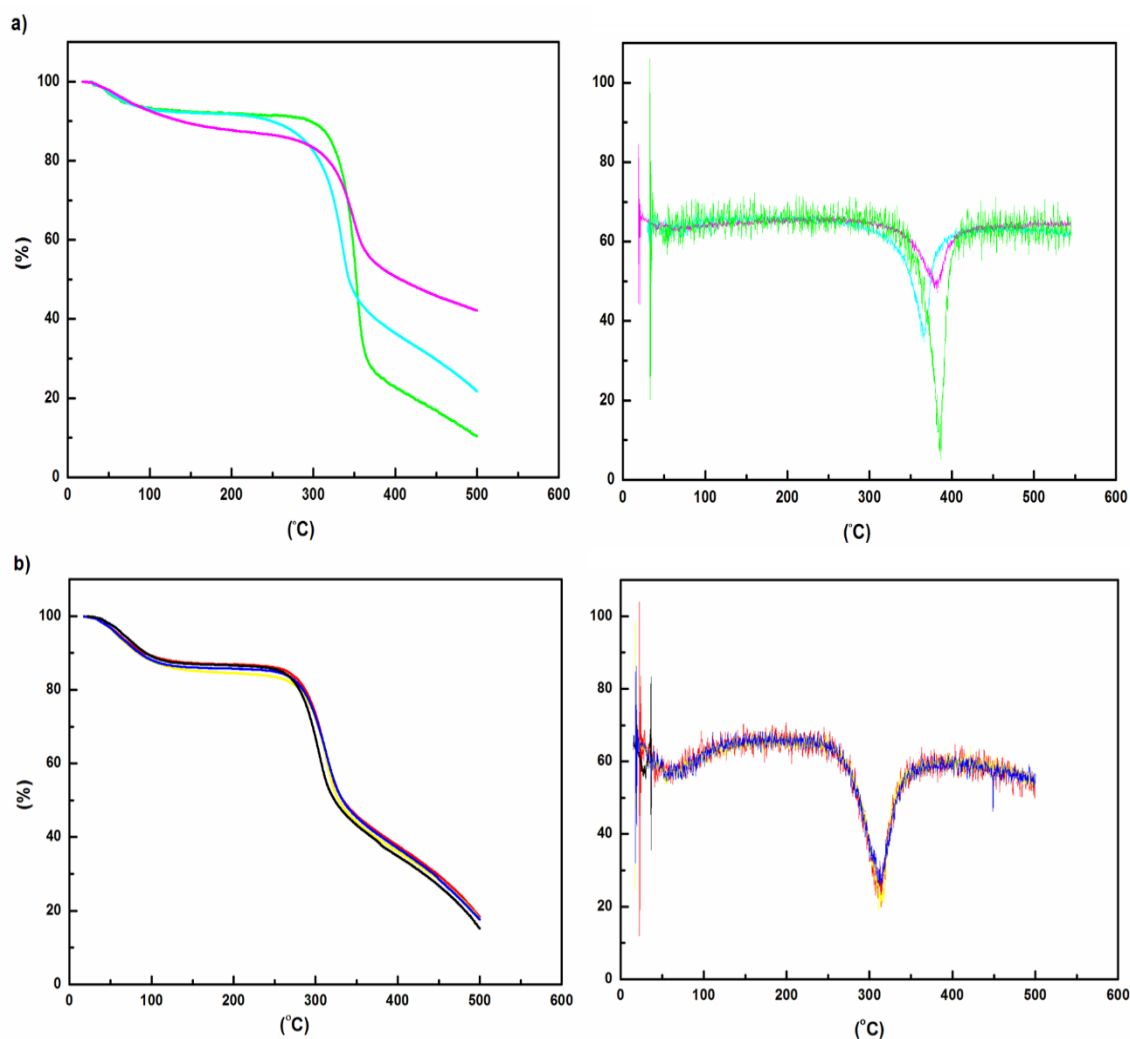


Figura 18 – Termogramas: TGA (esquerda) e DTA (direita), (a) quitina: casca de camarão (magenta), DM (ciano), DP (verde). (b) quitosanas: DS_{9h} (azul), DS_{MICRO} (vermelho), DS_{ULTRA} (amarelo), DS_{COM} (preto). Perda de massa (%) versus Temperatura (°C).

Tabela 27 – Resultados de TGA/DTA para a decomposição térmica das amostras.

Amostras	M _{inicial} (mg)	ΔT (°C) ¹	Perda de massa (mg)	T _{deg} (°C)	Resíduo (%)
Casca	6,0916	250-450	2,475	347,43	59,37
DM	5,5198	250-450	3,323	336,08	39,80
DP	2,589	250-450	1,930	352,76	25,51
DS _{9h}	5,2449	250-450	2,959	314,42	43,58
DS _{MICRO}	4,6708	250-450	2,635	311,26	43,62
DS _{ULTRA}	5,1958	250-450	2,862	312,70	44,91
Comercial	8,0535	250-450	4,736	310,62	41,19

¹ – ΔT – Estágio térmico (°C).

A temperatura máxima de degradação para amostras de quitina obtidas de casca de camarão são descritas na literatura em torno de 350 °C (ABDOU; NAGY; ELSABEE, 2008) e 372 °C (GERBER et al., 2018), o que está de acordo com os resultados deste trabalho observados pelos termogramas de DTA para a quitina na casca de camarão (347 °C), quitina desmineralizada (336 °C) e quitina desmineralizada e desproteínizada (353 °C). Essas amostras de quitina mostraram temperatura máxima de degradação superior às amostras de quitosana (310 – 314 °C). A porcentagem residual, após 450 °C, observada foi maior para a casca devido à presença de minerais (ABDOU; NAGY; ELSABEE, 2008; ANUSH; CHANDAN; VISHALAKSHI, 2019; FRICK et al., 2018; JIAHUA, et al. 2015; KUMARI et al., 2015). Os termogramas das amostras de quitosana sintetizadas mostraram-se muito semelhantes entre si e com a amostra obtida comercialmente. Foram observados dois estágios térmicos, um na faixa de 25 - 250 °C, para a perda de água livre ou coordenada por ligações de hidrogênio, e outro na faixa de 250 - 450 °C para a clivagem da cadeia e degradação da estrutura polimérica (KAYA et al., 2017; SOON et al., 2018). As taxas de perda de massa para quitosana até 450 °C foram de 55,09 – 58,81% e corroboram com a literatura que descreve perda de massa entre 40 – 60% (ABDOU; NAGY; ELSABEE, 2008; ANUSH; CHANDAN; VISHALAKSHI, 2019; FRICK et al., 2018; KUMARI et al., 2015; MA; XIN; TAN, 2015; NITHYA et al., 2017). A porcentagem residual das amostras de quitosana (41,19 - 44,91%) foi maior que as quitinas DM (39,80%) e DP (25,51%), sendo que isso ocorre devido à presença de ligações de hidrogênio com os grupos amino da quitosana, que garantem maior estabilidade térmica ao polímero até a temperatura de 500 °C avaliada (KAYA et al., 2017; SOON et al., 2018).

1.3.9 Determinação do grau de cristalinidade por difração de raios X

Os difratogramas das amostras são mostrados na Figura 19. A quitina desmineralizada (DM) e desproteínizada (DP), são apresentadas em comparação ao da casca. Os planos cristalográficos e suas posições angulares estão listados para efeitos de comparação. Pode-se observar que durante o processo de extração de quitina ocorre um rearranjo estrutural que resulta em

um material policristalino, com a identificação de diversos picos para quitina purificada, em conformidade com a literatura (EL KNIDRI et al., 2016).

A etapa de desacetilação para a amostra DS_{9h} mostra alterações estruturais marcantes, devido a remoção dos grupos acetil, em comparação com a quitina DP (Figura 19). A alteração na posição dos picos para menores valores de 2θ foram observados, que indicam uma alteração estrutural em que há aproximação dos planos atômicos (contração na rede) e alteração nas dimensões dos domínios cristalinos que é indicada pelo aumento nas larguras de linha dos picos. De modo geral, os difratogramas da quitosana apresentam dois picos característicos (2θ) geralmente em torno de 10° (020) e 20° (110). No entanto diferentes picos podem ser observados para a quitosana em função da fonte da quitina (ANUSH; CHANDAN; VISHALAKSHI, 2019; EL KNIDRI et al., 2016; FONSECA, 2016; KUMARI et al., 2017; LARBI et al., 2018; MA; XIN; TAN, 2015). A quitosana DS_{9h} mostrou um pico na região de $21,7^\circ$ diferentemente da amostra comercial.

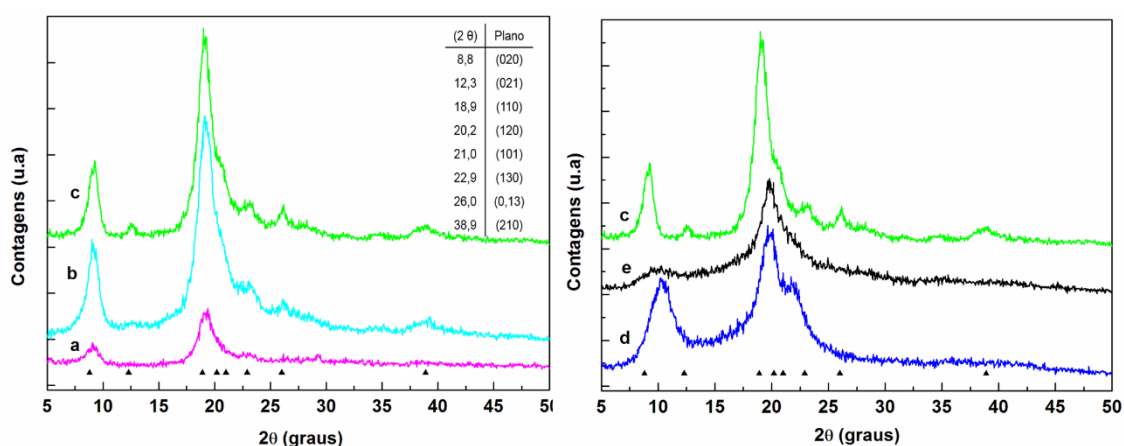


Figura 19 – Difratogramas: casca (magenta), quitina DM (ciano), quitina DP (verde), quitosana DS_{9h} (azul), quitosana comercial (preto), (▲) planos e as posições angulares da quitina loelovich (2014) estão identificados por triângulos.

Além disso, como era esperado, foi observado a diminuição da cristalinidade à medida que a quitosana foi sintetizada. Assim a quitosana mostra-se com maior percentual amorfo que a quitina. Esse percentual amorfo pode ocorrer devido à formação de ligações de hidrogênio intramoleculares com o grupo amino (NH₂) na amostra desacetilada. O mesmo comportamento inversamente proporcional entre %GD e cristalinidade vem sendo observado na

literatura (EL KNIDRI et al., 2016; FONSECA, 2016; KAYA et al., 2017; LARBI et al., 2018; NATARAJ et al., 2018; NOURI et al., 2016).

Ioelovich (2014) demonstrou que para amostras de quitosana a capacidade de sorção diminui com o aumento do grau de desacetilação ($\overline{GD}$) das amostras, assim amostras de quitosana menos desacetilada, e por consequência, com maior percentual amorfo são mais indicadas para estudos de sorção.

Os difratogramas de todas as amostras de quitosana são apresentados na Figura 20. Não se observam alterações nas posições angulares dos picos $2\theta = 10^\circ$ (020) em comparação com a amostra comercial. Já para o pico $2\theta = 20^\circ$ (110), as amostras DS_{MICRO} e DS_{SULTRA} coincidem com a amostra comercial.

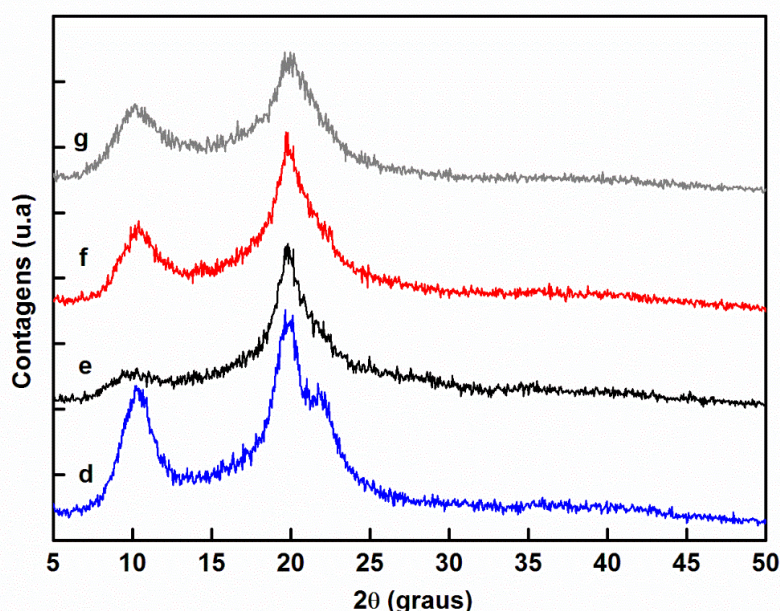


Figura 20 – Difratogramas de raios X para quitosana: DS_{9h} (d), DS_{COM} (e), DS_{MICRO} (f), DS_{SULTRA} (g).

O grau de cristalinidade ($\bar{x}$) representa a fração cristalina presente na amostra, ou seja, parte em peso da fração cristalina. A determinação da cristalinidade dos biopolímeros durante as etapas do processo de síntese da quitosana é um importante parâmetro que define as propriedades físicas e químicas, juntamente com a massa molar e sua distribuição (IOELOVICH, 2014).

Os estudos que envolvem DRX em geral calculam apenas o índice de cristalinidade (I_{CR}) com base nos cálculos da razão das alturas dos picos, devido à complexidade do cálculo do grau de cristalinidade. No entanto, conforme Ioelovich (2014), o índice de cristalinidade pode indicar apenas qual amostra tem

maior ou menor cristalinidade. Já o grau de cristalinidade leva em consideração a área definida pelas linhas de base nos difratogramas das amostras após a subtração do background e correções.

O difratograma da Figura 21 mostra a análise para determinação do grau de cristalinidade ($\bar{X}$), neste caso para a amostra de quitina desmineralizada (DM). Com tais procedimentos, pode-se calcular as áreas sobre as curvas dos difratogramas (IOELOVICH, 2014).

Os dados do grau de cristalinidade, os picos característicos em 2θ , planos cristalográficos e valores de % GD estão apresentados na Tabela 28. A quitina e quitosana exibem diferentes picos cristalinos característicos em $2\theta = 9,2749^\circ$ e $2\theta = 19,2033^\circ$ e em $2\theta = 9,6792^\circ$ e $2\theta = 19,9579^\circ$, respectivamente. Esses resultados estão de acordo com os citados na literatura (KUMARI et al., 2017; LARBI et al., 2018; MA; XIN; TAN, 2015; SOON et al., 2018; WANG et al., 2014b; ZHUANG; ZHONG; ZHAO, 2019).

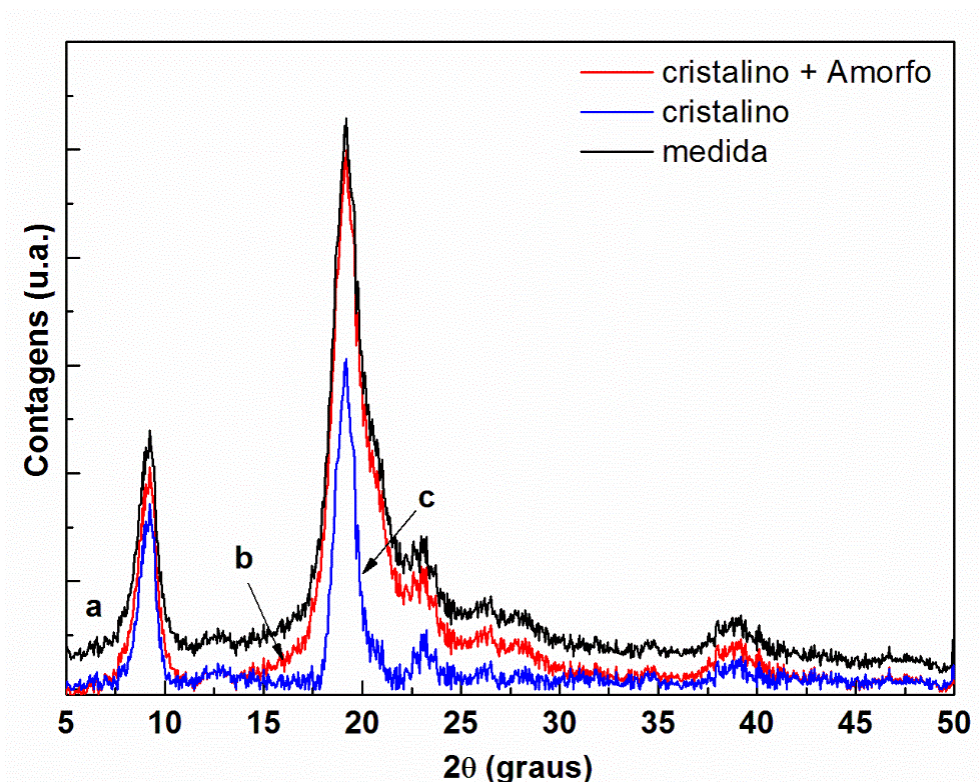


Figura 21 – Difratograma de raios X para a quitina (DM), Resultado experimental (a), Dados após subtração do background e correção (b), Dados após subtração da contribuição amorfa (c).

Tabela 28 – Planos característicos e valores de 2θ , áreas calculadas (A), grau de cristalinidade ($\bar{X}$) e grau de desacetilação (GD)

Amostras	(2 θ)		$A_{\text{cristalino}}$	A_{total}	$\bar{X}$ (%)	$\overline{GD}$ (%)
	Plano (020)	Plano (110)				
Casca	9,05	19,25	871,7693	917,4979	95,02	-
DM	9,15	19,05	2028,7173	4317,9235	46,98	-
DP	9,25	19,15	1920,5538	3650,4475	52,61	-
DS _{9h}	10,25	19,85	1640,8291	5022,0064	32,67	79,70
DS _{MICRO}	10,35	19,70	1263,5243	4132,6687	30,57	85,90
DS _{ULTRA}	10,20	19,80	1091,3836	3450,8867	31,63	80,60
Comercial	10,35	19,75	1148,8871	3835,7100	29,95	83,52

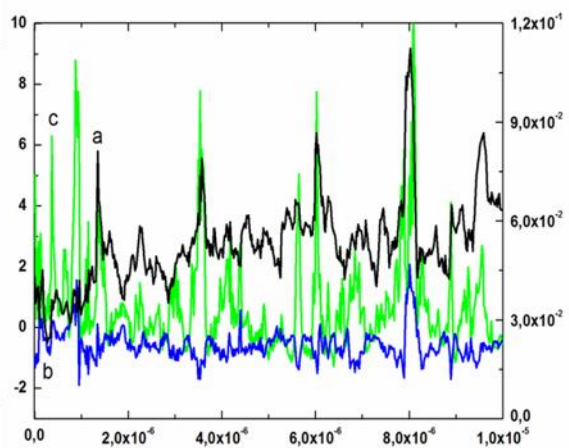
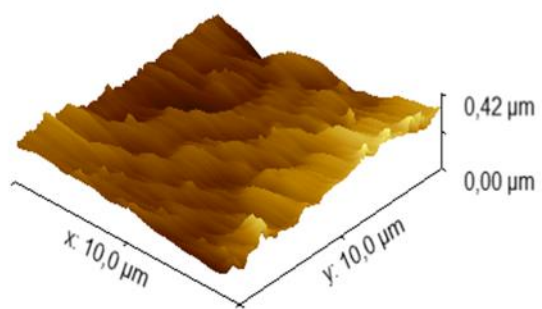
A amostra com maior ($\bar{X}$) é casca de camarão devido aos minerais cristalinos presentes. Ainda pode ser destacado a relação entre o grau de cristalinidade $\bar{X}$ e o grau de desacetilação $\overline{GD}$, em que conforme diminui o $\bar{X}$ aumenta o $\overline{GD}$, sendo que essa relação foi observada para todas as amostras de quitosana, o que está de acordo com a literatura (EL KNIDRI et al., 2016; FONSECA, 2016; LARBI et al., 2018; NOURI et al., 2016).

1.3.10 Microscopia de força atômica (AFM)

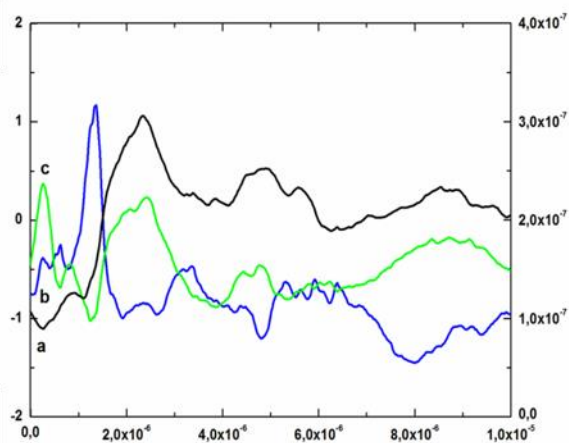
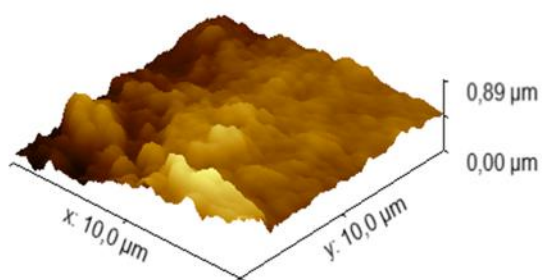
A morfologia da superfície tem uma inter-relação complexa com vários parâmetros estatísticos, que podem ser calculados a partir de medições de AFM. Esses parâmetros tridimensionais expressam a qualidade da estrutura de relevo, a complexidade das características morfológicas que caracterizam a rugosidade da superfície, a forma da distribuição da altura da superfície e a ordem ou desordem na topografia dentre outras características (KLAPETEK; NEČAS; CHRISTOPHER, 2020).

Nesse trabalho foram obtidas imagens das amostras por análise topográfica e deflexão, no entanto, para uma melhor visualização da superfície foram plotadas as topografias em 3D (Figura 22), obtendo-se, a partir delas, os dados da superfície, como rugosidade quadrática média (RMS), coeficiente de assimetria (S_{SK}), coeficiente de curtose (S_K) e a altura máxima (S_z) sendo que estes parâmetros de amplitude foram editados no *Origin 7.0*.

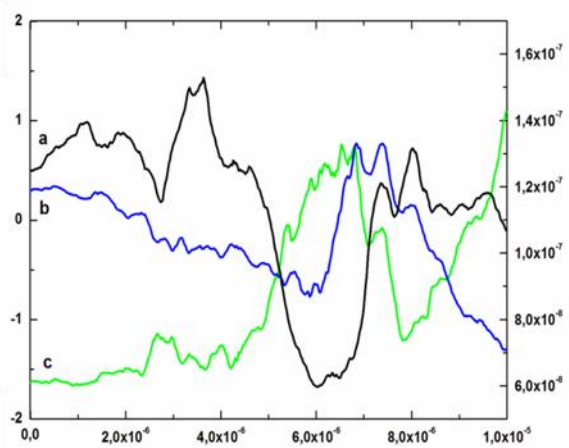
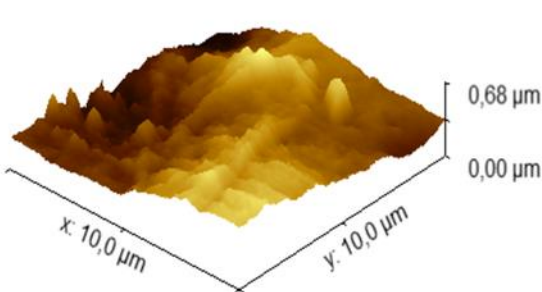
Casca



DM



DP



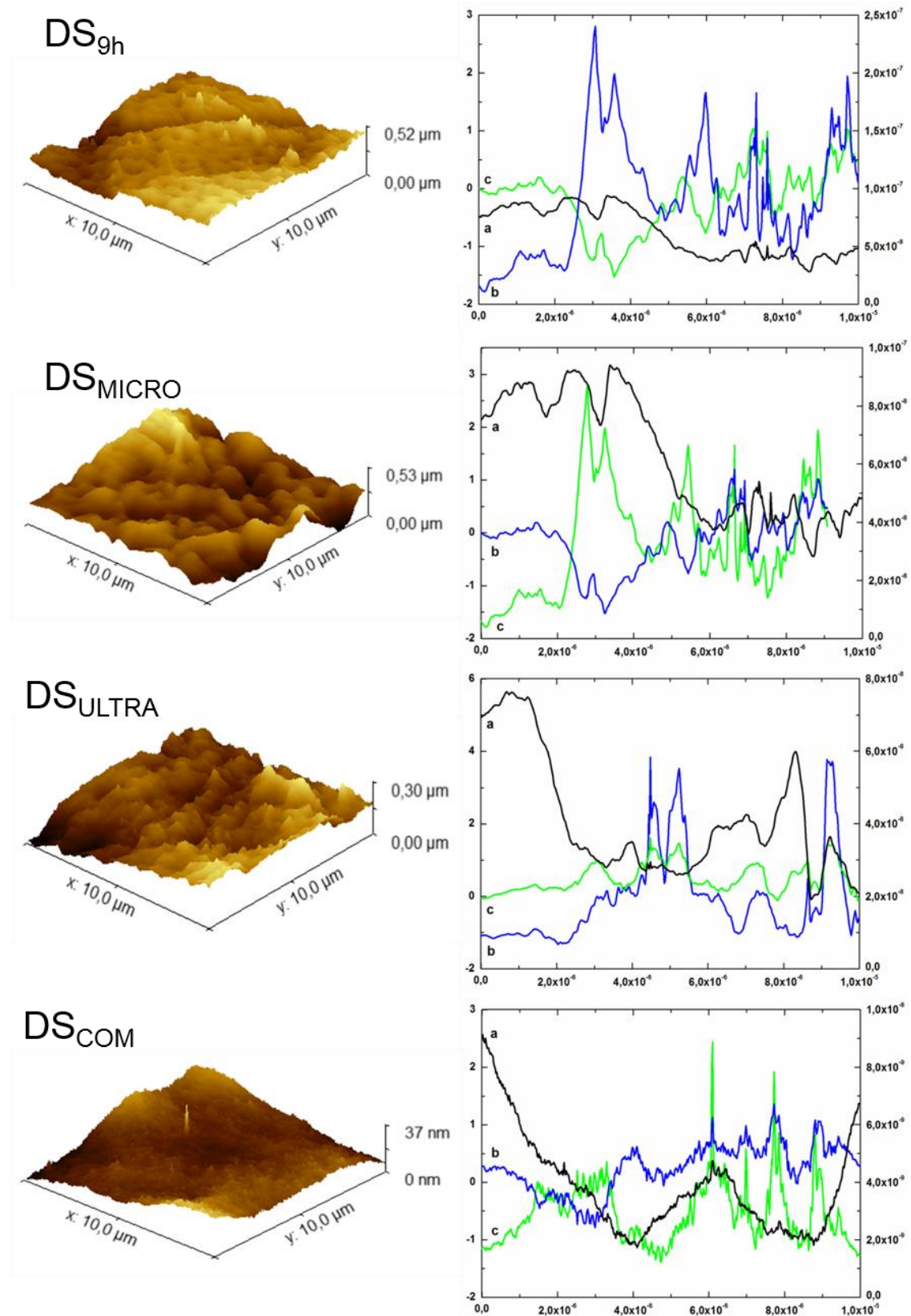


Figura 22 – Topografia em 3D da superfície com área de varredura $10 \times 10 \mu m^2$ e altura máxima (SZ) no eixo z . (esquerda). Dados da superfície (direita): rugosidade (RMS) no eixo z (preto, a), coeficiente de assimetria (SSK) (azul, b), coeficiente de curtose (SK) (verde).

As imagens de alta resolução obtidas indicaram que todas as amostras apresentaram superfícies irregulares. Os picos e vales são indicados pela variação de cores. Em vales mais profundos o tom tende ao mais escuro e nos picos maiores o tom tende à cor ouro, na escala da altura z .

Os dados comparativos de todas as amostras foram obtidos pela aquisição e processamento da imagem e dados no *software Picoview 1.14.4* e posterior tratamento e análise no *software Gwiddion 2.54* e constam na Tabela 29.

Em geral, os trabalhos relacionados aos parâmetros de rugosidade apresentam somente o perfil de linha traçado em cada área de varredura e as medições finais do coeficiente de assimetria e do coeficiente de curtose ou ainda, somente os dados da rugosidade, o que difere deste trabalho que apresenta um estudo mais detalhado da topografia da superfície, contendo os dados do perfil do coeficiente de assimetria e do coeficiente de curtose junto ao perfil da rugosidade, a altura máxima de pico, bem como os dados estatísticos de entropia detalhados (BHATT et al., 2017; SAZANOVA et al., 2016; STOICA et al., 2013; ZHUANG; ZHONG; ZHAO, 2019).

A rugosidade média da raiz quadrática (RMS) compreende a média dos desvios de altura medidos tomados dentro do comprimento de avaliação e medidos a partir da linha média, ou seja, é o desvio padrão da distribuição das alturas da superfície. Resumindo, RMS é a média das irregularidades de altura de uma superfície e a altura máxima (S_z), correspondendo ao valor absoluto entre os picos mais alto e mais baixo (BAJPAI; BHATT; KATARE, 2016; BHATT et al., 2017; GADELMAWLA et al., 2002; Klapetek; Nečas; Christopher, 2020; Munz, 2013; SAZANOVA et al., 2016; STOICA et al., 2013; Yacoot; Koenders, 2008; ZHUANG; ZHONG; ZHAO, 2019).

A quitina DM apresentou a maior altura máxima de pico (S_z) de 887,20 nm dentre as amostras analisadas e, conseqüentemente, apresentou rugosidade média maior de 125,40 nm (Tabela 29).

Entre as amostras de quitosana, a DS_{MICRO} apresenta a maior rugosidade da superfície de 74,53 nm e maior altura máxima (S_z) no eixo z de 530,87 nm, o que também pode ser evidenciado na imagem da Figura 22. Observando de forma geral, as amostras DS_{9H} e DS_{MICRO} apresentaram um perfil de altura máxima (S_z) e rugosidade (RMS) muito próximo, mas a DS_{MICRO} ainda se

manteve seus dados de irregularidade de superfície ligeiramente maiores. A quitosana DS_{ULTRA} não apresentou semelhança nos dados de superfície com as demais amostras de quitosana e a quitosana comercial mostrou-se como a de superfície mais regular. O perfil mais regular da quitosana comercial deve-se ao fato de ser uma amostra pulverizada, sendo que a análise de AFM foi realizada utilizando um o ácido clorídrico como substrato aderido sobre a mica, enquanto as demais amostras foram analisadas em partículas de tamanho de 0,5 cm².

Tabela 29 – Parâmetros topológicos das amostras

Amostras	Rugosidade ^a (nm)	Altura Máx. S _z (nm)	Coef. de assimetria (S _{sk})	Coef. de Curtose (S _k)	Entropia (H) ± (deficit)
Casca	49,46	421,1	0,6787	0,8514	-15,4762±0,0730
DM ^b	125,40	887,2	0,1300	0,9010	-14,5443±0,0151
DP ^c	101,42	676,2	0,4437	-0,4827	-14, 5783±0,0345
DS _{9h}	66,07	517,9	0,4937	0,9731	-15,1589±0,0452
DS _{MICRO}	74,53	530,87	0,4345	1,0083	-15,0381±0,0459
DS _{ULTRA}	44,88	300,28	0,1484	0,7348	-15,5572±0,0568
DS _{COM}	4,25	36,83	-0,6626	1,6767	-18,0552±0,0982

^a Média quadrática (RMS)

A semelhança sugerida pelos dados de DS_{9h} e DS_{MICRO} (Tabela 29) é um excelente indício, pois nesse trabalho a reação por micro-ondas substituiu de forma eficiente, em menos tempo e com menor gasto energético, um processo tradicional de aquecimento e sistema de refluxo, corroborando na escolha do método de desacetilação com uso de radiação de micro-ondas como método padrão para as amostras de quitosana sintetizadas no Lasir.

Algumas alterações observadas na superfície das amostras podem estar relacionadas às modificações ocorridas em cada etapa do processo, como a formação de aglomerados, cisão de cadeias, formação ou quebra de ligações químicas (BAJPAI; BHATT; KATARE, 2016; BHATT et al., 2017). Como é o caso da casca que apresenta superfície menos rugosa e com menor valor de S_z quando comparada às amostras de quitina DM e DP, bem como o caso da diminuição da rugosidade e de S_z após o processo de desacetilação e síntese de quitosana a partir de quitina purificada.

O processo de extração da quitina inicia a partir da casca que é um material resistente e compacto, visto que é uma carapaça. A etapa de desmineralização da quitina consiste na retirada de carbonatos de cálcio que constituem aproximadamente 60% da composição da casca que dão sustentação à carapaça, e é a etapa do processo que perde mais matéria, com menor rendimento. Essa alteração drástica justifica a maior rugosidade da quitina DM visível na maior altura máxima de 887,2 nm do processo de extração da quitina e está em concordância com o relatado por Bhatt et al. (2017) em que a etapa DM apresentou maior altura máxima. Já a síntese de quitosana se dá pela inserção de grupos amino, que por sua vez, resultam em aumento nas ligações de hidrogênio e outras interações dipolo-dipolo intramoleculares e intermoleculares que deixam o polímero menos rugoso.

Outro parâmetro avaliado foi o coeficiente de assimetria (S_{sk}), que representa o grau de simetria das alturas da superfície referente ao plano médio e o perfil obtido nas imagens da superfície da Figura 22, junto aos dados apresentados na Tabela 29. Durante o processo de extração de quitina e síntese de quitosana, o perfil do coeficiente de assimetria se manteve positivo indicando que as superfícies possuem mais picos do que vales ($S_{sk} > 0$) (KIM; WHITE, 2004; KLAPETEK; NEČAS; CHRISTOPHER, 2020; MAHMOUDI et al., 2020; STOICA et al., 2013). Somente a quitosana comercial evidenciou perfil negativo de S_{sk} ($S_{sk} < 0$), pois nela predominam mais vales em um platô mais suave, demonstrando uma superfície elevada mais plana ou com poucas ondulações (KLAPETEK; NEČAS; CHRISTOPHER, 2020).

O coeficiente de curtose (S_k) foi investigado por que é significativo para indicar a presença de picos ou vale que podem ocorrer em uma superfície, visto que curtose é definida como o menor ou maior grau de achatamento na distribuição, limitado pelo valor 3. S_k mede a pontualidade das alturas do perfil de linha e descreve a distribuição e variação dos grãos na superfície. (BAJPAI; BHATT; KATARE, 2016; HULUBEI et al., 2014; KIM; WHITE, 2004).

Em uma distribuição normal (amplitude gaussiana), $S_k = 3$, a superfície é chamada de mesocúrtica. Já $S_k > 3$ sugere superfície com pouca área acima ou abaixo da altura média, apresentando uma distribuição mais alta (afunilada) e concentrada que a distribuição normal, com mais saliências espalhadas na superfície, neste caso a superfície é classificada como leptocúrtica (BAJPAI;

BHATT; KATARE, 2016; HULUBEI et al., 2014; KIM; WHITE, 2004). $S_k < 3$ sugere superfície com distribuição relativamente uniforme de alturas acima e abaixo da altura média, apresentando uma distribuição mais achatada que a distribuição normal e classificada como superfície platicúrtica (BAJPAI; BHATT; KATARE, 2016; HULUBEI et al., 2014; KIM; WHITE, 2004).

Nesse sentido, conforme apresentado na Figura 22 e nos dados apontados na Tabela 29 é nítido perceber que todos os dados do coeficiente de curtose são inferiores a 3, o que indica superfície platicúrtica com morfologia mais uniforme de picos e vales em relação à altura média. O valor negativo ($S_k = -0,4827$) para a amostra DP indica distribuições esparsas relacionadas a superfícies altamente irregulares podendo apresentar agrupamento de grãos, também destacado em estudo com quitosana por Bhatt et al. (2017) (FIORI; ROSSI, 2004).

Outro parâmetro espacial calculado a partir das medidas morfológicas é a entropia da morfologia (H) que revela a análise da imagem de textura, medindo a riqueza da estrutura na morfologia que se inter-relaciona fortemente com os graus de ordem ou desordem na distribuição de altura da estrutura do grão (ANDRAUD; BEGHDAI; LAFAIT, 1994; KLAPETEK; NEČAS; CHRISTOPHER, 2020; PIASECKI, 2000).

A partir dos parâmetros topológicos apresentados (Tabela 29) ainda é possível observar que à medida que a rugosidade aumenta em cada amostra, a entropia diminui. Dentre as amostras de quitosana, a DS_{MICRO} obteve o menor valor de entropia ($H = -15,0381 \pm 0,0459$) e foi a quitosana que obteve o maior valor de rugosidade ($RMS = 74,53$). Esses parâmetros são inversamente proporcionais, quanto maior o valor de RMS, menor a entropia e menor será a complexidade da imagem. Em contrapartida, a amostra de quitosana comercial obteve a menor rugosidade entre todas as amostras resultando em uma entropia maior. (KLAPETEK; NEČAS; CHRISTOPHER, 2020; PIASECKI, 2000)

A entropia está intimamente associada ao fator de rugosidade quadrática média (RMS) que é o desvio padrão da distribuição das alturas da superfície. Assim, uma distribuição gaussiana tem a entropia máxima entre todas as distribuições com baixo valor de RMS. A diferença entre esse valor máximo e a entropia estimada é exibida como déficit de entropia, que por definição, é sempre positivo (vai além de questões numéricas) e as entropias são exibidas sem

unidade, pois são quantidades logarítmicas (ANDRAUD; BEGHDAI; LAFAIT, 1994; KLAPETEK; NEČAS; CHRISTOPHER, 2020; PIASECKI, 2000).

Ainda referente à relação dos parâmetros (Tabela 29), a Figura 23 mostra um estudo comparativo entre o parâmetro de rugosidade quadrática média (RMS) e o parâmetro espacial entropia (H). São observadas variações insignificantes para as amostras de casca e DS_{ULTRA} devido à similaridade da rugosidade e entropia. A natureza distinta de cada amostra, atribuída às diferentes interações presentes no material, é responsável pela variação de RMS e S_K.

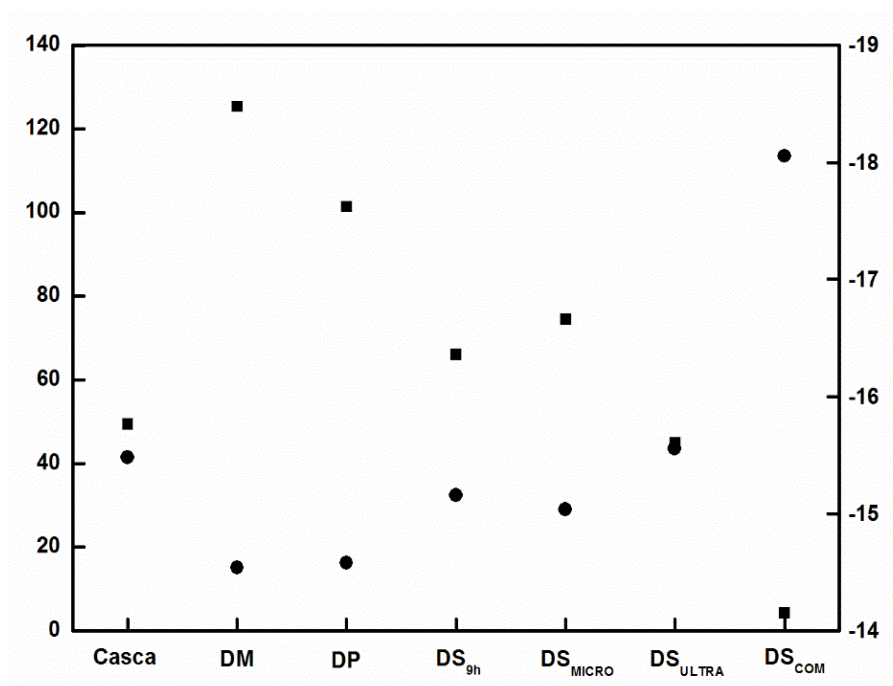


Figura 23 – Variação inversa dos parâmetros rugosidade (■) e entropia (●), da superfície representada no eixo y e eixo z, respectivamente, em relação à superfície da amostra, eixo x.

Outros resultados dos parâmetros topológicos resultantes das análises de AFM, topografia em 3D da superfície e valor de S_Z, bem como o perfil dos parâmetros RMS, S_K e S_{SK} em diferentes ampliações de varreduras (20, 50 e 90 μm²) são apresentados no Apêndice A .

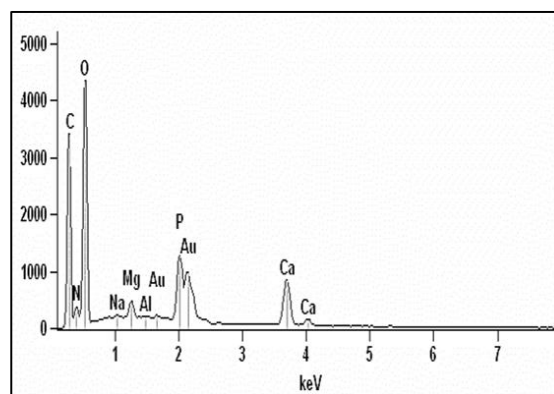
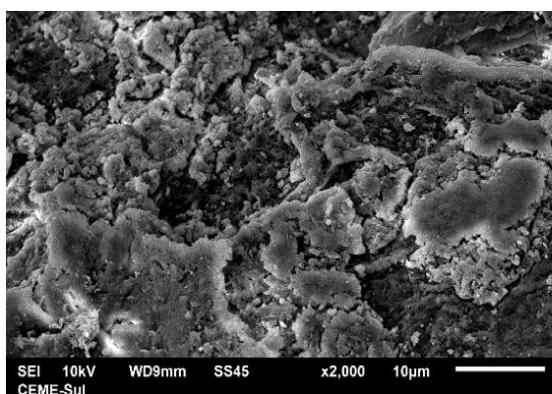
1.3.11 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia de energia dispersiva de raio x (EDS)

A análise por MEV é mostrada na Figura 24. Os dados completos na espectroscopia de EDS encontram-se na Tabela 30. Foram observados em maior percentual, átomos de C, N e O, que são os principais elementos da quitina e quitosana. Porém, além dos constituintes orgânicos, a análise semiquantitativa também detectou quantidades pequenas de metais, entre eles, os cátions Na, Mg, Al, Ca, Cl, P. Destaque pode ser dado ao processo de desmineralização, isto é, a diferença de constituição entre a casca e a quitina DM, mostrando eficiente remoção de carbonato de cálcio CaCO_3 . A remoção de cálcio na etapa da desmineralização têm sido relatada na literatura por diversos autores (EL KNIDRI et al., 2016; KAYA et al., 2017; MAREI et al., 2016; POERIO et al., 2020; ZHAO et al., 2019a).

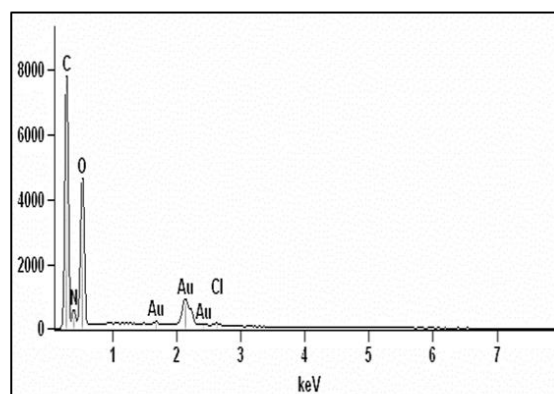
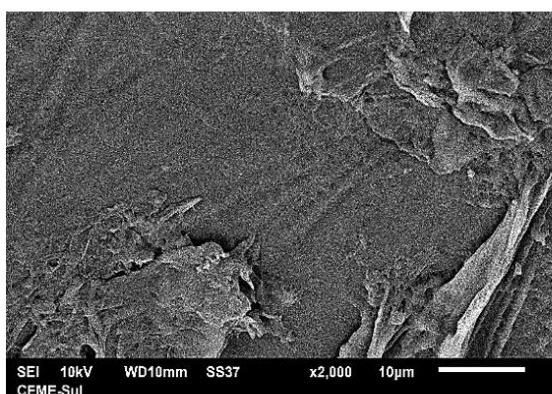
Tabela 30 – Análise semiquantitativa do percentual atômico por EDS

Composição (%)	Quitina				Quitosana		
	S	DM	DP	DS _{9h}	DS _{MICRO}	DS _{SULTRA}	DS _{COM}
C	20,98±0,34	39,85±0,59	32,32±0,37	29,25±0,34	52,13±1,19	51,91±0,31	35,61±0,53
N	11,54±1,24	8,02±2,47	13,53±0,99	13,17±0,89	15,12±1,91	9,07±0,43	7,35±2,08
O	51,94±0,96	49,42±0,98	52,37±0,81	55,6±0,80	32,35±1,03	38,86±0,21	52,62±0,95
Na	0,25±0,09	ND	ND	0,06±0,06	0,13±0,05	0,24±0,03	0,34±0,13
Mg	0,94±0,12	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Al	0,05±0,05	ND	ND	ND	0,1±0,04	0,03±0,01	0,15±0,06
P	4,22±0,24	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ca	8,24±0,18	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cl	ND	0,72±0,08	ND	ND	0,21±0,06	ND	0,31±0,07
Au	1,82±0,07	1,99±0,08	1,78±0,06	1,92±0,06	0,22±0,01	0,43±0,12	3,62±0,09

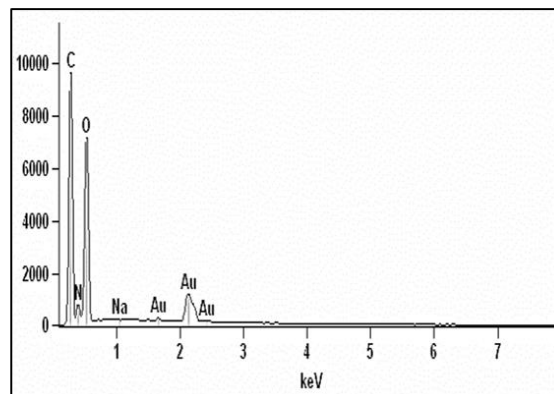
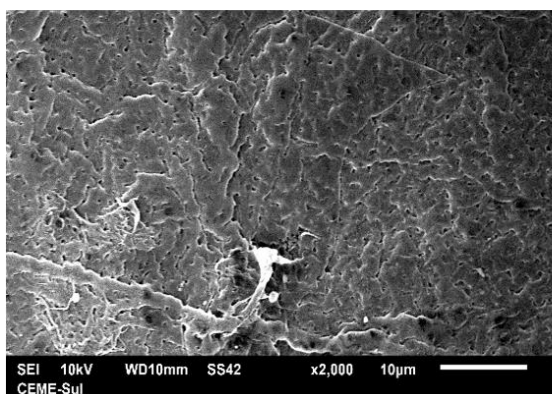
(a)



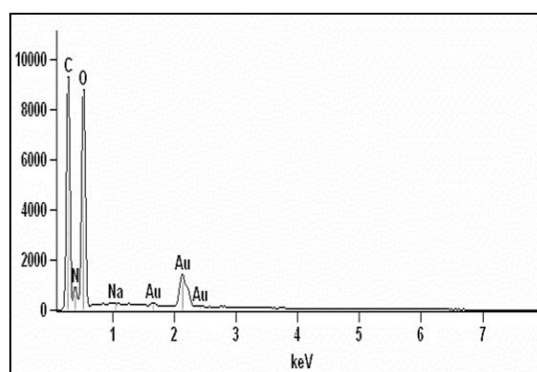
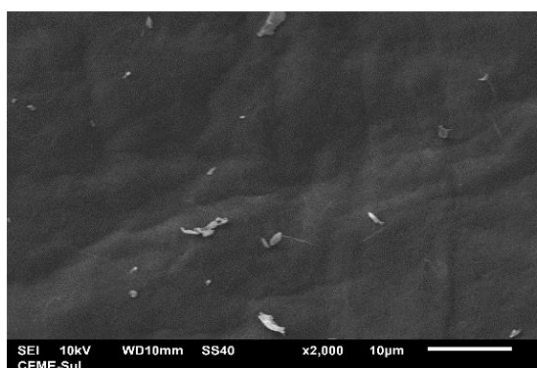
(b)



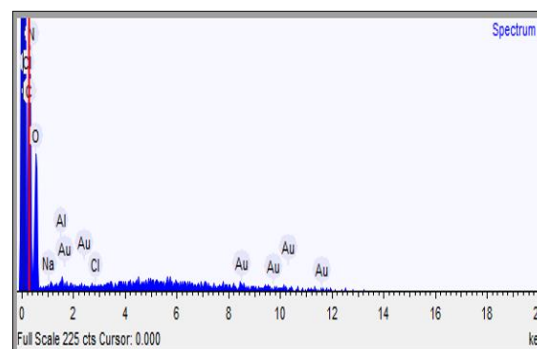
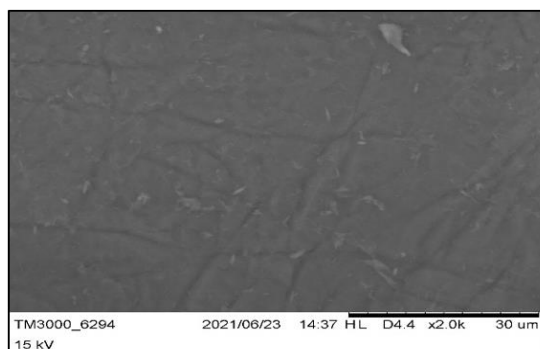
(c)



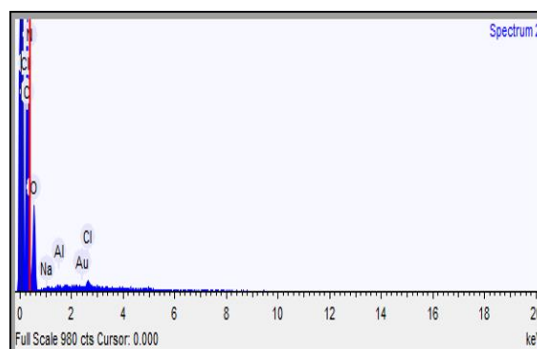
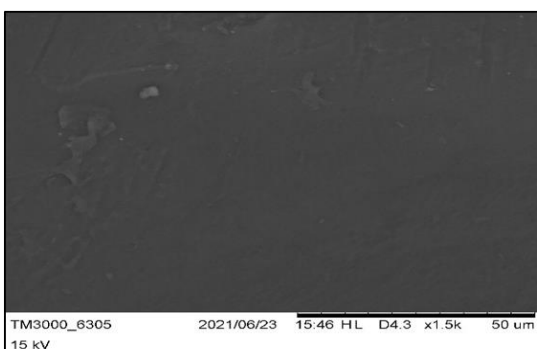
(d)



(e)



(f)



(g)

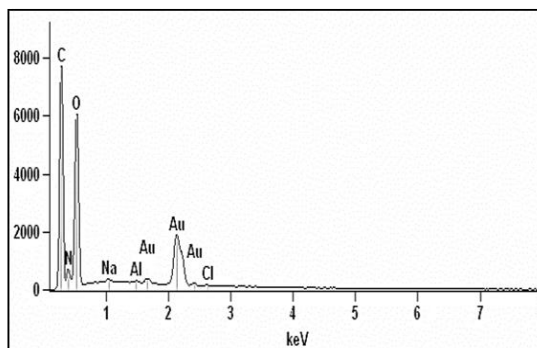
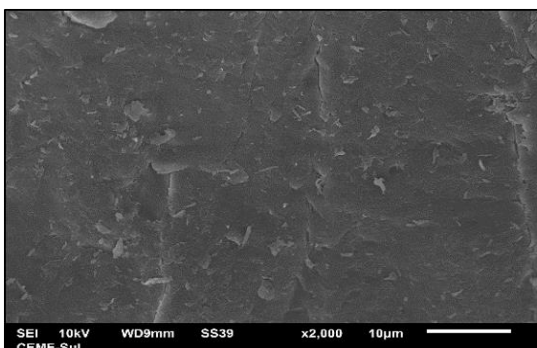


Figura 24 – Micrografias com magnitude de 2000x (10 μ m) e espectros de EDS (Intensidade (cps eV⁻¹) versus energia (keV), das amostras de cada etapa da extração da quitina, casca (a), DM (b) e DP (c) e das quitosanas DS_{9h} (d), DS_{MICRO} (e), DS_{ULTRA} (f) e DS_{COM} (g)

A micrografia da casca do camarão mostrou que sua superfície não é homogênea evidenciando diferentes regiões em sua superfície, semelhante às morfologias descritas por Knidri et al., (2016), no entanto o autor destaca uma estrutura altamente porosa da casca semelhante a união de várias folhas finas. Já Poerio et al., (2020) descreve uma superfície com morfologia porosa e uma organização lamelar intercalada com grânulos irregulares que poderiam ser resultantes dos minerais e proteínas. Nesse estudo, pode-se afirmar que as micrografias da casca também apresentaram um enovelamento da superfície com grãos dispostos irregularmente. Porosidade e presença de grãos irregulares na superfície da casca também foram observadas na análise comparativa com as topografias de AFM (Figura 25). Na casca, o cálcio destaca-se na porcentagem atômica, visto que é um dos principais constituinte da casca na forma de carbonato de cálcio junto a outros sais (EL KNIDRI et al., 2016; MAREI et al., 2016; POERIO et al., 2020; ZHAO et al., 2019a).

A micrografia da superfície da quitina desmineralizada (DM) permitiu observar a modificação ocorrida na superfície após o tratamento com solução aquosa de ácido clorídrico usada para a retirada de carbonato de cálcio e outros sais. A morfologia da superfície passa a apresentar uma estrutura lamelar mais plana, sem a presença dos grânulos, mas ainda irregular. Esse fato também foi destacado por Knidri et al., (2016) e Poerio et al., (2020). O desaparecimento dos grãos também foi evidenciado na topografia da superfície da DM na análise de AFM (Figura 25).

A micrografia da quitina purificada (DP) após a desproteíntização apresentou uma morfologia com características estruturais mais organizadas que a DM, compondo uma estrutura mais plana, porém fibrosa, parecendo mais porosa em sua superfície. Morfologia semelhante foi descrita por Zhao et al., (2019) que relata a modificação da superfície após a etapa de desproteíntização, tornando-se mais lisa e fibrosa e sem proteínas porém ainda rugosa. Essa superfície mais lisa, porém, fibrosa foi também identificada na análise de AFM (Figura 25). A eficiência e a remoção de proteínas na etapa DP foi destacada por diversos autores com alteração na superfície (EL KNIDRI et al., 2016; POERIO et al., 2020; SOON et al., 2018; ZHAO et al., 2019a).

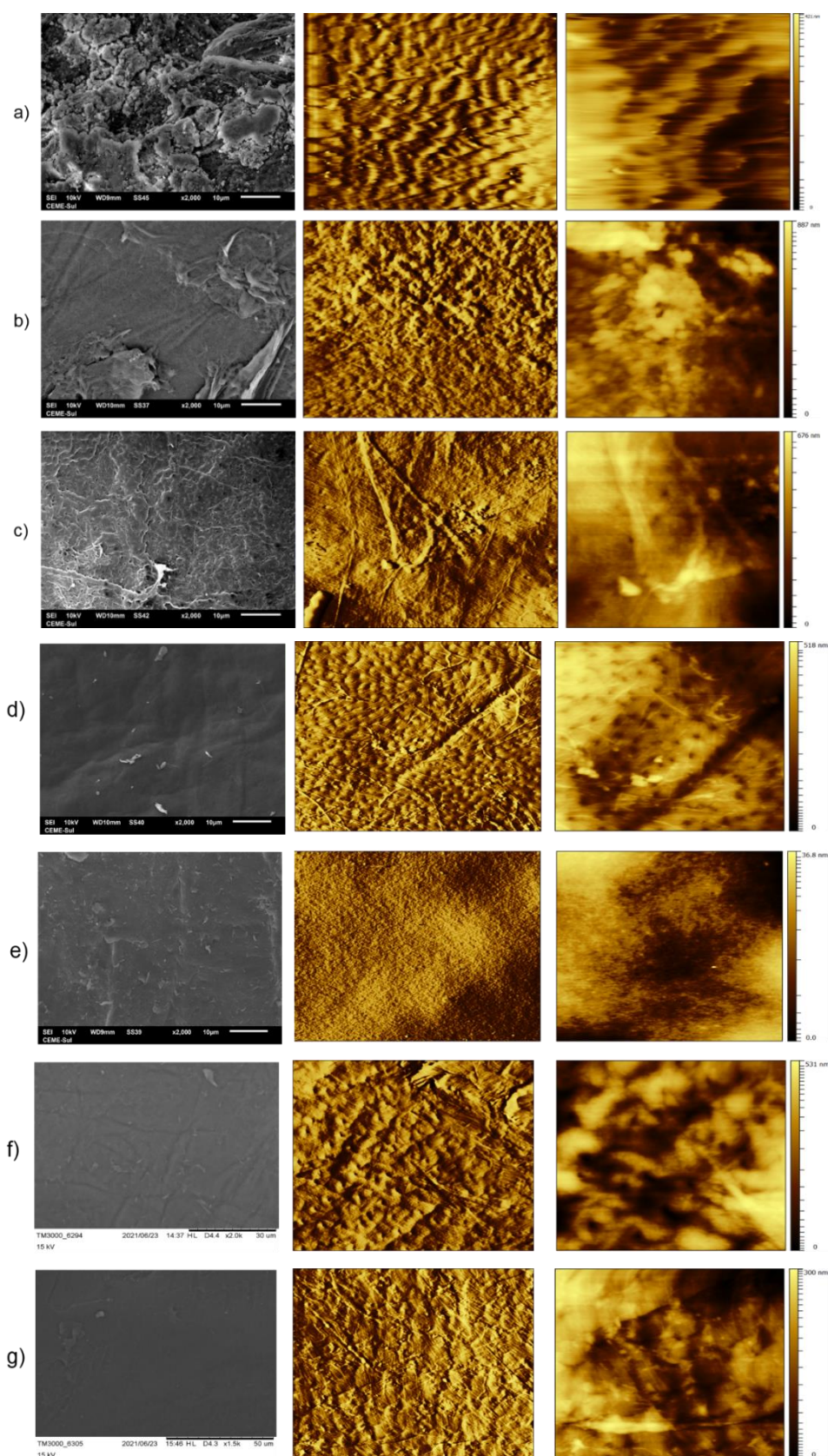


Figura 25 – Imagens comparativas obtidas por MEV representando as micrografias com magnitude 2000x (10 μm) (esquerda) e AFM representando as imagens em deflexão (centro) e topografia (direita) da superfície com área de varredura 10x10 μm² das amostras de cada etapa da extração da quitina, casca (a), DM (b) e DP (c) e das quitosanas DS_{9h} (d), DS_{MICRO} (e), DS_{ULTRA} (f) e DS_{COM} (g).

A quitosana sintetizada apresentou modificação em sua superfície frente a etapa DP, é possível observar em sua superfície um plano mais liso, tendendo a uma maior homogeneidade, apesar de apresentar algumas cristalizações na superfície (pequenos grânulos). O aspecto fibroso e elevado tornou-se mais plano e uniforme, sendo que nas topografias de AFM (Figura 25) são perceptíveis linhas que parecem resultar das ligações de entrecruzamento ocorrido na reação de desacetilação da quitina purificada. Superfícies com morfologias semelhantes também foram relatadas na literatura para quitosanas sintetizadas a partir de casca de camarão (EL KNIDRI et al., 2016; KUMARI et al., 2017; MAREI et al., 2016). A quitosana comercial apresentou semelhança às amostras sintetizadas nesse estudo.

A micrografia da quitosana comercial também mostrou pequenos grânulos com tamanhos irregulares e uma morfologia da superfície mais lisa, com grânulos para o pó de quitosana comercial. As mesmas características de superfície foram relatadas na literatura (EL KNIDRI et al., 2019; MAREI et al., 2016; SOON et al., 2018). Ao comparar a morfologia da superfície (MEV) com as imagens de topografia e deflexão (AFM) (Figura 25) podem ser observados grânulos, no entanto a análise de AFM para a amostra comercial pulverizada foi realizada com um substrato o que pode ter mascarado sua topografia.

Para todas as amostras de quitosana, inclusive a comercial, foi observada no espectro de EDS a presença de uma quantidade muito pequena de percentual atômico de sódio, provavelmente por conter resíduos de sódio resultante da reação de desacetilação que utiliza hidróxido de sódio altamente concentrado. Resíduos de sódio em quitosana também foram detectados por Knidri et al., (2016).

1.3.12 Avaliação do potencial antifúngico

A Tabela 31 mostra os resultados da avaliação do potencial antifúngico no quarto dia de experimentação. A atividade antimicrobiana da quitosana é influenciada por vários fatores como grau de desacetilação, massa molar, capacidade de quelação, tipo de microrganismo e tempo de exposição deste à quitosana (GOY; DE BRITTO; ASSIS, 2009; KONG et al., 2010), além da

concentração de quitosana empregada (LIU et al., 2001). Já é conhecido o efeito inibitório da quitosana no crescimento e esporulação de *C. Gloeosporioides* (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2003; HAGGAG; ABD-ALLA, 2010). A quitosana pode agir por dois mecanismos contra microorganismos, em baixa concentração, a quitosana pode se ligar à carga negativa da superfície do microorganismo, perturbando a atividade de membrana celular e propiciando a saída dos componentes intracelulares. Em alta concentração, a quitosana pode se adicionar à membrana da superfície, impedindo a transferência dos íons através da membrana celular, tendo como consequência a morte celular (LIU et al., 2001). No entanto, a concentração de quitosana de 0,6% (m:v) empregada nesta pesquisa, no sentido de obtenção de produto pouco viscoso, mostrou baixa efetividade, sem resultado significativo de inibição de crescimento micelial, em atuação direta sobre estruturas vegetativas do patógeno, o que discorda dos resultados de outros autores (HAGGAG; ABD-ALLA, 2010) que mostraram efeito inibitório da quitosana, em baixas concentrações, sobre o crescimento e esporulação de *C. gloeosporioides* na cultura da manga. A literatura (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2003) ainda relata que em testes *in vitro* o efeito fungicida sobre *C. gloeosporioides* em concentração de quitosana de 1,5% (m:v) na presença de extratos, o que não foi evidenciado na concentração de quitosana de 0,5% (m:v) com os mesmos extratos. Nenhuma relação foi observada dos resultados obtidos com o GD e a massa molar de cada amostra.

Em relação à avaliação do potencial antifúngico sobre as estruturas germinativas, isto é, sobre a esporulação de *C. gloeosporioides*, o melhor resultado foi obtido para quitosana comercial, que evidenciou uma redução da esporulação do patógeno da ordem de 43%. Redução de apenas 19% foi verificada para DS_{9h}. Já as quitosana DS_{MICRO} e DS_{SULTRA} mostraram redução de esporulação da ordem de aproximadamente 30% (Tabela 32). Estes resultados sugerem que as características de GD e massa molar média de cada amostra de quitosana sintetizada por três diferentes métodos, podem ter relação com os resultados obtidos nessa avaliação. Na prática, o equilíbrio entre GD e massa molar média resulta em amostra com melhores características, como a quitosana comercial (DS_{COM}). No entanto as amostras obtidas nesta pesquisa, principalmente a DS_{SULTRA} mostrou-se também muito efetiva. Há de se considerar que o fungo em questão pode sobreviver na superfície dos tecidos infectados e

ser disseminado a partir destes para novos tecidos sadios às custas dos esporos remanescentes que ainda persistem em quantidade (SOARES; LOURENÇO; AMORIM, 2008), assim uma inibição na esporulação em torno de 30% é um bom resultado, que pode evitar reinfecções de esporos nas várias fases de desenvolvimento da planta. A quitosana pode exercer várias funções na manifestação da atividade antifúngica ou na inibição de esporos, como a criação de barreiras estruturais sobre a membrana que podem restringir o desenvolvimento, bem como atrasar a retomada do desenvolvimento de infecções quiescentes ou então, pode atuar de modo a ativar várias respostas de defesa no tecido vegetal que incluem o acúmulo de *quitinases*, síntese de inibidores de proteinase e lignificação e indução da síntese de calose (AGRAWAL et al., 2002; EL GHOUTH et al., 1994) o que pode não ser observado de imediato por meio das análises realizadas neste artigo, necessitando de mais tempo de acompanhamento da estrutura vegetal.

Tabela 31 – Avaliação do crescimento micelial *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Amostras	Massa molar (g.mol ⁻¹)	GD (%) ^a	Crescimento micelial médio (cm) ^b
Controle negativo	-----	-----	0,771 b
Quitosana Comercial (controle positivo)	200 – 310	83,52	0,836 a
DS _{9h}	177 – 245	80,46	0,807 ab
DS _{MICRO}	348,7 – 459,6	82,77	0,793 ab
DS _{SULTRA}	182,5 – 203,6	80,19	0,837 a

^a Amostras de quitosana com GD maior que 75% consideradas como adequadas para uma amostra comercial (SIGMA-ALDRICH, 2019).

^b Dados médios apresentados como média ± erro padrão de seis repetições.

Tabela 32 – Esporulação de *C. gloeosporioides*

Amostras	Esporulação (esporos/mL) ^a	Inibição (%)
Controle negativo	265.833 ± 19.523 a	0
Quitosana comercial	150.500 ± 27.608 d	43,38
DS _{9h}	215.333 ± 16.669 b	19,00
DS _{MICRO}	185.833 ± 17.537 c	30,09
DS _{SULTRA}	186.000 ± 22.862 c	31,16

^a Dados médios apresentados como média ± erro padrão de seis repetições

1.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O processo de extração da quitina e síntese de quitosana foi realizado com sucesso a partir de cascas de camarão obtidas na Colônia Z3 de Pelotas-RS. As caracterizações dos principais parâmetros físico-químicos foram realizadas por técnicas simples e de baixo custo, tais como: determinação do teor de umidade, cinzas e nitrogênio, granulometria, massa molar viscosimetria e determinação do grau de desacetilação por titulação potenciométrica. As caracterizações estruturais dos polímeros foram avaliadas por espectroscopia na região do infravermelho, difração de raios X em pó, microscopia de força atômica, microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de dispersão eletrônica. Todas as análises em conjunto permitiram acompanhar as etapas do processo de extração da quitina e síntese de quitosana, com a comprovação da qualidade das amostras de quitosana sintetizadas, em comparação com uma amostra comercial e com dados da literatura. Diferentes metodologias de síntese foram empregadas, com destaque para quitosana sintetizada por meio de radiação de micro-ondas, devido a sua qualidade e rendimento em função do menor tempo de reação, em comparação com as demais metodologias avaliadas (aquecimento convencional em banho de óleo e sistema de refluxo, e radiação de ultrassom). A síntese de quitosana por micro-ondas apresentou alto grau de desacetilação, alto peso molecular e alta cristalinidade.

Todas as amostras de quitosana, incluindo a amostra comercial e as amostras sintetizadas no Laboratório de Sólidos Inorgânicos (LASIR), apesar de suas variações no grau de desacetilação, massa molar média, constituição e superfície, não mostraram potencial significativo na inibição do crescimento micelial do fungo *Colletotrichum Gloeosporioides*. No entanto, essas amostras evidenciaram capacidade de redução na esporulação desse fungo na ordem de 30-43%, o que é um bom resultado em virtude da fácil disseminação da doença, antracnose, por meio dos esporos, em todas as fases de desenvolvimento das goiabeiras.

CAPÍTULO 2

Síntese e caracterização de quitosana triazenídica, suporte em filmes de quitosana, avaliação na adsorção e complexação de cobre(II) e cobalto(II), atividade antifúngica e em reações de catálise em síntese orgânica

2.1 INTRODUÇÃO

A quitosana destaca-se por apresentar vantajosas propriedades, como disponibilidade, baixo custo, ser biocompatível e biodegradável. Essas propriedades a tornam biologicamente e quimicamente aceitável sendo muito atraente em diversos campos (EL KNIDRI et al., 2018; PAL et al., 2021). Por suas vantajosas características como: biocompatível, biodegradável, não tóxico, formar filmes, além de ter aprovação como aditivo alimentar pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos (EUA) (PAL et al., 2021). Os filmes de quitosana associados a substâncias naturais como o ácido cítrico ou óleos essenciais atuam como revestimento comestíveis na proteção das frutas e com ação fungicida satisfatória comparado aos fungicidas sintéticos (DOS PASSOS BRAGA et al., 2019; ESPAÑA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2018; SOARES; LOURENÇO; AMORIM, 2008).

Os filmes de quitosana como revestimentos comestíveis associados a substâncias naturais e biodegradáveis são considerados tecnologias amigáveis ao meio ambiente (KUMAR; MUKHERJEE; DUTTA, 2020; MUJTABA et al., 2019). Eles têm recebido atenção como uma estratégia para aumentar o tempo de armazenamento e manutenção da qualidade, inibir a antracnose da espécie *Colletotrichum gloeosporioides* uma das principais infecções pós colheita comum em goiaba e reduzir o uso de fungicidas sintéticos (NASCIMENTO et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2020, 2018).

Outro emprego para a quitosana é como adsorvente, pois a quitosana possui propriedades de adsorção notáveis devido à presença de grupos amina e hidroxila (altamente reativos) que atuam como sítios ativos para adsorção de íons metálicos, além da disponibilidade e do baixo custo (VIDAL; MORAES, 2019). Outras características da quitosana que a tornam um adsorvente atraente são hidrofiliabilidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade, propriedades de adsorção, capacidade de formação de filme, bioadesivos, polifuncionalidade (PAL et al., 2021; QU; LUO, 2020).

O tratamento de águas residuais com íons de metais pesados é uma questão importante e o desenvolvimento de adsorventes eficazes para a remoção desses íons de metal é de grande importância. Os metais pesados não são biodegradáveis e permanecem no corpo humano ou meio ambiente por

muito tempo (SHETH et al., 2021; VIDAL; MORAES, 2019). Entre os metais mais comuns encontrados em águas residuais estão o cobre e o cobalto e apesar de desempenharem um papel essencial no metabolismo humano, em concentrações elevadas pode causar toxicidade ao ambiente e ao ser humano. Portanto, deve ser realizado um tratamento prévio destes efluentes antes do descarte (AL-SAYDEH; EL-NAAS; ZAIDI, 2017; VAKILI et al., 2019).

A legislação ambiental cita que a exposição ocupacional ao cobre e cobalto são nocivos à saúde, no entanto define um valor máximo permitido de 2,0 mg/L apenas para o cobre (BRASIL, 2017).

Filmes de quitosana são excelentes adsorventes devido à facilidade de remoção após tratamento sem necessidade de técnicas de separação adicionais e pela possibilidade de reutilização conforme suas propriedades mecânicas (FAJARDO et al., 2012; HUO et al., 2021; LUCENA et al., 2015; MARQUES et al., 2019; VIEIRA, 2008). No entanto, pelo fato da quitosana ser solúvel em meio ácido, se justifica a necessidade de modificação estrutural para uso com adsorvente eficiente (BEGUM et al., 2021; MOHAMMADZADEH PAKDEL; PEIGHAMBARDOUST, 2018; VIDAL; MORAES, 2019).

Os grupos amina presentes na molécula da quitosana são aminas primárias, sendo esse o principal grupo para modificação estrutural em quitosana. Um exemplo de modificação possível em grupos amino consiste em reações com formação de sal de diazônio (BARBOSA, 2011; BECK; HÖRNER; DITTMANN, 2009; HÖRNER et al., 2004; SOLOMONS; FRYHLE, 2006). Os sais de diazônio têm sido amplamente utilizados em reações de acoplamento e na modificação de superfície de biopolímeros, com destaque para seu preparo simplificado e pela possibilidade de ser substituído por um grande número de grupos orgânicos (LI et al., 2021).

Filmes de quitosana modificados com diversos reticulantes já foram estudados para a adsorção de íons de cobre e cobalto em solução aquosa. Autores destacam a eficiência de remoção de íons de cobre(II) pela quitosana modificada com álcool polivinílico (PVA) (ANBINDER et al., 2019; KULKARNI et al., 2020; SAHEBJAMEE et al., 2019) e remoção de cobalto(II) por filmes de quitosana modificados com montmorilonita (MMT) (WANG et al., 2014a) e com cianoetil (ZHANG; ZHUANG; WANG, 2020).

Estudos de FT-IV confirmaram a formação do complexo Cu-NH₂ e que os grupos aminos da quitosana desempenham papéis importantes na absorção de cobre e cobalto. Autores discutem mecanismos e apresentam ilustrações sugerindo a interação entre os íons de cobre (II) e cobalto (II) ao filme de quitosana principalmente no grupo amino (ANBINDER et al., 2019; KULKARNI et al., 2020; SARODE et al., 2019; WANG et al., 2014a; ZHANG; ZHUANG; WANG, 2020).

Existem diversos estudos sobre os mecanismos que envolvem a sorção de íons de metais, por matrizes de quitosana (filmes, grânulos, hidrogel, entre outras), porém eles ainda não são totalmente compreendidos e, portanto, vários artigos de revisão destacam a necessidade de explorar os mecanismos de forma mais precisa a auxiliar a compreensão do processo à nível molecular (AL-SAYDEH; EL-NAAS; ZAIDI, 2017; BEGUM et al., 2021; SHETH et al., 2021; UPADHYAY et al., 2021; VIDAL; MORAES, 2019).

Os grupos amina presentes na molécula da quitosana são aminas primárias e em reação com o ácido nitroso, formado *in situ*, formam o sal de diazônio (BARBOSA, 2011; SOLOMONS; FRYHLE, 2006). Sais de diazônio acoplados com diversos compostos aromáticos ou alifáticos dão origem aos azocompostos que são compostos que apresentam em sua estrutura a unidade (-N=N-). Eles são normalmente coloridos e constituem uma parte importante da indústria de corantes (BARBOSA, 2011). São de diazônio oriundos de grupos amina e hidroxiaminas originam, respectivamente, triazenos (-N=N-N(H)-) e hidroxitriazenos (-N=N-N(OH)-) (BECK; HÖRNER; DITTMANN, 2009; HÖRNER et al., 2004; PARAGINSKI et al., 2016; SANTOS et al., 2014, 2016).

Pesquisas com quitosana e sais de diazônio são raras na literatura. Pereira (2016) descreve modificações estruturais feitas na cadeia lateral da quitosana modificada (bases de Schiff) acoplado a diferentes sais de diazônio produzindo uma nova classe de compostos poli-azóicos a partir da quitosana, para investigar a influência de diferentes substituintes na complexação de metais.

O material produzido a partir de sais de diazônio e quitosana podem ter empregos na química de coordenação e catálise. O paládio é reconhecido, como o catalisador de metal de transição mais útil para a formação de ligações carbono-carbono devido às suas atividades catalíticas superiores em várias

reações de transformação orgânica (JOO et al., 2020). A reação de Suzuki é uma importante reação de acoplamento orgânico entre reagentes de organoboro com organohaleto, que utilizam como catalisador o complexo de paládio (DONG et al., 2021; MIESSLER; FISCHER; TARR, 2014). Diversos estudos detêm foco no desempenho e eficiência da reação Suzuki-Miyaura, sempre no intuito de tornar o processo mais limpo, numa perspectiva da química verde (JOO et al., 2020; SHAIKH; PAMIDIMUKKALA, 2021).

Dentre os diversos biopolímeros já usados como suporte para estabilizar o paládio, a quitosana apresentou-se ser um potencial suporte, eficiente e ecológico para o sistema de catalisador de paládio devido à sua ocorrência natural, baixo custo, abundância e fácil interação com solventes ecológicos, atóxicos. Além disso, a quitosana tem vantagens adicionais devido sua alta reatividade, por conter grupos NH_2 e OH abundantes, que podem quelar fortemente com íons Pd ou atuar como um agente redutor para formar nanopartículas de metal que são estabilizadas no suporte (SHAIKH; PAMIDIMUKKALA, 2021).

Matrizes de ligantes baseados em nitrogênio para reações de Suzuki-Miyaura têm sido objeto de estudo pela facilidade de manuseio e por tolerar umidade. Nesse sentido, ligantes de base de Schiff foram considerados como melhores sistemas de ligantes para reações de acoplamento Suzuki-Miyaura catalisadas por paládio assistido por ligante fosfina (JOO et al., 2020).

Portanto, vários estudos vem sendo relatados sobre biopolímeros acoplados a bases de Schiff para aplicações catalíticas e na maioria dos estudos, a condensação de base de Schiff têm sido usada como estratégia para ancorar o paládio em suportes (DAS; LINERT, 2016). Nesse contexto, a quitosana modificada pela inserção de agente quelante surge como uma opção promissora, devido suas vantajosas características já conhecidas, de suporte ou agente estabilizante do paládio nas reações de Suzuki-Miyaura. (ALKABLI et al., 2021; DONG et al., 2021; JOO et al., 2020; VEISI et al., 2021)

Devido à ampla gama de aplicações das reações de Suzuki-Miyaura, existe um considerável interesse nesta área com foco voltado para o desenvolvimento de catalisadores mais eficientes e recicláveis para aplicações industriais em processos que envolvem a reação de Suzuki-Miyaura, numa

perspectiva mais ecológica (MCCARTHY; BRADDOCK; WILTON-ELY, 2021; SHAIKH; PAMIDIMUKKALA, 2021).

Portanto, desenvolver produtos poliméricos inéditos para atuação como sistemas catalíticos heterogêneos, com base na quitosana modificada, com estruturas intrínsecas versáteis, pode ser uma alternativa, com uma proposta mais direcionada ao caminho ecossustentável, tão requisitado na química verde. Nesse sentido, a investigação da quitosana modificada com sal de diazônio como um novo suporte para imobilizar/estabilizar o paládio pode ser um candidato alternativo a ser explorado, como suporte polimérico para aplicações futuras.

O objetivo geral desse estudo, no capítulo 2, foi sintetizar e caracterizar filmes de quitosana produzindo F-COM (a partir de quitosana comercial – COM) e F-DS_{9h} (a partir de quitosana sintetizada no capítulo 1 – DS_{9h}). Além disso, objetiva-se, também, propor de maneira inédita o uso de quitosana na síntese de compostos da classe “*azo compostos*” (quitosana triazenídica), chamados nessa tese de compostos C-01 (a partir de quitosana comercial – COM) e C-02 (a partir de quitosana sintetizada – DS_{9h}), bem como suportar os compostos C-01 e C-02 visando a modificação dos filmes de quitosana para a obtenção de filmes F-COM/C-01 e F-DS_{9h}/C-02. Ademais, esse estudo investigou três aplicações distintas: avaliação antifúngica de filmes e compostos contra o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* causador da doença chamada de antracnose em goiabeiras; avaliação catalítica dos filmes impregnados com nanopartículas de paládio(0) em reações de acoplamento cruzado de Suzuki-Miyaura; e avaliação dos filmes na adsorção de íons Cu(II) e o Co(II) em meio aquoso.

2.2 METODOLOGIA

2.2.1 Reagentes

Os reagentes químicos de grau analítico (PA) foram utilizados sem tratamento prévio. A água utilizada foi obtida a partir de um deionizador da marca Quimis Q342, por osmose reversa. Foram utilizados os seguintes reagentes: nitrito de sódio PA (NaNO₂, Synth); ácido sulfúrico PA (H₂SO₄, Vetec), ácido

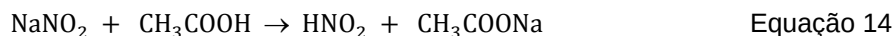
acético glacial PA (CH_3COOH , Synth), hidróxido de amônio PA (NH_4OH , Vetec); sulfato de cobre (II) penta hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Dinâmica) e sulfato de cobalto heptahidratado (II) ($\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Dinâmica) e quitosana de médio peso molecular (lote ST9F3507, Sigma-Aldrich).

2.2.2 Síntese de quitosana triazenídica

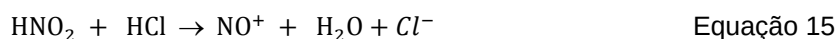
A quitosana triazenídica representada com compostos da classe azo foram sintetizados e denominados de compostos C-01 e C-02, partindo de quitosana comercial (COM) e quitosana sintetizada no LASIR ($\text{DS}_{9\text{h}}$), respectivamente. Uma amostra de 0,1 g de quitosana foi dissolvida em 20 mL de solução aquosa de ácido acético 3%, sob agitação constante, formando uma solução viscosa. Um volume de 1 mL de solução aquosa nitrito de sódio (NaNO_2) $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$ foi adicionada lentamente formando uma solução levemente amarelada característica de sal de diazônio. O meio de reação foi mantido sob agitação constante, por 1 h e em temperatura controlada ($\sim 0\text{-}5^\circ\text{C}$, banho de gelo). Na segunda hora, foi adicionado estequiometricamente uma solução de quitosana. A solução manteve-se com coloração levemente amarelada. A reação permaneceu em agitação por mais 1 h, em temperatura controlada. O pH do meio de reação era de $\sim 5,5$. Ao final da segunda hora a solução foi neutralizada até pH 7 com solução de hidróxido de amônio. A solução neutralizada de coloração amarela foi levada à estufa até a secagem total, à temperatura de 50°C , por 36 h. Após, o produto sólido formado, de cor marrom brilhante foi pesado e o rendimento foi calculado para C-01 (91,6%) e C-02 (84,6%) com base no somatório das massas dos constituintes adicionados. Essa metodologia representa a síntese de C-01 com quitosana comercial (COM) e C-02 com quitosana sintetizada pelo método convencional de sistema de refluxo e aquecimento por 9h ($\text{DS}_{9\text{h}}$). Essa metodologia inédita de síntese de C-01 e C-02 foi adaptada de Santos et al. (2016), Blank, Hirdes e Santos (2019) e Santos et al. (2017). O ponto de fusão para ambos os compostos C-01 e C-02 foi de 155°C , já o ponto de fusão da quitosana comercial (COM) e da quitosana sintetizada ($\text{DS}_{9\text{h}}$) foi de 218 e 231°C , respectivamente. Ambos compostos (C-01 e C-02) apresentaram coloração marrom escura após a secagem. A síntese de C-01 e C-02 segue por etapas. Num primeiro momento, o nitrito de sódio aquoso reage

em meio ácido, neste caso em meio de ácido acético aquoso, formando ácido nitroso e como subproduto acetato de sódio (Equação 14). O ácido nitroso preparado *in situ*, forma o íon nitrosônio ($N \equiv O^+ \leftrightarrow ^+N = O$) intermediário da reação, com a liberação de água, de acordo com a equação 15.

Equação 14 – Reação de formação do ácido nitroso



Equação 15 – Reação de formação do íon nitrosônio



O nitrogênio deste íon, por estar deficiente em elétrons, é atacado pelo par de elétrons do nitrogênio do grupo amino da quitosana. Em uma sequência de reações ácido-base de Lewis, em presença de água e hidrônio, finalmente ocorre a formação do sal de diazônio ($-^+N \equiv N$) ligado à quitosana. Os sais de diazônio são estáveis em temperatura entre 0 – 5 °C e em meio ácido, sendo os responsáveis pela formação dos azocompostos. Azocompostos apresentam em sua estrutura a unidade -N=N-, já os triazenos apresentam a unidade -N=N-N(H)-. Como é adicionada uma quantidade estequiométrica de quitosana ao meio de reação, o objetivo é a síntese de triazeno por meio de ligações de sais de diazônio dos grupos amino da quitosana com grupos amino de outras unidades de quitosana. Com base na literatura, no procedimento adotado e nas condições reacionais sugere-se um mecanismo (Figura 26) para formação do composto diazônico e o triazeno derivado da quitosana (BARBOSA, 2011; SOLOMONS; FRYHLE; SNYDER, 2018).

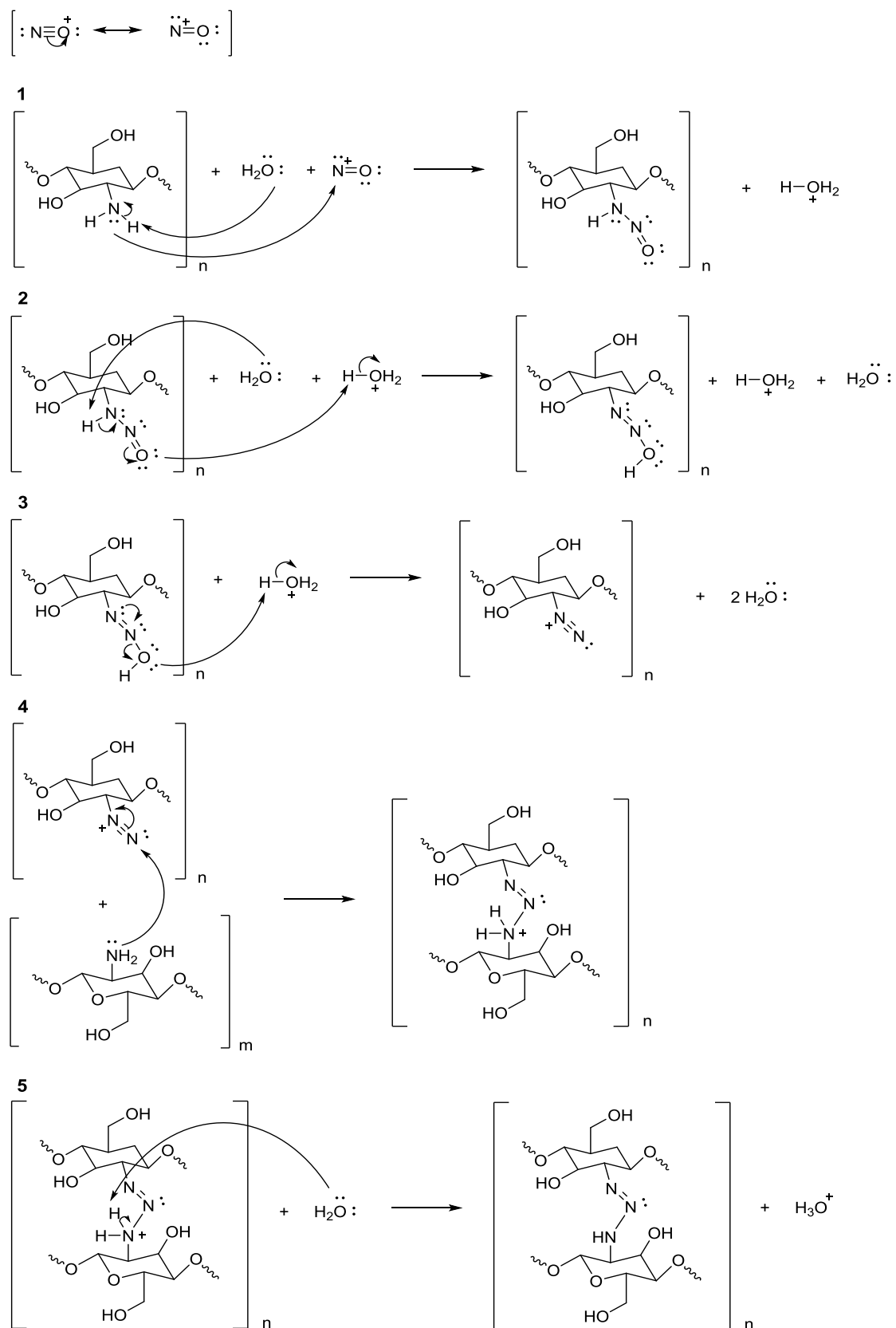


Figura 26 – Proposta de mecanismo para a formação do composto diazônico e o triazeno derivado da quitosana.

No geral, o mecanismo propõe a interação da quitosana com o íon nitrosônio, seguido da formação do íon diazônio no meio de reação e, por último, sua reação com a quitosana, na formação do triazeno (compostos C-01 e C-02). O mecanismo foi dividido em reações de 1-5.

O íon nitrosônio sofre um ataque eletrofílico do grupo amino da quitosana em uma reação ácido-base de Lewis, ao mesmo tempo em que a água se comporta como base de Lewis e retira um próton (H^+) do grupo amino da quitosana, com consequente quebra da ligação N-H (Reação 1). A água realiza novamente uma reação ácido-base de Lewis, nesse caso uma desprotonação, ao mesmo tempo em que o nitrosônio é protonado e a ligação dupla passa a outra posição (Reação 2). Na reação 3, o íon nitrosônico é novamente protonado, o que acarreta na quebra da ligação (N-OH), seguido da reorganização dos pares de elétrons e formação de uma ligação tripla na constituição do íon diazônio ($-^+N \equiv N$). Esse íon se estabiliza por ressonância, em meio ácido, formando o sal de diazônio.

O sal de diazônio, reação 4, vai reagir estequiometricamente com o grupo amino de outra cadeia polimérica de quitosana. Essas reações ocorrerão entre unidades de quitosana de maneira a formar ligações nas cadeias de quitosana (Reação 4). Neste caso, a cadeia triazênica atua como um *crosslink* entre as cadeias poliméricas de quitosana e evidencia um sítio quelante ($-N(H)-N=N-$) nos compostos C-01 e C-02, sendo ambos classificados como azocompostos ou triazenos (Figura 27). A formação desses compostos tem relação direta com o GD%, ou melhor, com a quantidade de grupos aminos presentes da estrutura polimérica da quitosana possíveis de serem diazotados no processo de formação do sal de diazônio.

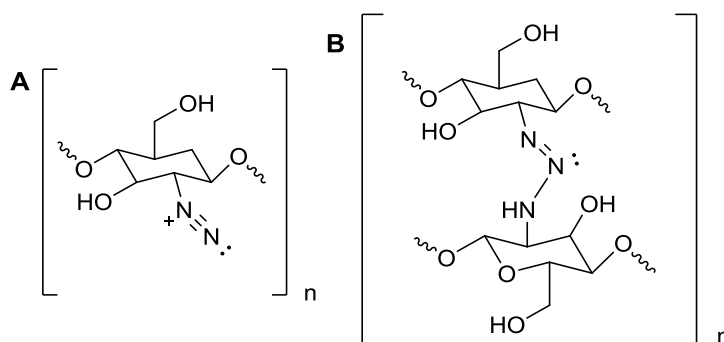


Figura 27 – Proposta de representação molecular da quitosana azo-modificada (A) e quitosana triazenídica (B).

2.2.3 Síntese de filmes de quitosana

Filmes de quitosana sintetizada (F-DS_{9h}) e comercial (F-COM) foram sintetizados a partir de uma solução 0,5% (m:v) de quitosana, isto é, 0,5 g de quitosana em 100 mL de solução de ácido acético 3%. Um volume de 20 mL de solução foi preparado, sob agitação lenta, por 1 hora, até completa dissolução. A solução filmogênica foi vertida numa placa de Petri de 49x15 mm e permaneceu em repouso por 72 horas em dessecador para retirada as bolhas de ar existentes devido à agitação magnética. Após, a placa foi levada à estufa para secagem a 45±5 °C por 36 h e, posteriormente, foi mantida em dessecador. Houve a formação de um filme homogêneo de coloração levemente amarelada.



Figura 28 – Filme de quitosana F-COM (esquerda) e DS_{9h} (direita)

Filmes de quitosana modificada (F-COM/C-01 e F-DS_{9h}/C-02) foram sintetizados com a inserção de C-01 e C-02. A solução filmogênica foi preparada de acordo com a descrição anterior, no entanto para receber C-01 ou C-02 em cada caso específico, o volume da solução de quitosana foi reduzido para 10 mL de solução de ácido acético 3%, já que o volume restante de 10 mL de solução ácida é destinado à solubilização de C-01 e C-02.

Em um graal foi pesado 0,01 g de C-01 ou C-02 e macerado com o pistilo, após macerar bem, o produto foi gotejado com parte da solução de 10 mL de ácido acético 3%. A solução foi transferida para um béquer com o auxílio de uma espátula e da pipeta de Pasteur e foi acrescentado o restante da solução ácida, lavando bem o graal. A solução foi mantida sob aquecimento a 70 °C e agitação lenta até dissolução completa do composto e formação de uma solução marrom (~ 2h). Após a solução foi filtrada à quente em papel filtro para retirar possíveis impurezas da solução e o filtrado foi avolumado até 10 mL.

Após o preparo das soluções dos compostos C-01 e C-02, estas foram adicionadas lentamente (gota-a-gota) ao béquer que continha a solução de quitosana (COM e DS_{9h}). Após a mistura das soluções, sob agitação magnética lenta, o conteúdo do béquer foi vertido para uma placa de Petri de 49x15 mm compondo um volume de 20 mL e foi deixada em repouso por 72 horas em dessecador para retirada das bolhas de ar existentes. Após, a placa foi levada à estufa para secagem à 45±5 °C por 36 h e, posteriormente, foi mantida em dessecador.

A concentração de quitosana nos filmes modificados permaneceu 0,5% (m:v) e a concentração resultante dos compostos triazenos foi de 0,05% (m:v) tanto para C-01 quanto para C-02. Houve a formação de filmes homogêneos de cor marrom semelhante aos compostos C-01 e C-02.

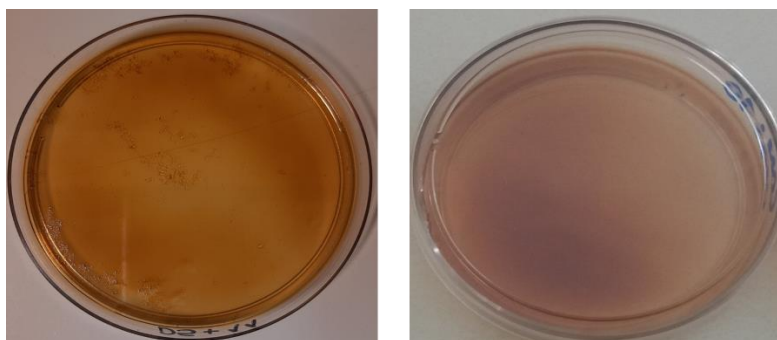


Figura 29 – Filme de quitosana modificada F-COM/C-01 (esquerda) e DS_{9h}/C-02 (direita)

2.2.4 Filmes contendo íons cobre (II) e cobalto (II)

Às soluções filmogênicas de quitosana (F-COM e F-DS_{9h}) e quitosana modificada (F-COM/C-01 e F-DS_{9h}/C-02) foi adicionado 1 mL de solução aquosa 5 mmol (0,05 mol.L⁻¹) e 50 mmol (0,05 mol.L⁻¹) de cada uma dos sais de sulfato de cobre(II) e sulfato de cobalto(II). O procedimento de secagem é o mesmo descrito para o preparo dos filmes de quitosana e quitosana modificada. Houve a formação de filmes homogêneos, tendo coloração verde característica de cobre(II) hidratado, coloração marrom característica do cobre(II) coordenado e de coloração rosa para os filmes contendo cobalto(II). (Figura 30).

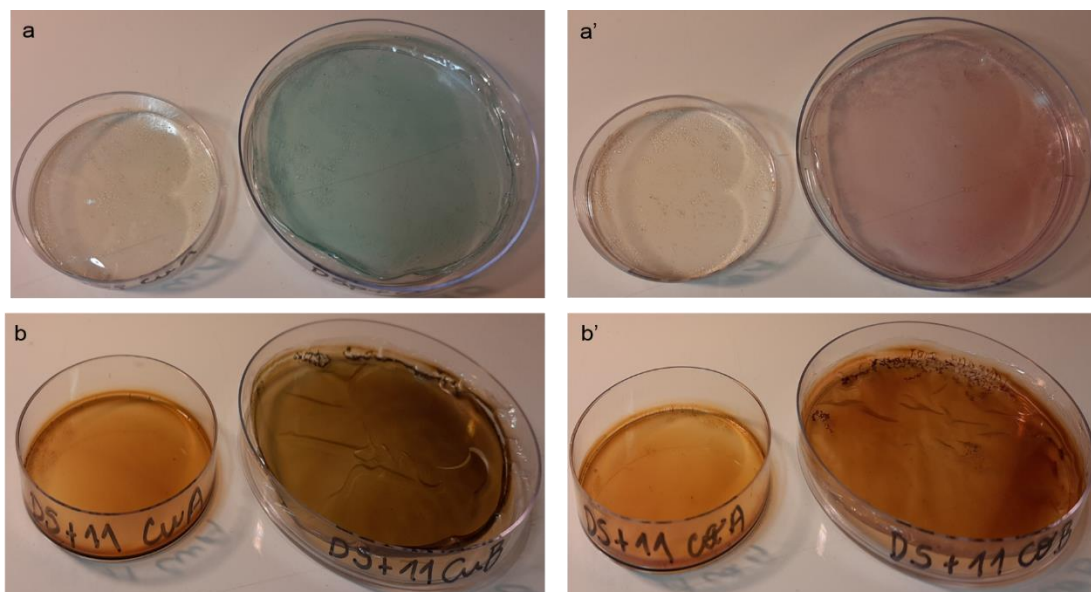


Figura 30 – Soluções $0,005 \text{ mol.L}^{-1}$ localizam-se à esquerda em cada imagem e $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ à direita. (a e b) Sulfato de cobre(II). (a' e b') Sulfato de cobalto(II) (a'). (a e a') Filmes F-DS_{9h}. (b e b') Filmes F-DS_{9h}/C-02..

Os íons metálicos escolhidos nesta tese foram Cu(II) e Co(II) por serem íons de transição fisiológicos a muitos seres vivos, mas que em excesso são tóxicos, ao mesmo tempo que podem ser poluentes ambientais.

2.2.5 Caracterizações

As caracterizações empregadas nas amostras estão descritas na Tabela 33.

Tabela 33 - Caracterizações realizadas

Caracterização	Equipamentos	Amostras	Referência
Espectroscopia de Infravermelho (FT-IV)	Shimadzu IRAffinity-1	F-DS _{9h} ^(A,B) F-COM ^(A,B) F-DS _{9h} /C-02 ^(A,B) F-COM/C-01 ^(A,B)	(ANBINDER et al., 2019; ZHANG; ZHUANG; WANG, 2020)
Espectroscopia de Ultravioleta (UV-Vis)	Shimadzu UV-1800		(AHMAD et al., 2019; WANG, 2018)
Termogravimetria (TGA/DTG)	Shimadzu – TA-60WS		(HOMEZ-JARA et al., 2018; KUMARI et al., 2015)
Difração de Raio X (DRX)	Rigaku – Modelo ULTIMA IV		(EL KNIDRI et al., 2019; IOELOVICH, 2014)
Microscopia de Força Atômica (AFM)	Agilent Technologies modelo 5500		(BHATT et al., 2017; SAZANOVA; OTVAGINA; VOROTYNTSEV, 2018)
Microscopia Eletrônica de Varredura/ Espectroscopia de Energia Dispersiva (MEV/EDS)	Jeol, JSM – 6610LV		(EL KNIDRI et al., 2016; POERIO et al., 2020)
Espectroscopia de Infravermelho (FT-IV)	Shimadzu IRAffinity-1		(SANTOS et al., 2016)
Determinação do Ponto de Fusão	Quimis Q340S023	C-01 C-02	(BLANK; HIRDES; SANTOS, 2019)
Termogravimetria (TGA/DTG)	Shimadzu – TA-60WS		(PARAGINSKI et al., 2016)
Análise Mecânico-Dinâmica (AMD)	DMA800	F-DS _{9h} ^(A,B) F-COM ^(A,B) F-DS _{9h} /C-02 ^(A,B) F-COM/C-01 ^(A,B)	(NATARAJ et al., 2018)

(A, B) Filmes com adição de soluções aquosas de íons metálicos: sulfato de cobre(II) e sulfato de cobalto(II) nas concentrações: A = 0,05 mol.L⁻¹ e B = 0,005 mol.L⁻¹

2.2.5.1 Espectroscopia na região do infravermelho (FT-IV)

Os espectros na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IV) foram obtidos com o acessório de refletância total atenuada (ATR) em um intervalo de varredura de 400 a 4000 cm⁻¹ e resolução de 4 cm⁻¹. Os filmes foram secos previamente em estufa a 40 °C por 12 h. Essa análise foi realizada na Central Analítica do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA), UFPEL. Os dados foram plotados em espectros de transmitância (u.a.) *versus* número de onda (nm).

2.2.5.2 Espectroscopia na região do ultravioleta (UV-Vis)

Os espectros de absorção na região do ultravioleta foram obtidos com um espectrofotômetro ultravioleta Shimadzu, modelo UV-1800 em uma faixa de varredura de 200 a 1000 nm. As medidas foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia da Unipampa, campus Bagé.

2.2.5.3 Medidas termogravimétricas (TGA/DTG)

A análise termogravimétrica foi realizada utilizando o analisador TGA/DTG simultâneo usando massa de cada filme entre 2,0 – 10 mg, em cadinho de platina, com rampa de aquecimento de 20 - 500 °C, razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ e sob atmosfera dinâmica de nitrogênio gasoso com vazão de 50 mL.min⁻¹.

Tanto o perfil de decomposição e quanto a estabilidade térmica das amostras foram avaliados. Os dados obtidos a partir dos termogramas foram avaliados no software TA-60WS e editados no Origin 7.0. A análise foi realizada na Central Analítica do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA), UFPel.

2.2.5.4 Difração de raios X (DRX)

O difratômetro de raios X utilizado atua com radiação da linha CuK α ($\lambda=1,54$ Å) e potência de 40kV/20mA. A geometria de Bragg-Brentano foi empregada com varredura em 2θ no intervalo de 2° a 70° e tempo de integração de 1s com passo de 0,05°. As medidas foram realizadas no Laboratório de Raios X (Grupo Nanoestruturados – PPCEM) da Unipampa, campus Bagé.

2.2.5.5 Microscopia de força atômica (AFM)

As imagens topográficas da AFM foram obtidas à temperatura ambiente e realizadas no modo contato (Contact Mode), fazendo uso de pontas PPP-Cont da Nanosensors. Constante de mola de 0,2 N/m foi utilizado para adquirir simultaneamente a topografia da superfície e imagens de fase.

As medidas de AFM foram realizadas na parte superior e inferior dos filmes confeccionados nas placas de Petri, no entanto, como não houve

diferenças considerável nas imagens obtidas, são apresentadas nessa tese somente as imagens obtidas da parte superior dos filmes.

A topografia da superfície dos filmes foi avaliada em 2 categorias, sendo as mesmas descritas na metodologia do Cap. 1: (1) parâmetros de amplitude - rugosidade quadrática média da raiz (RMS), altura máxima (S_z), coeficiente de assimetria (S_{sk}) e coeficiente de curtose (S_k); (2) parâmetro espacial - entropia (H). As medidas foram realizadas no Laboratório de Microscopia de Força Atômica (LabAFM) da UNIPAMPA, campus Bagé.

2.2.5.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

Para a EDS, os filmes foram previamente preparados utilizando "sputtering" de ouro (Denton Vacuum Desk V), para melhorar a condutibilidade; foi utilizada uma corrente de 20 mA, por 120 s. A MEV foi realizada com uma voltagem de aceleração de 10 kV e a faixa de magnificação variou de 30 a 300.000 vezes. As imagens (micrografias) foram obtidas com resolução de 512 x 384 pixels, tamanho de 0,24 μm e uma ampliação de 2000x (CEMESUL – FURG).

2.2.5.7 Análise mecânico dinâmica (AMD) – Ensaios de tração

Os ensaios de tração foram realizados para obtenção da curva tensão *versus* deformação, no modo de força controlada, utilizando o suporte de tração para filmes. Os ensaios foram realizados no mínimo em triplicata à 30 °C com uma taxa de aplicação de força de 3 N/min até atingir força máxima de 18 N. A média e o desvio padrão dos ensaios de tração foram calculados, tensão de ruptura, módulo de elasticidade (MPa) e deformação (%). As dimensões das amostras foram de aproximadamente 3,00 x 1,00 cm e espessura de aproximadamente 0,01 cm.

A curva tensão *versus* deformação, bem como os dados de tensão de ruptura (TR) foram obtidos pelo software Universal Analysis V4.5A e os dados foram editados no Origin 7.0.

O módulo de elasticidade (Equação 16) em tração ou módulo de Young (E) é definido pela razão entre a tensão de tração e a deformação correspondente, abaixo do limite de proporcionalidade do material e é expressa em termo de força por unidade de área (MPa) de acordo com a norma ASTM-E111 (1997).

Equação 16 – Determinação do módulo de elasticidade

$$E = \frac{\delta}{\varepsilon_{(t,T)}} \quad \text{Equação 16}$$

Onde, E é o módulo de elasticidade; δ a tensão de ruptura, ε a deformação de tração, t o tempo de ensaio e T a temperatura do ensaio.

As análises foram realizadas no Analisador Mecânico-Dinâmico (AMD) Q800TM da TA Instruments (Figura 31), no Laboratório de EERA – 1104, Unipampa, Campus Bagé.



Figura 31 – Analisador mecânico-dinâmico (AMD) Q800TM (esquerda). Suporte de tração com a amostra de filme em destaque (direita).

2.2.6 Aplicações

Os filmes foram avaliados conforme suas aplicações de acordo com a Tabela 34.

Tabela 34 - Aplicações realizadas

Aplicação	Amostras	Referência
Potencial antifúngico	F-DS _{9h}	(BAUTISTA-BAÑOS et al., 2003; EL GHOUTH et al., 1994)
Adsorção de Cu(II) e Co(II)	F-COM F-DS _{9h} /C-02	(NEGM et al., 2015; SHETH et al., 2021)
Potencial adjuvante em catálise	F-COM/C-01	(NASCIMENTO et al., 2020)

2.2.6.1 Atividade antifúngica

A linhagem de *Colletotrichum gloeosporioides* utilizada nessa avaliação foi obtida da coleção de microrganismos de interesse ao controle biológico de pragas, vinculada à Embrapa Clima Temperado, com código de acesso CPACT 651, oriunda de frutos de goiabeira infectados com antracnose. A colônia foi mantida em meio de cultura BDA (batata, dextrose, ágar), à 4° C, até sua utilização no ensaio em questão.

O potencial de antifúngico foi avaliado para as soluções filmogênicas F-DS_{9h}, F-DS_{9h}/C-02, F-COM e F-COM/C-01; para as soluções de C-01 e C-2 em ácido acético 0,25% e para as soluções aquosas de ácido acético 0,25% (empregada nessa atividade antifúngica) e 3% (empregada na confecção dos filmes). Um diferencial deve ser destacado referente à concentração de ácido acético nas soluções. Solução 3% foi empregada na confecção dos filmes desse capítulo, no entanto estudos anteriores indicaram que essa concentração é tóxica ao fungo e à planta (goiabeira) não podendo ser empregada nas avaliações antifúngicas. Por esse motivo que a concentração ácida de 0,25% foi a escolhida para a preparação das soluções filmogênicas e para a diluição de C-01 e C-02.

A avaliação ocorreu contra o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* e foi determinada com base em bioensaio *in vitro* destinado a avaliar o crescimento fúngico (para avaliar a ação sobre a estrutura vegetativa) e a esporulação (para avaliar a ação sobre a estrutura reprodutiva). Quitosana já é relatada na literatura por seu potencial antifúngico contra *C. gloeosporioides* (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2003; EL GHOUTH et al., 1994).

A concentração de quitosana empregada nas avaliações foi previamente definida na proporção de 0,6% (m:v) em solução em ácido acético 0,25% (v:v) (FRÁGUAS et al., 2015). Tween 80 foi adicionado na proporção de 0,046% (v:v) para melhor emulsificação, sob agitação constante.

Para avaliação do crescimento micelial fúngico, procedeu-se à deposição individual de alíquotas de 100 µL de cada solução preparada na superfície de meio de cultura BDA solidificado e contido em placas de Petri de 9 cm de diâmetro (SEIXAS et al., 2011). Água esterilizada foi utilizada como controle negativo. Os ensaios foram realizados em capela de fluxo laminar para manutenção das condições de assepsia. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, constituído de cinco repetições, sendo cada parcela representada por uma placa de Petri.

Após, um disco de micélio de 5 mm de diâmetro foi depositado na porção central de cada placa de Petri. A seguir as placas foram vedadas e mantidas em BOD, à 25 °C, sob fotoperíodo diário de 12 horas. Esse disco foi obtido da colônia de *C. gloeosporioides* cultivada previamente no mesmo meio de cultura, em condições de demanda bioquímica de oxigênio (BOD), por 20 dias, à 25 °C e fotoperíodo de 12 horas.

As avaliações diárias de cada placa foram realizadas por meio de medições do diâmetro das colônias em dois eixos ortogonais (média das duas medidas diametralmente opostas), iniciadas após 24 horas de incubação, e perduraram até o terceiro dia, momento em que as colônias fúngicas em desenvolvimento no controle negativo (água esterilizada) atingiram 2/3 da superfície total do meio de cultivo.

A incubação das placas perdurou até o décimo oitavo dia quando foi realizado à avaliação da produção de esporos por *C. gloeosporioides* em cada uma das placas. De cada placa foram retirados três discos de micélio (5 mm de diâmetro) da região periférica da colônia fúngica e foram transferidos para tubos contendo 9 mL de água estéril. Após vigorosa agitação em *vortex*, a concentração de esporos da solução foi estimada em câmara de Neubauer (MARQUES; MONTEIRO; PEREIRA, 2004).

Para análise da atividade antifúngica, foi ajustado um modelo linear para representar o crescimento micelial esperado em cada solução, observando cada uma das cinco repetições, durante o período de avaliação.

2.2.6.2 Avaliação da adsorção de Cu(II) e Co(II)

A capacidade de adsorção dos íons Cu(II) e Co(II) foi determinada para os filmes de quitosana puro (F-DS_{9h} e F-COM) e de quitosana modificada (F-DS_{9h}/C-02 e F-COM/C-01), no decorrer do tempo até a saturação (ou seja, equilíbrio). Cada filme com tamanho aproximado de 1,3 cm² e massa conhecida (~0,007 g) foi submerso em 30 mL de solução aquosa de sulfato de cobalto(II) 0,05 mol.L⁻¹ e sulfato de cobre(II) 0,05 mol.L⁻¹ (Figura 32). O tempo de contato das amostras de filme com as soluções metálicas variou de 5 min a 48 h. Foi preparada uma fração para cada tempo. O experimento foi realizado em temperatura ambiente e o pH 6,0, sem agitação.

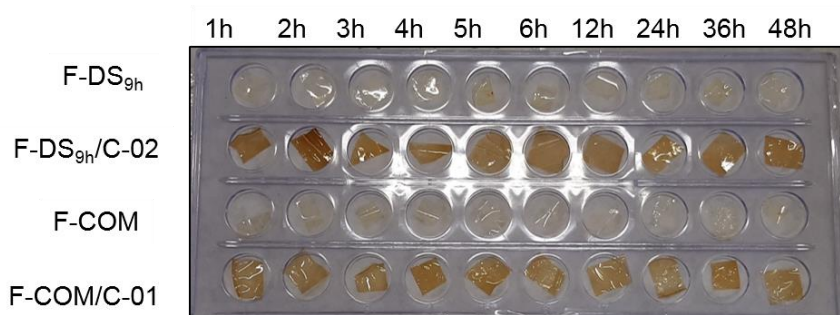


Figura 32 – Filmes de quitosana após adsorção em solução de sulfato de cobre(II)

A concentração de metal residual nas soluções para cada intervalo de tempo estudado (C_t) foi determinada a partir de medidas de espectroscopia na região do UV-Vis (Shimadzu, UV-1800), realizadas nos comprimentos de onda (λ) 500 – 1100 nm para o Cu²⁺ e 400 – 600 nm para o Co²⁺. Os dados de absorbância medidos foram tratados utilizando curvas de calibração para as soluções de sulfato de cobre e sulfato de cobalto, previamente construídas, nas seguintes concentrações: 0,025 mol.L⁻¹, 0,050 mol.L⁻¹, 0,075 mol.L⁻¹, 0,1 mol.L⁻¹. A quantidade de íons metálicos adsorvidos por grama de adsorvente (q_t) para cada intervalo de tempo foi calculada utilizando a Equação 17. Os valores de q_t foram plotados em função do tempo de adsorção (LUCENA et al., 2015).

Equação 17 – Capacidade de adsorção no equilíbrio

$$q_t = \frac{(C_0 - C_t) V}{m} \quad \text{Equação 17}$$

Onde, q_t é a capacidade de adsorção dos filmes em um tempo específico (t) (mg.g⁻¹), C_t é concentração residual do metal na solução após a adsorção e

C_0 concentração inicial dos íons metálicos na solução, (mg.L^{-1}), respectivamente. V (L) é o volume da solução e m (g) é a massa dos adsorventes.

O percentual de metal removido das soluções (R%) foi determinado para cada intervalo de tempo conforme a Equação 18.

Equação 18 – Remoção de metal

$$R(\%) = \frac{(C_0 - C_t)}{C_0} \times 100 \quad \text{Equação 18}$$

2.2.6.3 Avaliação como adjuvante de catálise

O potencial catalítico dos filmes de quitosana (F-COM e F-DS_{9h}) e dos filmes de quitosana modificada (F-COM/C-01 e F-DS_{9h}/C-02) foram avaliados em reações de acoplamento de Suzuki- Miyaura em presença de paládio (SCHMITT et al., 2021).

Cerca de 0,1g de cada amostra de filme foi colocada em frasco de erlenmeyer. Cada filme foi imerso em 25 mL de solução aquosa de cloreto de paládio (PdCl_2) 0,1 mM e agitado em *shaker* (30 min, 150 rpm). Posteriormente, adicionou-se o agente redutor – 80 mL de solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,01 M + 0,02128 g de borohidreto de sódio (NaBH_4) – e agitou-se por cerca de 10 min. Observou-se a nítida mudança de coloração, de laranja para preto iniciando a formação das nanopartículas de paládio (NPs-Pd) e, nesse momento, retirou-se os filmes da solução para secagem natural.

Alternativamente, a biossíntese de NPs-Pd foi avaliada pela substituição do agente redutor tradicional por extrato de erva-mate. Assim, obteve-se o extrato de 10 g de erva-mate comercial em 100 mL de H_2O com agitação constante (80 °C, 30 min). Após filtração, o extrato aquoso foi adicionado no sistema composto do filme de quitosana com a solução de PdCl_2 descrito anteriormente. Quando evidenciada a formação das NPs-Pd, por meio da mudança de coloração, os filmes foram separados e secos.

Os filmes contendo Pd foram caracterizados por FT-IV. Caracterizações de espectroscopia de emissão óptica com plasma (ICP-OES) e DRX estão sendo realizadas em universidades parceiras, que não ficaram prontas para a defesa em virtude da pandemia de covid-19.

Com os filmes impregnados de NPs-Pd, escolheu-se a reação de acoplamento cruzado de Suzuki-Miyaura para avaliar a potencial atividade

catalítica. Assim, a reação entre o ácido fenilborônico e 4-bromobenzonitrila (Figura 33) foi empregada. Não houve uma otimização do sistema catalítico, apenas testou-se o emprego filmes contendo paládio numa condição reacional *eco-friendly* em presença de carbonato de potássio (K_2CO_3) e etanol (ROSA et al., 2019; SCHMITT et al., 2021). A avaliação de rendimento foi realizada por meio da quantificação de 4-cianobifenila isolada conforme técnica que consiste em lavar o reator de Schlenk com 20 mL de éter etílico e extrair com 5 mL de solução aquosa de NaOH 1M. A fase orgânica foi extraída mais duas vezes com 5 mL de solução saturada de NaCl. A fase etérea foi seca com $MgSO_4$ anidro, o éter foi evaporado sob vácuo e o produto desejado pesado. O produto desejado foi caracterizado por RMN de 1H e ^{13}C .

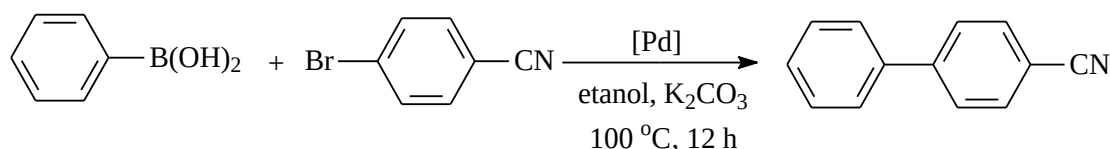


Figura 33 - Reação entre o ácido fenilborônico e 4-bromobenzonitrila e formação de 4-cianobifenila

Esta avaliação foi realizada em parceria com a Universidade de Rio Grande – FURG, Campus Santo Antônio da Patrulha.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Caracterizações

Todos os materiais sintetizados (C-01, C-02, F-DS_{9h}, F-COM, F-COM/C-01 e F-DS_{9h}/C-02) foram caracterizados como segue abaixo.

2.3.1.2 Espectroscopia na região do infravermelho (FT-IV)

Os produtos inéditos (C-01, C-02) em pó foram investigados por FT-IV em pastilha de KBr e comparados as suas respectivas amostras de quitosana de

partida, em pó, (COM, DS_{9h}), bem como com os filmes de quitosana (F-COM, F-DS_{9h}) e quitosana modificada (F-COM/C01, F-DS_{9h}/C02) (Figura 34 e Tabela 35).

Fica evidente a modificação das bandas características nos produtos inéditos em comparação com a quitosana. Há o surgimento de uma banda larga na região entre 1480 – 1346 cm⁻¹ características de compostos triazenos, evidenciando que a modificação na quitosana foi feita com sucesso. Essa banda larga é relativa ao estiramento ν [C=N] e confirma a reticulação inédita proposta em quitosana. Na literatura são relatadas bandas características de compostos triazeno do estiramento ν [C=N] em 1351 cm⁻¹ (SANTOS et al., 2014), 1347 - 1366 (BLANK; HIRDES; SANTOS, 2019).

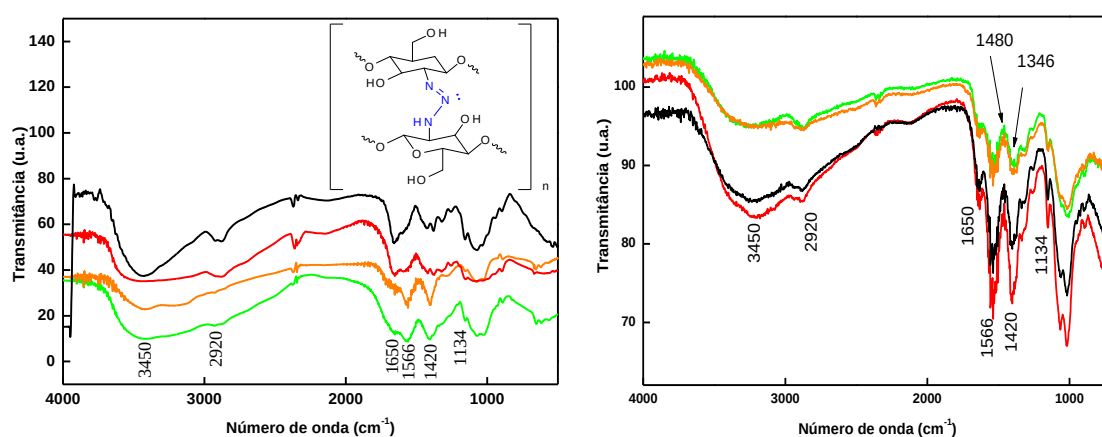


Figura 34 – Espectros FT-IV. Amostras em pó (esquerda): DS_{9h} (vermelho) e C-02 (laranja), DSCOM (preto), e C-01 (verde) com destaque para a quitosana triazenídica. Filmes de quitosana (direita): F-DS_{9h} (vermelho) e F-DS_{9h}/C-02 (laranja), F-COM (preto) e F-COM/C-01 (verde).

Para os filmes de quitosana modificados comparados aos filmes puros, destacam-se as bandas características de quitosana, atribuído ao estiramento ν [-OH] (3450 cm⁻¹); estiramento ν [-CH] (2920 cm⁻¹); estiramento ν [C=O] (1650 cm⁻¹) denominada amida I; deformação angular δ [N-H] no plano e ao estiramento ν [-CH] denominada amida II (1560 cm⁻¹); deformação angular simétrica δ [CH₃] (1420 cm⁻¹) e estiramentos ν [-C-O-C-] e ν [C-O] (1134 - 1074 cm⁻¹) (EL KNIDRI et al., 2016; FRICK et al., 2018; SILVERSTEIN et al., 2014). Pode ser observado que a inserção de C-01 e C-02 nas respectivas quitosanas não alterou o padrão espectroscópico em relação aos filmes de quitosana puros. Isso pode ter ocorrido pelo fato de a reticulação nos filmes ocorrer principalmente pela interação dos grupos amino protonados da quitosana com o grupo acetato

do ácido acético, já evidenciando a banda larga na região de $1480 - 1346 \text{ cm}^{-1}$ e sobrepondo a banda característica do triazeno.

Aos filmes F-DS_{9h}, F-COM, F-DS_{9h}/C-02, F-COM/C-01 foram adicionados cátions de transição, por meio de soluções aquosas de sulfato de cobre (II) e sulfato de cobalto (II) e, posteriormente, foi realizada sua caracterização estrutural por FT-IV (Figura 35).

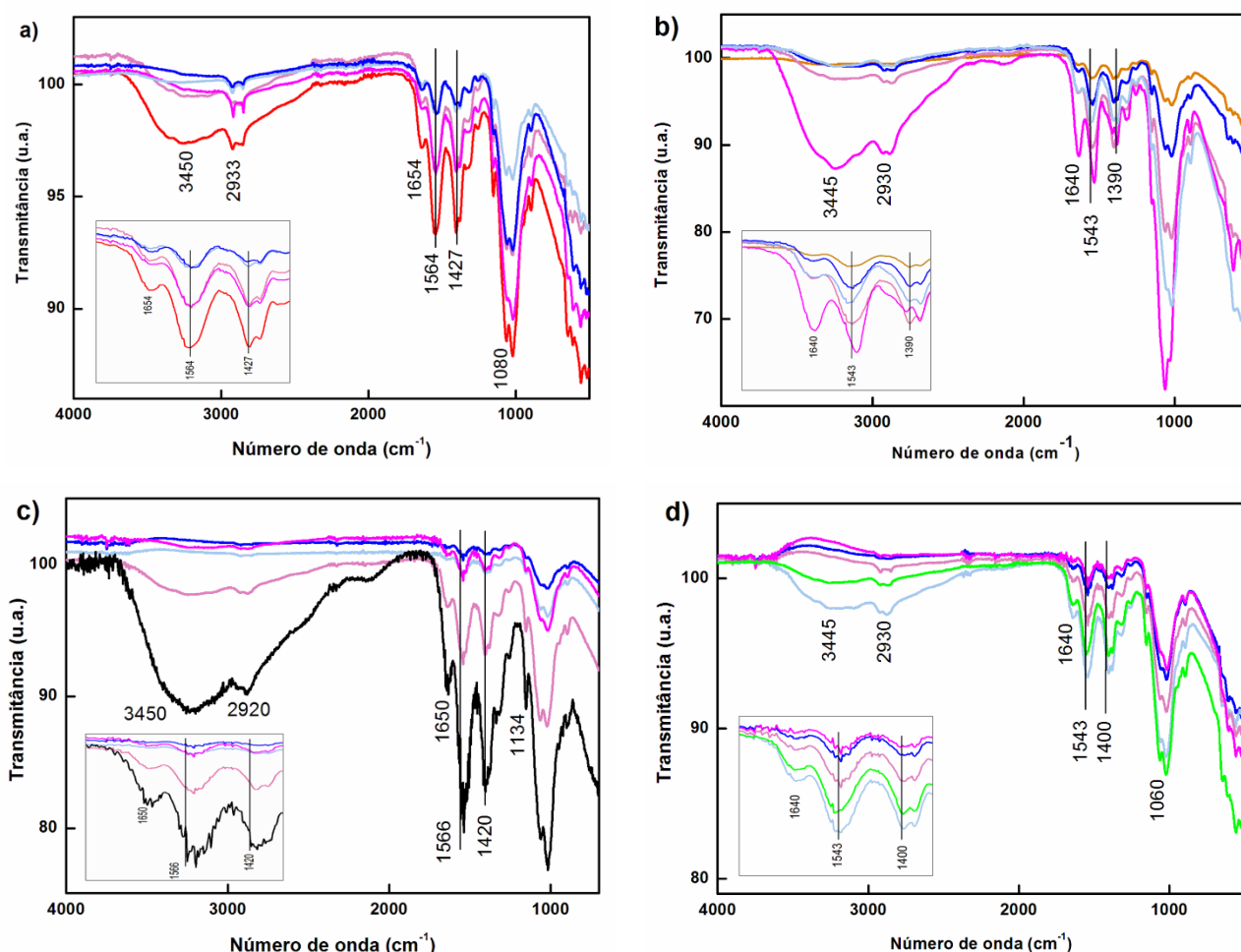


Figura 35 – Espectros na região do IV detalhe para a região entre $1800 - 1200 \text{ cm}^{-1}$. (a) F-DS_{9h} – vermelho, (b) F-DS_{9h}/C-02 – laranja, (c) F-COM – preto, (d) F-COM/C-01 – verde. Filmes contendo CuSO_4 $0,005 \text{ mol.L}^{-1}$ (ciano), CuSO_4 $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ (azul), CoSO_4 $0,005 \text{ mol.L}^{-1}$ (rosa claro), CoSO_4 $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ (magenta).

Os filmes de quitosana F-DS_{9h}, F-COM mostram deslocamentos discretos da banda em 1566 cm^{-1} ($\delta[\text{-NH}]$) para menor número de onda, indicando interações com os cátions Co(II) e Cu(II) nestes sítios (Figura 35 a,c). (ANBINDER et al., 2019; NEGM et al., 2015). Os filmes de quitosana modificados pelos compostos inéditos, F-DS_{9h}/C-02, F-COM/C-01 demonstram

deslocamentos consideráveis da banda $\delta[\text{-NH}]$ de $1550 - 1554 \text{ cm}^{-1}$ para menor comprimento de onda em $1547 - 1534 \text{ cm}^{-1}$, indicando a complexação dos cátions Co(II) e Cu(II) ao triazeno protonado e/ou ao grupo amino da quitosana (Figura 35 b,d) (KULKARNI et al., 2020; ZHANG; ZHUANG; WANG, 2020). O padrão espectroscópico dos filmes modificados pela inserção do triazeno é diferente dos filmes puros na região de $1566 - 1534 \text{ cm}^{-1}$ o que demonstra a influência da presença dos triazenos C-01 e C-02 na estrutura.

As bandas de $\nu(\text{C-N=N-})$ e $\delta(\text{CH}_3)$ aparecem sobrepostas na região entre $1480 - 1350 \text{ cm}^{-1}$, o que fica difícil de avaliar a interação dos cátions metálicos com o triazeno. Essa ligação do triazeno com cátion metálico, segundo a literatura, seria evidenciada pelo deslocamento de banda para o menor comprimento de onda devido a formação de ligação covalente com o metal e a transferência de elétrons do ligante para o metal por meio de ligação covalente (ANBINDER et al., 2019; KULKARNI et al., 2020).

Estudos de FT-IV em suportes de quitosana modificados demonstram variações entre as bandas como deslocamentos na região de 1610 cm^{-1} (ANBINDER et al., 2019) e 1498 cm^{-1} (KULKARNI et al., 2020) como evidência da interação do cobre (II) com o grupo amino da quitosana. Além disso, estudos também evidenciam a interação do cobalto (II) com o grupo amino na região de 1598 cm^{-1} (ZHANG; ZHUANG; WANG, 2020).

Cabe ainda salientar que com o aumento da concentração dos cátions metálicos os deslocamentos tornam-se mais evidentes (Tabela 35).

Tabela 35 – Principais bandas na região do infravermelho para as amostras de quitosana e produtos inéditos em pó, filmes de quitosana e quitosana modificada e filmes de quitosana em presença de Cu(II) e Co(II).

Amostras	Atribuições e número de onda (cm ⁻¹)						
	ν [-OH]	ν [-CH]	ν [C=O]	δ [N-H]	δ [CH ₃]	ν -C-N=N-	ν [-C-O-C-]
DS _{9h}	3450	2933	1654	1564	1427	----	1080
COM	3445	2920	1657	1553	1421	----	1083
C-02	3477	2905	1651	1578	1483 – 1346		1076
C-01	3472	2898	1655	1570	1475 – 1354		1080
F-DS _{9h}	3440	2927	1640	1554	1420	----	1064
F-COM	3450	2920	1650	1550	1427	----	1068
F-DS _{9h} /C-02	3450	2920	1639	1560	1470 – 1355		1066
F-COM/C-01	3445	2920	1650	1550	1470 – 1355		1068
F-DS _{9h} /Cu ^A	----	2930	1642	1538	1410	----	1058
F-DS _{9h} /Cu ^B	----	2930	1642	1538	1410	----	1067
F-DS _{9h} /Co ^A	3445	2930	1640	1542	1412	----	1065
F-DS _{9h} /Co ^B	3445	2930	1640	1542	1412	----	1065
F-DS _{9h} /C-02/Cu ^A	----	----	1640	1544	1470 – 1345		1065
F-DS _{9h} /C-02/Cu ^B	----	2937	1650	1544	1470 – 1345		1062
F-DS _{9h} /C-02/Co ^A	----	2937	1639	1542	1470 – 1345		1065
F-DS _{9h} /C-02/Co ^B	3445	----	1650	1544	1470 – 1345		1065
F-COM/Cu ^A	----	----	----	1544	1418	----	1067
F-COM/Cu ^B	----	2937	----	1545	1415	----	1058
F-COM/Co ^A	3442	2933	1637	1555	1415	----	1065
F-COM/Co ^B	----	2898	1631	1557	1418	----	1060
F-COM/C-01/Cu ^A	3445	2935	1642	1548	1409 – 1380		1060
F-COM/C-01/Cu ^B	----	----	1647	1541	1409 – 1380		1058
F-COM/C-01/Co ^A	----	2925	1646	1548	1409 – 1380		1064
F-COM/C-01/Co ^B	----	----	1640	1541	1409 – 1380		1061

A= 0,005 mol.L⁻¹. B= 0,05 mol.L⁻¹

2.3.1.3 Espectroscopia na região do ultravioleta (UV-Vis)

As soluções filmogênicas de F-DS_{9h}/C-02 e F-COM/C-01 apresentaram maior intensidade nas bandas em comparação àquelas observadas para os filmes F-DS_{9h} e F-COM, partindo de mesma concentração, provavelmente devido à presença do grupo triazeno modificador. Os espectros de absorção obtidos são relatados como característicos para a quitosana (AHMAD et al.,

2019; ANBINDER et al., 2019; WANG, 2018). A quitosana pura apresenta banda na região de 200-300, característica de molécula saturada e transição do tipo $\sigma \rightarrow \sigma^*$. Já os filmes de quitosana modificados após a inserção do produto inédito (C-01 e C-02), apresentaram ombros na região de 300 – 309 nm que pode ser atribuído à transição do tipo $n \rightarrow \pi^*$, que é característico de compostos azo confirmando sua presença nos filmes modificados (Figura 36) (SKOOG; HOLLER; NILMAN, 2009).

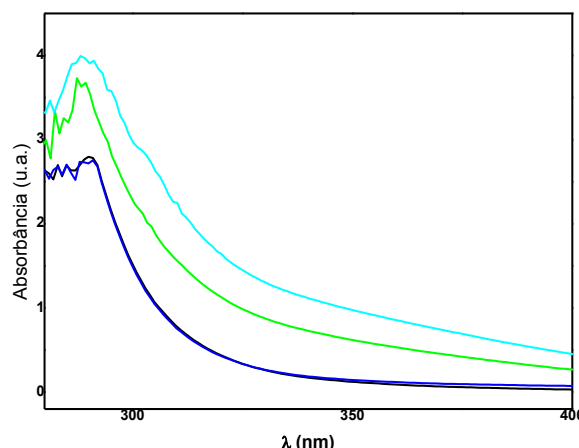


Figura 36 – Espectros de UV-Vis das soluções filmogênica de quitosana F-DSh (azul) e F-COM (preto), F-DSh/C-02 (ciano), F-COM/C-01 (verde).

2.3.1.4 Medidas termogravimétricas (TGA/DTG)

A análise térmica dos produtos inéditos em pó (C-01, C-02) foi comparada as suas respectivas amostras de quitosana de partida, em pó, (DSh, COM) (Figura 37 – 40 e Tabela 36). É observada diferença no perfil térmico para os compostos sintetizados (C-01 e C-02), comprovando sua síntese com sucesso e evidenciando sua maior estabilidade térmica pela maior presença de resíduo ao final da faixa de aquecimento.

Os termogramas de TGA (Figura 38) mostram praticamente o mesmo perfil térmico para os filmes de quitosana puros e àqueles com a inserção de C-01 e C-02. A temperatura máxima de degradação dos filmes, observada no termograma de DTG, também mostra essa similaridade. A literatura relata termogramas semelhantes a esses obtidos para filmes de quitosana, variando é claro, conforme a modificação proposta (FRICK et al., 2017, PRIYADARSHI et al., 2018).

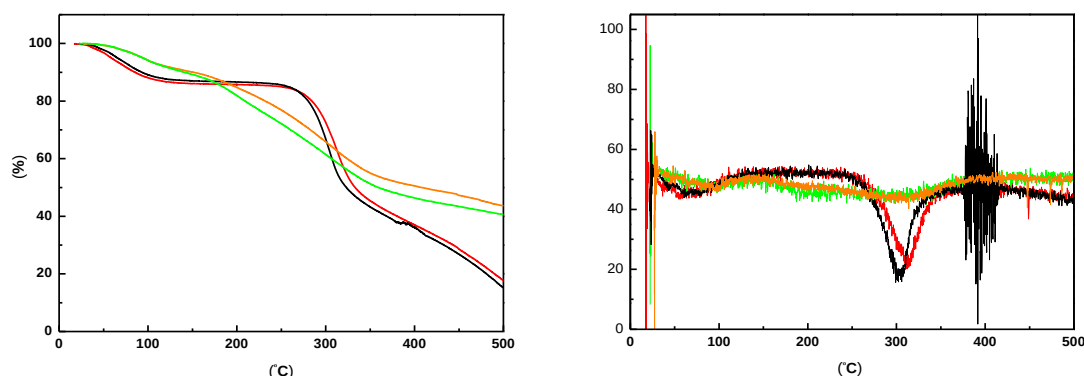


Figura 37 – Termogramas TGA (esquerda) e DTG (direita) das amostras de quitosana em pó DS_{9h} (vermelho) e COM (preto) e dos produtos inéditos C-02 (laranja) e C-01 (verde).

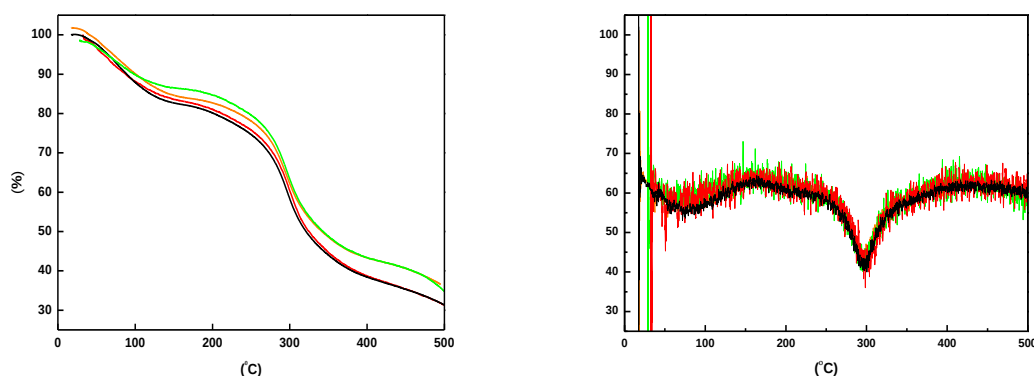
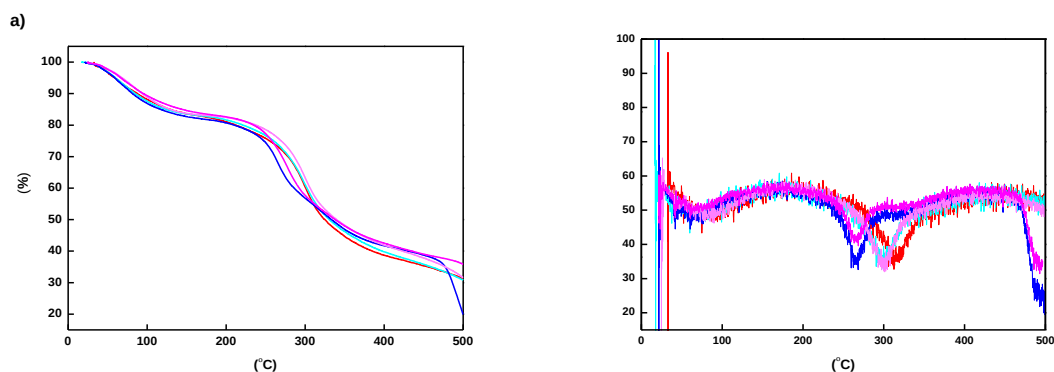


Figura 38 – Termogramas TGA (esquerda) e DTG (direita) para os filmes de quitosana puros F-DS_{9h} (vermelho) e F-COM (preto) e os modificados com o produto inédito F-DS_{9h}/C-02 (laranja) e F-COM/C-01 (verde).

Foi relatado por Frick et al. (2018) uma redução da temperatura máxima de degradação dos filmes de quitosana quando comparado à quitosana em pó, evidenciando uma redução da estabilidade térmica da quitosana quando solubilizada pelo ácido, bem como maior perda de massa na faixa de temperatura avaliada. Uma leve redução na temperatura máxima de degradação foi evidenciada nesse estudo após a modificação dos filmes de quitosana com inserção de C-01 e C-02 (Tabela 36). Estudos sugerem uma leve redução na estabilidade térmica dos filmes de quitosana após a modificação comparado ao filme de quitosana (AHMAD et al., 2019; FRICK et al., 2018; ZHANG; ZHUANG; WANG, 2020).

Os grupos funcionais, amino e hidroxila da quitosana, são relatados como os responsáveis pela estabilidade térmica estrutural dos filmes de quitosana (ARAMESH; BAGHERI; BILAL, 2021; SHETH et al., 2021; ZHANG; ZHUANG; WANG, 2020). Neste estudo, a porcentagem residual dos filmes de quitosana F-DS_{9h} e F-COM (54,37 e 55,15%, respectivamente) foi semelhante aos filmes de quitosana modificados F-DS_{9h}/C-02 e F-COM/C-01 (57,92 e 56,01%, respectivamente) (Tabela 36). Ficou evidente uma leve redução na temperatura máxima de degradação após a inserção dos íons Cu(II) e Co(II) (Tabela 36 e Figura 39), sendo que quanto maior a concentração do cátion metálico, maior foi a redução na temperatura. Estudos relatam redução na temperatura máxima de degradação após a interação dos íons Cu(II) (AHMAD et al., 2019; ANBINDER et al., 2019) e Co(II) (NEGM et al., 2015; ZHANG; ZHUANG; WANG, 2020) atribuídos à interação dos íons com os grupos funcionais da quitosana e perda de estrutura enovelada que garante maior estabilidade térmica.

Nos filmes de quitosana (Figura 39 e Tabela 36) que continham a solução metálica em menor concentração (0,005 mol.L⁻¹) de Cu(II) ou Co(II), percebeu-se que o percentual de resíduo verificado foi muito próximo ou menor que a amostra pura, o que pode ser justificado pela interação do metal com os sítios do polímero que provavelmente, promove a quebra das ligações intermoleculares no próprio polímero reduzindo sua estabilidade térmica resultando em um menor resíduo final comparado à amostra pura (NEGM et al., 2015). Já com o aumento da concentração da solução metálica, como se esperado, se observa um aumento do percentual de resíduo total ao final do intervalo de aquecimento.



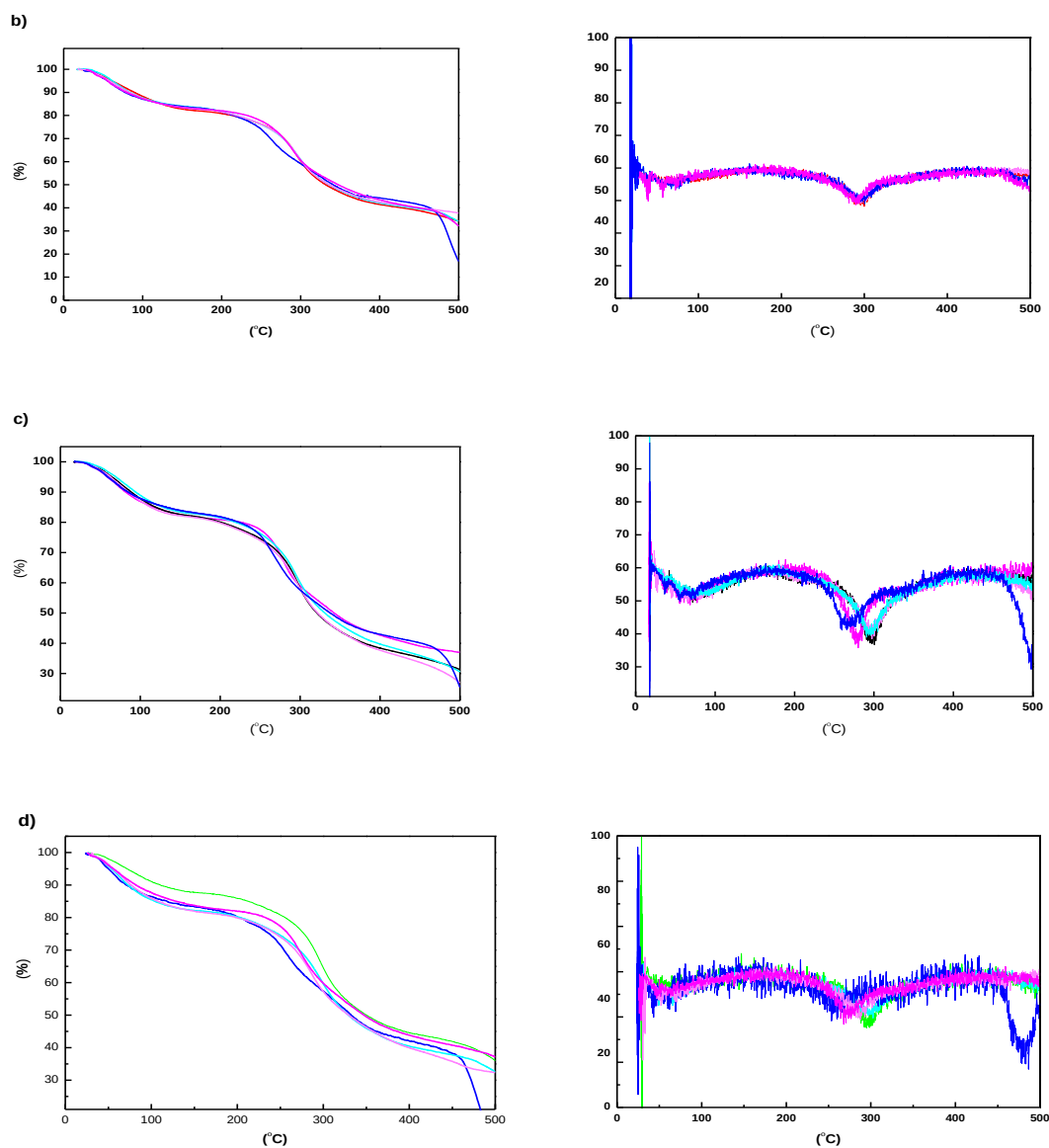


Figura 39 – Termogramas TGA (esquerda) e DTG (direita). (a) F-DS_{9h} – vermelho. (b) F-DS_{9h}/C-02 – laranja. (c) F-COM – preto. (d) F-COM/C-01 – verde). Soluções CuSO₄ 0,005 mol.L⁻¹ (ciano), CuSO₄ 0,05 mol.L⁻¹ (azul), CoSO₄ 0,005 mol.L⁻¹ (rosa claro), CoSO₄ 0,05 mol.L⁻¹ (magenta).

Tabela 36 – Resultados de TGA/DTG para a decomposição térmica das amostras

Amostras	M _{inicial} (mg)	ΔT (°C) ¹	Perda de massa (mg)	T _{deg} (°C)	Resíduo (%)
DS _{9h}	5,245	250-450	2,959	314,42	43,58
C-02	6,470	200 – 450	2,612	283,73	55,89
COM	8,053	250-450	4,736	310,62	41,19
C-01	7,110	200 – 450	2,967	275,08	58,70
F-DS _{9h}	3,830	200 – 450	1,751	297,61	54,37
F-DS _{9h} /Cu ^A	5,228	200 – 450	2,581	295,82	54,16
F-DS _{9h} /Cu ^B	6,124	200 – 450	2,570	276,35	58,05
F-DS _{9h} /Co ^A	7,998	200 – 450	3,570	297,05	55,37
F-DS _{9h} /Co ^B	8,484	200 – 450	3,696	281,52	56,42
F-DS _{9h} /C-02	6,666	200 – 450	2,804	295,85	57,93
F-DS _{9h} /C-02/Cu ^A	5,987	200 – 450	2,525	293,62	57,84
F-DS _{9h} /C-02/Cu ^B	3,785	200 – 450	1,519	272,63	59,91
F-DS _{9h} /C-02/Co ^A	5,215	200 – 450	2,165	292,64	58,48
F-DS _{9h} /C-02/Co ^B	3,564	200 – 450	1,499	289,89	57,97
F-COM	7,441	200 – 450	3,337	295,72	55,15
F-COM/Cu ^A	8,867	200 – 450	4,041	290,88	54,41
F-COM/Cu ^B	7,110	200 – 450	2,967	275,08	58,70
F-COM/Co ^A	6,470	200 – 450	2,612	284,73	55,89
F-COM/Co ^B	6,147	200 – 450	2,572	283,48	58,16
F-COM/C-01	5,272	200 – 450	2,319	292,84	56,01
F-COM/C-01/Cu ^A	3,900	200 – 450	1,655	290,18	57,56
F-COM/C-01/Cu ^B	2,020	200 – 450	0,847	273,12	58,09
F-COM/C-01/Co ^A	5,918	200 – 450	2,612	284,73	55,89
F-COM/C-01/Co ^B	5,392	200 – 450	2,222	283,01	58,79

A= 0,005 mol.L⁻¹ B= 0,05 mol.L⁻¹

2.3.1.5 Difração de raios X (DRX)

Os difratogramas das quitosanas em pó e dos filmes são mostrados na (Figura 40). Pode-se observar que os dois picos cristalinos característicos da quitosana estão presentes, em 10° e 20° (2 θ) aproximadamente, em conformidade com a literatura (EL KNIDRI et al., 2016).

O padrão de DRX dos filmes de quitosana modificados apresenta alterações relativas às mudanças na cristalinidade (Figura 40). A perda de cristalinidade confirma a inclusão dos produtos inéditos C-01 e C-02 aos filmes de quitosana F-DS_{9h}, F-COM formando F-DS_{9h}/C-02 e F-COM/C-01. A literatura

já relata que a quitosana modificada perde sua cristalinidade original ao formar os filmes modificados (AHMAD et al., 2019; NATARAJ et al., 2018).

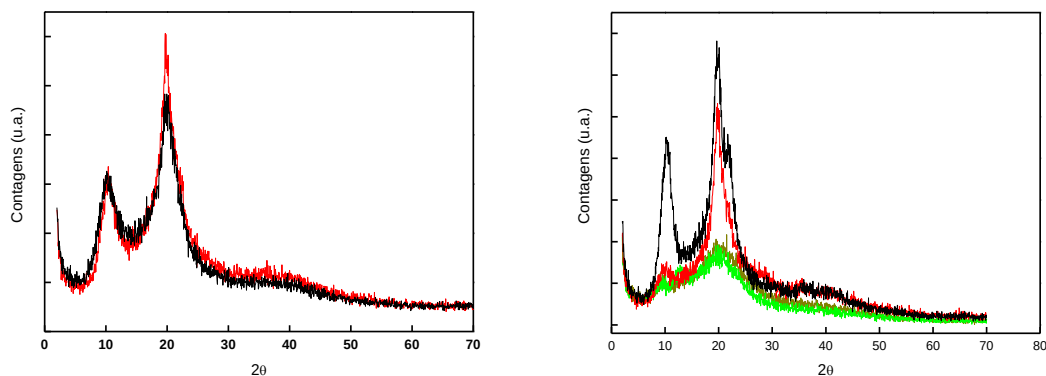


Figura 40 – Difrátogramas. Quitosana em pó (esquerda): DS_{9h} (vermelho) e COM (preto). ; Filmes de quitosana (direita): F-DS_{9h} (vermelho) e F-DS_{9h}/C-02 (laranja), F-COM (preto) e F-COM/C-01 (verde).

Os filmes de quitosana foram caracterizados também após a incorporação dos cátions metálicos Cu(II) e Co(II). Ficou nítido, que a presença desses cátions aumentou ainda mais a contribuição do amorfo (Figura 41).

A cristalinidade dos filmes diminuiu conforme a aumenta a reticulação dos filmes, o que está de acordo com Ahmad et al., 2019, os filmes de quitosana modificados reduzem a cristalinidade característica após a modificação.

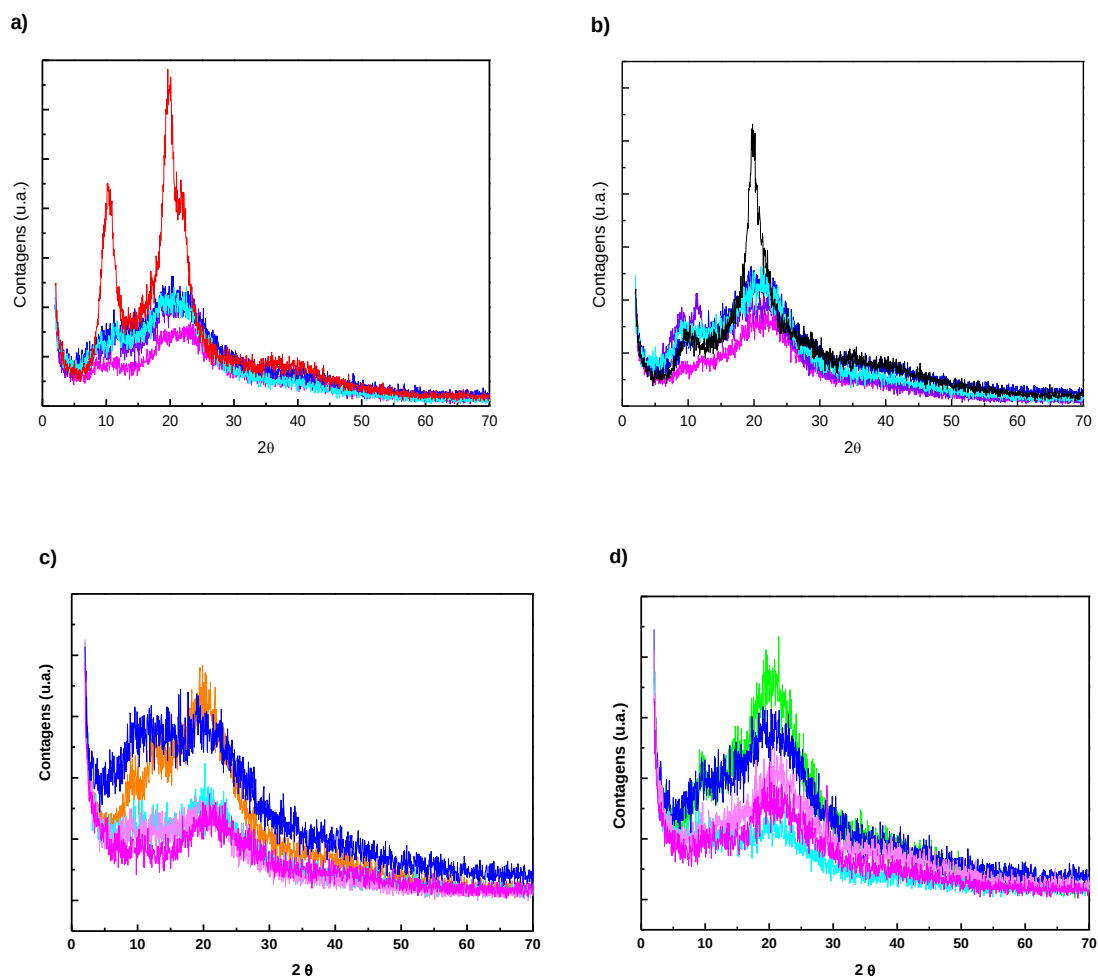


Figura 41 – Difratomogramas. (a) F-DS_{9h} – vermelho. (b) F-COM – preto. (c) F-DS_{9h}/C-02 – laranja. (d) F-COM/C-01 – verde. Soluções metálicas: CuSO₄ 0,005 mol.L⁻¹ (ciano), CuSO₄ 0,05 mol.L⁻¹ (azul), CoSO₄ 0,005 mol.L⁻¹ (rosa claro), CoSO₄ 0,05 mol.L⁻¹ (magenta).

2.3.1.6 Microscopia de força atômica (AFM)

As topografias em 3D foram plotadas para uma melhor visualização da superfície dos filmes, no entanto também foram obtidas imagens por topografia e deflexão, e a partir delas foram avaliados os parâmetros de amplitude da superfície, como rugosidade quadrática média (RMS), coeficiente de assimetria (S_{SK}), coeficiente de curtose (S_K) e a altura máxima (S_z). Esses parâmetros de amplitude tridimensionais revelam a complexidade das características morfológicas da superfície.

As imagens de alta resolução obtidas indicaram que todas as amostras apresentaram superfícies irregulares. Os picos e vales são indicados pela

variação de cores. Em vales mais profundos o tom tende ao mais escuro e nos picos maiores o tom tende à cor ouro, na escala da altura z (KIM; WHITE, 2004; KLAPETEK; NEČAS; CHRISTOPHER, 2020; MAHMOUDI et al., 2020; STOICA et al., 2013).

Este estudo mostra modificações ocorridas na superfície (Figura 42 – 46, Tabela 37), contendo os dados do perfil do coeficiente de assimetria e do coeficiente de curtose junto ao perfil da rugosidade, a altura máxima de pico, bem como os dados estatísticos de entropia detalhados (BHATT et al., 2017; SAZANOVA et al., 2016; STOICA et al., 2013; ZHUANG; ZHONG; ZHAO, 2019).

A rugosidade quadrática média (RMS) é a média das irregularidades de altura de uma superfície e a altura máxima (S_z), correspondendo ao valor absoluto entre os picos mais alto e mais baixo (BAJPAI; BHATT; KATARE, 2016; BHATT et al., 2017; GADELMAWLA et al., 2002; KLAPETEK; NEČAS; CHRISTOPHER, 2020; MUNZ, 2013; SAZANOVA et al., 2016; STOICA et al., 2013; YACOOT; KOENDERS, 2008; ZHUANG; ZHONG; ZHAO, 2019). A entropia (H) revela a riqueza da estrutura na morfologia (textura) que se inter-relaciona fortemente com os graus de ordem ou desordem na distribuição de altura da estrutura do grão (ANDRAUD; BEGHDAI; LAFAIT, 1994; KLAPETEK; NEČAS; CHRISTOPHER, 2020; PIASECKI, 2000).

Entre os filmes F-DS_{9h}, F-COM, F-DS_{9h}/C-02 e F-COM/C-01 (Figura 42), o filme F-COM/C-01 apresentou maior altura máxima (S_z) no eixo z de 220,20 nm e, conseqüentemente, apresentou rugosidade quadrática média maior (RMS) de 30,59 nm e menor entropia (H) de -17,0259 (Tabela 37). O perfil da topografia em 3D do filme de quitosana comercial pura (F-COM) apresentou maior rugosidade que a DS_{9h}, no entanto após a inserção do produto inédito C-01, a rugosidade do filme F-COM/C-01 aumentou assim como sua altura máxima, apesar do filme F-COM apresentar mais picos do que vales. Já o filme de quitosana modificado com o produto inédito (F-DS_{9h}/C-02) apresentou maior rugosidade comparado ao filme (F-DS_{9h}) que o originou.

O perfil do coeficiente de assimetria (S_{sk}) representa o grau de simetria das alturas da superfície referente ao plano médio. Os dados do perfil do coeficiente de assimetria (S_{sk}) obtidos são apresentados nas imagens da superfície dos filmes e (Tabela 37). Nesse sentido, os perfis topográficos dos filmes F-DS_{9h} e F-COM mostraram mais picos do que vales em ambos, com

coeficiente de assimetria (S_{SK}) positivo que indica que as superfícies possuem mais picos do que vales ($S_{SK} > 0$), com destaque para F-COM (KIM; WHITE, 2004; KLAPETEK; NEČAS; CHRISTOPHER, 2020; MAHMOUDI et al., 2020; STOICA et al., 2013).

O filme de quitosana modificado com produto inédito F-DS_{9h}/C-02 apresentou um pico abaixo do plano, e é evidenciado então o perfil negativo de S_{SK} ($S_{SK} < 0$) (Tabela 37), pois nele predominam mais vales em um platô mais suave, demonstrando uma superfície elevada, o que está em concordância com o perfil em 3D apresentado de a cor mais clara da imagem (Figura 42, b). Dentre os demais filmes, esse filme indica um perfil com mais elevações em concordância com a variação de cores, já que em picos maiores o tom tende a cor ouro mais clara (KIM; WHITE, 2004; KLAPETEK; NEČAS; CHRISTOPHER, 2020; MAHMOUDI et al., 2020; STOICA et al., 2013).

O coeficiente de curtose (S_K) mede a pontualidade das alturas do perfil de linha, descreve a distribuição e variação dos grãos na superfície e indica a presença de picos ou vale que podem ocorrer em uma superfície, visto que curtose é definida como o menor ou maior grau de achatamento na distribuição, limitado pelo valor 3 (BAJPAI; BHATT; KATARE, 2016; HULUBEI et al., 2014; KIM; WHITE, 2004).

Entre os filmes F-DS_{9h}, F-COM, F-DS_{9h}/C-02 e F-COM/C-01, o coeficiente de curtose determinado permaneceu superior a 3. O $S_K > 3$ sugere uma superfície com pouca área acima ou abaixo da altura média, apresentando uma distribuição mais alta e concentrada que a distribuição normal, com mais saliências espalhadas na superfície, neste caso a superfície é classificada como leptocúrtica, ou seja, a medida de curtose foi maior que a medida da distribuição normal (BAJPAI; BHATT; KATARE, 2016; HULUBEI et al., 2014; KIM; WHITE, 2004)

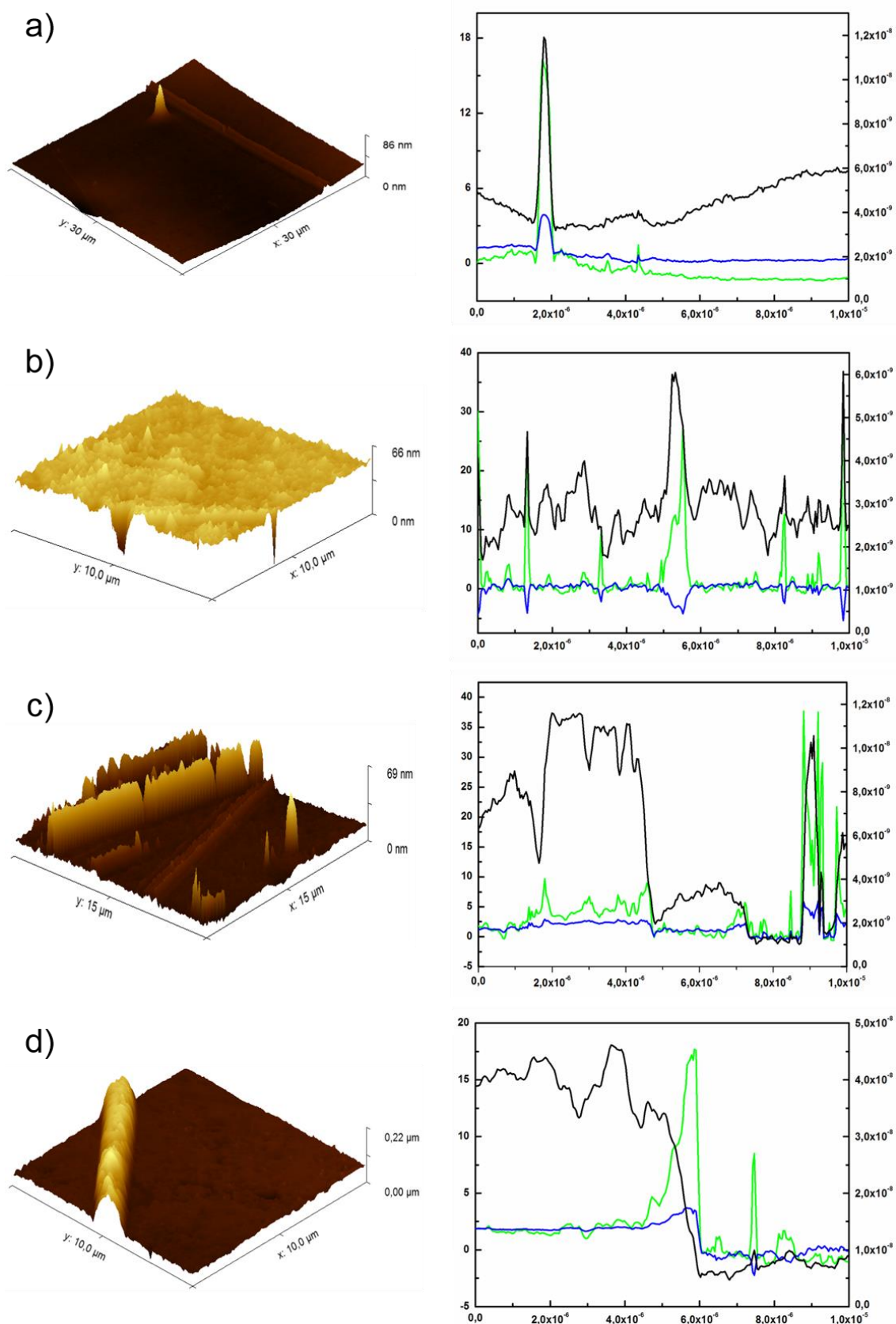


Figura 42 – Topografia em 3D da superfície (esquerda) com área de varredura $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ e altura máxima (SZ) no eixo z. Dados da superfície (direita): rugosidade (RMS) (preto) no eixo z, coeficiente de assimetria (SSK) (azul), coeficiente de curtose (SK) (verde). (a) F-DS_{9h}. (b) F-DS_{9h}/C-02. (c) F-COM. (d) F-COM/C-01 (d).

Tabela 37 – Parâmetros topológicos das amostras

Amostras	Rugosidade ^a (nm)	Altura Máx. S _z (nm)	Coef. de assimetria (S _{sk})	Coef. de Curtose (S _k)	Entropia (H) ± (deficit)
F-DS_{9h}	4,87	85,75	1,68	12,26	-17,8514±0,1302
F-DS_{9h}_Cu^A	4,65	44,54	1,95	6,23	-18,0007±0,0234
F-DS_{9h}_Cu^B	19,53	247,07	0,91	6,21	-16,6501±0,3177
F-DS_{9h}_Co^A	9,04	2,73	-1,47	2,74	-17,3041±0,2014
F-DS_{9h}_Co^B	13,60	360,30	3,157	30,31	-16,9595±0,2749
F-DS_{9h}/C-02	3,02	65,36	-0,71	10,81	-18,2834±0,0850
F-DS_{9h}/C-02_Cu^A	24,51	278,50	1,87	7,98	-16,2951±0,1897
F-DS_{9h}/C-02_Cu^B	12,16	77,95	-0,22	-0,27	-16,8229±0,0169
F-DS_{9h}/C-02_Co^A	7,97	128,90	3,18	17,08	-17,6812±0,4527
F-DS_{9h}/C-02_Co^B	17,96	318,80	-0,12	6,07	-16,4838±0,0673
F-COM	6,979	69,41	3,43	13,75	-18,102±0,7406
F-COM_Cu^A	17,54	180,90	-0,16	2,58	-16,5534±0,1133
F-COM_Cu^B	197,00	1070,00	0,06	-0,53	-14,0613±0,0402
F-COM_Co^A	9,73	58,22	0,01	-0,26	-17,0401±0,0114
F-COM_Co^B	30,49	218,30	1,34	2,04	-16,0578±0,1709
F-COM/C-01	30,59	220,20	2,88	7,46	-17,0259±1,1421
F-COM/C-01_Cu^A	5,57	50,62	0,46	0,69	-17,6149±0,0284
F-COM/C-01_Cu^B	11,07	82,58	0,16	-0,17	-16,9069±0,0072
F-COM/C-01_Co^A	20,44	168,00	1,81	4,39	-16,5589±0,2719
F-COM/C-01_Co^B	22,94	194,60	0,19	0,71	-16,1896±0,018

^a Média quadrática (RMS). A= 0,005 mol.L⁻¹. B = 0,05 mol.L⁻¹.

Com base no estudo detalhado da topografia da superfície dos filmes F-DS_{9h}, F-COM, F-DS_{9h}/C-02 e F-COM/C-01 e da avaliação das modificações ocorridas na superfície após a inserção de íons de Cu (II) e Co (II) nos referidos filmes (Figura 42 a Figura 46, Tabela 37) e dos respectivos parâmetros topográficos avaliados, fica evidente que o filme F-COM_Cu^B apresentou maior altura máxima (S_z) no eixo z de 1070 nm e, conseqüentemente, apresentou rugosidade quadrática média maior (RMS) de 197 nm e menor entropia (H) de -14,0613 (Figura 44, “c” e Tabela 37). É possível perceber nos dados da superfície do filme F-COM_Cu^B, que o perfil resultante do coeficiente de assimetria foi (S_{SK} = 0,06) (S_{SK}>0) indica um perfil com mais picos do que vales, também confirmado pela variação de cor, em que os picos predominam quando

o tom tende à cor mais clara, na escala da altura z (KIM; WHITE, 2004; KLAPETEK; NEČAS; CHRISTOPHER, 2020; MAHMOUDI et al., 2020; STOICA et al., 2013). A maior rugosidade observada para F-COM_Cu^B pode estar associada a menor desordem (entropia) na morfologia. Já o perfil resultante do coeficiente de curtose (S_K) apresentou valor negativo ($S_K = -0,53$), o que confirma se tratar de distribuições esparsas relacionadas a superfícies altamente irregulares podendo apresentar agrupamento de grãos. Distribuições irregulares semelhantes são relatadas na literatura em estudos que envolvem quitosana (BHATT et al., 2017; FIORI; ROSSI, 2004). Vale destacar que perfil resultante do coeficiente de curtose ($S_K < 3$) foi evidenciado para os filmes F-DS9h_Co^A (2,74), F-COM_Cu^A (2,58), F-COM_Co^B (2,04), F-COM/C-01_Cu^A (0,69), F-COM/C-01_Co^B (0,71), o que indica uma superfície platicúrtica com morfologia mais uniforme de picos e vales em relação à altura média (BAJPAI; BHATT; KATARE, 2016; HULUBEI et al., 2014; KIM; WHITE, 2004).

A entropia (H) está intimamente associada ao fator de rugosidade quadrática média (RMS) que é o desvio padrão da distribuição das alturas da superfície (KLAPETEK; NEČAS; CHRISTOPHER, 2020; PIASECKI, 2000). A diferença entre esse valor máximo e a entropia estimada é exibida como déficit de entropia, que por definição, é sempre positivo (vai além de questões numéricas) e as entropias são exibidas sem unidade, pois são quantidades logarítmicas (ANDRAUD; BEGHDAI; LAFAIT, 1994; KLAPETEK; NEČAS; CHRISTOPHER, 2020; PIASECKI, 2000).

A partir dos parâmetros topológicos apresentados (Tabela 37), é possível observar que à medida que a rugosidade aumenta em cada amostra, a entropia diminui. Como já foi destacado no estudo do processo de síntese de quitosana, no capítulo 1. Os parâmetros entropia (H) e rugosidade quadrática média (RMS) são inversamente proporcionais, quanto maior o valor de RMS, menor a entropia e menor será a complexidade da imagem. Em contrapartida, o filme F-DS9h/C-02 obteve a menor rugosidade entre todas as amostras resultando em uma entropia maior e maior complexidade de imagem.

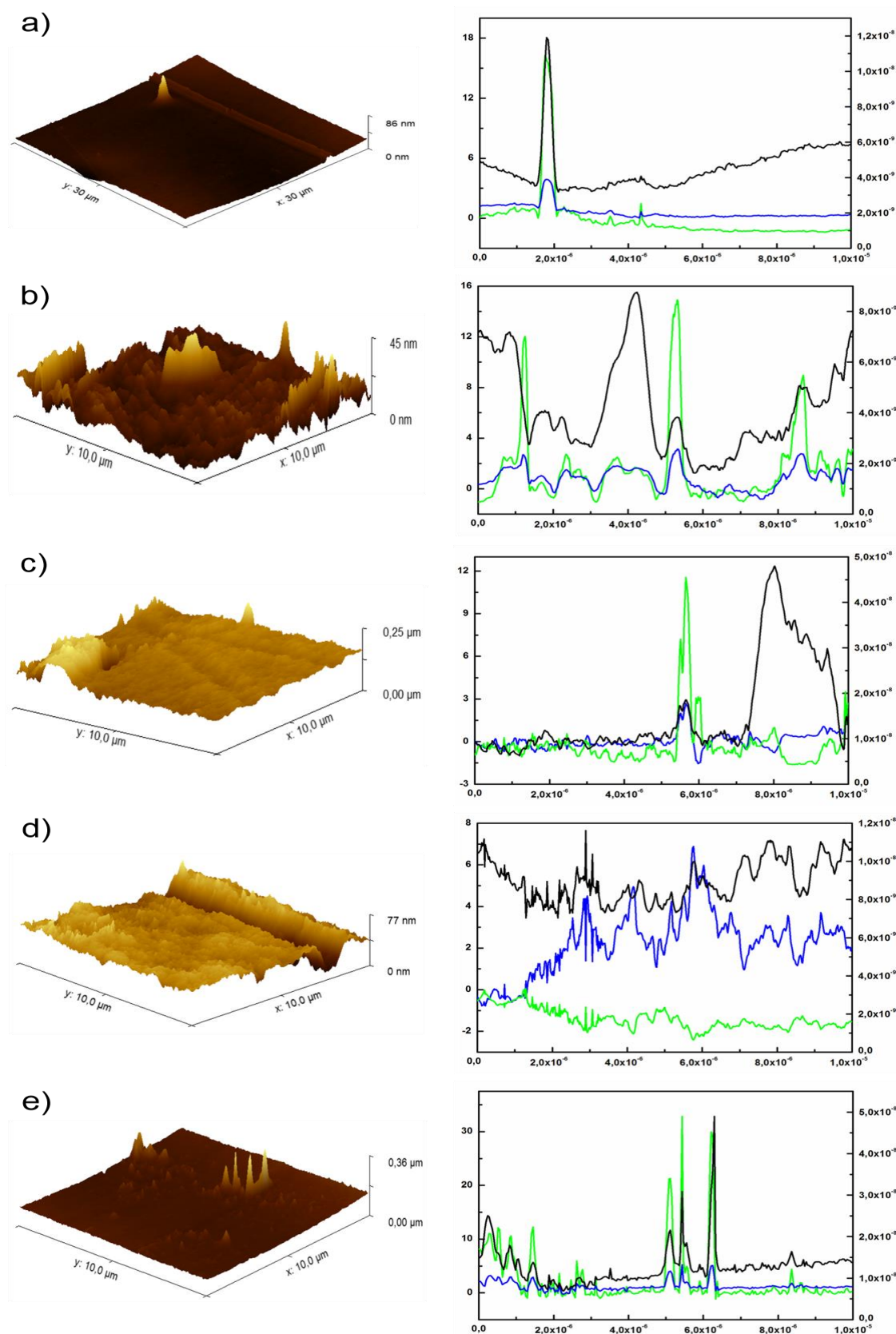


Figura 43 – Topografia em 3D da superfície (esquerda) com área de varredura 10x10 μm² e altura máxima (SZ) no eixo z. Dados da superfície (direita): rugosidade (RMS) (preto) no eixo z, coeficiente de assimetria (SSK) (azul), coeficiente de curtose (SK) (verde). (a) F-DS_{9h} (b) em presença de CuSO₄ 0,005 mol.L⁻¹. (c) em presença de CuSO₄ 0,05 mol.L⁻¹. (d) em presença de CoSO₄ 0,005 mol.L⁻¹. (e) em presença de CoSO₄ 0,05 mol.L⁻¹.

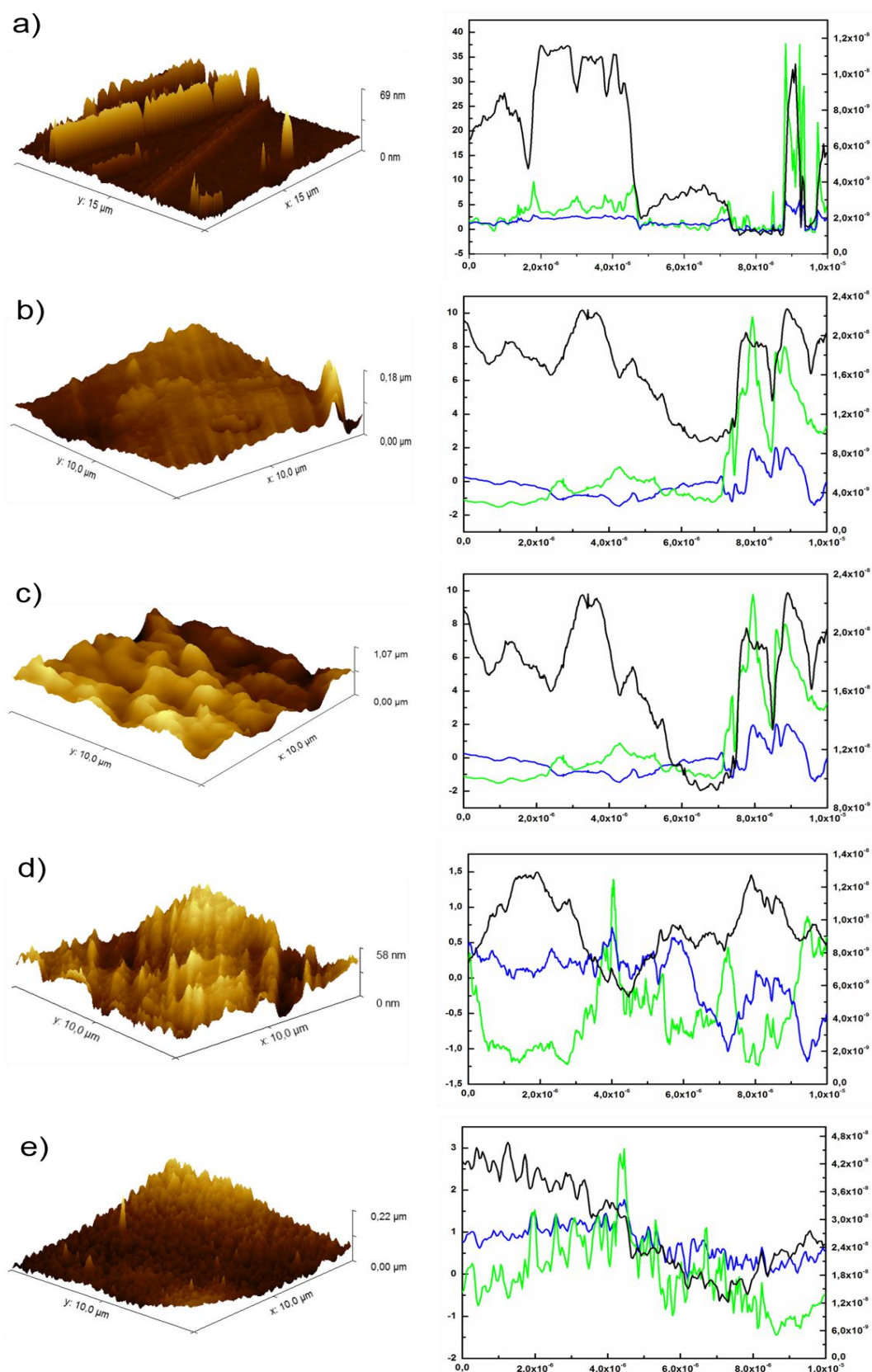


Figura 44 – Topografia em 3D da superfície (esquerda) com área de varredura $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ e altura máxima (SZ) no eixo z. Dados da superfície (direita): rugosidade (RMS) (preto) no eixo z, coeficiente de assimetria (SSK) (azul), coeficiente de curtose (SK) (verde). (a) F-COM (b) em presença de CuSO_4 $0,005 \text{ mol.L}^{-1}$. (c) em presença de CuSO_4 $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$. (d) em presença de CoSO_4 $0,005 \text{ mol.L}^{-1}$. (e) em presença de CoSO_4 $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$.

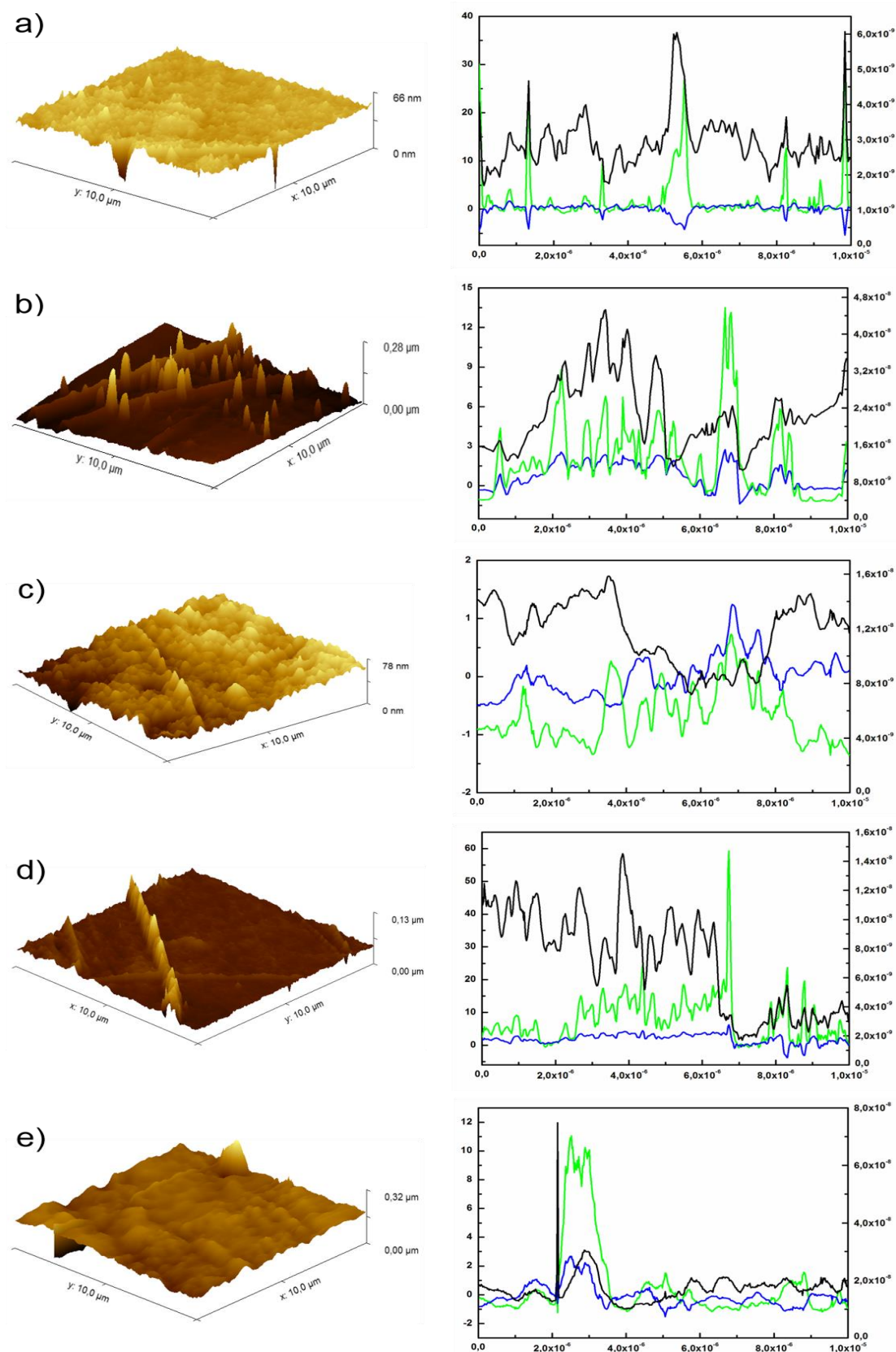


Figura 45 – Topografia em 3D da superfície (esquerda) com área de varredura 10x10 μm² e altura máxima (SZ) no eixo z. Dados da superfície (direita): rugosidade (RMS) (preto) no eixo z, coeficiente de assimetria (SSK) (azul), coeficiente de curtose (SK) (verde). (a) F-DS_{9H}/C-02 (b) em presença de CuSO₄ 0,005 mol.L⁻¹. (c) em presença de CuSO₄ 0,05 mol.L⁻¹. (d) em presença de CoSO₄ 0,005 mol.L⁻¹. (e) em presença de CoSO₄ 0,05 mol.L⁻¹.

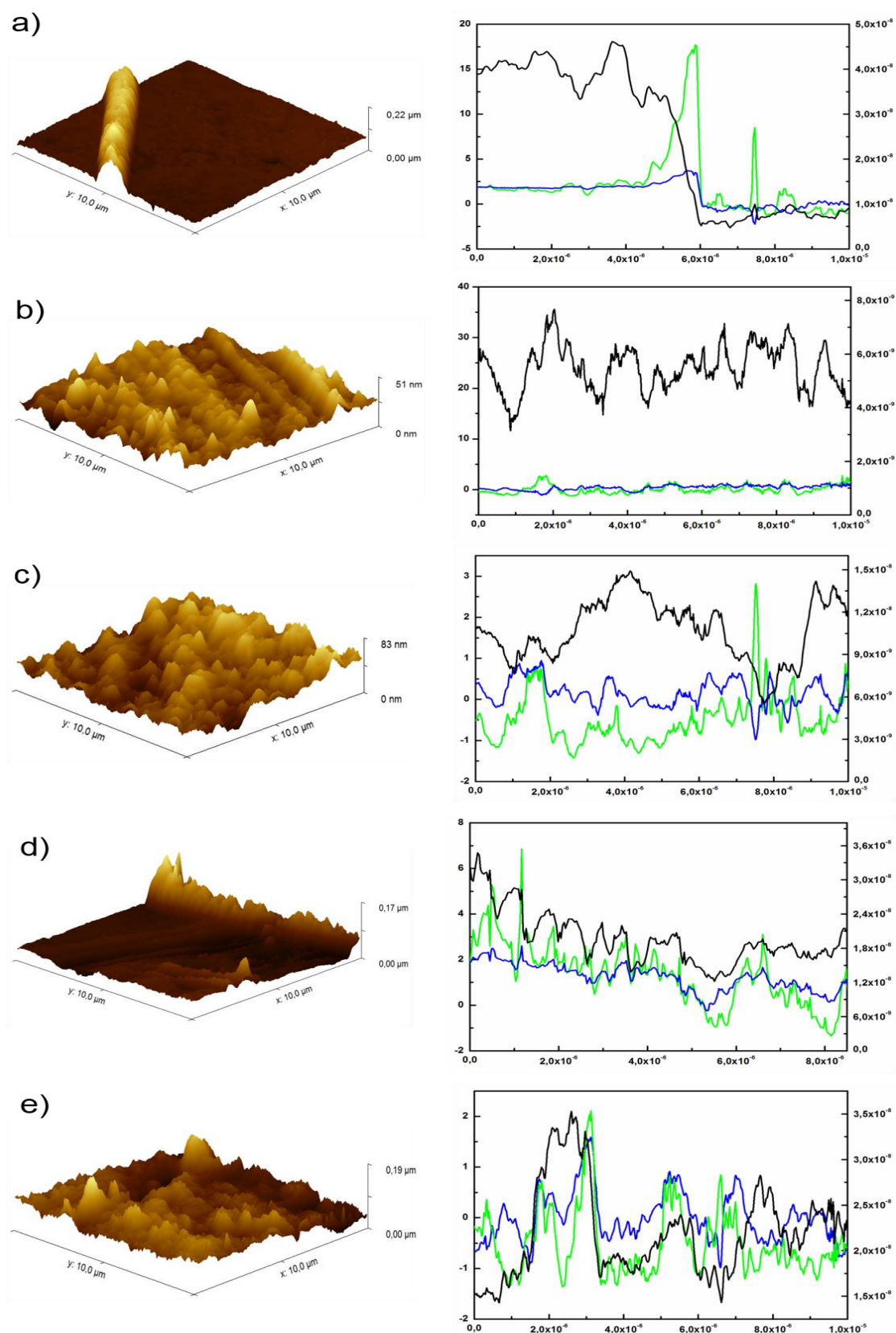


Figura 46 – Topografia em 3D da superfície (esquerda) com área de varredura 10x10 μm² e altura máxima (SZ) no eixo z. Dados da superfície (direita): rugosidade (RMS) (preto) no eixo z, coeficiente de assimetria (SSK) (azul), coeficiente de curtose (SK) (verde). (a) F-COM/C-01. (b) em presença de CuSO₄ 0,005 mol.L⁻¹. (c) em presença de CuSO₄ 0,05 mol.L⁻¹. (d) em presença de CoSO₄ 0,005 mol.L⁻¹. (e) em presença de CoSO₄ 0,05 mol.L⁻¹.

Um estudo comparativo entre o parâmetro de rugosidade quadrática média (RMS) e o parâmetro espacial entropia (H) é importante no sentido de observar as variações desses parâmetros para cada filme (Figura 47). A variação dos parâmetros RMS e H, no que diz respeito à estrutura dos filmes, apresentaram variações insignificantes entre a rugosidade e a entropia para os filmes F-DS_{9h}/C-02 e F-COM_Cu^B, o que pode indicar uma menor diversidade no relevo da superfície (Figura 47). Uma proximidade relativa entre RMS e H também é observada nos filmes de quitosana puros F-DS_{9h}, F-COM e no filme de quitosana sintetizada após inserção do íon Cu (II) 0,005 mol.L⁻¹ (F-DS_{9h}_Cu^A). Para os demais filmes, são observados uma tendência semelhante, seguindo uma variação inversa entre entropia e rugosidade (Figura 47).

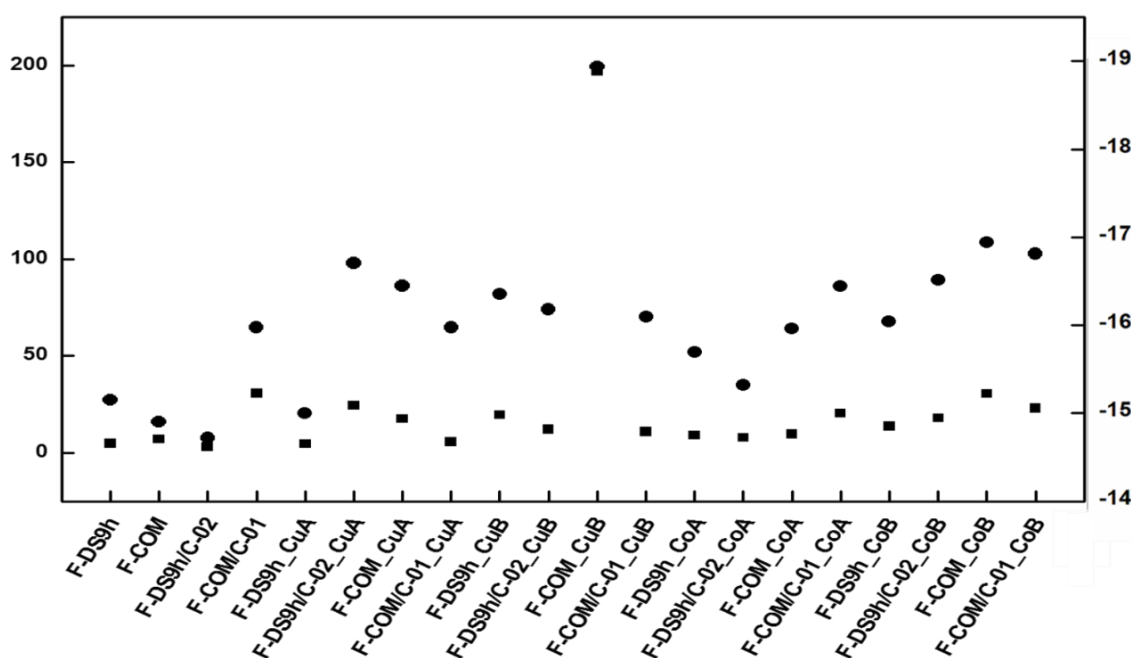
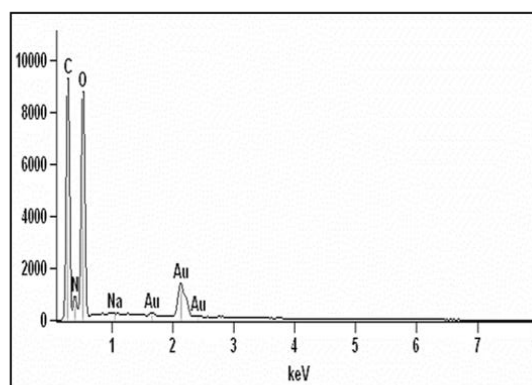
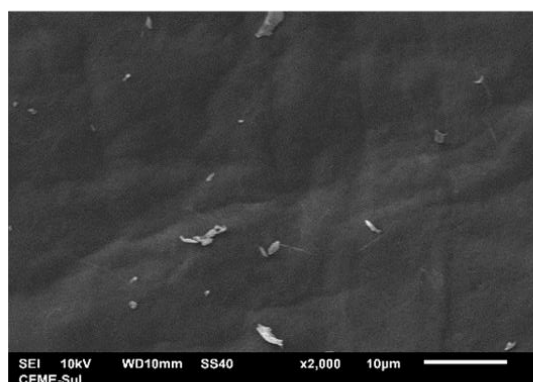


Figura 47 – Variação inversa dos parâmetros rugosidade (■) e entropia (●), da superfície dos filmes representada no eixo y e eixo z, respectivamente.

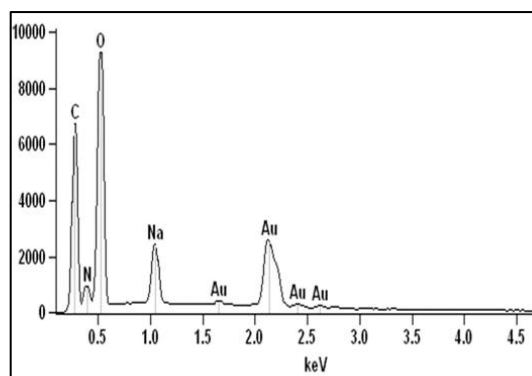
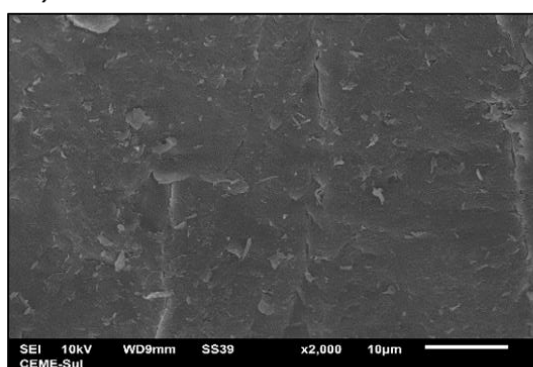
2.3.1.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

As análises por MEV/EDS propiciaram a avaliação da microestrutura superficial das amostras de quitosana em pó (DS_{9h}, COM) comparativamente ao produto inédito (C-02, C-01) (Figura 48, Tabela 38).

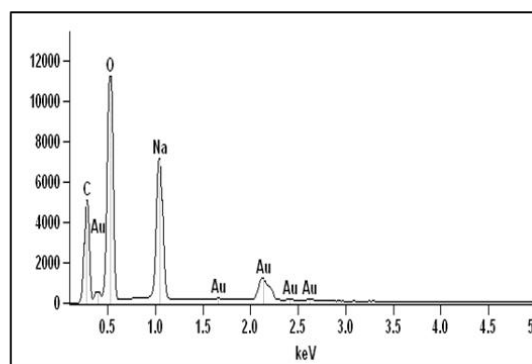
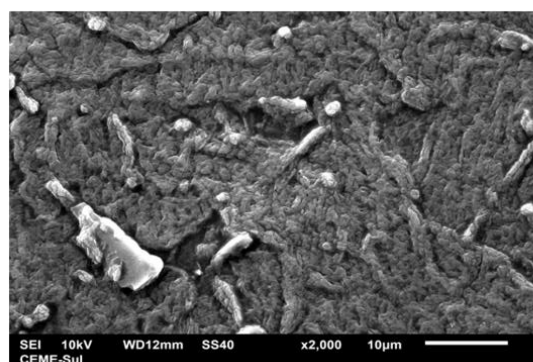
a)



b)



c)



d)

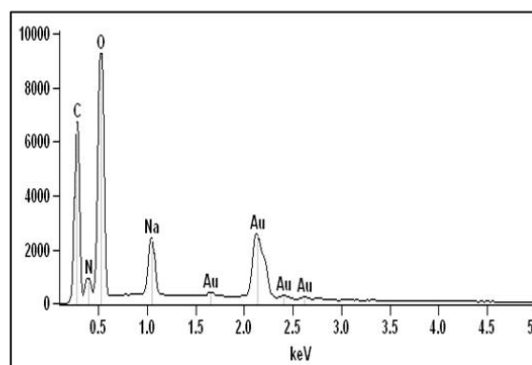
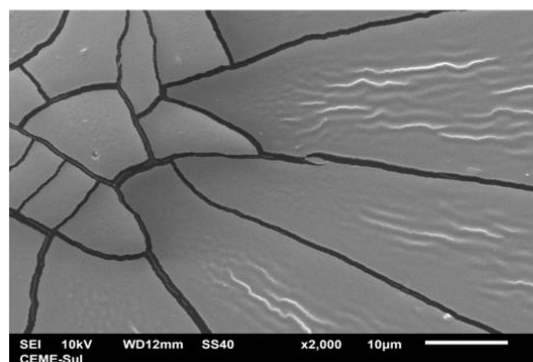


Figura 48 – Micrografias com magnitude de 2000x (10µm) e espectros de EDS (Intensidade cps eV⁻¹) versus energia (keV) das amostras de quitosana em pó DS_{9h} (a), COM (b) e dos produtos inéditos C-02 (c), C-01 (d).

Tabela 38 – Análise semiquantitativa do percentual atômico

Composição (%)	DS_{9h}	C-02	COM	C-01
C	32,88±0,33	22,49±0,31	35,61±0,53	24,04±0,32
N	8,20±0,84	15,42±0,41	7,81±2,08	11,58±0,32
O	56,45±0,80	55,49±0,68	52,67±0,95	55,01±0,79
Na	0,41±0,09	4,76±0,24	0,39±0,11	5,75±0,14
Au	2,06±0,06	1,84±0,06	3,62±0,09	3,62±0,07

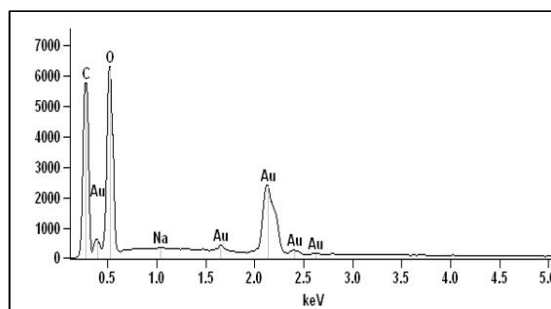
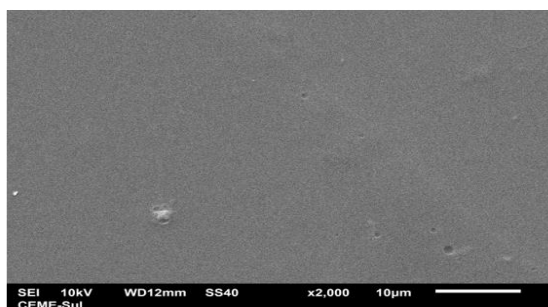
As micrografias apresentaram uma morfologia mais lisa e homogênea para as amostras em pó de quitosanas DS_{9h} e COM (Figura 48), o que está de acordo com a literatura (EL KNIDRI et al., 2016; KUMARI et al., 2017; SHETH et al., 2021). Os produtos inéditos apresentaram variações na aparência da superfície. Para o C-02 observa-se uma aparência fibrosa, enquanto o C-01 revela uma aparência fraturada (Figura 48), fato que pode ter relação com a característica da amostra de quitosana utilizada para sua síntese, para o C-01 foi utilizada a amostra comercial que é pulverizada e para o C-02 a quitosana sintetizada DS_{9h} que apresenta-se na forma de escamas.

Os dados da espectroscopia de EDS (Tabela 38) identificaram os átomos de C, N e O, que são os principais elementos da quitosana, o que está de acordo com a literatura (EL KNIDRI et al., 2016; HOMEZ-JARA et al., 2018; KUMARI et al., 2017; SOON et al., 2018).

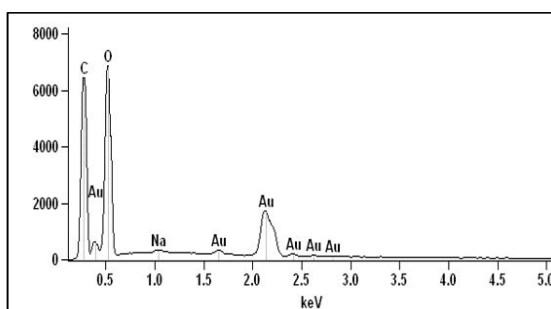
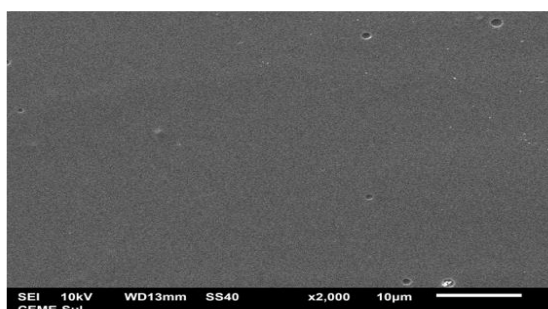
Cabe ainda ressaltar que um maior percentual atômico do átomo de nitrogênio foi identificado para os produtos inéditos C-01 (11,58%) e C-02 (15,42%), comparado às quitosanas DS_{9h} (8,20%) e COM (7,81%), justificado pela inserção de grupos triazenos à quitosana com adição de NaNO₂ para a diazotação e neutralização com NH₄OH durante a síntese. O aumento no percentual de sódio em C-01 e C-02 de (5,75; 4,76%) comparado ao pó de quitosana COM e DS_{9h} de (0,39; 0,41%) também foi observado.

Micrografias também foram obtidas para os filmes de quitosana puros (F-DS_{9h}, F-COM) e filmes de quitosana modificados com o produto inédito (F-DS_{9h}/C-02, F-COM/C-01) (Figura 49).

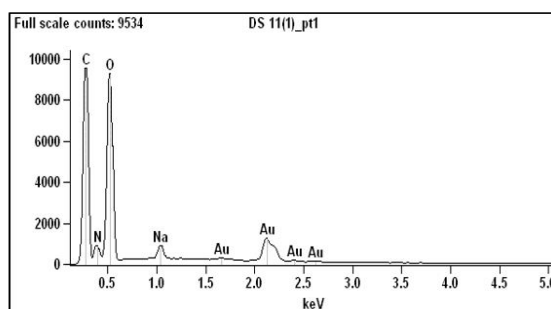
a)



b)



c)



d)

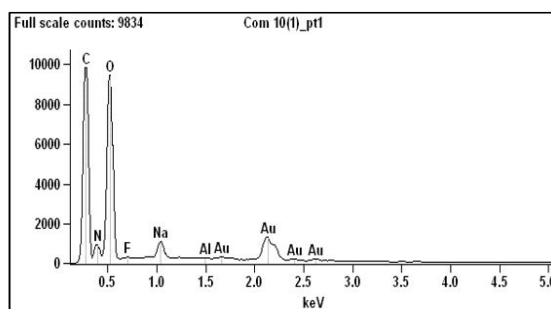
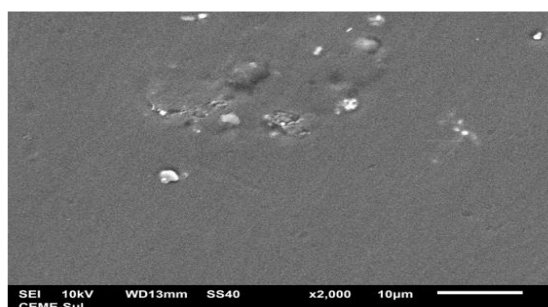


Figura 49 – Micrografias com magnitude de 2000x (10µm) e espectros de EDS Micrografias com magnitude de 2000x (10µm) e espectros de EDS (Intensidade (cps eV⁻¹) versus energia (keV) dos filmes de quitosana puros F-DS_{9h} (a), F-COM (b), F-DS_{9h}/C-02 (c), F-COM/C-01 (d).

As micrografias dos filmes de quitosana (Figura 49) puros F-DS_{9h} e F-COM apresentaram uma aparência mais lisa e homogênea comparado aos filmes modificados F-DS_{9h}/C-02, F-COM/C-01 o que está de acordo com a

literatura ao comparar filmes puros e modificados (PRIYADARSHI et al., 2018; TANG et al., 2021). A morfologia da superfície dos filmes de quitosana é relatada na literatura com uma morfologia uniforme e homogênea (HOMEZ-JARA et al., 2018; PRIYADARSHI et al., 2018). A presença de pequenas partículas sólidas pode ser observada na superfície dos filmes modificados com o produto inédito F-DS_{9h}/C-02, F-COM/C-01.

Comparando as micrografias dos filmes de quitosanas puros F-DS_{9h}, F-COM (Figura 49) com os respectivos produtos em pó DS_{9h} e COM (Figura 48), fica evidente que os filmes de quitosana compõem uma morfologia mais lisa e homogênea (HOMEZ-JARA et al., 2018; KUMARI et al., 2017).

Os espectros de EDS permitem evidenciar uma redução no percentual atômico do nitrogênio em F-COM e F-DS_{9h} em comparação com as amostras de quitosana na forma de pó COM e DS_{9h} (Tabela 39). Essa redução é justificada pois na formação do filme, ocorre o processo de reticulação das cadeias poliméricas da quitosana com a inserção de ácido acético, com a função de unir suas cadeias gerando uma rede polimérica (FRICK et al., 2018; HOMEZ-JARA et al., 2018; SIVASELVI; GHOSH, 2017). Além disso, pode-se destacar que o aumento de N% em F-DS_{9h}/C-02 e F-COM/C-01 em comparação a F-DS_{9h} e F-COM comprova a inserção dos compostos triazenos nos respectivos filmes.

Outro destaque percebido foi o aumento no percentual atômico do átomo de sódio após a formação dos filmes modificados F-DS_{9h}/C-02 e F-COM/C-01 (1,82; 2,36%) comparados aos filmes F-DS_{9h} e F-COM (0,49; 0,44%). Fato também justificado pela presença de C-01 e C-02. Apesar disso, não foi identificado sódio em nenhum dos filmes F-COM/C-01/Cu^B, F-DS_{9h}/C-02/Cu^B, F-COM/C-01/Co^B, F-DS_{9h}/C-02/Co^B, isto é, quando os cátions Cu (II) e Co (II) forma inseridos na concentração de 0,05 mol.L⁻¹. Isso mostra o deslocamento dos cátions alcalinos Na⁺ (duros) pelos cátions de transição Cu²⁺ e Co²⁺ na ligação pelos sítios da quitosana modificada, evidenciando maior afinidade desses sítios por cátions de transição mais moles.

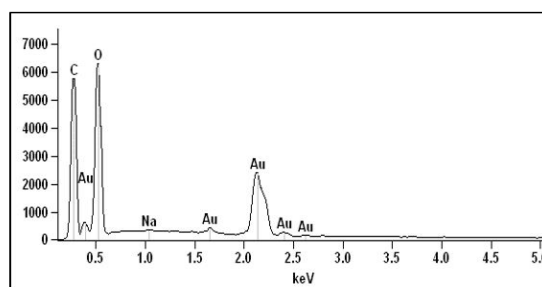
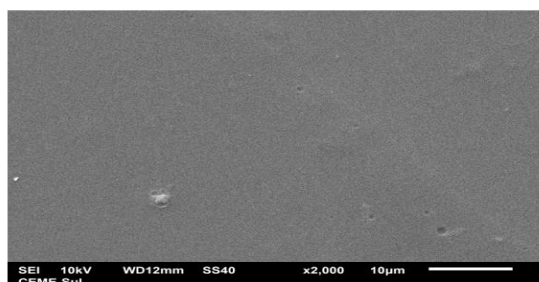
A análise de EDS permitiu evidenciar qualitativamente o percentual atômico dos íons metálicos Cu (II) e Co (II) inseridos nos filmes de quitosana (Tabela 39) (KARAER; KAYA, 2017; KULKARNI et al., 2020; MILOSAVLJEVIĆ et al., 2011; SAHEBJAMEE et al., 2019; TANG et al., 2021)(WANG, 2018).

Tabela 39 – Análise semiquantitativa do percentual atômico por EDS.

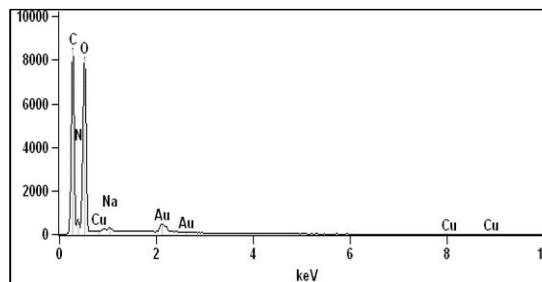
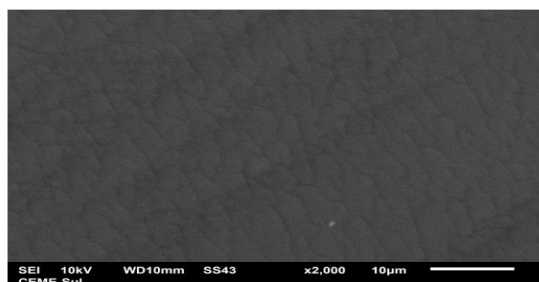
Amostras	Composição (%)						
	C	N	O	Na	Au	Co	Cu
F-DS_{9h}	29,34±0,45	5,49±0,21	58,91±0,93	0,49±0,11	5,77±0,12	--	--
F-DS_{9h}/Cu^A	29,10±0,35	12,22±0,95	57,09±0,82	0,46±0,08	0,86±0,05	--	0,27
F-DS_{9h}/Cu^B	28,89±0,35	12,57±0,88	55,11±0,79	--	0,62±0,04	--	2,81±0,12
F-DS_{9h}/Co^A	28,22±0,36	11,67±0,97	58,28±0,86	0,59±0,07	0,97±0,04	0,27±0,15	--
F-DS_{9h}/Co^B	28,63±0,42	12,14±0,92	55,90±0,95	--	2,31±0,16	2,02±0,21	--
F-DS_{9h}/C-02	28,77±0,34	12,75±0,85	55,00±0,78	1,82±0,1	1,65±0,06	--	--
F-DS_{9h}/C-02/Cu^A	27,07±0,40	10,81±1,16	59,51±0,98	0,92±0,16	1,28±0,07	--	0,42±0,11
F-DS_{9h}/C-02/Cu^B	23,98±0,11	10,54±0,99	61,60±0,95	--	1,31±0,06	--	2,57±0,16
F-DS_{9h}/C-02/Co^A	27,93±0,36	12,22±0,96	57,44±0,86	0,69±0,11	1,43±0,06	0,29±0,10	--
F-DS_{9h}/C-02/Co^B	23,84±0,32	10,23±0,82	61,49±0,91	--	0,97±0,07	3,47±0,28	--
F-COM	28,93±0,44	5,77±0,12	60,71±0,90	0,44±0,10	4,15±0,10	--	--
F-COM/Cu^A	26,61±0,34	12,75±0,91	59,25±0,81	0,38±0,09	0,83±0,05	--	0,18±0,06
F-COM/Cu^B	25,22±0,37	10,70±0,99	60,74±0,93	--	1,09±0,05	--	2,25±0,14
F-COM/Co^A	26,64±0,42	10,97±0,95	60,68±1,09	0,27±0,07	1,22±0,06	0,22±0,10	--
F-COM/Co^B	24,87±0,43	9,85±1,05	61,44±1,16	--	1,05±0,06	2,78±0,26	--
F-COM/C-01	29,09±0,34	10,71±0,85	56,11±0,77	2,36±0,11	1,73±0,06	--	--
F-COM/C-01/Cu^A	30,14±0,34	13,24±0,88	54,65±0,77	1,09±0,08	0,54±0,03	--	0,34±0,09
F-COM/C-01/Cu^B	24,34±0,34	11,01±0,90	61,63±0,89	--	0,50±0,06	--	2,51±0,14
F-COM/C-01/Co^A	26,99±0,34	11,82±0,91	58,38±0,89	0,79±0,07	1,04±0,04	0,98±0,14	--
F-COM/C-01/Co^B	24,41±0,38	10,35±1,02	61,46±1,06	--	0,64±0,08	3,13±0,35	--

As características morfológicas gerais da superfície dos filmes também foram investigadas para avaliar a influência da modificação química e inserção dos íons Cu(II) e Co(II) nas concentrações de 0,005 mol.L⁻¹ (A) e 0,05 mol.L⁻¹ (B) (Figuras 50-53). No geral é observada menor homogeneidade de superfície à medida que os cátions são adicionados aos filmes F-DS_{9h}, F-COM, F-DS_{9h}/C-02 e F-COM/C-01, sendo que quanto maior a concentração de Cu(II) ou Co(II), menor é a homogeneidade da superfície. É possível observar que nos filmes que contêm os triazenos C-01 e C-02 (F-DS_{9h}/C-02 e F-COM/C-01) as irregularidades de superfície são maiores na presença dos cátions Cu(II) e Co(II) do que nos filmes F-DS_{9h} e F-COM. No entanto essas superfícies parecem ser mais organizadas, o que indica incremento no tipo de interação metal-ligante, neste caso o incremento da complexação triazeno-Cu(II) ou triazeno-Co(II), além da interação esperada dos cátions metálicos com os grupos hidroxila e amino da quitosana, lembrando que somente interações metal-nitrogênio foram claramente evidenciadas por meio do FT-IV.

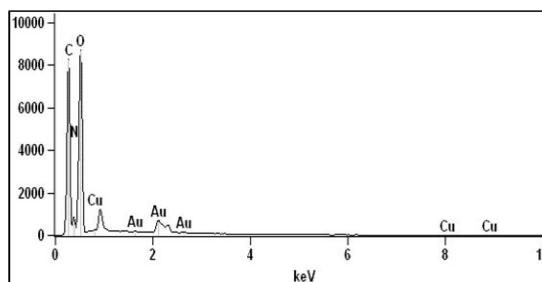
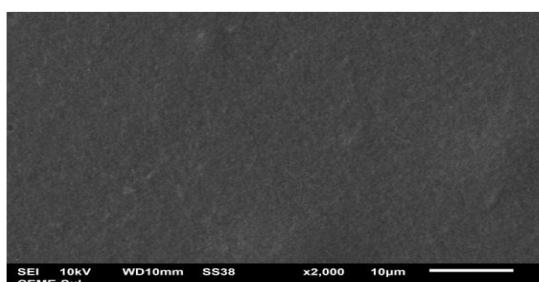
a)



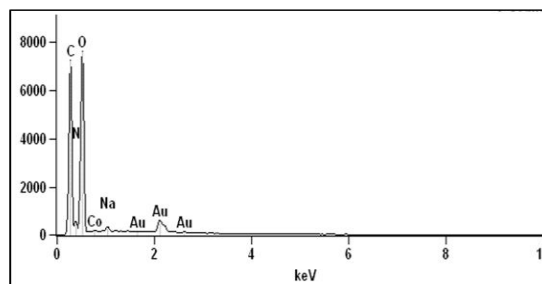
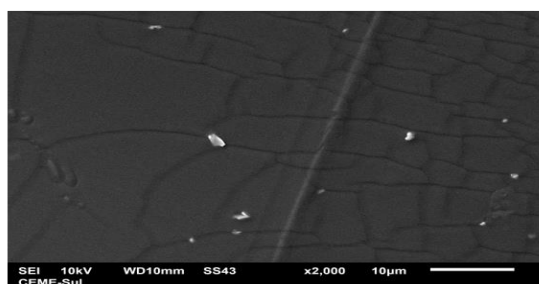
b)



c)



d)



e)

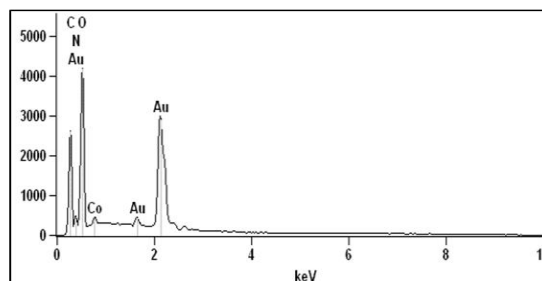
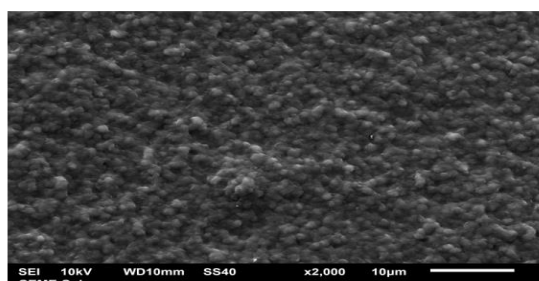
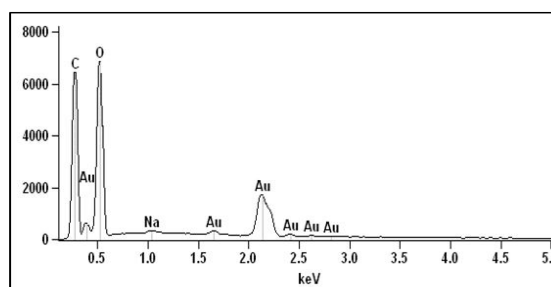
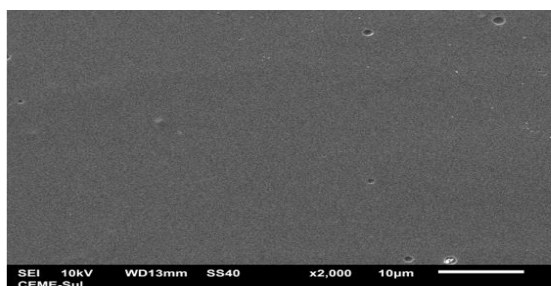
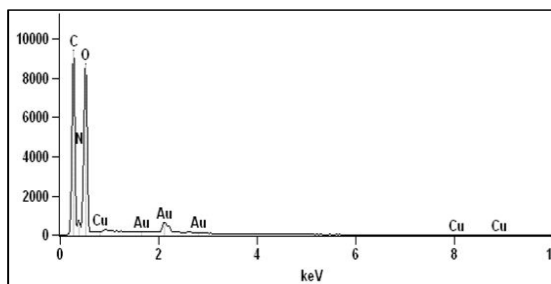
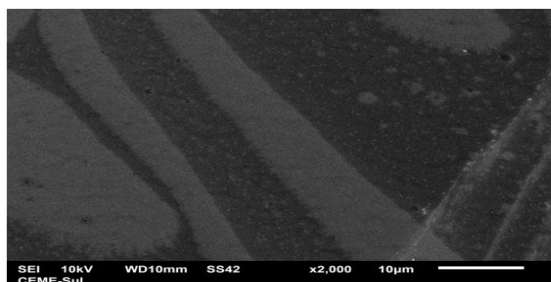


Figura 50 – Micrografias com magnitude de 2000x (10µm) e espectros de EDS Micrografias com magnitude de 2000x (10µm) e espectros de EDS (Intensidade (cps eV⁻¹) versus energia (keV) dos filmes F-DS_{9h} (a), F-DS_{9h}/Cu^A (b), F-DS_{9h}/Cu^B (c), F-DS_{9h}/Co^A (d), F-DS_{9h}/Co^B (e)

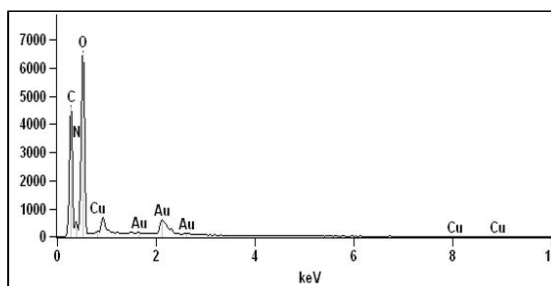
a)



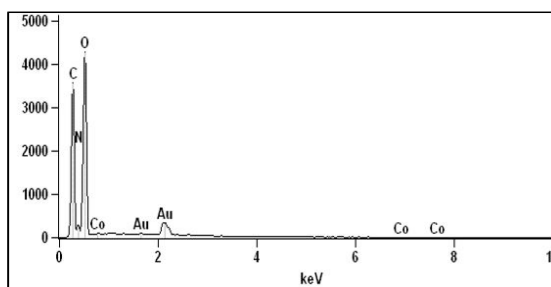
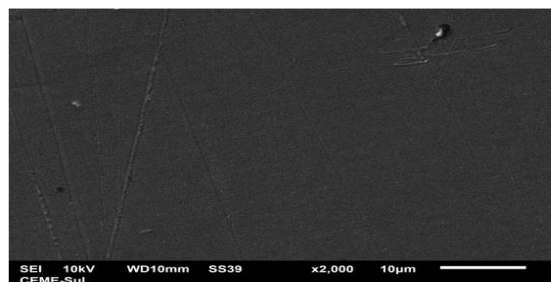
b)



c)



d)



e)

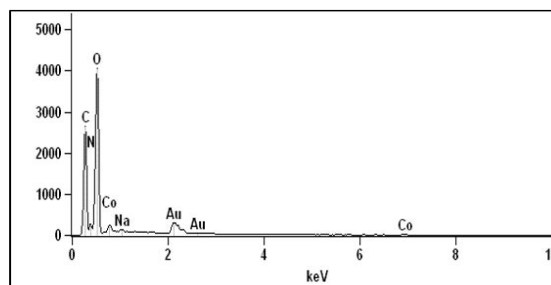
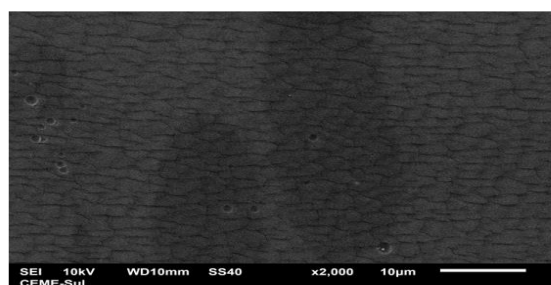


Figura 51 – Micrografias com magnitude de 2000x (10µm) e espectros de EDS Micrografias com magnitude de 2000x (10µm) e espectros de EDS (Intensidade (cps eV⁻¹) versus energia (keV) dos filmes F-COM (a), F-COM/Cu^A (b), F-COM/Cu^B (c), F-COM/Co^A (d), F-COM/Co^B (e)

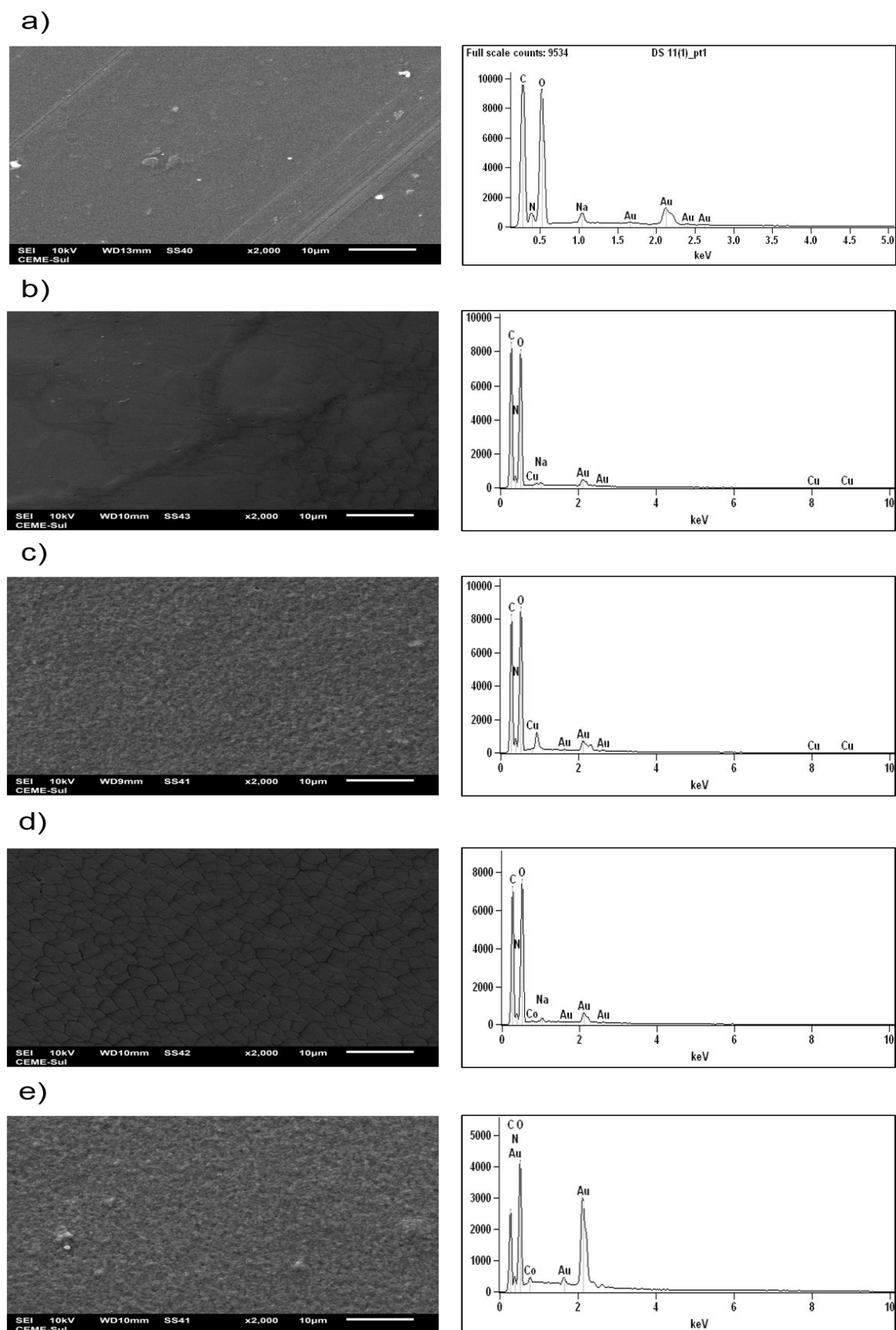
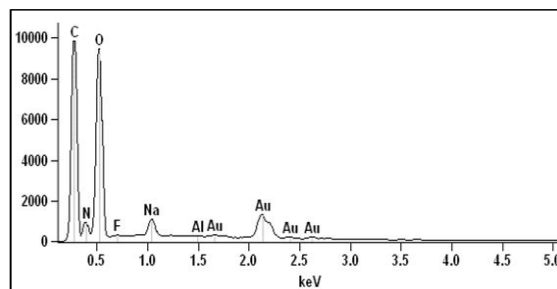
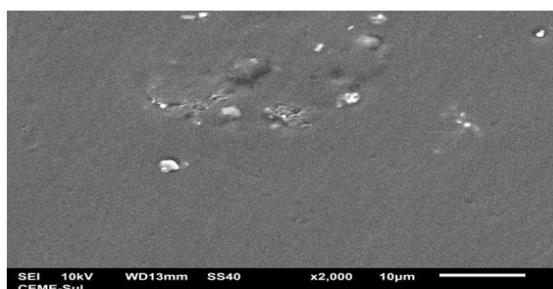
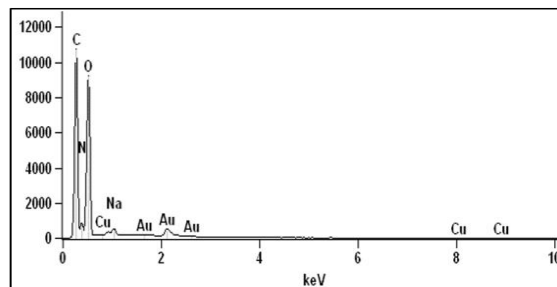
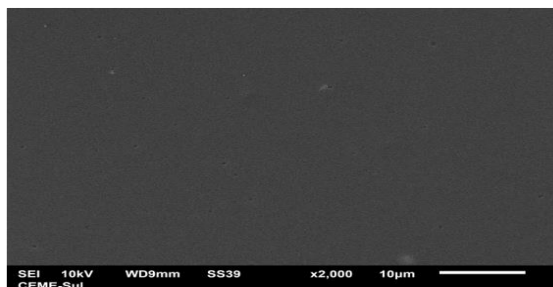


Figura 52 – Micrografias com magnitude de 2000x (10µm) e espectros de EDS Micrografias com magnitude de 2000x (10µm) e espectros de EDS (Intensidade (cps eV⁻¹) versus energia (keV) dos filmes F-DS_{9h}/C-02 (a), F-DS_{9h}/C-02 /Cu^A (b), F-DS_{9h}/C-02 /Cu^B (c), F-DS_{9h}/C-02/Co^A (d) F-DS_{9h}/C-02/Co^B (e)

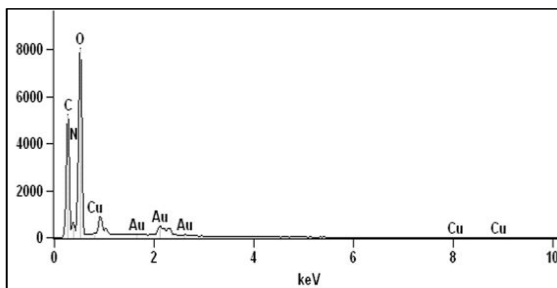
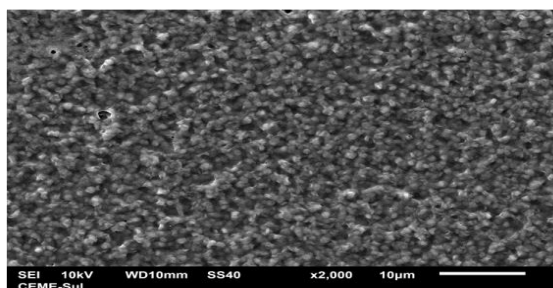
a)



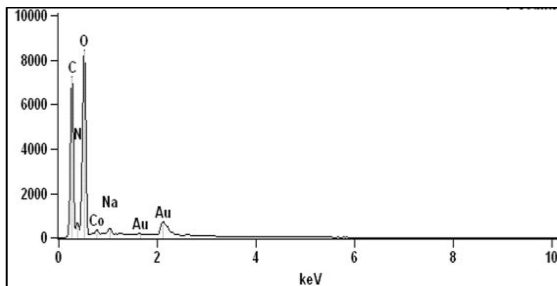
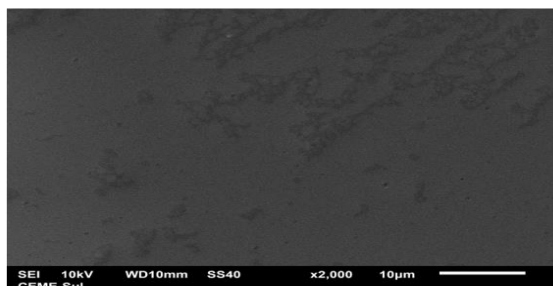
b)



c)



d)



e)

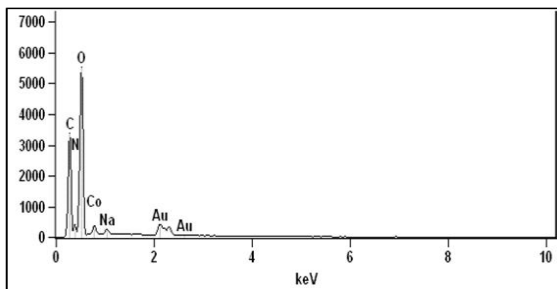
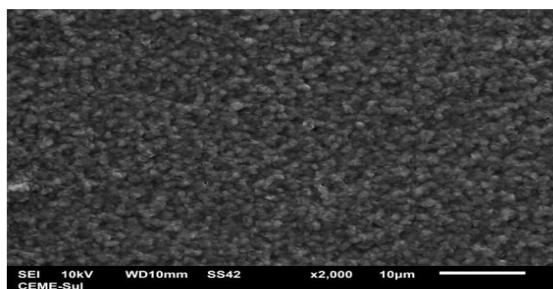


Figura 53 – Micrografias com magnitude de 2000x (10µm) e espectros de EDS Micrografias com magnitude de 2000x (10µm) e espectros de EDS (Intensidade (cps eV⁻¹) versus energia (keV) dos filmes F-COM/C-01 (a), F-COM/C-01/Cu^A (b), F-COM/C-01/Cu^B (c), F-COM/C-01/Co^A (d) F-COM/C-01/Co^B (e).

A comparação de micrografias de MEV e imagens de AFM fornecem dados interessantes, tais como a presença de linhas na superfície dos filmes (Figuras 54 – 58) devido à reticulação das fibras poliméricas. Além da evidência de poros na superfície que fornecem sítios ativos para os metais Cu (II) e Co (II).

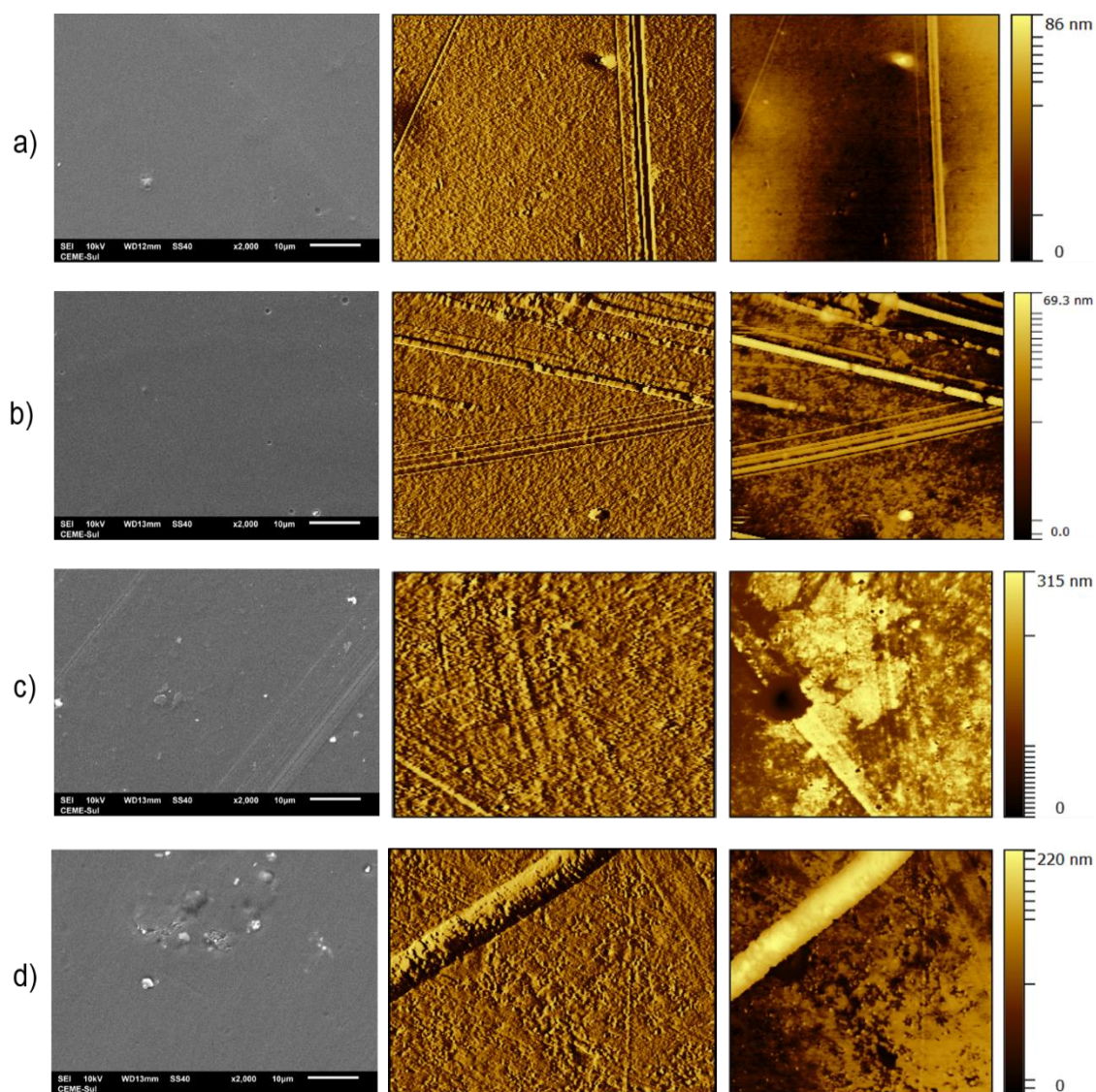


Figura 54 – Imagens comparativas obtidas por MEV representando as micrografias (esquerda) e AFM representando as imagens por deflexão (centro) e topografia (direita) dos filmes F-DS_{9h} (a), F-COM (b), F-DS_{9h}/C-02 (c) e F-COM/C-01 (d).

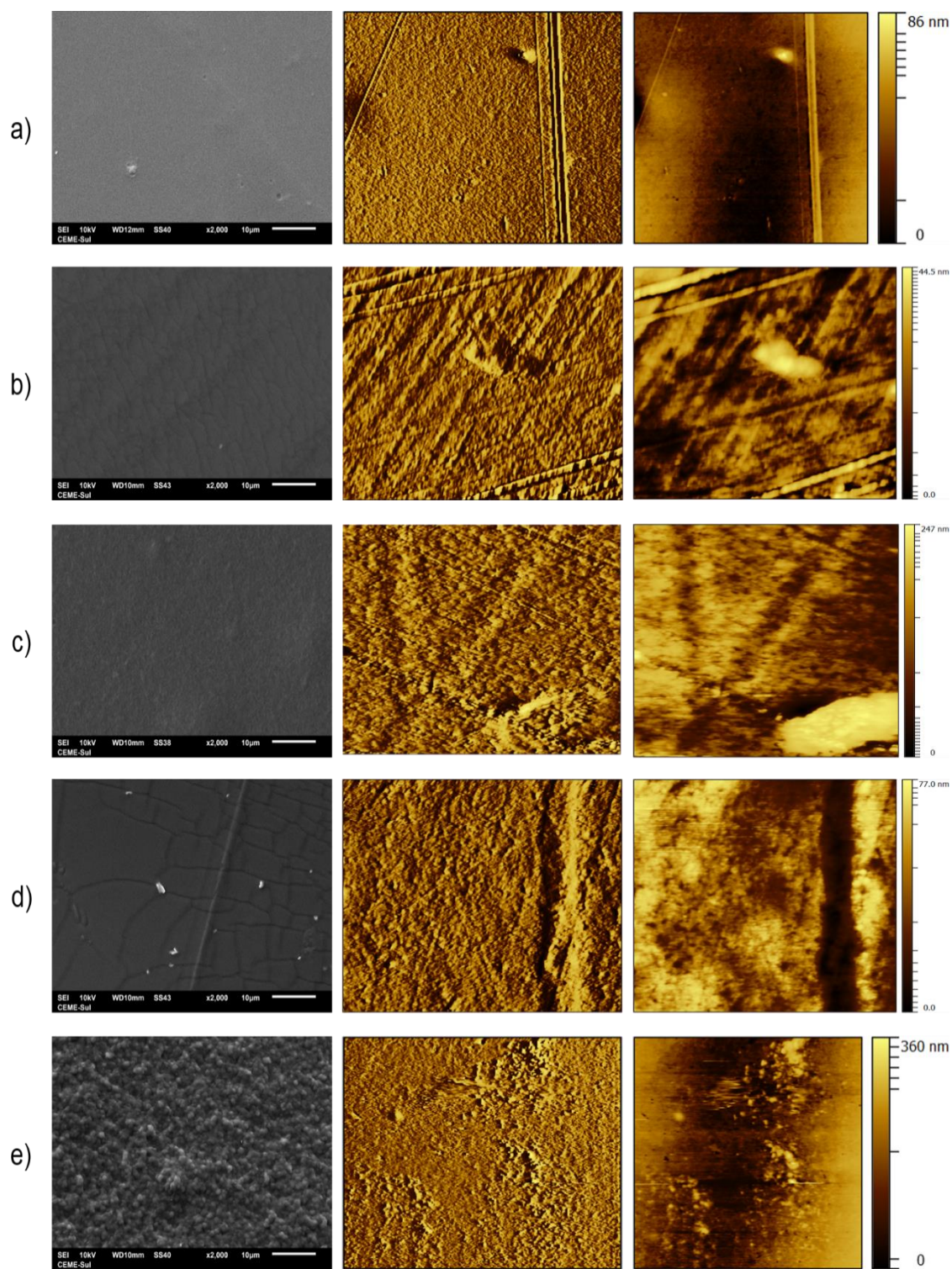


Figura 55 – Imagens comparativas obtidas por MEV representando as micrografias (esquerda) e AFM representando as imagens por deflexão (centro) e topografia (direita) dos filmes F-DS_{9h} (a), F-DS_{9h}/Cu^A (b), F-DS_{9h}/Cu^B (c), F-DS_{9h}/Co^A (d), F-DS_{9h}/Co^B (e).

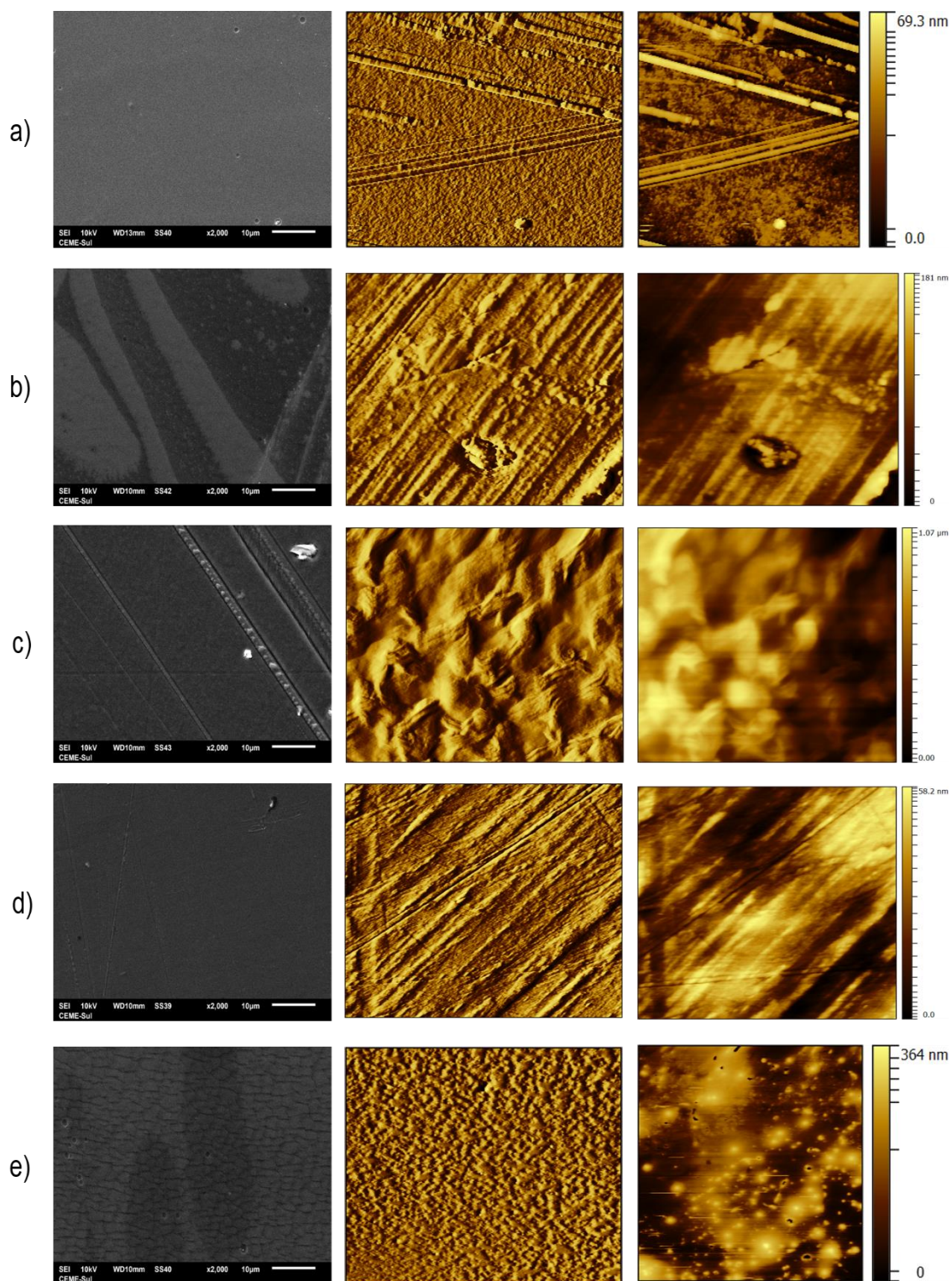


Figura 56 – Imagens comparativas obtidas por MEV representando as micrografias (esquerda) e AFM representando as imagens por deflexão (centro) e topografia (direita) dos filmes F-COM (a), F-COM/Cu^A (b), F-COM/Cu^B (c), F-COM/Co^A (d), F-COM/Co^B (e).

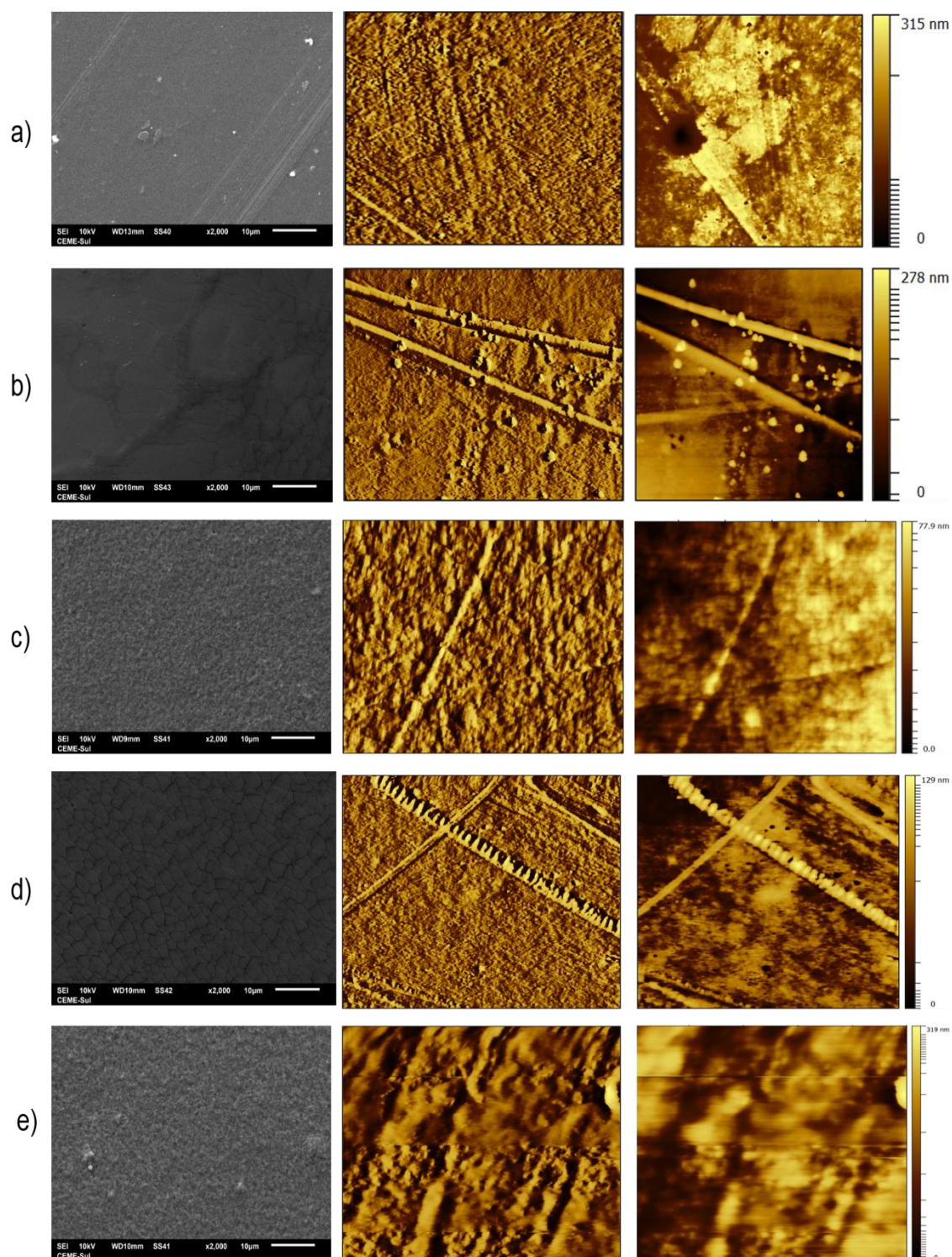


Figura 57 – Imagens comparativas obtidas por MEV representando as micrografias (esquerda) e AFM representando as imagens por deflexão (centro) e topografia (direita) dos filmes F-DS_{9h}/C-02 (a), F-DS_{9h}/C-02/Cu^A (b), F-DS_{9h}/C-02/Cu^B (c), F-DS_{9h}/C-02/Co^A (d), F-DS_{9h}/C-02/Co^B (e).

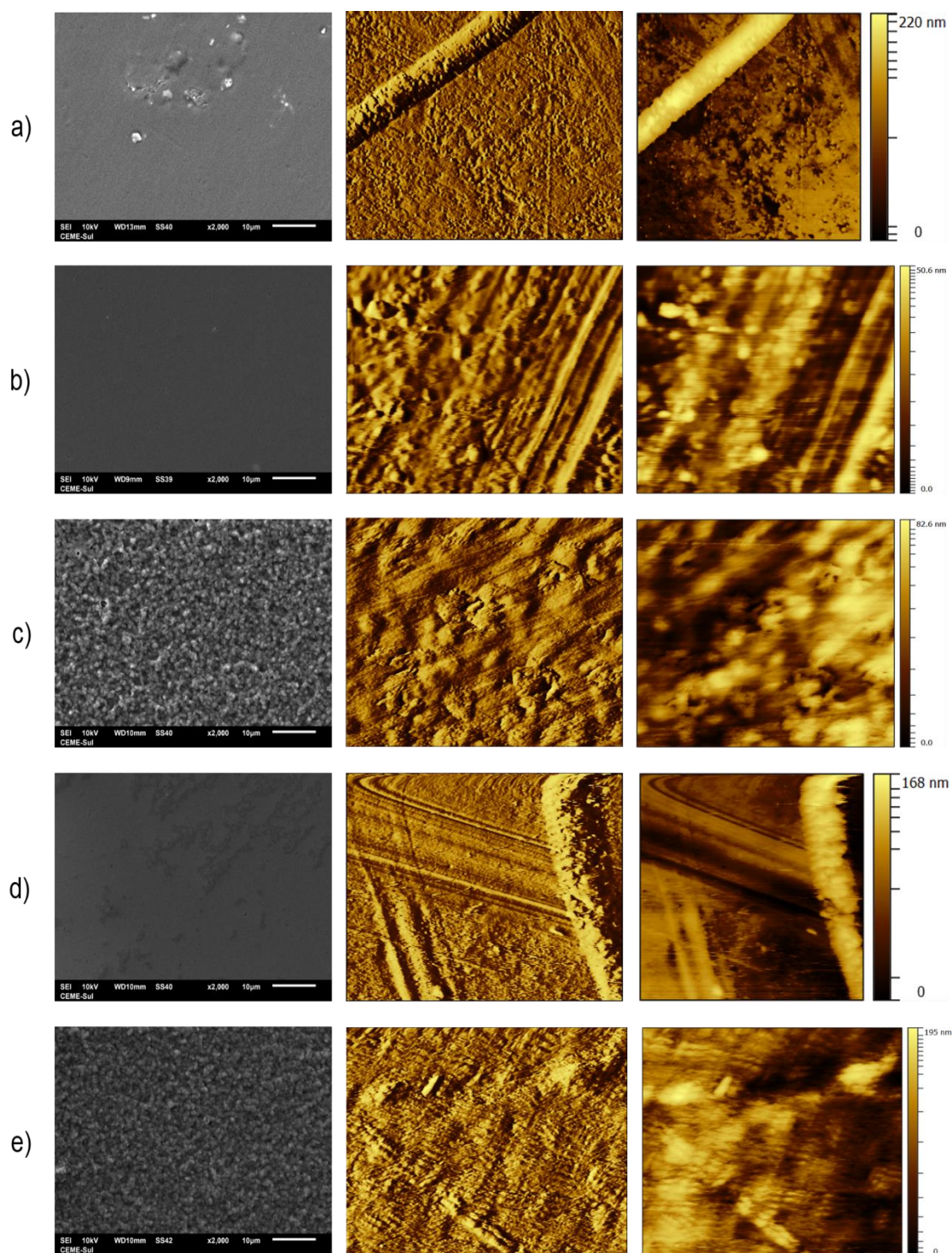


Figura 58 – Imagens comparativas obtidas por MEV representando as micrografias (esquerda) e AFM representando as imagens por deflexão (centro) e topografia (direita) dos filmes F-COM/C-01 (a), F-COM/C-01/CuA (b), F-COM/C-01/CuB (c), F-COM/C-01/CoA (d), F-COM/C-01.

2.3.1.8 Análise Mecânico-Dinâmica (AMD)

O ensaio de tração dos filmes de quitosana puros (F-DS_{9h}, F-COM) e modificados (F-DS_{9h}/C-02, F-COM/C-01) avaliaram sua capacidade de resistência mecânica (Figura 59).

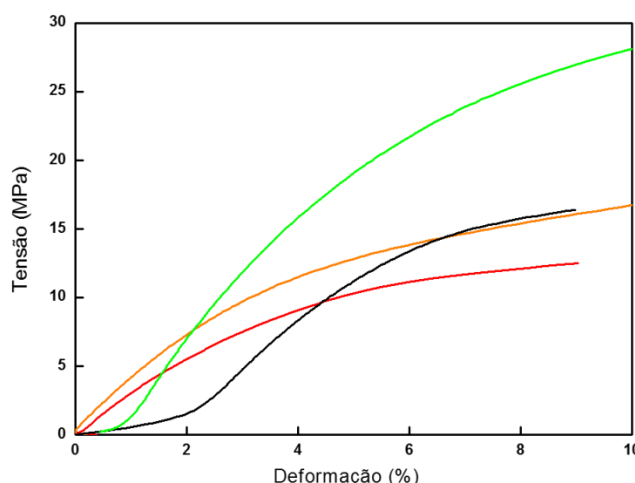


Figura 59 – Curvas do ensaio de tração dos filmes de quitosana F-DS_{9h} (vermelho), F-DS_{9h}/C-02 (laranja), F-COM (preto) e F-COM/C-01 (verde).

A tensão de ruptura é demonstrada na Figura 59. Os filmes de quitosana modificados com o produto inédito (F-DS_{9h}/C-02, F-COM/C-01) não romperam para essa faixa de ensaio especificamente, mostrando-se mais resistentes a taxa de aplicação de força de 3 N/min até atingir a capacidade do equipamento, força máxima de 18 N. Dessa maneira fica evidente que a modificação na quitosana pela inserção de C-01 e C-02 contribuiu com a reticulação do material e sua resistência. Como o filme F-COM/C-01 suportou maior tensão sem se romper até a força de 18N, pode ser considerado o mais elástico entre eles.

Os filmes de quitosana F-DS_{9h}, F-COM apresentaram deformação semelhante, no entanto F-COM apresentou maior tensão a ruptura comparado ao F-DS_{9h}. A tensão de ruptura é determinada pela resistência do material quando submetido à tração até o momento de sua ruptura, ou seja, a força necessária para rompê-lo quando aplicada uma tensão (CANEVAROLO, 2007).

O comportamento demonstrado pelas curvas de tração (Figuras 60-61) está de acordo com os resultados obtidos pelo cálculo do módulo de elasticidade (E), de acordo com a norma ASTM-E111 (1997) (Tabela 40). Os maiores valores de elasticidade são dados para os filmes que sofreram a maior deformação antes de romperem ou aos que não romperam nas condições avaliadas.

O módulo de elasticidade obtido para os filmes de quitosana sintetizada (F-DS_{9h}) e quitosana comercial (F-COM) foram de $1033,48 \pm 85,52$ MPa e $1153,93 \pm 60,82$ MPa, respectivamente. O que está em concordância com os relatados por Frick et al. (2018), que avaliaram as propriedades mecânicas de filmes de quitosana modificados e utilizaram como amostra controle um filme de quitosana puro com módulo de elasticidade de 1133 ± 187 MPa. Já os filmes de quitosana modificados com o produto inédito, (F-DS_{9h}/C-02, F-COM/C-01) propostos nesse estudo não romperam apresentando-se maior resistência e módulo de elasticidade (Tabela 40, Figura 59), superando as propriedades mecânicas dos filmes de quitosana puro com potencial promissor para produção de filmes de revestimento e podem ser avaliados em estudos futuros.

O módulo de elasticidade mede a rigidez do material, quanto maior o seu valor, mais rígido e resistente o material se apresenta. Os filmes de quitosana (F-DS_{9h}, F-DS_{9h}/C-02, F-COM e F-COM/C-01) mostraram maior resistência comparados aos filmes com os íons metálicos inseridos.

Os ensaios de tração com os filmes formados pela inserção dos íons Cu(II) e Co(II), nas concentrações de $0,005 \text{ mol.L}^{-1}$ e $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$, mostram menor resistência à ruptura que os filmes sem cátions metálicos. Quanto maior a concentração do cátion Co(II), menor é a resistência dos filmes (Figura 60), dessa maneira é evidente que a presença dos íons metálicos abala a organização polimérica do material, diminuindo sua resistência.

Assim, pode ser observado que a inserção dos cátions Co(II) (Figura 60) e Cu(II) (Figura 61), em menor concentração ($0,005 \text{ mol.L}^{-1}$) resultou em filmes mais elásticos, de modo a suportar maior tensão até sua ruptura, comparado aos filmes de maior concentração.

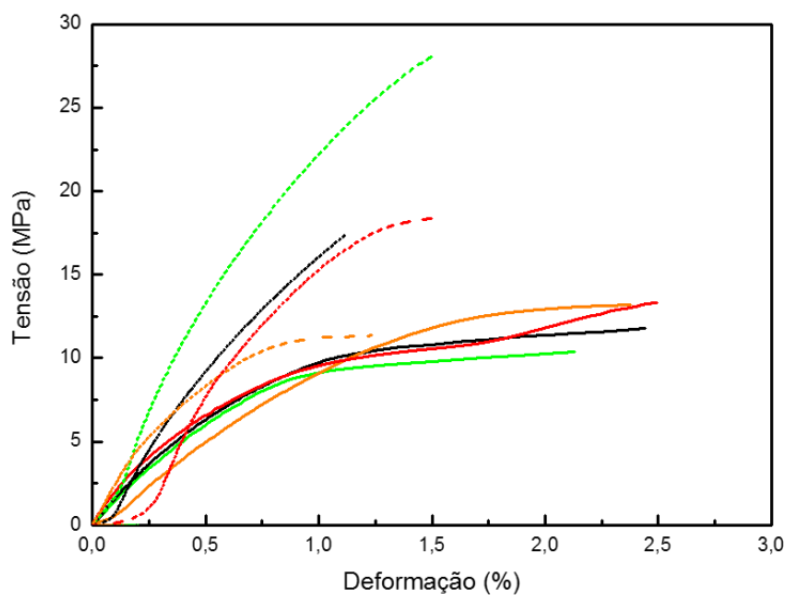


Figura 60 – Curvas de tração. F-DS_{9h}/Co (vermelho), F-DS_{9h}/C-02/Co (laranja), F-COM/Co (preto) e F-COM/C-01/Co (verde). Linha contínua = 0,005 mol.L⁻¹. Linha tracejada = 0,05 mol.L⁻¹.

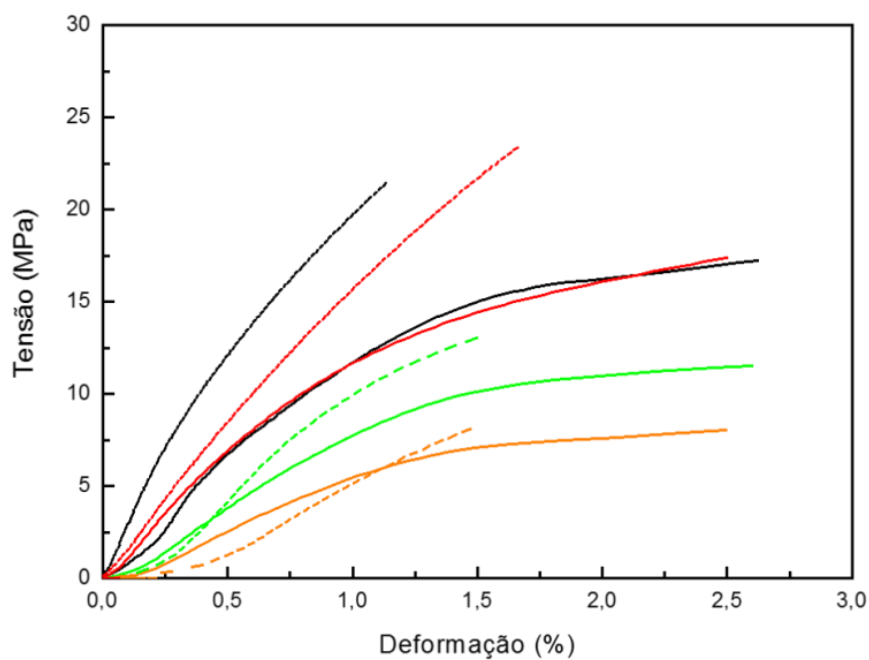


Figura 61 – Curvas de tração. F-DS_{9h}/Cu (vermelho), F-DS_{9h}/C-02/Cu (laranja), F-COM/Cu (preto) e F-COM/C-01/Cu (verde). Linha contínua = 0,005 mol.L⁻¹. Linha tracejada = 0,05 mol.L⁻¹.

Tabela 40 – Propriedades de tração dos ensaios. A = 0,005 mol.L⁻¹. B = 0,05 mol.L⁻¹.

Filmes	Tensão de ruptura* (MPa)	Módulo de elasticidade* (MPa)	Deformação* (%)
F-DS _{9h}	12,48±1,02	1033,48±85,52	8,511±0,157
F-DS _{9h} /Cu ^A	16,72±0,41	944,37±55,97	2,497±0,135
F-DS _{9h} /Cu ^B	16,39±0,82	873,65±51,23	1,587±0,270
F-DS _{9h} /Co ^A	28,04±1,01	827,19±55,47	2,476±0,352
F-DS _{9h} /Co ^B	17,38±0,52	773,75±51,08	1,499±0,291
F-DS _{9h} /C-02	8,051±0,40	1139,29±10,74	--
F-DS _{9h} /C-02/Cu ^A	17,23±0,51	580,83±31,56	2,524±0,114
F-DS _{9h} /C-02/Cu ^B	11,55±0,47	546,89±30,47	1,479±0,255
F-DS _{9h} /C-02/Co ^A	23,51±1,07	748,77±51,23	2,382±0,085
F-DS _{9h} /C-02/Co ^B	8,23±0,43	721,69±77,46	1,254±0,128
F-COM	21,42±0,69	1153,93±60,82	8,434±0,007
F-COM/Cu ^A	13,04±0,69	560,35±31,72	2,63±0,064
F-COM/Cu ^B	13,34±0,99	550,44±52,23	1,159±0,157
F-COM/Co ^A	13,22±1,23	744,49±93,90	2,459±0,333
F-COM/Co ^B	11,77±0,35	709,54±89,52	1,154±0,246
F-COM/C01	10,4±0,90	1189,74±72,17	--
F-COM/C-01/Cu ^A	18,45±0,85	676,94±75,74	2,589±0,094
F-COM/C-01/Cu ^B	11,36±1,17	622,81±74,91	1,535±0,205
F-COM/C01/Co ^A	17,36±0,50	732,05±31,14	2,175±0,015
F-COM/C01/Co ^B	28,08±0,77	655,36±57,43	1,499±0,078

*Dados médios das triplicatas

Na revisão da literatura não foram evidenciados estudos das propriedades mecânicas de filmes de quitosana com inserção de cátions metálicos e nem de filmes de quitosana com semelhante modificação a deste trabalho.

O módulo de elasticidade mede a rigidez do material, quanto maior o seu valor, mais rígido e resistente o material se apresenta (FRICK et al., 2018). Os filmes de quitosana (F-DS_{9h}, F-DS_{9h}/C-02, F-COM e F-COM/C-01) mostraram maior resistência comparados aos filmes com os íons metálicos inseridos Figura 62.

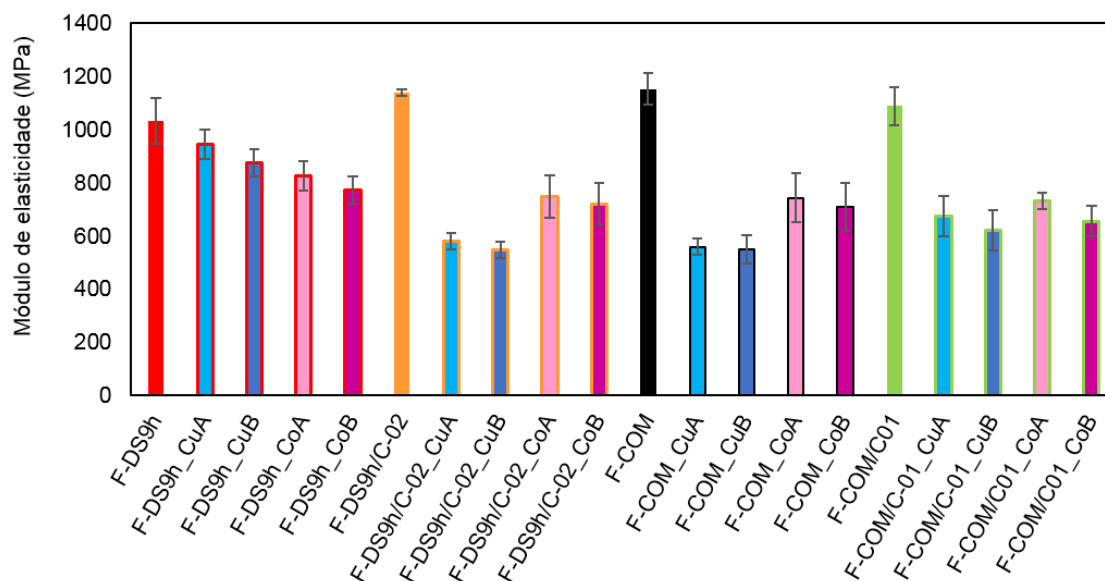


Figura 62 – Diagrama representando o módulo de elasticidade dos filmes. Destaque para os filmes de quitosana puros e modificados F-DS_{9h} (vermelho), F-DS_{9h}/C-02 (laranja), F-COM (preto) e F-COM/C-01 (verde).

Em geral, estudos de propriedades mecânicas de filmes poliméricos envolvem testes de resistência comparativamente a polímeros sintéticos, neste trabalho o foco são polímeros naturais, numa perspectiva eco-sustentável de substituição de polímeros sintéticos, como relata a literatura (FRICK et al., 2018; HOMEZ-JARA et al., 2018; NATARAJ et al., 2018). Nesse sentido, as propriedades mecânicas são de grande importância e de interesse científico e tecnológico, devido aos requisitos e/ou exigências que os diversos polímeros existentes devem atender na maior parte das suas aplicações.

2.3.2 Aplicações

2.3.2.1 Avaliação do potencial antifúngico

O potencial de toxicidade das amostras (Tabela 41) foi avaliado contra estruturas vegetativas e reprodutivas do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, com base em bioensaio *in vitro* destinado a avaliar a inibição do crescimento fúngico e da esporulação, respectivamente.

Tabela 41 – Descrição das amostras avaliadas

Amostras	Descrição*
F-DS _{9h}	Solução filmogênica
C-02	Pó dissolvido em solução
F-DS _{9h} /C-02	Solução filmogênica
F-COM	Solução filmogênica
C-01	Pó dissolvido em solução
F-COM/C-01	Solução filmogênica

* Soluções preparadas em ácido acético 0,25% por não ser tóxico às plantas hospedeiras do fungo segundo a literatura (FRÁGUAS et al., 2015)

Nas placas de cultura, de acordo com o que foi descrito na metodologia, foram realizadas avaliações por medições diárias do diâmetro das colônias em dois eixos ortogonais. As avaliações do crescimento micelial (fase vegetativa) cessaram no terceiro dia, quando as colônias fúngicas em desenvolvimento no controle negativo (água esterilizada) atingiram 2/3 da superfície total do meio de cultivo. É possível perceber que todas as amostras avaliadas mostraram resultados muito próximos entre si e próximos do controle negativo (Figura 63), portanto não revelaram nenhum resultado significativo de inibição do crescimento micelial, ou seja, de inibição da fase vegetativa do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*.

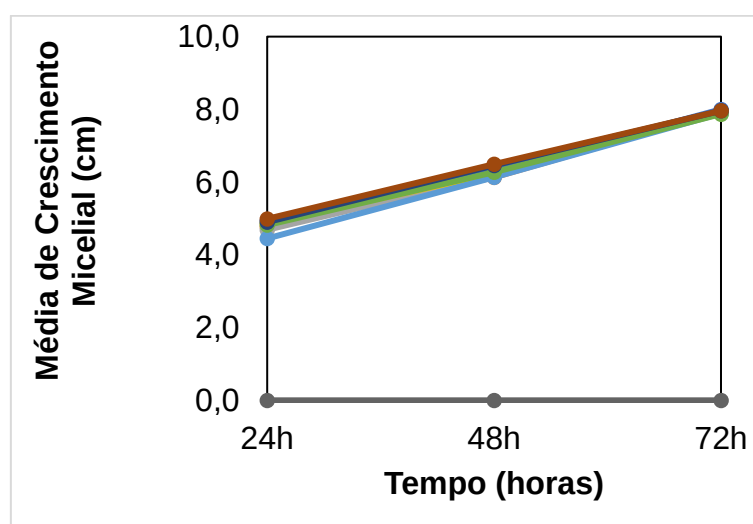


Figura 63 – Média do crescimento micelial, a partir de 24h de incubação até 72 h (terceiro dia) para as amostras F-DS_{9h}, C-02, F-DS_{9h}/C-02, F-COM, C-01, F-COM/C-01. Controle negativo indicado em azul.

Após o crescimento micelial, o fungo entra na fase reprodutiva e libera os esporos. Nesse sentido, ficou evidente a ação contra os esporos do fungo, por parte da solução filmogênica F-COM, indicando redução de 23,03% (Tabela 42) comparado ao controle negativo, estando de acordo com o que é apontado na literatura a quitosana tem apresenta atividade antifúngica (GOY; DE BRITTO; ASSIS, 2009; NASCIMENTO et al., 2020).

Já as soluções filmogênicas e soluções que continham os compostos inéditos C-01 e C-02 estimularam a esporulação, o que pode ser justificado pelo aumento na quantidade de nitrogênio disponível proveniente do triazeno (-N=N=N(H)-) e dos reagentes utilizados NaNO_2 e NH_4OH . Com destaque para a ação estimulante de 30,5% de C-02 e de 12,3% de F-DS_{9h}/C-02. Além do aumento da presença de N, houve também o aumento da presença de Na, o que foi comprovado pela análise de EDS, sendo que esse aumento também pode resultar em estímulo à esporulação.

Nesse contexto, vale ainda ressaltar que comparando a ação dos compostos inéditos puros C-01 e C-02 aos filmes e F-COM/C-01 e F-DS_{9h}/C-02 foi possível evidenciar que a redução no estímulo à esporulação tem relação com a inserção de quitosana às amostras, que por sua vez apresenta ação antifúngica contra o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* já descrito na literatura (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2003; EL GHAOUTH et al., 1994; GOY; DE BRITTO; ASSIS, 2009; NASCIMENTO et al., 2020).

O solvente (solução de ácido acético) foi avaliado em duas concentrações (0,25% e 3%). O solvente ácido acético 3% foi utilizado na confecção dos filmes do Capítulo 2 e essa concentração impediu o crescimento fúngico, no entanto concentrações desse padrão não são utilizadas por serem, também, tóxicas às plantas, nesse caso às goiabeiras hospedeiras do fungo em questão. Por essa razão o solvente adotado na avaliação antifúngica foi solução aquosa de ácido acético 0,25%, que não mostrou toxicidade fúngica se comparado à concentração de 3% e nem às plantas, sendo que essa concentração já é descrita na literatura para experimentos com plantas (FRÁGUAS et al., 2015).

Tabela 42 – Esporulação de *C. gloeosporioides*

Amostras	Esporulação (esporos/mL) ^b	Inibição (%)
Controle negativo*	154,60 ± 31,39	0
F-COM	119,00 ± 29,88	23,03↓
F-COM/C-01	159,80 ± 24,24	3,36↑
C-01	169,40 ± 24,86	9,57↑
F-DS _{9h}	136,60 ± 23,41	11,64↓
F-DS _{9h} /C-02	173,20 ± 32,58	12,03↑
C-02	201,08 ± 17,25	30,5↑
AAC 0,25%	134,40 ± 34,29	13,07↓
AAC 3%	0	0

*Água estéril

2.3.2.2 Avaliação da adsorção de Cu(II) e Co(II)

As curvas de calibração para as soluções aquosas de CuSO₄ e CoSO₄, em diferentes concentrações, foram construídas com base no espectro de absorção na faixa de 500 – 1000 nm para o Cu(II) (ANBINDER et al., 2019) e de 400 – 600 nm para o Co(II) (NEGM et al., 2015) (Figura 64) e com base nos ajustes lineares dos dados experimentais obtidos para construção da curva de calibração (Figura 65 e Tabela 43).

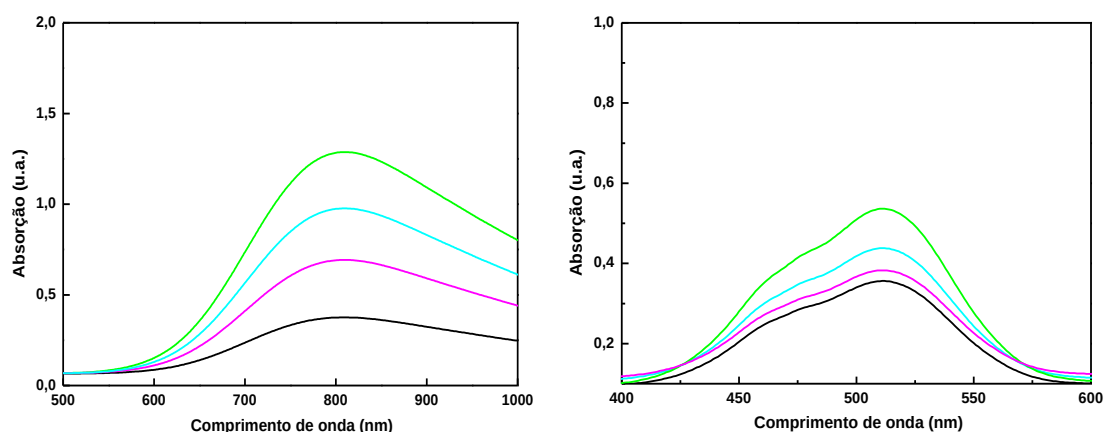


Figura 64 – Espectros de absorção no UV-Vis soluções aquosas de CuSO₄ (esquerda) e CoSO₄ (direita). Concentração 0,1 mol.L⁻¹ (verde), 0,075 mol.L⁻¹ (ciano), 0,05 mol.L⁻¹ (magenta) e 0,025 mol.L⁻¹ (preto).

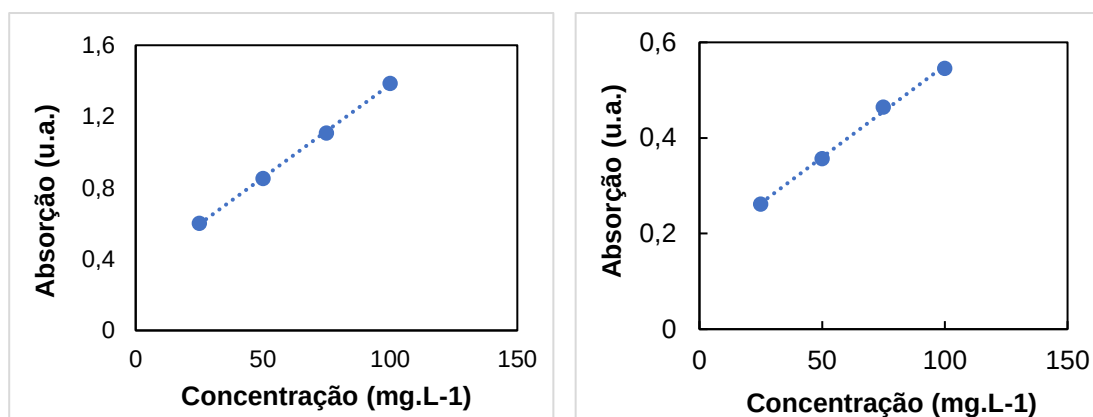


Figura 65 – Ajuste linear da curva de calibração soluções aquosas de CuSO_4 (esquerda) relativo a 800 nm e de CoSO_4 (direita) relativo à 520 nm.

Tabela 43 – Dados das curvas de calibração das soluções metálicas utilizadas no estudo de adsorção

Metais	Ajuste linear	R^2
Cu^{2+}	$Y = 0,00104 x + 0,3355$	0,9994
Co^{2+}	$Y = 0,0038 x + 0,1675$	0,9972

A quantidade adsorvida dos íons Cu (II) e Co (II) na superfície dos filmes de quitosana F-DS_{9h}, F-DS_{9h}/C-02, F-COM, F-COM/C-01 foi determinada em função do tempo de contato de cada amostra de filme submersa nas soluções contendo os cátions metálicos.

A quantidade de íons metálicos adsorvidos por grama de adsorvente (q_t) em função do tempo de contato é representada para Cu^{2+} (Figura 66 e Tabela 44) e Co^{2+} (Figura 67 e Tabela 45) e mostram um aumento constante na concentração dos íons adsorvidos, indicando saturação a partir de 12h.

A capacidade de adsorção de íons cobre (II) (AHMAD et al., 2019) e cobalto (II) (ZHANG et al., 2020) utilizando quitosana modificada como adsorvente são descritas na literatura. A capacidade de adsorção de cobre por filmes de quitosana puro foram avaliadas por Anbinder et al., (2019) apontando para um tempo de saturação em 12 h.

A adsorção é um processo que ocorre em poucas etapas e inclui a transferência de massa da fase de fluido para a superfície do adsorvente através da camada limite, ligando-se aos sítios ativos e difundindo-se nos poros (AHMAD et al., 2019). O processo de adsorção é bastante rápido no início devido a um

número suficientemente grande de locais ativos vazios e disponíveis para adsorção (SHETH et al., 2021).

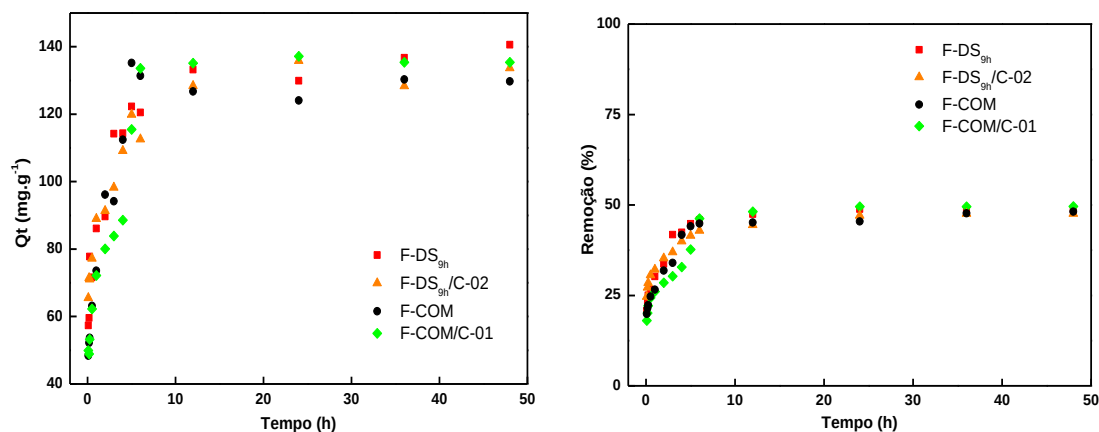


Figura 66 – Capacidade de adsorção de Cu^{2+} (esquerda) e remoção percentual de Cu^{2+} (direita) pelos filmes de quitosana em função do tempo de contato.

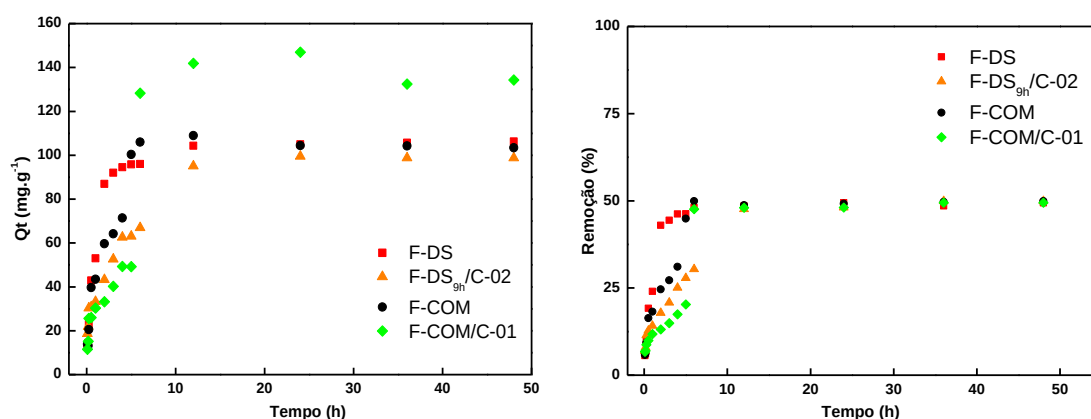


Figura 67 – Capacidade de adsorção de Co^{2+} (esquerda) e remoção percentual de Co^{2+} (direita) pelos filmes de quitosana em função do tempo de contato.

A quantidade de íons metálicos adsorvidos por grama de adsorvente (q_t) em função do tempo de contato são representadas, Cu^{2+} (Figura 66 e Tabela 44) e Co^{2+} (Figura 67 e Tabela 45), indicam um aumento constante na concentração dos íons até a saturação, a partir do tempo de contato de 12 h.

A capacidade de adsorção de íons cobre (II) (AHMAD et al., 2019) e cobalto (II) (ZHANG et al., 2020) utilizando quitosana modificada como adsorvente foram avaliadas. A capacidade de adsorção de cobre por filmes de quitosana puro foram avaliadas por Anbinder et al., (2019) apontando para um tempo de saturação após 12 h.

A adsorção é um processo que ocorre em poucas etapas e inclui a transferência de massa da fase de fluido em massa para a superfície do adsorvente através da camada limite, ligando-se aos sítios ativos e difusão nos poros (AHMAD et al., 2019). O processo de adsorção é bastante rápido no início devido a um número suficientemente grande de locais ativos vazios e disponíveis para adsorção (SHETH et al., 2021).

Os filmes de quitosana modificados apresentaram maior capacidade de adsorção de íons Cu^{2+} , comparados aos filmes puros que os originaram, atingindo até a saturação (12 h), capacidade de $133,25 \text{ mg.g}^{-1}$ (F-DS9h/C-02) e muito próximo ao F-COM/C-01 que foi de $135,12 \text{ mg.g}^{-1}$.

O filme F-COM/C-01 para o íon Co^{2+} apresentou maior capacidade de adsorção atingindo a saturação em $131,54 \text{ mg.g}^{-1}$ e obteve os melhores percentuais de remoção comparado aos demais $48,13\%$ (Cu^{2+}) no equilíbrio.

O percentual de remoção em função do tempo de contato são apresentados, para o Cu^{+2} (Figura 67 e Tabela 44) e Co^{+2} (Figura 68 e Tabela 45), indicam um aumento constante na remoção dos íons até a saturação, a partir do tempo de contato de 12 h.

Com base no percentual de remoção do Cu^{+2} e Co^{+2} , Figura 67 e Figura 68, respectivamente, podemos perceber que todos os filmes de quitosana, puros (F-DS_{9h} e F-COM) e modificados (F-DS_{9h}/C-02 e F-COM/C-01) ambos apresentaram variação semelhante na remoção dos cátions Cu^{+2} e Co^{+2} .

No entanto, podemos destacar para a adsorção de Cu^{+2} , que o filme de quitosana modificado F-COM/C-01 removeu $48,13\%$ do cátion, enquanto o filme puro F-COM foi de $45,13\%$.

Já para o Co^{+2} , (Figura 68, Tabela 45), essa tendência não foi observada, apesar da proximidade dos dados obtidos, os filmes puros obtiveram maior remoção de cátion comparado aos filmes modificados.

Tabela 44 – Dados do estudo de adsorção do íon Cu^{2+} em função do tempo de contato para os filmes de quitosana

Amostras/ Parâmetros		Tempo (h)													
		0,083	0,167	0,25	0,5	1	2	3	4	5	6	12	24	36	48
F-DS _{9h}	m (g)	0,0073	0,0078	0,0065	0,0075	0,0071	0,0076	0,0074	0,0075	0,0074	0,0077	0,0072	0,0076	0,0072	0,007
	C (mg.L ⁻¹)	53,41	51,88	50,53	49,47	47,01	44,66	39,20	38,79	37,21	36,45	35,40	34,47	34,57	34,57
	Q _t (mg.g ⁻¹)	57,41	59,61	77,76	71,64	86,07	89,68	114,24	114,36	122,31	120,50	133,25	129,90	136,70	140,61
	C _t (mg.L ⁻¹)	13,97	15,50	16,85	17,91	20,37	22,72	28,18	28,59	30,17	30,93	31,98	32,91	32,81	32,81
	Remoção (%)	20,73	23,00	25,01	26,58	30,23	33,72	41,82	42,43	44,77	45,90	47,46	48,84	48,69	48,69
F-DS _{9h} /C-02	m (g)	0,0076	0,0077	0,0081	0,008	0,0073	0,0078	0,0076	0,0074	0,007	0,0077	0,007	0,007	0,0075	0,0072
	C (mg.L ⁻¹)	50,79	49,06	48,20	46,80	45,73	43,63	42,49	40,46	39,41	38,49	37,43	35,69	35,31	35,31
	Q _t (mg.g ⁻¹)	65,49	71,39	71,03	77,18	88,97	91,33	98,25	109,13	119,86	112,56	133,25	135,80	128,29	133,63
	C _t (mg.L ⁻¹)	16,59	18,32	19,18	20,58	21,65	23,75	24,89	26,92	27,97	28,89	29,95	31,69	32,07	32,07
	Remoção (%)	24,62	27,19	28,46	30,55	32,13	35,24	36,94	39,95	41,51	42,88	44,45	47,03	47,60	47,60
F-COM	m (g)	0,0083	0,0083	0,0084	0,0079	0,0073	0,0067	0,0073	0,0075	0,0066	0,0069	0,0072	0,0074	0,0074	0,0075
	C (mg.L ⁻¹)	53,99	52,93	52,36	50,76	49,47	45,91	44,47	39,28	37,64	37,16	36,97	36,78	35,24	34,95
	Q _t (mg.g ⁻¹)	48,40	52,22	53,66	63,12	73,60	96,12	94,15	112,40	135,16	131,38	126,70	124,06	130,30	129,71
	C _t (mg.L ⁻¹)	13,39	14,45	15,02	16,62	17,91	21,47	22,91	28,10	29,74	30,22	30,41	30,60	32,14	32,43
	Remoção (%)	19,87	21,44	22,30	24,67	26,58	31,86	34	41,71	44,13	44,84	45,13	45,42	47,70	48,10
F-COM/C-01	m (g)	0,0083	0,0083	0,0084	0,0079	0,0073	0,0072	0,0073	0,0075	0,0066	0,0070	0,0072	0,0073	0,0074	0,0074
	C (mg.L ⁻¹)	55,23	53,85	52,48	50,98	49,82	48,16	46,97	45,24	41,97	36,20	34,95	33,80	33,99	33,98
	Q _t (mg.g ⁻¹)	49,93	48,92	53,21	62,28	72,18	80,07	83,87	88,56	115,49	133,62	135,12	138,01	135,36	135,40
	C _t (mg.L ⁻¹)	12,15	13,53	14,90	16,40	17,56	19,22	20,41	22,14	25,41	31,18	32,43	33,58	33,39	33,40
	Remoção (%)	18,03	20,09	22,11	24,34	26,07	28,52	30,29	32,86	37,71	46,27	48,13	49,53	49,55	49,57

C₀ = 67,38 mg.L⁻¹ e Absorbância 0,692 nm.

Tabela 45 – Dados do estudo de adsorção do íon Co^{2+} em função do tempo de contato para os filmes de quitosana

Amostras/ Parâmetros		Tempo (h)													
		0,083	0,167	0,25	0,5	1	2	3	4	5	6	12	24	36	48
F-DS _{9h}	m (g)	0,0075	0,0072	0,0075	0,0076	0,0077	0,0084	0,0082	0,0083	0,0082	0,0085	0,0079	0,0080	0,0078	0,0079
	C (mg.L ⁻¹)	53,42	53,13	50,87	45,74	43,00	32,36	31,45	30,45	30,42	29,39	29,13	28,61	29,13	28,63
	Q _t (mg.g ⁻¹)	12,74	14,47	22,95	42,9	53,01	86,94	92,04	94,55	95,8	96,04	104,33	105,00	105,67	106,23
	C _t (mg.L ⁻¹)	3,190	3,480	5,740	10,870	13,610	24,250	25,160	26,160	26,190	27,220	27,480	28,000	27,480	27,980
	Remoção (%)	5,64	6,15	10,14	19,20	24,04	42,84	44,44	46,21	46,26	48,08	48,54	49,46	48,54	49,43
F-DS _{9h} /C-02	m (g)	0,0063	0,0062	0,0064	0,007	0,0072	0,007	0,0067	0,0068	0,0075	0,0077	0,0085	0,0082	0,0085	0,0084
	C (mg.L ⁻¹)	52,68	52,08	50,13	49,39	48,61	46,50	44,84	42,42	40,84	39,42	29,66	29,39	28,34	28,34
	Q _t (mg.g ⁻¹)	18,67	21,90	30,35	30,90	33,33	43,31	52,67	62,58	63,05	66,95	95,11	99,55	99,75	100,94
	C _t (mg.L ⁻¹)	3,92	4,53	6,47	7,21	8,00	10,11	11,76	14,18	15,76	17,18	26,95	27,21	28,26	28,26
	Remoção (%)	6,93	8,00	11,44	12,74	14,13	17,85	20,78	25,06	27,84	30,35	47,60	48,07	49,93	49,93
F-COM	m (g)	0,0075	0,0080	0,0077	0,0070	0,0071	0,0070	0,0072	0,0074	0,0076	0,0080	0,0076	0,0080	0,0081	0,0082
	C (mg.L ⁻¹)	53,13	53,11	51,34	47,34	46,32	42,68	41,21	39,00	31,18	28,34	29,00	28,76	28,47	28,34
	Q _t (mg.g ⁻¹)	13,05	13,12	20,51	39,70	43,48	59,66	64,14	71,37	100,35	105,99	108,97	104,41	104,19	103,40
	C _t (mg.L ⁻¹)	3,26	3,50	5,26	9,26	10,29	13,93	15,40	17,61	25,43	28,27	27,61	27,85	28,14	28,27
	Remoção (%)	5,76	6,17	9,30	16,37	18,17	24,60	27,19	31,10	44,91	49,93	48,76	49,19	49,70	49,93
F-COM/C-01	m (g)	0,0071	0,0078	0,0058	0,0065	0,0066	0,0067	0,0063	0,0060	0,0070	0,0063	0,0062	0,0062	0,0070	0,0069
	C (mg.L ⁻¹)	52,82	52,66	51,66	50,97	49,92	48,16	48,16	46,74	45,13	29,66	29,42	29,39	28,61	28,61
	Q _t (mg.g ⁻¹)	16,01	15,18	25,59	25,99	30,38	37,82	40,22	49,34	49,17	128,32	131,54	131,66	120,00	121,74
	C _t (mg.L ⁻¹)	3,79	3,95	4,95	5,63	6,68	8,45	8,45	9,87	11,47	26,95	27,18	27,21	28,00	28,00
	Remoção (%)	6,69	6,97	8,74	9,95	11,81	14,92	14,92	17,43	20,27	47,60	48,02	48,07	49,46	49,46

C₀ = 56,61 mg.L⁻¹ e Absorbância 0,357 nm.

Mesmo que os percentuais de remoção não tenham variado muito entre as amostras de filme modificados e não modificados para os cátions de Co(II) e Cu(II) , por meio da análise das colorações observadas dos filmes após o contato com as soluções (Figura 68 e Figura 69), principalmente em relação à solução de Cu(II) , foi possível observar uma maneira diferente de complexação do cátion Cu(II) entre os filmes de quitosana puro e os filmes de quitosana modificados.

Cátions de Cu(II) coordenados com ligantes aquo ou ligantes de campo fraco, tais como água, grupos amino monodentados, hidroxila, formam complexos de coordenação coloração verde, enquanto cátions de Cu(II) coordenados com ligantes de campo forte, tais como triazenos, formam complexos de coordenação de coloração marrom, o que pode ser comprovado pela imagen da Figura 69.

Essa coloração diferenciada mostra o tipo de coordenação diferenciada do Cu(II) aos filmes de quitosana puros ($\text{F-DS}_{9\text{h}}$ e F-COM) e quitosana modificada pela presença da quitosana triazenídica ($\text{F-DS}_{9\text{h}}/\text{C-02}$ e $\text{F-COM}/\text{C-01}$), indicando um ponto importante com relação ao modo de coordenação. Estudos futuros devem ser realizados para aprofundar o tema.

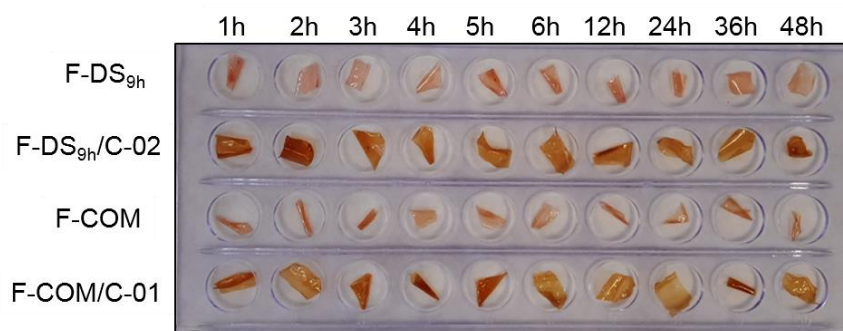


Figura 68 – Filmes de quitosana após adsorção em solução de sulfato de cobalto(II)

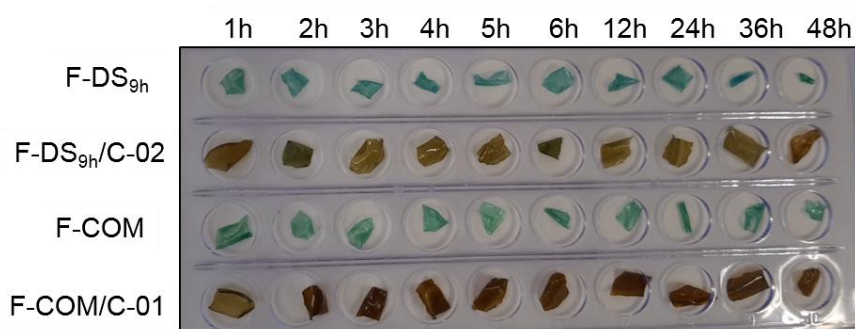


Figura 69 – Filmes de quitosana após adsorção em solução de sulfato de cobre(II)

2.3.2.3 Avaliação preliminar em processo catalítico

Nos filmes impregnados com Pd(II), foi feita uma varredura por FT-IV com intuito de avaliar modificações em grupos funcionais superficiais decorrentes do processamento e formação *in situ* de Np-Pd nesses filmes. Os espectros obtidos permitiram verificar que a incorporação de Pd(II) e a redução à Pd(0) (nanopartículas de Pd – Np-Pd) com NaBH₄ não trouxe modificação estrutural aos filmes de quitosana pura ou modificada (Figura 70 e Figura 71).

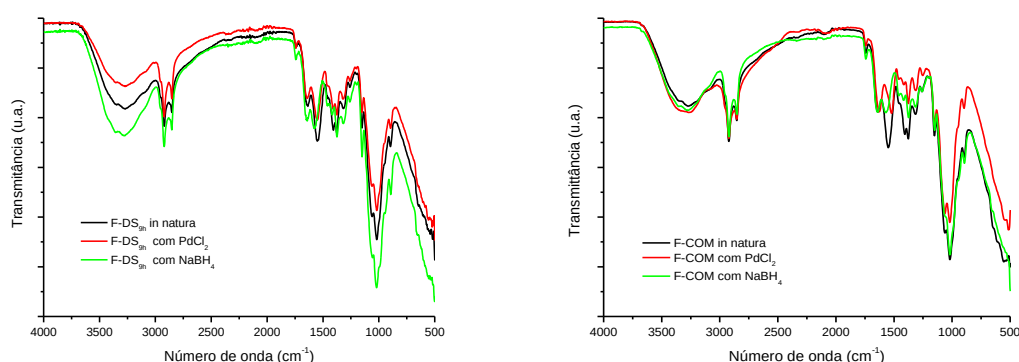


Figura 70 – Espectro de IVs dos filmes F-COM e F-DSh. Filme *in natura* (preto) e impregnado com Pd(II) (vermelho) e com Pd(0) (verde) após sua exposição ao agente redutor borohidreto de sódio (NaBH₄).

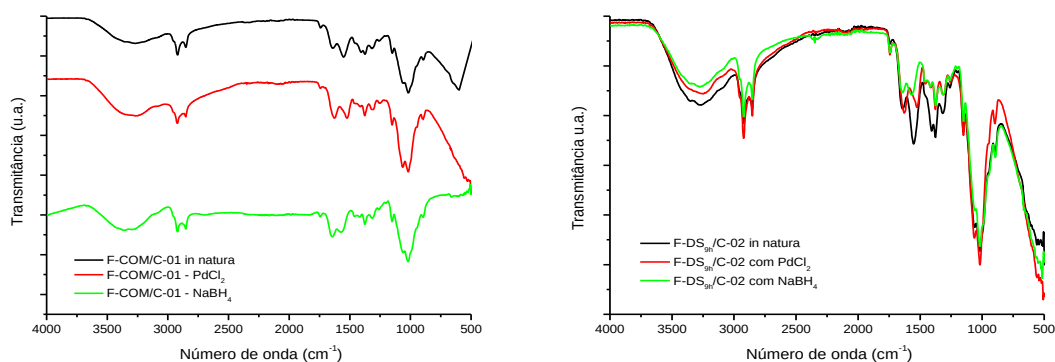


Figura 71 – Espectros de IV dos filmes F-COM/C-01 e F-DSh/C-02. Filme *in natura* (preto) e impregnado com Pd(II) (vermelho) e com Pd(0) (verde) após sua exposição ao agente redutor borohidreto de sódio (NaBH₄).

Para avaliação dos filmes em processos catalíticos, escolheu-se a reação de acoplamento cruzado de Suzuki-Miyaura, como descrito na metodologia. A avaliação do sucesso da reação foi feita com base no estudo do rendimento do

produto 4-cianobifenila (Figura 72 – Produto isolado da reação 4-ciannobifenila) como consta na Tabela 46.

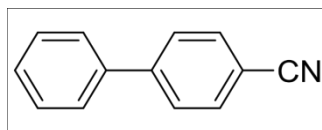


Figura 72 – Produto isolado da reação 4-ciannobifenila

Tabela 46 – Rendimento de 4-cianobifenila obtido na reação de Suzuki-Miyaura empregando diferentes catalisadores e agentes redutores.

Catalisador impregnado com Pd(II)	Agente redutor	Produto (%)
F-DS _{9h}	NaBH ₄	50
F-DS _{9h} /C-02	NaBH ₄	48
F-COM	NaBH ₄	68
F-COM/C-01	NaBH ₄	75
F-DS _{9h}	Erva-mate	97
F-DS _{9h} /C-02	Erva-mate	24
F-COM	Erva-mate	48
F-COM/C-01	Erva-mate	30

Condições reacionais: 4-bromobenzonitrila (0,001 mol.L⁻¹), ácido fenilborônico (0,0015 mol.L⁻¹), filme impregnado com Pd(II) (0,05 g), K₂CO₃ (0,002 mol.L⁻¹), etanol (3 mL), Extrato de erva mate (100 g.L⁻¹) e NaBH₄ (0,266 g.L⁻¹), 12 h, 100 °C, rendimento isolado após duas corridas.

Com base na análise dos melhores rendimentos é interessante destacar os filmes F-COM e F-COM/C-01 contendo Np-Pd, reduzidos com NaBH₄, bem como o filme F-DS_{9h} contendo Np-Pd, reduzido com extrato de erva-mate. Para aprofundar os resultados, deve-se fazer uma otimização do sistema catalítico variando base, solvente, tempo reacional e temperatura. A partir disso, o escopo reacional será expandido com a variação de haletos e ácidos arilborônicos. Por fim, o estudo da espécie cataliticamente ativa será realizado. No entanto a pandemia por covid-19 atrasou a análises e impossibilitou a sequência do trabalho.

O produto isolado (4-ciannobifenila) foi solubilizado em *D*-clorofórmio e caracterizado por RMN de ¹H e ¹³C, conforme mostra a Figura 73 e Figura 74. As análises mostram o produto da reação como esperado (ROSA et al., 2019) e serão úteis futuramente, à título de comparação com os aprimoramentos na síntese.

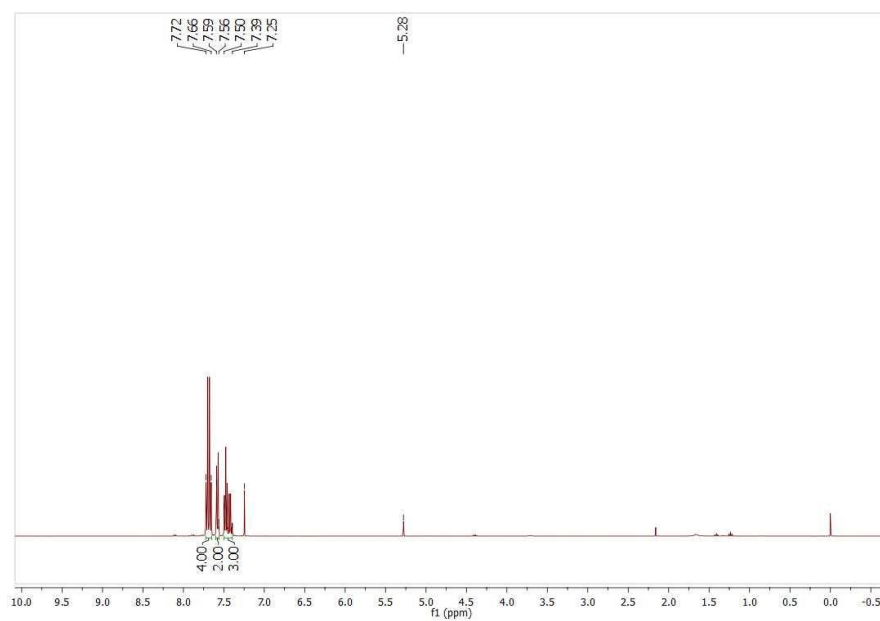


Figura 73 – Espectro de RMN de ^1H do produto da reação e confere com sendo 4-cianobifenila.

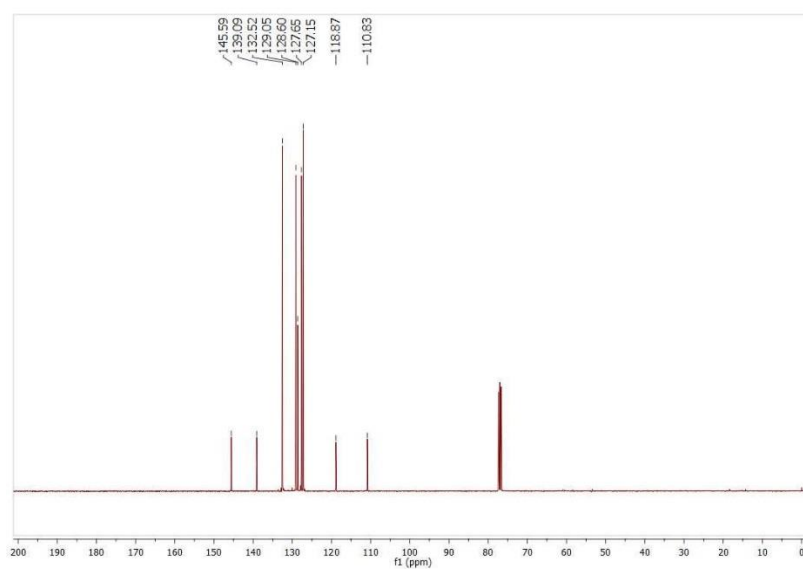


Figura 74 – Espectro de RMN de ^{13}C do produto da reação e confere com sendo 4-cianobifenila.

2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os objetivos específicos propostos pode-se destacar como ponto principal o desenvolvimento de filmes de quitosana modificados com compostos inéditos (C-01 e C-02), os quais foram caracterizados por FT-IV, TGA/DTG, DRX, AFM, MEV/EDS e AMD, e avaliados quanto sua aplicação antifúngica, na adsorção de Cu(II) e Co(II) e em catálise de síntese orgânica, sempre em comparação ao filme de quitosana não modificado. Duas amostras de quitosana foram avaliadas na confecção dos filmes, sendo uma sintetizada no LASIR (F-DS_{9h}) e outra amostra obtida comercialmente (F-COM).

Um mecanismo foi proposto para formação dos compostos inéditos (C-01 e C-02) - triazenos (-N(H)-N=N-) derivados da quitosana, chamado de quitosana triazenídica nesse trabalho - sendo que sua formação foi comprovada por meio das caracterizações estruturais e químicas.

Foram sintetizados, caracterizados e avaliados com sucesso os seguintes filmes: F-DS_{9h}, F-DS_{9h}/C-02, F-DS_{9h}/C-02/Cu^A, F-DS_{9h}/C-02/Cu^B, F-DS_{9h}/C-02/Co^A, F-DS_{9h}/C-02/Co^B, F-COM, F-COM/C-01, F-COM/C-01/Cu^A, F-COM/C-01/Cu^B, F-COM/C-01/Co^A, F-COM/C-01/Co^B, sendo A a concentração de 0,005 mol.L⁻¹ e B a concentração de 0,05 mol.L⁻¹.

Os filmes de quitosana não apresentaram capacidade de inibir o crescimento do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* causador de antracnose em goiabeiras. Pelo contrário, os filmes modificados F-DS_{9h}/C-02 e F-COM/C-01, bem como os compostos C-01 e C-02 estimularam seu crescimento, o que foi atribuído à presença de maior quantidade percentual de nitrogênio (N) em sua estrutura pela presença da quitosana triazenídica e devido à presença de N e sódio (Na⁺) como resquício da síntese. Os filmes de quitosana puros, principalmente de amostra comercial (F-COM) evidenciaram, como esperado, efeito antifúngico, reduzindo 23% a esporulação.

O estudo da capacidade de adsorção dos íons Cu²⁺ e Co²⁺ para os filmes de quitosana evidenciaram um aumento constante na porcentagem de remoção dos cátions em função do tempo de contato da amostra com a solução. Estudos complementares sobre a cinética da adsorção, variando a concentração da solução podem ser discutidos como perspectiva futura bem como o estudo das isotermas de Langmuir e Freundlich.

O uso dos filmes em atividade catalítica de síntese orgânica em presença de Pd(0) mostrou-se promissor em reações de acoplamento cruzado de Suzuki-Miyaura, necessitando de aprimoramentos futuros, com variações das condições de síntese.

CONCLUSÕES

Nesse estudo, envolvendo os resultados dos Capítulos 1 e 2, quitina foi extraída de rejeitos da casca de camarão-rosa (*Farfantepenaeus brasiliensis*) oriundos da colônia Z-3 de Pelotas/RS. Quitosana foi sintetizada, fazendo uso de metodologias diversas e, com esta matéria prima, filmes foram produzidos, nos quais foram imobilizados compostos inéditos da classe do triazenos, sintetizados a partir de quitosana sintetizada e quitosana comercial, chamado nesse trabalho de quitosana triazenídica. A esses filmes ainda foram adicionados íons metálicos fisiológicos de cobre(II) e cobalto(II) para avaliação na mudança de suas propriedades químicas e físicas. Todos os materiais (pós e filmes) sintetizados foram caracterizados, de acordo com suas especificidades, por meio de análises químicas e físicas. Aplicações foram avaliadas, tais como: do potencial antifúngico, na adsorção de íons cobre(II) e cobalto(II) e ação catalítica em reações de acoplamento cruzado de Suzuki-Miyaura.

Todas as etapas de desenvolvimento científico foram consideradas, desde a obtenção da matéria prima residual, sua conversão em produto de valor agregado até a investigação de suas aplicações. Artigos científicos foram e estão sendo confeccionados com estes resultados relevantes.

Como perspectivas futuras para o desenvolvimento do tema no grupo de pesquisa, pode-se citar o desenvolvimento de uma linha de síntese e suporte de compostos triazenos inéditos em quitosana, com intuito de aprimoramento na adsorção e complexação de cátions metálicos, bem como no aprimoramento de propriedades químicas, físicas, biológicas e catalíticas dos materiais inéditos obtidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOU, E. S.; NAGY, K. S. A.; ELSABEE, M. Z. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 5, p. 1359–1367, 2008.

ABDULKARIM, A. et al. Extraction and Characterization of Chitin and Chitosan from Mussel Shell. **Natural Products Chemistry & Research**, v. 3, n. 2, p. 108–114, 2013.

ABREU, F. O. M. D. S. et al. Propriedades e Características da Quitosana Obtida a Partir do Exoesqueleto de Caranguejo-Uçá Utilizando Radiação de Micro-Ondas. **Polímeros Ciência e Tecnologia**, v. 23, n. 5, p. 630–635, 2013.

AGARWAL, T. et al. Gelatin/Carboxymethyl chitosan based scaffolds for dermal tissue engineering applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 1499–1506, 2016.

AGRAWAL, G. K. et al. Chitosan activates defense/stress response(s) in the leaves of *Oryza sativa* seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 12, p. 1061–1069, 2002.

AHMAD, M. et al. New method for hydrogel synthesis from diphenylcarbazine chitosan for selective copper removal. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 189–198, 2019.

AL-MANHEL, A. J.; AL-HILPHY, A. R. S.; NIAMAH, A. K. Extraction of chitosan, characterisation and its use for water purification. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 17, n. 2, p. 186–190, 2018.

AL-SAYDEH, S. A.; EL-NAAS, M. H.; ZAIDI, S. J. Copper removal from industrial wastewater: A comprehensive review. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 56, p. 35–44, 2017.

ALI, H.; TIAMA, T. M.; ISMAIL, A. M. International Journal of Biological Macromolecules New and efficient NiO / chitosan / polyvinyl alcohol nanocomposites as antibacterial and dye adsorptive films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 186, n. April, p. 278–288, 2021.

ALISHAHI, A. et al. Enhancement and Characterization of Chitosan Extraction from the Wastes of Shrimp Packaging Plants. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 19, n. 3, p. 776–783, 2011.

ALKABLI, J. et al. Ionic chitosan Schiff bases supported Pd(II) and Ru(II) complexes; production, characterization, and catalytic performance in Suzuki cross-coupling reactions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 184, n. June, p. 454–462, 2021.

ALMEIDA, E. V. R.; DELEZUK, J. A. D. M.; CAMPANA-FILHO, S. P. Production of beta-chitin aqueous stable suspensions by ultrasound process: a green chemistry way. **Materials Today: Proceedings**, v. 14, p. 708–715, 2019.

ANBINDER, P. S. et al. Carbohydrate Polymers A study of the structural changes in a chitosan matrix produced by the adsorption of copper and chromium ions. **Carbohydrate Polymers**, v. 222, p. 114987, 2019.

ANDRAUD, C.; BEGHDAI, A.; LAFIT, J. Entropic analysis of random morphologies. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**, v. 207, n. 1–3, p. 208–212, 1994.

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

ANTONY, R. et al. Synthesis, spectrochemical characterisation 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.

ANUSH, S. M.; CHANDAN, H. R.; VISHALAKSHI, B. Synthesis and metal ion adsorption characteristics of graphene oxide incorporated chitosan Schiff base. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 126, p. 908–916, 2019.

ANWAR, M.; ANGGRAENI, A. S.; AMIN, M. H. AL. Comparison of green method for chitin deacetylation. **AIP Conference Proceedings**, v. 1823, 2017.

ARAMESH, N.; BAGHERI, A. R.; BILAL, M. Chitosan-based hybrid materials for adsorptive removal of dyes and underlying interaction mechanisms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 183, p. 399–422, 2021.

BAJPAI, A. K.; BHATT, R.; KATARE, R. Atomic force microscopy enabled roughness analysis of nanostructured poly (diaminonaphthalene) doped poly (vinyl alcohol) conducting polymer thin films. **Micron**, v. 90, p. 12–17, 2016.

BAKSHI, P. S. et al. Chitosan as an environment friendly biomaterial – A review on recent modifications and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 150, p. 1072–1083, 2020.

BANIK, S.; BANDYOPADHYAY, S.; GANGULY, S. Bioeffects of microwave - a brief review. **Bioresource Technology**, v. 87, n. 2, p. 155–159, 2003.

BARBOSA, L. C. DE A. **Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos**. 1. ed. Viçosa-MG: Editora UFV, 2007.

BARBOSA, L. C. DE A. **Introdução à Química Orgânica**. 2. ed. São Paulo, SP: Pearson Prentice Hall, 2011.

BARBOZA, A. C. R. N. et al. Aquecimento em forno de microondas / desenvolvimento de alguns conceitos fundamentais. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 901–904, 2001.

BATISTA, M. P. et al. Novel alginate-chitosan aerogel fibres for potential wound healing applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 156, p. 773–782, 2020.

BAUTISTA-BAÑOS, S. et al. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. **Crop Protection**, v. 22, n. 9, p. 1087–1092, 2003.

BAXTER, A. et al. Improved method for I.R. determination of the degree of acetylation of chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 14, p. 166–169, 1992.

BECK, J.; HÖRNER, M.; DITTMANN, G. A macrocyclic bistriazene and its complexes with divalent metal ions. **European Journal of Inorganic Chemistry**, n. 28, p. 4314–4319, 2009.

BEGUM, S. et al. Review of chitosan composite as a heavy metal adsorbent: Material preparation and properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 259, p. 117613, 2021.

BEMILLER, J. N. **Food Polysaccharides and Their Applications**. 2. ed. v. 7, 712 p. Boca Raton: CRC Press, 2016.

BERGER, L. R. R. **Produção e Caracterização de Quitina e Quitosana por *Rhizopus arrhizus* e *Cunninghamella elegans* e Aplicação em Membranas na Remoção de Cádmio**. 180 f. Tese (Doutorado em Ciências

Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

BHATT, R. et al. Topological and morphological analysis of gamma rays irradiated chitosan-poly (vinyl alcohol) blends using atomic force microscopy. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 133, p. 81–85, 2017.

BIBI, S. et al. Ultrasound promoted synthesis and properties of chitosan nanocomposites containing carbon nanotubes and silver nanoparticles. **European Polymer Journal**, v. 105, n. November 2017, p. 297–303, 2018.

BIROLI, W. G.; DELEZUK, J. A. D. M.; CAMPANA-FILHO, S. P. Ultrasound-assisted conversion of alpha-chitin into chitosan. **Applied Acoustics**, v. 103, p. 239–242, 2016.

BISPO, V. M.; MANSUR, A. A. P.; MANSUR, H. S. Caracterização Por Espectroscopia De Infravermelho De Filmes De Quitosana Com Diferentes Quantidades De Agente Reticulante. p. 1–10, 2009.

BLANK, H. T.; HIRDES, A. R.; SANTOS, A. J. W. R. DOS. Síntese de compostos inéditos pela modificação do polímero de quitosana. In: Sociedade Brasileira de Química, Encontro de Química da Região Sul, 26. v. 3, p. 6131328, 2019, **Anais...** Caxias do Sul – RS: Universidade de Caxias do Sul, 2019.

BORBA DA CRUZ, J. et al. Síntese e caracterização de arcabouços de quitosana com agente antineoplásicos Synthesis and characterization of chitosan scaffolds with antineoplastic agent. p. 129–140, 2016.

BRASIL, M. DA S. **Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017.** Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/marco/29/PRC-5-Portaria-de-Consolida----o-n---5--de-28-de-setembro-de-2017.pdf>>. Acesso em: 3 dez. 2020.

BRUGNEROTTO, J. et al. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. **Polymer**, v. 42, n. 8, p. 3569–3580, 2001.

BUMGARDNER, J. D.; JENNING, J. A. **Chitosan based Biomaterials**. I ed. Memphis, EUA: Elsevier Science, 2016.

CAMPOS, A. C. et al. Non-parametric statistical methods and data transformations in agricultural pest population studies. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 72, n. 3, p. 440–443, 2012.

CANEVAROLO, S. V. J. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo, SP: Artiliber Editora, 2007.

CEYLAN, S. Propolis loaded and genipin-crosslinked PVA/chitosan membranes; characterization properties and cytocompatibility/genotoxicity response for wound dressing applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 181, p. 1196–1206, 2021.

CHANDRAPALA, J. et al. Ultrasonics in food processing. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, n. 5, p. 975–983, 2012.

CHOLANT, C. M. et al. Synthesis and characterization of solid polymer electrolyte based on poly(vinyl alcohol)/gum Arabic/LiClO₄. **Ionics - International Journal of Ionics**, 2020.

CHUYSINUAN, P. et al. Preparation of chitosan/hydrolyzed collagen/hyaluronic acid based hydrogel composite with caffeic acid addition. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 1937–1943, 2020.

COCOLETZI, H. H. et al. Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. **Superficies y Vacío**, v. 22, n. 3, p. 57–60, 2009.

COSTA, E. M. et al. Textile dyes loaded chitosan nanoparticles: Characterization, biocompatibility and staining capacity. **Carbohydrate Polymers**, v. 251, p. 117120, 2021.

CRAVOTTO, G. et al. Chemical modification of chitosan under high-intensity ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 12, n. 1-2, p. 95–98, 2005.

CZECHOWSKA-BISKUP, R. et al. Determination of Degree of Deacetylation of Chitosan - Comparaison of Methods. **Progress on chemistry and application of chitin and its derivatives**, v. 17, p. 5–20, 2012.

DAMASCENO, K. S. F. DA S. C.; ANDRADE, S. A. C.; STAMFORD, T. L. M. Aproveitamento do resíduo de camarão. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 213–224, 2009.

DANG, M. Y.; GUO, H. M.; TAN, Y. K. Adsorption Kinetics of Zn (II) from Aqueous Solutions on Epichlorohydrin Crosslinked Chitosan. **Pesquisa de Materiais Avançados**, v. 463–464, p. 7–11, 2012.

DAS, P.; LINERT, W. Schiff base-derived homogeneous and heterogeneous palladium catalysts for the Suzuki-Miyaura reaction. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 311, p. 1–23, 2016.

DE CARLI, R. F. et al. Evaluation of the genotoxic properties of nickel oxide nanoparticles in vitro and in vivo. **Mutation Research - Genetic**

Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 836, p. 47–53, 2018.

DE OLIVEIRA CRUZ, F. S. et al. Textile effluent treatment using a fixed bed reactor using bimetallic Fe/Ni nanoparticles supported on chitosan spheres. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 5, p. 104133, 2020.

DE OLIVEIRA, K. Á. R. et al. Synergistic mixtures of chitosan and *Mentha piperita* L. essential oil to inhibit *Colletotrichum* species and anthracnose development in mango cultivar Tommy Atkins. **Food Microbiology**, v. 66, p. 96–103, 2017.

DE OLIVEIRA, L. I. G. et al. Characterization and efficacy of a composite coating containing chitosan and lemongrass essential oil on postharvest quality of guava. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 66, p. 102506, 2020.

DELEZUK, J. A. D. M. et al. Ultrasound-assisted deacetylation of beta-chitin: Influence of processing parameters. **Polymer International**, v. 60, n. 6, p. 903–909, 2011.

DELEZUK, J. A. DE M. **Desacetilação de Beta-Quitina Assistida por Ultra-som de Alta Intensidade: Estudo dos Efeitos da Amplitude e do Tempo de Irradiação e da Temperatura da Reação**. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

DEMITRI, C. et al. Nanostructured active chitosan-based films for food packaging applications: Effect of graphene stacks on mechanical properties. **Measurement: Journal of the International Measurement Confederation**, v. 90, p. 418–423, 2016.

DENG, W. et al. Honeycomb-like structure-tunable chitosan-based porous carbon microspheres for methylene blue efficient removal. **Carbohydrate Polymers**, v. 247, p. 116736, 2020.

DEVENDAR, P. et al. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions: A Powerful Tool for the Synthesis of Agrochemicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 34, p. 8914–8934, 2018.

DI MARTINO, A. et al. Organic-inorganic hybrid nanoparticles controlled delivery system for anticancer drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 526, n. 1–2, p. 380–390, 2017.

DONG, Y. et al. Functionalized chitosan as a novel support for stabilizing

palladium in Suzuki reactions. **Carbohydrate Polymers**, v. 260, p. 117815, 2021.

DOS PASSOS BRAGA, S. et al. Application of coatings formed by chitosan and Mentha essential oils to control anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. brevisporum* in papaya (*Carica papaya* L.) fruit. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 139, p. 631–639, 2019.

DU, J. R. et al. Using genipin as a “green” crosslinker to fabricate chitosan membranes for pervaporative dehydration of isopropanol. **Separation and Purification Technology**, v. 244, p. 116843, 2020.

DUONG, N. T. H.; NGHIA, N. D. Effects of low–frequency ultrasound on heterogenous deacetylation of chitin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1604–1610, 2017.

EL GHAOUTH, A. et al. Ultrastructural and cytochemical aspects of the effect of chitosan on decay of bell pepper fruit. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 44, n. 6, p. 417–432, 1994.

EL KNIDRI, H. et al. Eco-friendly extraction and characterization of chitin and chitosan from the shrimp shell waste via microwave irradiation. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 104, p. 395–405, 2016.

EL KNIDRI, H. et al. Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 1181–1189, 2018.

EL KNIDRI, H. et al. Rapid and efficient extraction of chitin and chitosan for scale-up production: Effect of process parameters on deacetylation degree and molecular weight. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 139, p. 1092–1102, 2019.

ESCOBAR-SIERRA, D. M. et al. Manufacturing and evaluation of Chitosan, PVA and Aloe Vera hydrogels for skin applications. **DYNA**, v. 84, n. 203, p. 134–142, 2017.

ESPAÑA, M. D. et al. Eucalyptus leaf byproduct inhibits the anthracnose-causing fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. **Industrial Crops and Products**, v. 108, p. 793–797, 2017.

FAJARDO, A. R. et al. Development and application of chitosan/poly(vinyl alcohol) films for removal and recovery of Pb(II). **Chemical Engineering**

Journal, v. 183, p. 253–260, 2012.

FARIAS, R. F. **Química de Coordenação: Fundamentos e atualidades**. 2. ed. São Paulo, SP: Editora Átomo, 2009.

FIAMINGO, A. et al. Extensively deacetylated high molecular weight chitosan from the multistep ultrasound-assisted deacetylation of beta-chitin. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 32, p. 79–85, 2016.

FIORI, S.; ROSSI, R. Statistical characterization of some electrical and mechanical phenomena by a neural probability density function estimation technique. **Neural Network World**, v. 14, n. 2, p. 153–176, 2004.

FONSECA, A. C. M. **Processos de obtenção e caracterização físico-química de quitinas e quitosanas extraídas dos rejeitos da indústria da região de Cananéia - SP**. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

FONSECA, L. M. **Produção e caracterização de filmes biodegradáveis de amido de batata (*solanum tuberosum* L.) para aplicação em embalagens de alimentos**. 123 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais). Universidade Federal do Pampa, Bagé, 2015.

FRÁGUAS, R. M. et al. Preparo e caracterização de filmes comestíveis de quitosana. **Polímeros**, v. 25, p. 48–53, 2015.

FRANK, L. A. et al. Reactive and Functional Polymers Chitosan as a coating material for nanoparticles intended for biomedical applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 147, p. 104459, 2020.

FRICK, J. M. et al. Influence of Glutaraldehyde Crosslinking and Alkaline Post-treatment on the Properties of Chitosan-Based Films. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 26, n. 7, p. 2748–2757, 2018a.

GABRIEL PAULRAJ, M. et al. Comparative studies of tripolyphosphate and glutaraldehyde cross-linked chitosan-botanical pesticide nanoparticles and their agricultural applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1813–1819, 1 nov. 2017.

GADELMAWLA, E. S. et al. Roughness. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 123, n. 1, p. 133–145, 2002.

GARCIA, I. A. et al. Avaliação de métodos titulométricos para determinação do grau de desacetilação em quitosana. **Brazilian Journal of**

Development, v. 6, n. 1, p. 4066–4084, 2020.

GERBER, U. et al. Metabolism-dependent bioaccumulation of uranium by *Rhodospiridium toruloides* isolated from the flooding water of a former uranium mine. **PLoS ONE**, v. 13, n. 8, p. 1–21, 2018.

GEROMEL-COSTA, C. G. A. et al. Adsorption of metals by crosslinked chitosan beads in sugarcane contaminated streams. **Biomass and Bioenergy**, v. 119, p. 128–134, 2018.

GÓMEZ-RÍOS, D.; BARRERA-ZAPATA, R.; RÍOS-ESTEPA, R. Comparison of process technologies for chitosan production from shrimp shell waste: A techno-economic approach using Aspen Plus®. **Food and Bioproducts Processing**, v. 103, p. 49–57, 2017.

GONSALVES, A. DE A. et al. Diferentes estratégias para a reticuação de quitosana. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1215–1223, 2011.

GOY, R. C.; DE BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. A review of the antimicrobial activity of chitosan. **Polimeros**, v. 19, n. 3, p. 241–247, 2009.

GUIBAL, E. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: A review. **Separation and Purification Technology**, v. 38, n. 1, p. 43–74, 2004.

HACKBART, H. C. DOS S. **Síntese e caracterização de quitosana como suporte para o desenvolvimento de polímeros híbridos contendo níquel(II)**. Tese. (Doutorado em Química). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

HAGGAG, W. M. New Safe Methods for Controlling Anthracnose Disease of Mango (*Mangifera indica* L.) Fruits Caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). **Journal of American Science**, v. 8, n. 8, p. 1545–1003, 2010.

HAGGAG, W. M.; ABD-ALLA, M. . New Safe Methods for Controlling Anthracnose Disease of Mango (*Mangifera indica* L.) Fruits Caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). **Journal of American Science**, v. 8, n. 8, p. 1545–1003, 2010.

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

HANSMA, H. G. Possible origin of life between mica sheets. **Journal of Theoretical Biology**, v. 266, n. 1, p. 175–188, 2010.

HARISH PRASHANTH, K. V.; THARANATHAN, R. N. Chitin/chitosan:

modifications and their unlimited application potential-an overview. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, n. 3, p. 117–131, 2007.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro, RJ: Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2005.

HASSAINIA, A.; SATHA, H.; BOUFI, S. Chitin from *Agaricus bisporus*: Extraction and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 1334–1342, 2018.

HAYES, B.; HAYES, B. L. Recent Advances in Microwave- Assisted Synthesis. **Aldrichimica acta**, v. 37 , n. 2, p. 66–76, 2015.

HOMEZ-JARA, A. et al. Characterization of chitosan edible films obtained with various polymer concentrations and drying temperatures. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 1233–1240, 1 jul. 2018.

HÖRNER, M. et al. cis-Bis[1,3-bis(2-fluorophenyl)triazenido-κ2 N1,N3]bis(pyridine-κN)cadmium(II). **Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications**, v. 60, n. 3, p. 140–142, 2004.

HOSSAIN, M. S.; IQBAL, A. Production and characterization of chitosan from shrimp waste. **Journal Bangladesh Agricultural University**, v. 12, n. 1, p. 153–160, 2014.

HOSSEINI, S. F. et al. Fabrication of bio-nanocomposite films based on fish gelatin reinforced with chitosan nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, v. 44, p. 172–182, 2015.

HOUSECROFT, C. E.; SHARPE, A. G. **Química Inorgânica**. 4. ed. Rio de Janeiro, RJ: LTC Livros Técnico e Científicos Editora, 2013.

HUANG, J.; YIN, Z.; WU, J. Covalent attachment of chitosan to graphene via click chemistry for superior antibacterial activity. **Materials Advances**, v. 1, n. 4, p. 579–583, 2020.

HULUBEI, C. et al. New polyimide-based porous crosslinked beads by suspension polymerization: physical and chemical factors affecting their morphology. **Journal of Polymer Research**, v. 21, n. 9, 2014.

HUO, M. X. et al. Facile synthesis of chitosan-based acid-resistant composite films for efficient selective adsorption properties towards anionic dyes. **Carbohydrate Polymers**, v. 254, p. 117473, 2021.

HUSSEIN, M. H. M. et al. Preparation of Some Chitosan Heavy Metal Complexes and Study of Its Properties 1. **Natural Polymers**, v. 54, n. 2, p. 113–

124, 2012.

IOELOVICH, M. Crystallinity and Hydrophilicity of Chitin and Chitosan. **Journal of Chemistry**, v. 3, n. 3, p. 7–14, 2014.

ISA, M. T. et al. Extraction and characterization of chitin from Nigerian sources. **Bioresource Technology**, v. 11, n. 21, p. 73–81, 2008.

ISLAM, M. A. et al. Opportunities and constraints of using the innovative adsorbents for the removal of cobalt(II) from wastewater: A review. **Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management**, v. 10, p. 435–456, 2018.

JOO, S.-R. et al. Pd-catalyst Anchored on Schiff Base-modified Chitosan-CNT Nanohybrid for the Suzuki–Miyaura Coupling Reaction. **Current Organic Chemistry**, v. 24, n. 20, p. 2383–2390, 2020.

KACZMAREK, M. B. et al. Enzymatic modifications of chitin, chitosan, and chitooligosaccharides. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, n. SEP, 2019.

KARAER, H.; KAYA, İ. Synthesis, characterization and using at the copper adsorption of chitosan/polyvinyl alcohol magnetic composite. **Journal of Molecular Liquids**, v. 230, p. 152–162, 2017.

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

KERCH, G. Chitosan films and coatings prevent losses of fresh fruit nutritional quality: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 46, n. 2, p. 159–166, 2015.

KIM, T. H.; WHITE, H. On more robust estimation of skewness and kurtosis. **Finance Research Letters**, v. 1, n. 1, p. 56–73, 2004.

KLAPETEK, P.; NEČAS, D.; CHRISTOPHER, A. **Gwyddion Software** Boston, MAFree Software Foundation, Inc., 2020. Disponível em: <<http://gwyddion.net/documentation/user-guide-en/>>

KONG, M. et al. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 51–63, 2010.

KULKARNI, P. et al. Evaluation of thermodynamic parameters via reaction stoichiometry and the corrected Langmuir parameter for sorption of Cu(II) on chitosan and chitosan blended PVA films. **Journal of Molecular Liquids**, v. 317,

p. 113962, 2020.

KUMAR DUTTA, P.; DUTTA, J.; TRIPATHI, V. S. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 63, p. 20–31, 2004.

KUMAR, S.; MUKHERJEE, A.; DUTTA, J. Chitosan based nanocomposite films and coatings: Emerging antimicrobial food packaging alternatives. **Trends in Food Science and Technology**, v. 97, p. 196–209, 2020.

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

KUMARI, S. et al. Physicochemical properties and characterization of chitosan synthesized from fish scales, crab and shrimp shells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1697–1705, 2017.

KUMIRSKA, J. et al. Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. **Marine Drugs**, v. 8, n. 5, 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.

LARBI, F. et al. Comparison of nanocrystals and nanofibers produced from shrimp shell α -chitin: From energy production to material cytotoxicity and Pickering emulsion properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 196, p. 385–397, 2018.

LEGGETT, R. W. The biokinetics of inorganic cobalt in the human body. **Science of the Total Environment**, v. 389, n. 2–3, p. 259–269, 2008.

LI, D. et al. Surface functionalization of nanomaterials by aryl diazonium salts for biomedical sciences. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 294, p. 102479, 2021.

LI, Y. et al. Copper and iron ions accelerate the prion-like propagation of α -synuclein: A vicious cycle in Parkinson's disease. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 562–573, 2020.

LIU, C. et al. A simple and efficient approach for the palladium-catalyzed ligand-free Suzuki reaction in water. **Green Chemistry**, v. 14, n. 11, p. 2999–3003, 2012.

LIU, X. F. et al. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated

chitosan. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 79, n. 7, p. 1324–1335, 2001.

LOPES, J. C. et al. Biomassa e extração de quitina e quitosana a partir de isolados de *Cunninghamella* sp. Isolates. **Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina**, v. 38, p. 25–34, 2017.

LUCENA, G. L. et al. Evaluation of the adsorption capacity of chitosan quaternized in the removal of Cu^{2+} and Cr^{3+} ions. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 2166–2179, 2015.

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

MAHDY SAMAR, M. et al. Physicochemical, functional, antioxidant and antibacterial properties of chitosan extracted from shrimp wastes by microwave technique. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 58, n. 1, p. 33–41, 2013.

MAHMOUDI, M. R. et al. The properties of a decile-based statistic to measure symmetry and asymmetry. **Symmetry**, v. 12, n. 2, p. 1–9, 2020.

MAO, J. et al. Ion-imprinted chitosan fiber for recovery of Pd(II): Obtaining high selectivity through selective adsorption and two-step desorption. **Environmental Research**, v. 182, p. 108995, 2020.

MAREI, N. H. et al. Isolation and characterization of chitosan from different local insects in Egypt. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 871–877, 2016.

MARQUES, J. S. et al. Removal of aqueous copper(II) by using crosslinked chitosan films. **Reactive and Functional Polymers**, v. 134, p. 31–39, 2019.

MARQUES, R. P.; MONTEIRO, A. C.; PEREIRA, G. T. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo de nim (*Azadirachta indica*). **Ciência Rural**, v. 34, n. 6, p. 1675–1680, 2004.

MATHUR, N. K.; NARANG, C. K. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. **Journal of Chemical Education**, v. 67, n. 11, p. 938, 1990.

MCCARTHY, S.; BRADDOCK, D. C.; WILTON-ELY, J. D. E. T. Strategies for sustainable palladium catalysis. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 442, p. 213925, 2021.

MENDHAM, J. et al. **Análise Química Quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro, RJ: LTC, 2002.

MENEZES, J. E. S. A. et al. Preparation, structural and spectroscopic characterization of chitosan membranes containing allantoin. **Journal of Molecular Structure**, v. 1199, 1173–1181, 2020.

MICHEL, J. DE O. **Jornalismo Comunitário na construção, compartilhamento e permanência das Memórias Sociais: O caso do Jornal “O Pescador” na/da Colônia de Pescadores Z3/Pelotas**. Tese (Doutorado em Memória Social e Patrimônio Cultural). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

MESSLER, G. L.; FISCHER, P. J.; TARR, D. A. **Química Inorgânica**. 5 ed. São Paulo, SP: Pearson Education do Brasil, 2014.

MILOSAVLJEVIĆ, N. B. et al. Removal of Cu²⁺ ions using hydrogels of chitosan, itaconic and methacrylic acid: FT-IV, SEM/EDX, AFM, kinetic and equilibrium study. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 388, n. 1–3, p. 59–69, 2011.

MOHAMMADZADEH PAKDEL, P.; PEIGHAMBARDOUST, S. J. Review on recent progress in chitosan-based hydrogels for wastewater treatment application. **Carbohydrate Polymers**, v. 201, p. 264–279, 2018.

MONTEIRO, A. A. D. S. et al. Efeito da modificação química na solubilidade e intumescimento de microesferas à base de goma do cajueiro carboximetilada e quitosana. **Polímeros**, v. 25, p. 31–39, 2015.

MORAN, H. B. T. et al. Immunomodulatory properties of chitosan polymers. **Biomaterials**, v. 184, p. 1–9, 2018.

MORI, T. J. DE A. **Materiais e técnicas para nanoestruturas magnetoelétricas compósitas**. 172 f. Tese (Doutorado em Física). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

MOURA, C. M. DE et al. 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, n. 4, p. 351–355, 2011.

MOURA, J. M. et al. Preparation of Chitosan with Different Characteristics and Its Application for Biofilms Production. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 23, n. 4, p. 470–477, 2015.

MUJTABA, M. et al. Current advancements in chitosan-based film production for food technology : A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 889–904, 2019.

MUJTABA, M. et al. Chitosan-based delivery systems for plants: A brief overview of recent advances and future directions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 154, p. 683–697, 2020.

MUNZ, M. Microstructure and roughness of photopolymerized poly(ethylene glycol) diacrylate hydrogel as measured by atomic force microscopy in amplitude and frequency modulation mode. **Applied Surface Science**, v. 279, p. 300–309, 2013.

MUXIKA, A. et al. Chitosan as a bioactive polymer: Processing , properties and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 1358–1368, 2017.

MUZZARELLI, R. A. A. **Chitin**. 5. ed. Ancona, Itália: Pergamon Press, 1977.

NAGHIPOUR, A.; FAKHRI, A. Heterogeneous Fe₃O₄@chitosan-Schiff base Pd nanocatalyst: Fabrication, characterization and application as highly efficient and magnetically-recoverable catalyst for Suzuki-Miyaura and Heck-Mizoroki C-C coupling reactions. **Catalysis Communications**, v. 73, p. 39–45, 2016.

NASCIMENTO, J. I. G. et al. Chitosan–citric acid edible coating to control *Colletotrichum gloeosporioides* and maintain quality parameters of fresh-cut guava. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 1127–1135, 2020.

NASRIN, R. et al. Preparation of Chitin-PLA laminated composite for implantable application. **Bioactive Materials**, v. 2, n. 4, p. 199–207, 2017.

NATARAJ, D. et al. Crosslinked chitosan films with controllable properties for commercial applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 1256–1264, 2018.

NEGM, N. A. et al. Treatment of industrial wastewater containing copper and cobalt ions using modified chitosan. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 21, p. 526–534, 2015.

NITHYA, A. et al. International Journal of Biological Macromolecules A potential photocatalytic , antimicrobial and anticancer activity of chitosan-copper

nanocomposite. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1774–1782, 2017.

NOSAL, W. H. et al. UV-vis-infrared optical and AFM study of spin-cast chitosan films. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 43, n. 3–4, p. 131–137, 2005.

NOURI, M. et al. Improvement of chitosan production from Persian Gulf shrimp waste by response surface methodology. **Food Hydrocolloids**, v. 59, p. 50–58, 2016.

OLIVEIRA, C. DE et al. Uranium determination in industrial effluents by voltammetric method using triazene 1-oxide as an alternative binder. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 17, n. 3, p. 1271–1280, 2020.

OLIVEIRA, H. M. L. et al. Estudo da produção de quitosana a partir do resíduo da casca de camarão por biofermentação. Congresso Latino-Americano de Órgãos Artificiais, 9. **Anais...Foz do Iguaçu – PR: 2016.**

OLIVEIRA, P. D. L. et al. Control of anthracnose caused by *Colletotrichum* species in guava, mango and papaya using synergistic combinations of chitosan and *Cymbopogon citratus* (D.C. ex Nees) Stapf. essential oil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 266, p. 87–94, 2018.

On chemistry of γ -chitin. **Carbohydrate Polymers**, v. 176, n. August, p. 177–186, 2017.

OZAKI, M. M. et al. Using chitosan and radish powder to improve stability of fermented cooked sausages. **Meat Science**, v. 167, p. 108165, 2020.

PADILLA-RODRÍGUEZ, A. et al. Synthesis of protonated chitosan flakes for the removal of vanadium(III, IV and V) oxyanions from aqueous solutions. **Microchemical Journal**, v. 118, p. 1–11, 2015.

PAL, P. et al. Applications of chitosan in environmental remediation: A review. **Chemosphere**, v. 266, p. 128934, 2021.

PARAGINSKI, G. L. et al. 1-(2-biphenyl)-3-methyltriazene-N-oxide as a template for intramolecular copper(II)•••arene- π interactions. **Journal of Molecular Structure**, v. 1104, p. 79–84, 2016.

PEREIRA, F. S. **Estudos de biopolímeros a base de quitina e quitosana quimicamente transformados para quelação de metais e para a captura e fixação de dióxido de carbono.** 183 f. Tese (Doutorado em Ciências

de Tecnologia de Materiais). Faculdade de Ciências e Tecnologia Campus de Presidente Prudente, Universidade Estadual Paulista, Presidente Prudente, 2016.

PEREIRA, V. DE A. et al. Chitosan-based hydrogel for magnetic particle coating. **Reactive and Functional Polymers**, v. 146, p. 7, 2020.

PIASECKI, R. Entropic measure of spatial disorder for systems of finite-sized objects. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**, v. 277, n. 1, p. 157–173, 2000.

PILLAI, C. K. S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 34, n. 7, p. 641–678, 2009.

PITHAN, S. L. DA S. **Caracterização de Imagens de Microscopia de Força Atômica Utilizando Processamento de Imagens**. 117 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais). Universidade de Ouro Preto, Ouro Preto, 2011.

POERIO, A. et al. Extraction and Physicochemical Characterization of Chitin from Cicada orni Sloughs of the South-Eastern French Mediterranean Basin. **Molecules**, v. 25, n. 11, p. 12, 2020.

POKHREL, S.; YADAV, P. N.; ADHIKARI, R. Applications of Chitin and Chitosan in Industry and Medical Science: A Review Demineralised powder. **Nepal Journal of Science and Technology**, v. 16, n. 1, p. 99–104, 2015.

POON, L.; WILSON, L. D.; HEADLEY, J. V. Chitosan-glutaraldehyde copolymers and their sorption properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 109, p. 92–101, 2014.

PRIYADARSHI, R. et al. Chitosan film incorporated with citric acid and glycerol as an active packaging material for extension of green chilli shelf life. **Carbohydrate Polymers**, v. 195, p. 329–338, 2018.

QAMAR, S. A. et al. Chitosan-based hybrid materials as adsorbents for textile dyes—A review. **Case Studies in Chemical and Environmental Engineering**, v. 2, p. 100021, 2020.

QU, B.; LUO, Y. Chitosan-based hydrogel beads: Preparations, modifications and applications in food and agriculture sectors – A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 152, p. 437–448, 2020.

QU, J. et al. Nitrogen, oxygen and phosphorus decorated porous carbons derived from shrimp shells for supercapacitors. **Electrochimica Acta**, v. 176, p. 982–988, 2015.

RAMOS BERGER, L. R. et al. Chitosan produced from Mucorales fungi using agroindustrial by-products and its efficacy to inhibit Colletotrichum species. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 635–641, 2018.

RAYMOND, L.; MORIN, F. G.; MARCHESSAULT, R. H. Degree of deacetylation titration and solid-state of chitosan using conductometric NMR. **Carbohydrate Research**, v. 246, p. 331–336, 1993.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603–632, 2006.

RINAUDO, M.; MILAS, M.; LE DUNG, P. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 15, p. 281–285, 1993.

ROBERTS, G. A. F. **Chitin Chemistry**. London, UK: Macmillan Press Ltd, 1992.

ROBERTS, G. A. F.; DOMSZY, J. G. Determination of the viscometric constants for chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 4, n. 6, p. 374–377, 1982.

ROSA, D. S. et al. On the Use of Calcined Agro-Industrial Waste as Palladium Supports in the Production of Eco-Friendly Catalysts : Rice Husks and Banana Peels Tested in the Suzuki – Miyaura Reaction. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 8, p. 2285–2296, 2019.

ROY, J. C. et al. Solubility of Chitin: Solvents, Solution Behaviors and Their Related Mechanisms. In: **Solubility of Polysaccharides**. Roy, J. C. (Org). Soochow: InterchOpen, 2017, p. 20.

RUBINA, M. S. et al. Chitosan aerogel containing silver nanoparticles: From metal-chitosan powder to porous material. **Polymer Testing**, v. 86, p. 106481, 2020.

SAHEBJAMEE, N. et al. Removal of Cu^{2+} , Cd^{2+} and Ni^{2+} ions from aqueous solution using a novel chitosan/polyvinyl alcohol adsorptive membrane. **Carbohydrate Polymers**, v. 210, p. 264–273, 2019.

SANTOS, A. J. R. W. A. DOS et al. Triazene 1-oxide compounds:

Synthesis, characterization and evaluation as fluorescence sensor for biological applications. **Journal of Molecular Structure**, v. 1060, n. 1, p. 264–271, 2014.

SANTOS, A. J. W. A. DOS et al. Inorganic and organic structures as interleavers among [bis(1-methyl-3-(p-carboxylatephenyl)triazene 1-oxide) Ni(II)] complexes to form supramolecular arrangements. **Journal of Molecular Structure**, v. 1125, p. 426–432, 2016.

SANTOS, A. J. W. R. DOS et al. Filmes inéditos de quitosana modificada e íons Cu (II). In: Sociedade Brasileira de Química, Encontro de Química da Região Sul, 26. v. 3, p. 6131328, 2019, **Anais...** Caxias do Sul – RS: Universidade de Caxias do Sul, 2019.

SANTOS, J. E. DOS. **Preparação, caracterização e estudos termoanalíticos de bases de shiff biopoliméricas e seus complexos de cobre**. 112 f. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

SANTOS, J. E. DOS; SOARES, J. DA P.; DOCKAL, E. R. Caracterização de Quitosanas Comerciais de Diferentes Origens. **Polímeros Ciência e Tecnologia**, v. 13, p. 242–249, 2003.

SARODE, S. et al. Overview of wastewater treatment methods with special focus on biopolymer chitin-chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 1086–1100, 2019.

SAZANOVA, T. S. et al. An atomic force microscopy study of hybrid polymeric membranes: Surface topographical analysis and estimation of pore size distribution. **Petroleum Chemistry**, v. 56, n. 5, p. 427–435, 2016.

SAZANOVA, T. S.; OTVAGINA, K. V.; VOROTYNTSEV, I. V. The contributions of supramolecular organization to mechanical properties of chitosan and chitosan copolymers with synthetic polymers according to atomic force microscopy. **Polymer Testing**, v. 68, p. 350–358, 2018.

SCHMITT, C. R. et al. Palladium nanoparticle biosynthesis via Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) extract: an efficient eco-friendly catalyst for Suzuki – Miyaura reactions. **SN Applied Sciences**, v. 3, n. 2, p. 1–9, 2021.

SEBASTIAN, J. et al. Microwave-assisted extraction of chitosan from *Rhizopus oryzae* NRRL 1526 biomass. **Carbohydrate Polymers**, v. 219, p. 431–440, 2019.

SEDAGHAT, F. et al. International Journal of Biological Macromolecules

Bioconversion of shrimp waste *Penaeus merguensis* using lactic acid fermentation: An alternative procedure for chemical extraction of chitin and chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 883–888, 2017.

SEENUVASAN, M.; SAROJINI, G.; DINESHKUMAR, M. Recovery of chitosan from natural biotic waste. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**, v. 6, p. 115-133, 2020.

SEIXAS, P. T. L. et al. Controle fitopatológico do *Fusarium subglutinans* pelo óleo essencial do capim-citronela (*Cymbopogon nardus* L.) e do composto citronelal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 523–526, 2011.

SHAHID-UL-ISLAM; BUTOLA, B. S.; VERMA, D. Facile synthesis of chitosan-silver nanoparticles onto linen for antibacterial activity and free-radical scavenging textiles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 133, p. 1134–1141, 2019.

SHAIKH, N.; PAMIDIMUKKALA, P. Magnetic chitosan stabilized palladium nanostructures: Potential catalysts for aqueous Suzuki coupling reactions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 183, p. 1560–1573, 2021.

SHENVI, S.; ISMAIL, A. F.; ISLOOR, A. M. Preparation and characterization study of PPEES / chitosan composite membrane crosslinked with tripolyphosphate. **Desalination**, v. 344, p. 90–96, 2014.

SHENVI, S. S. et al. Preparation and characterization of PPEES/chitosan composite nanofiltration membrane. **Desalination**, v. 315, p. 135–141, 2013.

SHETH, Y. et al. An environment friendly approach for heavy metal removal from industrial wastewater using chitosan based biosorbent: A review. **Sustainable Energy Technologies and Assessments**, v. 43, p. 100951, 2021.

SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W. **Química Inorgânica**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2008.

SIGMA-ALDRICH. **Quitosana da casca de camarão com peso molecular médio**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/448877?lang=en®ion=US>>. Acesso em: 14 jan. 2019.

SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S. P. Purificação e caracterização de quitosana comercial. **Polímeros**, v. 8, n. 4, p. 63–68, 1998.

SILVERSTEIN, R. et al. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro, RJ: Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2007.

SIVASELVI, K.; GHOSH, P. Characterization of modified Chitosan thin film. **Materials Today: Proceedings**, v. 4, n. 2, p. 442–451, 2017.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5. ed. São Paulo, SP: Bookman, 2002.

SKOOG, D.; HOLLER, F.; NILMAN, T. **Princípios de Análise Instrumental**. 6. ed. São Paulo, SP: Bookman, 2009.

SOARES, A. R.; LOURENÇO, S. A.; AMORIM, L. Infection of guava by *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum acutatum* under different temperatures and wetting periods. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 4, p. 265–272, 2008.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. 10. ed. São Paulo, SP: Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2006.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B.; SNYDER, S. A. **Química Orgânica**. 12. ed. São Paulo, SP: Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2018.

SOON, C. Y. et al. Extraction and physicochemical characterization of chitin and chitosan from *Zophobas morio* larvae in varying sodium hydroxide concentration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 135–142, 2018.

SORIA, A. C.; VILLAMIEL, M. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, n. 7, p. 323–331, 2010.

SOUZA, K. V. DE; ZAMORA, P. G. P.; ZAWADZKI, S. F. Esferas de Quitosana/Fe na Degradação do Corante Azul QR-19 por Processos Foto-Fenton Utilizando Luz Artificial ou Solar. **Polímeros**, v. 20, n. 3, p. 210–214, 2010.

SQUITTI, R. et al. Commentary: The case for abandoning therapeutic chelation of copper ions in Alzheimer's disease. **Frontiers in Neurology**, v. 8, p. 10–13, 2017.

STOICA, I. et al. Statistical analysis on morphology development of some semialicyclic polyimides using atomic force microscopy. **Microscopy Research**

and Technique, v. 76, n. 5, p. 503–513, 2013.

SURAT, M. A.; JAUHARI, S.; DESAK, K. R. A brief review : Microwave assisted organic reaction. **Applied Science Research**, v. 4, n. 1, p. 645–661, 2012.

TANG, L. et al. An efficient chitosan-based adsorption material containing phosphoric acid and amidoxime groups for the enrichment of Cu(II) and Ni(II) from water. **Journal of Molecular Liquids**, v. 331, p. 115815, 2021.

TASHAKKORIAN, H. et al. Transparent chitosan based nanobiocomposite hydrogel: Synthesis, thermophysical characterization, cell adhesion and viability assay. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 144, p. 715–724, 2020.

THOMPSON, J. B. et al. The Backbone Conformational Entropy of Protein Folding : Experimental Measures from Atomic Force Microscopy. **Journal of Molecular Biology**, v. 2836, n. 02, p. 645–652, 2002.

THONGCHAI, K. et al. Characterization, release, and antioxidant activity of caffeic acid-loaded collagen and chitosan hydrogel composites. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 9, n. 3, p. 6512–6520, 2020.

TIWARI, A. D. et al. Carbohydrate Polymers Stabilisation of silver and copper nanoparticles in a chemically modified chitosan matrix. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1402–1407, 2013.

TORBORG, C.; BELLER, M. Recent applications of palladium-catalyzed coupling reactions in the pharmaceutical, agrochemical, and fine chemical industries. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 351, n. 18, p. 3027–3043, 2009.

TRUNG, T. S. et al. Improved method for production of chitin and chitosan from shrimp shells. **Carbohydrate Research**, v. 489, p. 107913, 2020.

TYLINGO, R. et al. Preparation and characterization of porous scaffolds from chitosan-collagen-gelatin composite. **Reactive and Functional Polymers**, v. 103, p. 131–140, 2016.

UPADHYAY, U. et al. Recent advances in heavy metal removal by chitosan based adsorbents. **Carbohydrate Polymers**, v. 251, p. 117000, 2021.

VAKILI, M. et al. Regeneration of chitosan-based adsorbents used in heavy metal adsorption: A review. **Separation and Purification Technology**, v. 224, p. 373–387, 2019.

VARGHESE, L. R.; DAS, D.; DAS, N. Application of novel nanobiocomposites for removal of nickel (II) from aqueous environments: Equilibrium, kinetics, thermodynamics and ex-situ studies. **Koorean Journal Chemistry Engineering** v. 33, n. 1, p. 238–247, 2016.

VEISI, H. et al. Ultrasound assisted synthesis of Pd NPs decorated chitosan-starch functionalized Fe₃O₄ nanocomposite catalyst towards Suzuki-Miyaura coupling and reduction of 4-nitrophenol. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 172, p. 104–113, 2021.

VICARO, K. O. et al. **Estudo de Propriedades Elétricas no Sistema Tensionado InAs / InP**. 94 f. Dissertação (Mestrado em Física). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

VIDAL, R. R. L.; MORAES, J. S. Removal of organic pollutants from wastewater using chitosan: a literature review. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 16, n. 3, p. 1741–1754, 2019.

VIEIRA, R. S. Adsorção competitiva dos íons cobre e mercúrio em membranas de quitosana natural e reticulada. **Polímeros**, V.4, p. 162, 2008.

WAN NGAH, W. S.; TEONG, L. C.; HANAFIAH, M. A. K. M. Adsorption of dyes and heavy metal ions by chitosan composites: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 4, p. 1446–1456, 2011.

WANG, H. et al. Removal of cobalt (II) ion from aqueous solution by chitosan – montmorillonite. **JES**, v. 26, n. 9, p. 1879–1884, 2014a.

WANG, M. et al. The green adsorption of chitosan tripolyphosphate nanoparticles on cotton fiber surfaces. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, n. 1, p. 812–818, 2014b.

WANG, S. T. Z. Y. N. Y. J. L. Simultaneous detection and removal of cobalt ions from aqueous solution by modified chitosan beads. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 15, n. 2, p. 385–394, 2018.

WANG, X. et al. Preparation of pure chitosan film using ternary solvents and its super absorbency. **Carbohydrate Polymers**, v. 153, p. 253–257, 2016.

WANI, T. A.; MASOODI, F. A.; AKHTER, R. Preparation and characterization of chitosan flake and chitosan nanopowder gels: A comparative study of rheological, thermal and morphological perspectives. **Food Science and technology**, v. 148, p. 111–144, 2021.

WROBEL, T. P.; BHARGAVA, R. Infrared Spectroscopic Imaging

Advances as an Analytical Technology for Biomedical Sciences. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 3, p. 1444–1463, 2018.

WU, T. et al. Efficient reduction of chitosan molecular weight by high-intensity ultrasound: Underlying mechanism and effect of process parameters. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 13, p. 5112–5119, 2008.

YACOOT, A.; KOENDERS, L. Aspects of scanning force microscope probes and their effects on dimensional measurement. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 41, n. 10, 2008.

YOUNES, I. et al. Chitin and chitosan preparation from shrimp shells using optimized enzymatic deproteinization. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 2032–2039, 2012.

YOUNES, I.; RINAUDO, M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. **Marine Drugs**, v. 13, n. 3, p. 1133–1174, 2015.

ZENG, D.; LUO, X.; TU, R. Application of Bioactive Coatings Based on Chitosan for Soybean Seed Protection. **Internacional Journal of Carbohydrate**, v. 2, p. 241–254, 2012.

ZENG, L. et al. Adsorption of Cd (II), Cu (II) and Ni (II) ions by cross-linking chitosan / rectorite nano-hybrid composite microspheres. **Carbohydrate Polymers**, v. 130, p. 333–343, 2015.

ZHANG, H. et al. The preparation and characterization of chitin and chitosan under large-scale submerged fermentation level using shrimp by-products as substrate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 334–339, 2017.

ZHANG, H. et al. Development of PEGylated Chitosan/CRISPR-Cas9 Dry Powders for Pulmonary Delivery via Thin-Film Freeze-Drying. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 605, p. 120831, 2021a.

ZHANG, L.; ZENG, Y.; CHENG, Z. Removal of heavy metal ions using chitosan and modified chitosan: A review. **Journal of Molecular Liquids**, v. 214, p. 175–191, 2016.

ZHANG, N. et al. Preparation and adsorption properties of citrate-crosslinked chitosan salt microspheres by microwave assisted method. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 152, p. 1146–1156, 2020.

ZHANG, Q.; ZHUANG, S.; WANG, J. Biosorptive removal of cobalt(II) from aqueous solutions using magnetic cyanoethyl chitosan beads. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 6, p. 104531, 2020.

ZHANG, Y. et al. Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 11, p. 1914–1917, 2005.

ZHANG, Y. et al. Research progress of adsorption and removal of heavy metals by chitosan and its derivatives: A review. **Chemosphere**, v. 279, p. 130927, 2021b.

ZHAO, D. et al. Two-step separation of chitin from shrimp shells using citric acid and deep eutectic solvents with the assistance of microwave. **Polymers**, v. 11, n. 3, 2019a.

ZHAO, D. et al. Eco-friendly extraction and characterization of chitin and chitosan from the shrimp shell waste via microwave irradiation. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 104, n. 3, p. 395–405, 2019b.

ZHENG, F. et al. Cobalt induces neurodegenerative damages through Pin1 inactivation in mice and human neuroglioma cells. **Journal of Hazardous Materials**, v. 419, p. 126378, 2021.

ZHU, L. F. et al. Synthesis and Evaluation of Herbal Chitosan from Ganoderma Lucidum Spore Powder for Biomedical Applications. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.

ZHUANG, C.; ZHONG, Y.; ZHAO, Y. Effect of deacetylation degree on properties of Chitosan films using electrostatic spraying technique. **Food Control**, v. 97, p. 25–31, 2019.

ZIA, Q. et al. Porous poly(L-lactic acid)/chitosan nanofibres for copper ion adsorption. **Carbohydrate Polymers**, v. 227, p. 115343, 2020.

ZVEZDOVA, D. Synthesis and characterization of chitosan from marine sources in Black Sea. Annual Scientific Conference, 50. **Anais**. University of Ruse, v. 3, n. 1, p. 65–69, 2010.

APÊNDICE

Apêndice A – Titulação Potenciométrica (mV) e condutimétrica

Esta titulação foi realizada simultaneamente com a titulação potenciométrica (pH). As curvas de potência (mV) em função do volume de NaOH adicionado nas soluções de quitosana comercial e sintetizada diluídas em ácido clorídrico estão representadas na Figura 1a.

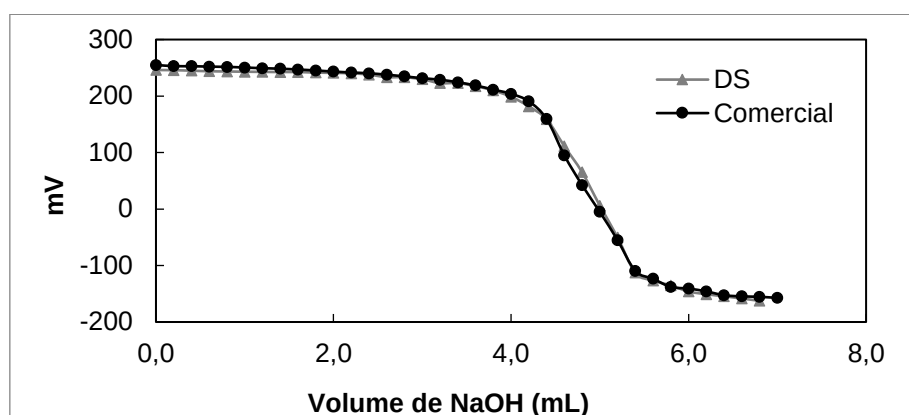


Figura 1a – Curvas de titulação potenciométrica (mV) para a quitosana sintetizada (DS_{9h}) e quitosana comercial.

Na titulação potenciométrica (mV) o primeiro ponto de inflexão corresponde à neutralização do ácido clorídrico da solução (V_1) e o segundo ponto de inflexão se refere à neutralização de prótons do grupo amino presentes na molécula da quitosana (V_2). Com base no estudo das curvas de titulação potenciométrica (Figura 1a) foram evidenciado dois pontos de inflexão que, por sua vez, geram três retas e três equações de reta (RAYMOND; MORIN; MARCHESSAULT, 1993).

Pelo estudo das equações das retas, ao igualarmos $Y_1 = Y_2$ o “X” equivale ao volume de base utilizada para neutralizar o ácido clorídrico da solução, ou seja, V_1 ; e ao igualar $Y_2 = Y_3$ o valor de “X” corresponderá ao volume de base utilizada para neutralizar os grupos aminos protonados, ou seja, V_2 . Então, com o estudo das equações de retas pode-se determinar o volume gasto com maior precisão (RAYMOND; MORIN; MARCHESSAULT, 1993).

A Tabela 1a apresenta $\%GD$ para amostras de quitosana comercial e quitosana sintetizada (DS), indicando valores muito semelhantes entre si para cada amostra, apesar do coeficiente de determinação (R^2) (Tabela 1a) ter apresentado baixa precisão, o que é indício de algum erro na análise, alguma instabilidade no eletrodo, no phmetro ou erro na coleta de dados

(CZECHOWSKA-BISKUP et al., 2012; SANTOS; SOARES; DOCKAL, 2003). Os dados da tabela abaixo foram utilizados para o cálculo do grau de desacetilação ($\overline{GD}$), conforme Equação 10.

Tabela 1a – Equações das retas para as curvas de titulação potenciométrica (mV).

Quitosana comercial		Quitosana DS	
Equação das retas	R ²	Equação das retas	R ²
$Y_1 = -2,1919X + 263,25$	0,8779	$F(X) = -2,2404X + 147,35$	0,7318
$Y_2 = -223,59X + 1271,5$	0,9969	$F(X) = -269,41X + 1361,10$	0,9967
$Y_3 = -4,4405X - 50,84$	0,8838	$F(X) = -5,1452X - 103,95$	0,9309

Os dados obtidos para a curva potenciométrica estão apresentados na Tabela 2a e o ajuste da linearização do estudo da equação das retas da Tabela 1a.

Tabela 2a – Dados obtidos na curva de titulação potenciométrica (mV) e no estudo das equações das retas.

Quitosana	Massa (g)	Curva potenciométrica (mV)				Estudo das equações de reta			
		V ₁	V ₂	V ₂ – V ₁	% $\overline{GD}$	V ₁	V ₂	V ₂ – V ₁	% $\overline{GD}$
Comercial	0,020	4,4	5,4	1,0	79,70	4,552	5,571	1,019	81,21
DS	0,021	4,4	5,4	1,0	75,90	4,542	5,544	1,002	75,98

V₁ = ponto de equivalência para a titulação da solução ácida, dado em mL.

V₂ = ponto de equivalência para a neutralização dos grupos amino protonados da quitosana, dado em mL.

Um ajuste no % $\overline{GD}$ da amostra comercial foi observado, de 79,70% para 81,21%, utilizando o estudo das equações de reta. Já para a amostra sintetizada (DS), o % $\overline{GD}$ foi ajustado de 75,90% para 75,98%.

O estudo das equações das retas permite determinar os pontos de equivalência com maior precisão do que pela variação percebida nos dados ao longo da projeção da curva ou visivelmente no gráfico, no entanto não houve variações tão grandes nos resultados obtidos comparando-se os dados da curva potenciométrica (mV) e os dados do estudo das equações de reta, apesar dos baixos coeficiente lineares de R².

O princípio básico das titulações condutimétrica é a substituição de íons que têm certa condutividade, por outros íons de condutividade diferente. O

procedimento adotado para as medidas de $\overline{GD}$ foi adaptado de Raymond e colaboradores (1993).

As curvas de titulação condutimétrica para as amostras de quitosana comercial e sintetizada (DS) são representadas na Figura 2a.

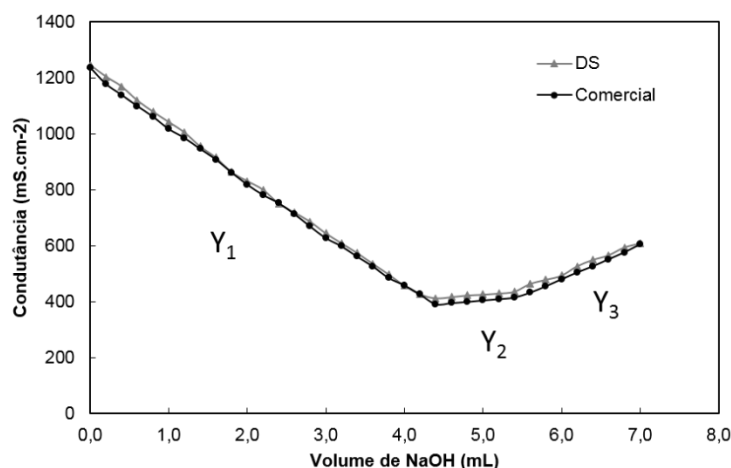


Figura 2a – Curva de titulação condutimétrica da quitosana sintetizada (DS) e quitosana comercial.

Podem ser observados dois pontos de inflexão, em que, o primeiro ramo linear representa a neutralização do ácido presente na solução (V_1) e o segundo ramo linear corresponde à neutralização de prótons dos grupos amino protonados da quitosana (V_2) (RAYMOND; MORIN; MARCHESSAULT, 1993).

O terceiro ramo linear refere-se ao excesso de base após o ponto de equivalência. Estas três retas originaram as seguintes equações das retas e podem ser evidenciadas na Tabela 3a.

Tabela 3a – Equações de reta para as curvas de titulação condutimétrica.

Quitosana comercial		Quitosana DS	
Equação de reta	R^2	Equação de reta	R^2
$Y_1 = -191,87X + 1232,14$	0,9988	$F(X) = -195,49X + 1297,22$	0,9988
$Y_2 = 119,28X - 235,25$	0,9965	$F(X) = 107,25X - 151,28$	0,9921
$Y_3 = 22,55X + 290,90$	0,9982	$F(X) = 22,343X + 322,42$	0,9908

O estudo das equações de reta foi usado na obtenção de dados mais precisos, sendo idêntico ao detalhado anteriormente, onde a igualdade entre $Y_1 = Y_2$ o “X” equivale ao volume de base utilizada para neutralizar o ácido clorídrico

da solução, ou seja, V_1 ; e a igualdade $Y_2 = Y_3$ equivale ao valor de “X” correspondente ao volume de base utilizada para neutralizar os grupos aminos protonados, ou seja, V_2 (RINAUDO; MILAS; LE DUNG, 1993).

A Tabela 4a apresenta os dados obtidos na curva de titulação condutimétrica e o estudo das equações das retas para a amostra de quitosana comercial e quitosana sintetizada. Os dados foram utilizados para o cálculo do grau de desacetilação ($\overline{GD}$), conforme E6.

Tabela 4a – Dados obtidos na curva de titulação condutimétrica e no estudo das equações de reta.

Quitosana	Massa (g)	Curva condutimétrica				Estudo das equações de reta			
		V_1	V_2	$V_2 - V_1$	$\% \overline{GD}$	V_1	V_2	$V_2 - V_1$	$\% \overline{GD}$
Comercial	0,020	4,4	5,4	1,0	79,70	4,387	5,439	1,052	83,54
DS	0,021	4,4	5,4	1,0	75,90	4,575	5,579	1,002	76,19

V_1 = ponto de equivalência para a titulação da solução ácida, dado em mL.

V_2 = ponto de equivalência para a neutralização dos grupos amino protonados da quitosana, dado em mL.

Os dados mostram um ajuste pelo estudo das equações de reta, resultando em um aumento no $\% \overline{GD}$ de 79,70% para 83,54% para a quitosana comercial e de 75,90% para 76,19% para a quitosana sintetizada (DS).

A quitosana sintetizada (DS) está de acordo com a amostra padrão e com os resultados que vem sendo apontados na literatura para determinação do grau de desacetilação por titulação condutimétrica, entre eles, 76,50% (FRICK et al., 2018), 89,20% (ANTONINO, 2007), 74% (FONSECA, 2016), 79,80 (ZVEZDOVA, 2010).

Como resultado, observa-se que as diferentes titulações potenciométricas (pH e mV) e condutimétrica geraram dados que foram tratados, resultando na determinação do grau de desacetilação ($\% \overline{GD}$) com maior precisão. Diante disso, a Tabela 5a apresenta um comparativo dos dados obtidos nas titulações realizadas.

Tabela 5a - Dados comparativo do grau de desacetilação ($\overline{GD}$) nas diferentes titulações.

Quitosana	Potenciométrica		Condutimétrica
	pH	(mV)	(mS.cm ⁻¹)
Comercial	83,52±0,010%	81,21±2,32%	83,54±0,010%
DS	76,20±0,005%	75,98±0,22%	76,19±0,005%

A análise estatística dos dados da Tabela 5a indica que a análise potenciométrica com coleta de dados em (mV) apresentou baixa precisão que pode ser evidenciada pelo coeficiente de determinação (R^2), interferindo na confiabilidade dos resultados da Tabela 1a e comprovada pelos valores discrepantes.

A partir de então, com base nos resultados indicados podemos perceber que a análise potenciométrica (pH) e a análise condutimétrica tiveram uma maior acuidade no tratamento estatístico devido à aplicação do método das derivadas e do método dos mínimos quadrados para os dados potenciométricos (pH) e aplicando o estudo das equações de reta para a titulação condutimétrica. Assim, foi feita a escolha dos dados obtidos pelo método potenciométrico (pH) como adequados a este trabalho, bem como este método foi escolhido como método a ser adotado em análises futuras.

Apêndice B – Parâmetros topológicos resultante das análises de AFM

A Tabela 6a e Figuras 3a – 8a evidenciam dados e topografias em 3D da superfície e do perfil dos parâmetros RMS, S_k e S_{sk} em diferentes ampliações de varreduras (20, 50 e 90) μm^2 .

Tabela 6a – Parâmetros topológicos das amostras experimentais

Amostras	Rugosidade ^a (nm)	Altura Máx. S_z (nm)	Coef. de assimetria (S_{sk})	Coef. de Curtose (S_k)	Entropia (H) $\pm$ (déficit)
Área de varredura 20x20 μm^2					
CASCA	67,44	492,7	0,2834	0,6020	-15,1591 $\pm$ 0,0660
DM ^b	128,30	926,6	0,5329	0,7406	-14,4927 $\pm$ 0,0427
DP ^c	172,71	1554,3	1,8202	8,7240	-14,3508 $\pm$ 0,1981
DS _{9h}	120,35	906,63	-1,8122	5,1607	-14,7329 $\pm$ 0,2189
DS _M	126,52	1082,34	0,4422	1,5946	-14,5167 $\pm$ 0,0527
DS _U	75,66	532,13	0,4704	0,0283	-15,0137 $\pm$ 0,0355
COM	18,49	155,83	-0,7755	2,0394	-16,5104 $\pm$ 0,1233
Área de varredura 50x50 μm^2					
CASCA	241,10	3060,80	0,2785	-0,4611	-14,0150 $\pm$ 0,1956
DM ^b	128,30	1504,90	0,6543	1,4528	-14,0781 $\pm$ 0,0618
DP ^c	172,71	1598,50	0,6711	0,6318	-13,9276 $\pm$ 0,0478
DS _{9h}	278,49	3150,20	0,4948	0,8875	-13,2637 $\pm$ 0,1299
DS _M	237,13	5320	0,2025	-0,6922	-12,9852 $\pm$ 0,2454
DS _U	75,66	893,54	0,8869	0,5695	-14,1396 $\pm$ 0,0983
COM	18,49	321,10	-0,6355	1,8439	-15,7091 $\pm$ 0,1615
Área de varredura 90x90 μm^2					
CASCA	374,10	4171,1	1,4604	1,2285	-13,7177 $\pm$ 0,3378
DM ^b	295,30	2197,3	0,6459	1,3362	-13,6851 $\pm$ 0,0687
DP ^c	255,25	2051,2	0,5978	-0,4667	-13,3647 $\pm$ 0,1218
DS _{9h}	638,94	5115,40	0,1016	0,2502	-12,6305 $\pm$ 0,0402
DS _M	823,91	8669,62	0,7961	-0,1795	-12,1974 $\pm$ 0,2184
DS _U	417,82	2329,98	0,3385	0,8414	-13,3644 $\pm$ 0,0951
COM	55,66	706,03	0,5862	2,3517	-15,3809 $\pm$ 0,0959

Rugosidade quadrática média (RMS)

S= casca

Quitina desmineralizada (DM)

Quitina desproteinizada (DP)

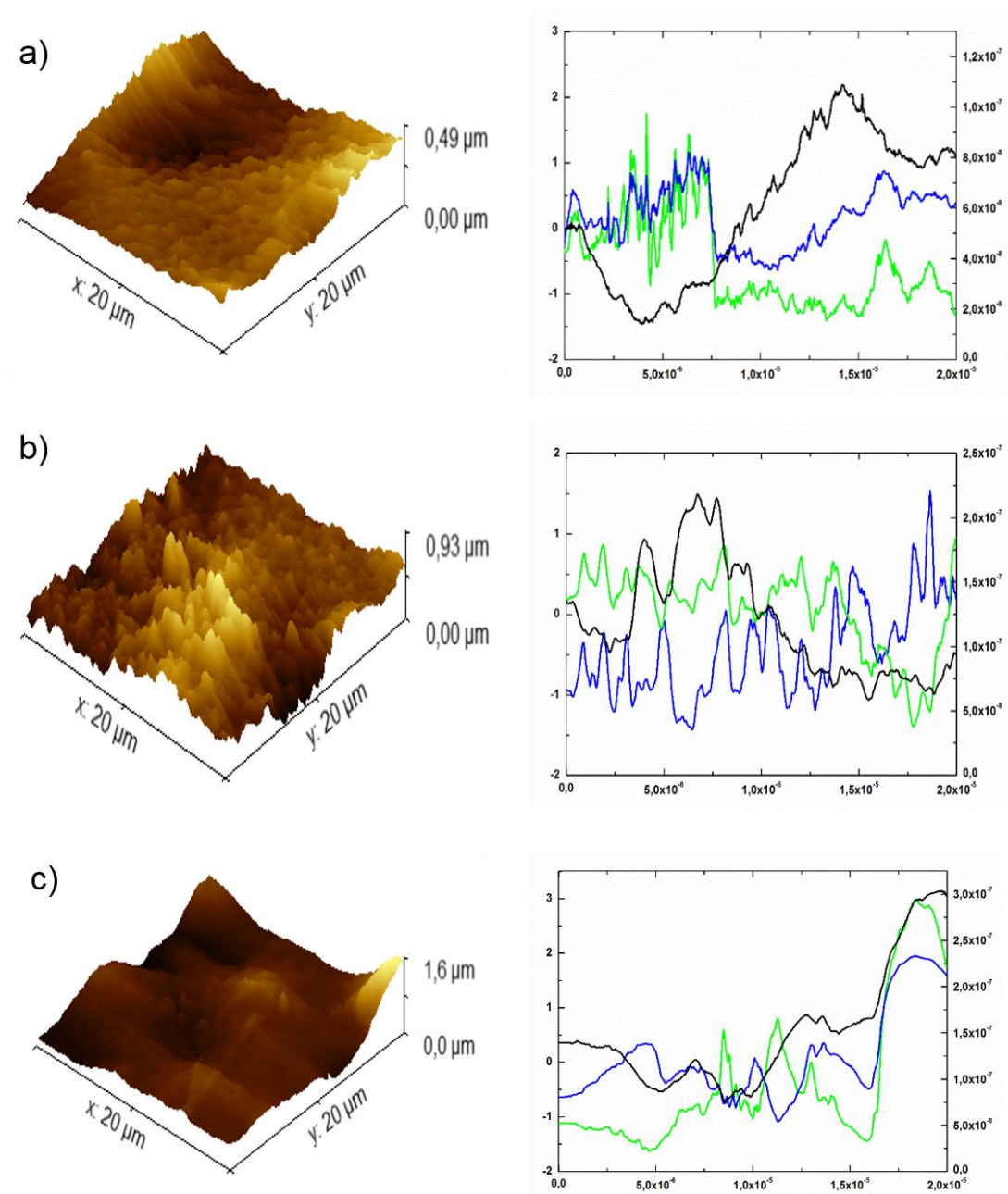


Figura 3a – Topografia em 3D da superfície das etapas do processo de extração da quitina com área de varredura $20 \times 20 \mu\text{m}^2$: (a) Casca, (b) DM e (c) DP (3D) e respectiva imagem da superfície representando: Rugosidade RMS (nm) no eixo z (preto); Coeficiente de assimetria (azul) e Coeficiente de Curtose (verde) no eixo y e a posição representada no eixo x

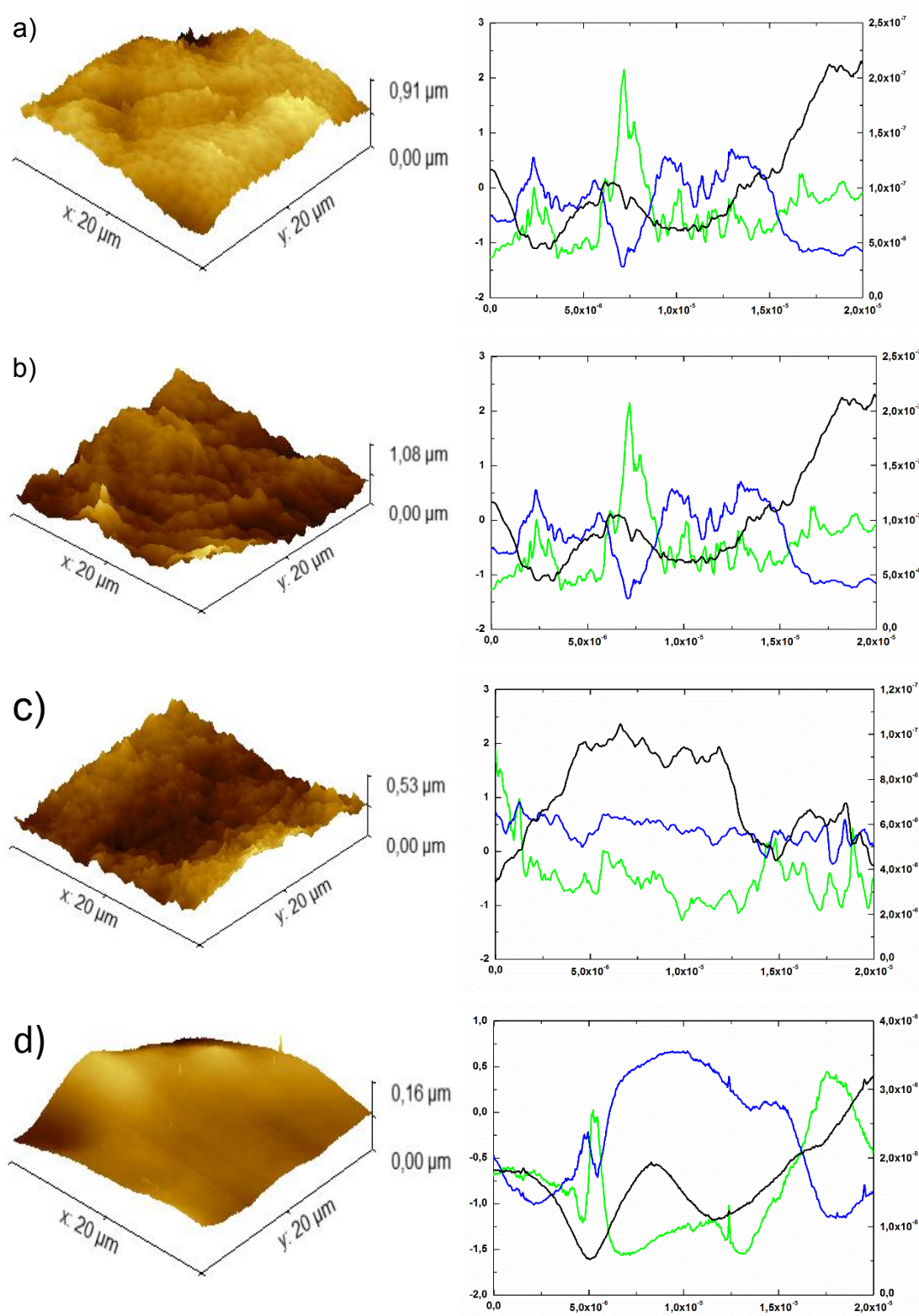


Figura 4a – Topografia em 3D da superfície das etapas do processo de síntese de quitosana com área de varredura 20x20 μm²: (a) DS_{9h}, (b) DS_M, (c) DS_U e (d) COM e respectiva imagem da superfície representando: Rugosidade RMS (nm) no eixo z (preto); Coeficiente de assimetria S_{sk} (azul) e Coeficiente de Curtose S_k (verde) no eixo y e a posição representada no eixo x.

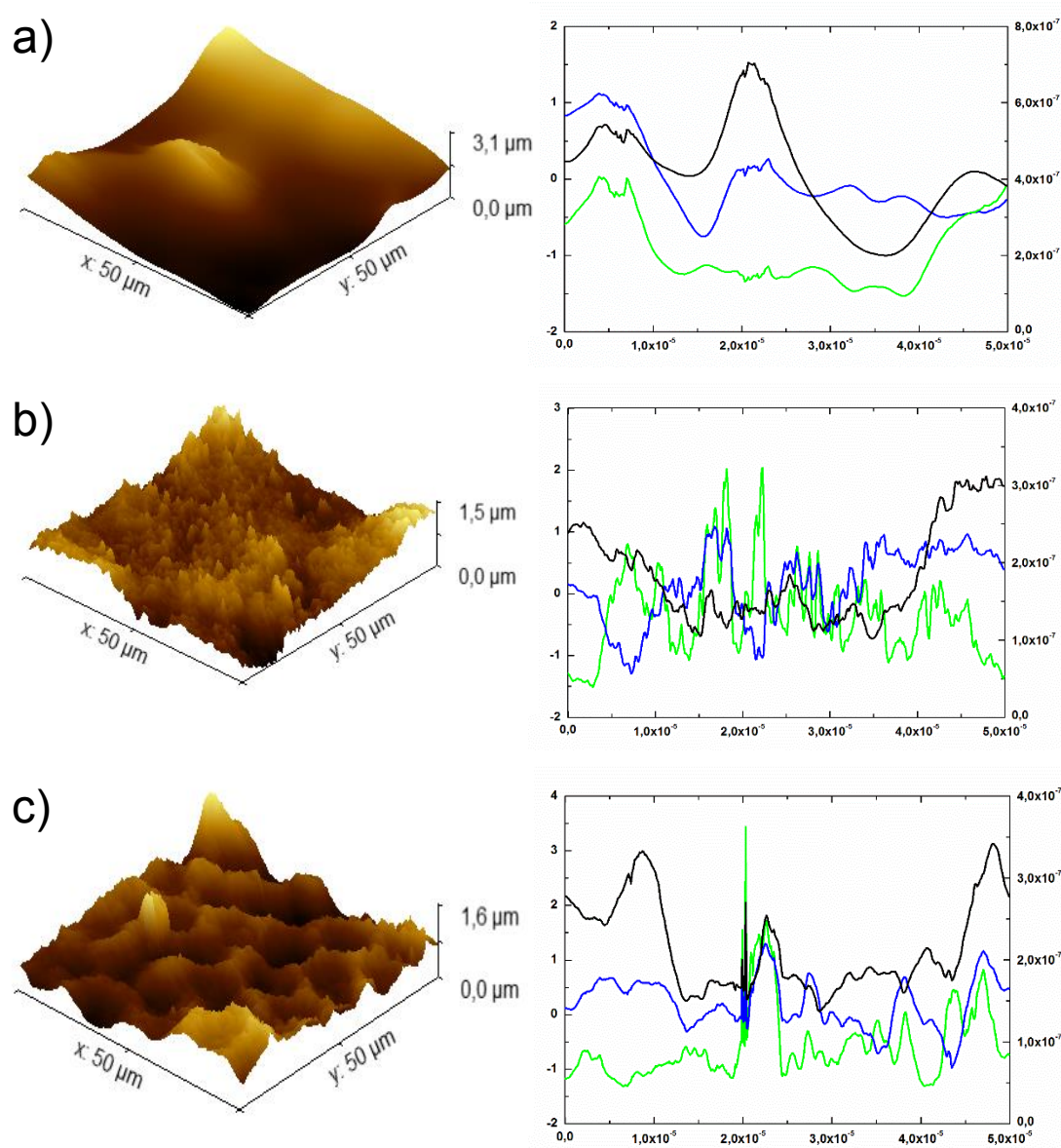


Figura 5a – Topografia em 3D da superfície das etapas do processo de extração da quitina com área de varredura 50x50 μm^2 : (a) Casca, (b) DM e (c) DP e respectiva imagem da superfície representando: Rugosidade RMS (nm) no eixo z (preto); Coeficiente de assimetria (azul) e Coeficiente de Curtose (verde) no eixo y e a posição representada no eixo x.

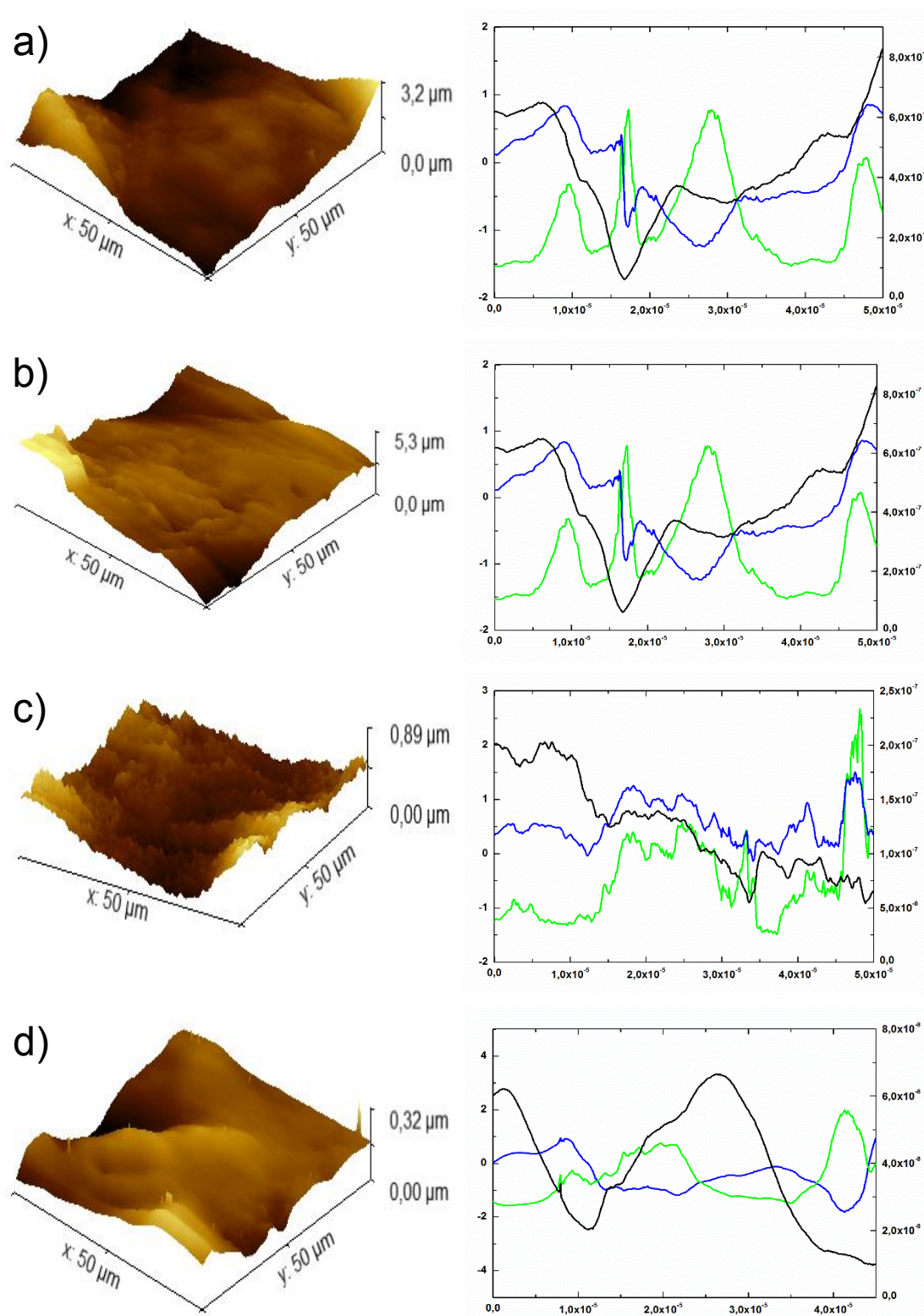


Figura 6a – Topografia em 3D da superfície das etapas do processo de síntese de quitosana com área de varredura $20 \times 20 \mu m^2$: (a) DS_{9h} , (b) DS_M , (c) DS_U e (d) COM e respectiva imagem da superfície representando: Rugosidade RMS (nm) no eixo z (preto); Coeficiente de assimetria S_{SK} (azul) e Coeficiente de Curtose S_K (verde) no eixo y e a posição representada no eixo x.

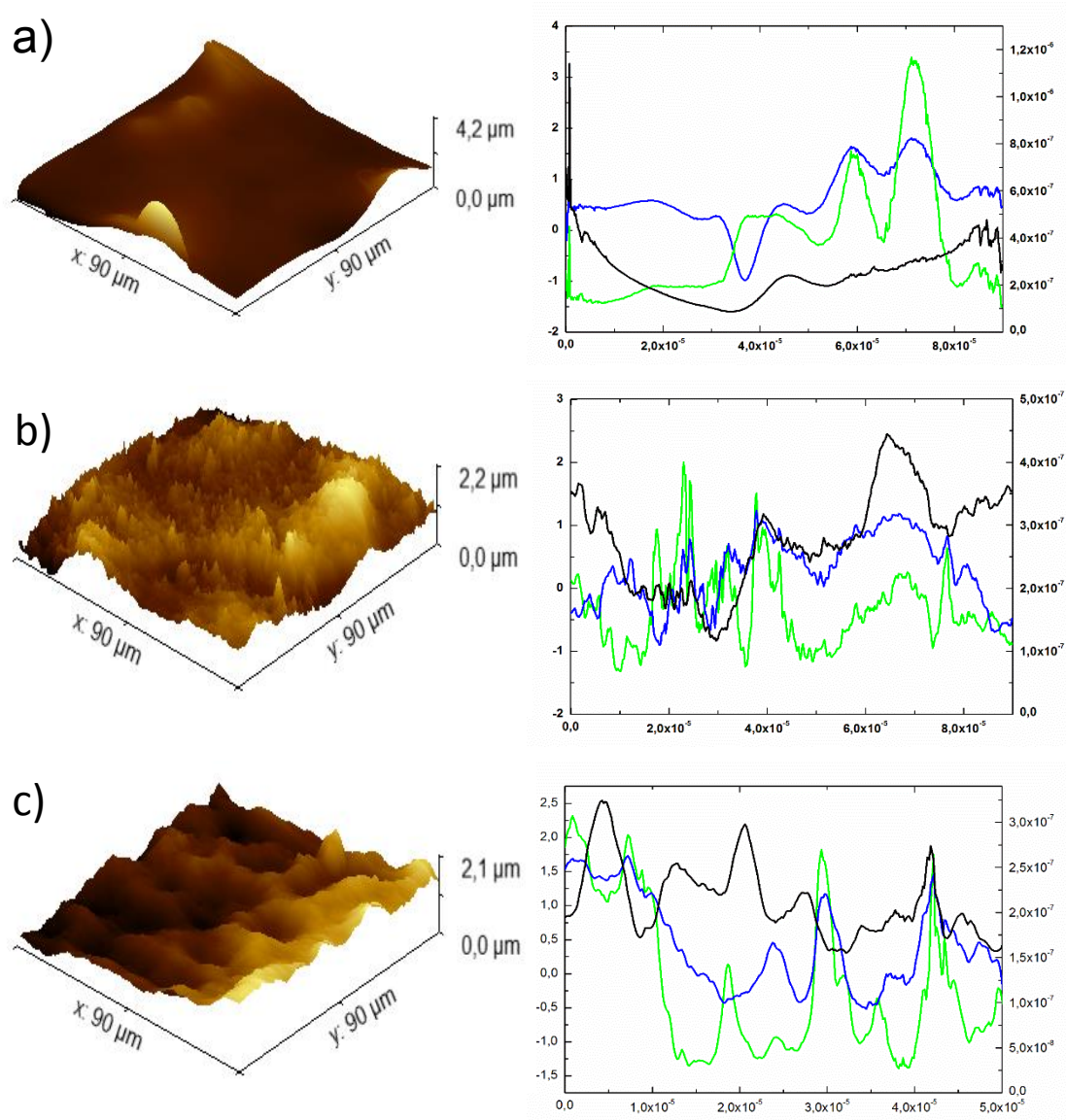


Figura 7a – Topografia em 3D da superfície das etapas do processo de extração da quitina com área de varredura $90 \times 90 \mu\text{m}^2$: (a) Casca, (b) DM e (c) DP e respectiva imagem da superfície representando: Rugosidade RMS (nm) no eixo z (preto); Coeficiente de assimetria (azul) e Coeficiente de Curtose (verde) no eixo y e a posição representada no eixo x.

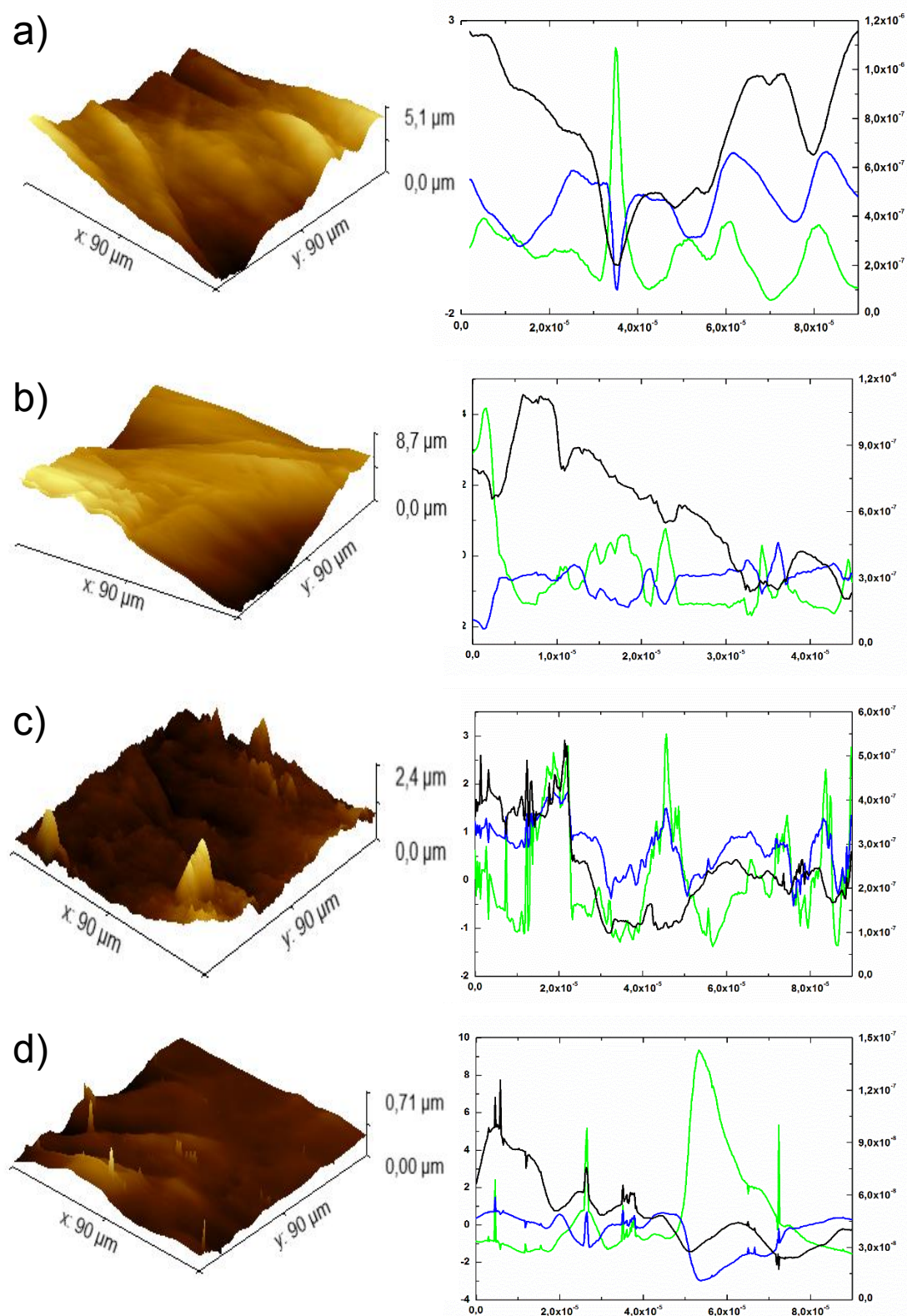


Figura 8a – Topografia em 3D da superfície das etapas do processo de síntese de quitosana com área de varredura $90 \times 90 \mu m^2$: (a) DS_{9h} , (b) DS_M , (c) DS_U e (d) COM e respectiva imagem da superfície representando: Rugosidade RMS (nm) no eixo z (preto); Coeficiente de assimetria S_{SK} (azul) e Coeficiente de Curtose S_K (verde) no eixo y e a posição representada no eixo x.