



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
CAMPUS CARAÚBAS
BACHARELADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA

RENNAN DE SOUSA LINHARES

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROESFERAS DE QUITOSANA
OBTIDAS A PARTIR DE CARAPAÇA DE CAMARÃO**

CARAÚBAS - RN

2019

RENNAN DE SOUSA LINHARES

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROESFERAS DE QUITOSANA
OBTIDAS A PARTIR DE CARAPAÇA DE CAMARÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Ciência e
Tecnologia da Universidade Federal
Rural do Semi-Árido (UFERSA),
Campus Caraúbas, como parte dos
requisitos para obtenção do Título de
Bacharel em Ciência e Tecnologia.

Orientador: Profa. Dra. Guymmann Clay
da Silva – UFERSA.

CARAÚBAS - RN

2019

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

L735 Linhares, Rennan de Sousa.
p Produção e caracterização de microesferas de
quitosana obtidas a partir de carapaça de camarão
/ Rennan de Sousa Linhares. - 2019.
54 f. : il.

Orientadora: Guymmann Clay daSilva.
Monografia (graduação) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Curso de
Ciência e
Tecnologia, 2019.

1. quitosana. 2. microesfera. 3. quitina. 4.
desacetilação. 5. biopolímero. I. Silva, Guymmann
Clay da , orient. II. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas

da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

RENNAN DE SOUSA LINHARES

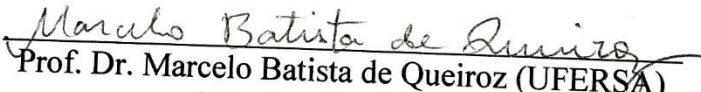
**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROESFERAS DE QUITOSANA
OBTIDAS A PARTIR DE CARAPAÇA DE CAMARÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Ciência e
Tecnologia da Universidade Federal
Rural do Semi-Árido (UFERSA),
Campus Caraúbas, como parte dos
requisitos para obtenção do Título de
Bacharel em Ciência e Tecnologia.

Avaliado em: 22 / 03 / 2019.

BANCA EXAMINADORA


Orientadora Prof. Dra. Guymann Clay da Silva (UFERSA)
Presidente


Prof. Dr. Marcelo Batista de Queiroz (UFERSA)
Membro Examinador


Prof. Dr. Daniel Freitas Freire Martins (UFERSA)
Membro Examinador

*“O navio está seguro quando está no porto.
Mas não é pra isso que se fazem navios.”*

C. S. Lewis

AGRADECIMENTOS

De modo geral, venho aqui agradecer a todos que fizeram parte dessa longa caminhada, agradeço cada momento compartilhado, independente das experiências e resultados, que nem sempre foram os melhores, mas foram de suma importância para o meu crescimento, acima de tudo, como homem. Desde já peço desculpas se esqueço alguém, então de forma especial quero agradecer ...

Ao meu grandioso e bondoso Deus, dedico inteiramente esse trabalho e tudo o que vivi para chegar até aqui, porque dele, por ele e para ele são todas as coisas, e que tudo seja feito para glória do senhor Jesus.

A minha família, por depositar confiança e ser indispensável na minha vida, em especial aos meus pais: Rosimar Linhares dos Santos e Janicleide Alves de Sousa Linhares, por fazerem tudo que foi possível para que eu chegasse até aqui e ainda possa voar mais alto, tudo que eu faço é por vocês, agradeço todo carinho, suporte e amor.

Ao meu irmão Rammon de Sousa Linhares, por sempre está comigo, dividindo momentos especiais e me dando mais um motivo para ser exemplo de homem íntegro e de caráter.

A minha orientadora e amiga Guymmann Clay, por toda assistência, paciência, conselhos, e de forma especial quero parabenizá-la por ser a pessoa amável e exemplar que ela é.

A todos os amigos que fizeram e fazem parte dessa caminhada, vocês são indispensáveis, e sempre serão lembrados, posso assegurar que vocês fizeram meus dias bem mais leves, Weverson Neri, Carlos Henrique, Thalyson Oriel, Guilherme Barbosa, Gustavo Brito, Gabriel Nakaharada, Daniel Queiroga, Breno José, Victor Yago, Anderson Mateus, Jorge Cruz, Alisson Brenno, João Gabriel, Felipe Menezes, Júlia Plíscia, Pâmela Granjeiro, Naara Shiva, Gessica Moura, Larissa Martins, Pedro Yago, Fabrício Leite e Thiago Ruan, torço por cada um, e o sucesso de vocês, também é o meu.

A todos amigos fora do universo universitário que são tão importantes quanto os demais já citados aqui, em especial queria agradecer a Jefferson Martins, Gustavo Oliveira e Yanneson Marlon, que são verdadeiros irmãos que Deus me deu, me aconselhando da melhor forma e conseguindo sempre arrancar um sorriso, independentemente da situação.

Aos Técnicos dos laboratórios de Química da Ufersa-Caraúbas, Joe Victor e Wicliton Wagner, por todo apoio e suporte prestado.

A todos que compõe a banca examinadora pela disponibilidade e contribuições feitas para agregar e melhorar o presente trabalho.

Por fim, de forma especial, queria dedicar também esse trabalho, aos amigos Ygor Lima e Mariane Silva, que nos deixaram e partiram dessa vida, deixando muitas lembranças e eternas Saudades.

RESUMO

A pesca é uma das atividades econômicas que causa impactos negativos ao meio ambiente, dessa maneira o destino adequado de resíduos dela é algo de extrema importância. Uma preocupação da indústria pesqueira atualmente diz respeito ao destino adequado para seus resíduos, de modo que as agressões ao meio ambiente sejam cada vez mais reduzidas. Na medida em que a geração de resíduos de camarões e siris é significativa e que tais resíduos são constituídos por quitina, tem havido grande interesse em seu reaproveitamento. O aproveitamento de resíduos de pescados diminui o risco de poluição ambiental e pode contribuir para o aumento do consumo de proteína animal, além de fornecer matéria-prima de baixo custo. A quitina, uma fibra natural, precursora da quitosana, é a mais abundante depois da celulose, e sua estrutura é semelhante a essa fibra vegetal. Por isso, o presente trabalho teve como objetivo produzir e caracterizar microesferas de quitosana obtidas a partir da carapaça de camarão. A metodologia consiste em obter a quitosana através da desacetilação da quitina em meio básico, caracterização da quitosana obtida através do teor de sólidos, grau de desacetilação e massa molar média, com posterior formulação e caracterização das microesferas obtidas. Os resultados apresentados foram satisfatórios como o grau de desacetilação igual a 76,21% mostrando uma boa conversão de quitina/quitosa, obtendo uma esfera estável de granulometria homogênea em torno de 1,7 μ m e boa biodegradável.

Palavras-chave: Biopolímero. Quitina. Quitosana. Microesfera. Grau de desacetilação.

ABSTRACT

Fishing is one of the economic activities that causes negative impacts to the environment, so the proper destination of waste is of the utmost importance. A concern of the fishing industry nowadays refers the appropriate destination for its residues, so that the aggressions to the environment are increasingly reduced. To the extent that the generation of shrimp and crabs residues is significant and that such residues are composed of chitin, there has been great interest in its reuse. The use of fish waste reduces the risk of environmental pollution and can contribute to the increase of the consumption of animal protein, besides providing raw material of low cost. Chitin, a natural fiber, precursor of chitosan, is the most abundant after cellulose, and its structure is similar to this vegetable fiber. Therefore, the present work aimed to produce and characterize chitosan microspheres obtained from the shrimp shell. The methodology consists of obtaining the chitosan through the deacetylation of chitin in basic medium, characterization of the chitosan obtained through the solids content, degree of deacetylation and average molar mass, with subsequent formulation and characterization of the microspheres obtained. The results presented were satisfactory as the degree of deacetylation equal to 76.21% showing a good chitin / chitosan conversion, obtaining a stable sphere of homogeneous granulometry around 1.7 mm and good biodegradable.

Keywords: Biopolymer. Chitin. Chitosan. Microsphere. Degree of deacetylation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tipos de polímeros de acordo com suas ligações. a) linear; b) ramificado; c) ramificações em estrela; d) escalar; e) enxertado; f) semi-escalar; g) reticulado.....	17
Figura 2: Comparação das estruturas moleculares da celulose e da quitina.....	19
Figura 3: Estrutura polimórfica da quitina.	20
Figura 4: Estrutura da Quitosana.	21
Figura 5 - Gráfico de titulação condutimétrica relacionando a condutividade com a variação de volume de NaO.	23
Figura 6: Sistema de refluxo para desacetilação da quitina.....	33
Figura 7: Solução de quitosana precipitada.....	34
Figura 8: Quitosana purificado secando.	34
Figura 9: Sistema montado para titulação condutimétrica.	35
Figura 10: Sistema montado para obtenção da massa molar média.	36
Figura 11: Aparato usado para gotejar a solução de quitosana 4%.	37
Figura 12: Microesferas de quitosana.....	37
Figura 13 - Peneiras usadas para determinar granulometria das esferas.	39
Figura 14: Condutividade da solução de quitosana em meio ácido em função da solução de NaOH. ●: condutividade da solução de quitosana. ○: réplica da condutividade da solução de quitosana.	41
Figura 15 - pH em função da concentração de NaOH da solução ácida de quitosana. ..	43
Figura 16: viscosidade relativa em função da concentração de quitosana.	44
Figura 17: viscosidade reduzida/inerente em função da concentração de quitosana. ○ é a viscosidade reduzida. □ viscosidade inerente.....	45
Figura 18: Grau de intumescimento em função do tempo para as esferas de quitosana obtida. ●: grau de intumescimento. ○: réplica do grau de intumescimento	48
Figura 19 - esferas degradadas em solução de pH 1,2.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Definições dos tipos de viscosidade e suas respectivas relações.....	25
Tabela 2 - Reagentes utilizados para realização do presente trabalho	30
Tabela 3 - Equipamentos utilizados para realização do presente trabalho	30
Tabela 4 - Viscosidades determinadas a partir da viscosimetria capilar. Viscosidade relativa (η_r), viscosidade específica (η_{sp}), viscosidade reduzida (η_{red}) e viscosidade inerente (η_{iner}).	44
Tabela 5 - Massas das microesferas de quitosana secas e após o intumescimento.	47
Tabela 6 - Grau de intumescimento das microesferas de quitosana com 1h, 2h e 4h de imersão.	48
Tabela 7 - Dados referentes ao ensaio de granulometria com relação a percentagem de massa retida em cada peneira.	50

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3. REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1. Polímeros	17
3.2. Biomateriais	18
3.3. Quitina	18
3.4. Quitosana.....	20
3.4.1. Propriedades farmacológicas da quitosana.....	22
3.5. Caracterização da quitosana	22
3.5.1. Determinação do Grau de Desacetilação.....	23
3.5.2. Determinação da Massa Molar Média.....	24
3.5.3. Determinação do Teor de Sólidos	26
3.6. Microesferas de quitosana	26
3.7. Adsorção de fármaco.....	27
3.8. Caracterização das microesferas de quitosana	27
3.8.1. Teor de sólidos	27
3.8.2. Determinação da Granulometria.....	28
3.8.3. Determinação do Grau de Intumescimento	28
3.8.4 - Teste de Degradação das Microesfera: Simulação do ambiente estomacal	29
3.9. Liberação de fármaco.....	29
4. METODOLOGIA	30
4.1. Materiais.....	30
4.2. Detenção de quitosana a partir de casca de camarão	31
4.2.1. Lavagem	31
4.2.2. Desmineralização	31

4.2.3. Desproteínização	32
4.2.4. Despigmentação.....	32
4.2.5- Desacetilação.....	32
4.3. Purificação da quitosana.....	33
4.4. Caracterização da Quitosana	34
4.4.1. Determinação do Grau de Desacetilação.....	34
4.4.2. Determinação da Massa Molar Média.....	35
4.4.3. Determinação do Teor de Sólidos	36
4.5. Produção de microesferas de quitosana	37
4.6 Caracterização das microesferas de quitosana	38
4.6.1. Determinação do Teor de Sólidos	38
4.6.2. Determinação do Grau de Intumescimento	38
4.6.3. Teste de Degradação das Microesfera com simulação do ambiente estomacal ...	38
4.6.4. Determinação da Granulometria.....	39
5. RESULTADOS.....	40
5.1. Caracterização da quitosana	40
5.1.1. Teor de Sólidos.....	40
5.1.2. Determinação do Grau de Desacetilação.....	40
5.1.3 Determinação da Massa Molar Média.....	43
5.2 Caracterização das microesferas de quitosana	46
5.2.1 - Determinação do Teor de Sólidos	46
5.2.2 - Determinação do Grau de Intumescimento.....	47
5.2.3 - Teste de Degradação das Microesfera.....	49
5.2.4 - Determinação da Granulometria	50
6. CONCLUSÃO.....	51
REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	52

1. INTRODUÇÃO

A pesca é uma das atividades econômicas que causa impactos ao meio ambiente. Atividade presente ao longo de toda história, e, ainda hoje, é consideravelmente importante em todo o mundo como fonte de geradora de empregos, alimentos e renda para vários segmentos econômicos (BENTO, 2008).

A natureza tem a capacidade de degradar os resíduos orgânicos e reduzir os impactos provocados por eles, contudo alguns desequilíbrios ecológicos têm ocorrido em locais cuja capacidade de assimilação natural é excedida. Assim, o gerenciamento de resíduos de forma inadequada pode resultar na poluição dos solos, da água e do ar (SANTOS, 2005).

No Brasil, nota-se um grande potencial pesqueiro, isso se deve ao fato do território do país gozar de um litoral vasto e várias bacias hidrográficas, além de uma diversa fauna aquática. A produção gerada pela pesca no Brasil em termos de capturas desembarcadas pela pesca extrativa, aquicultura continental e marinha, tem atingido níveis próximos a um milhão de toneladas anuais (MOURA et al., 2006).

Uma das preocupações da indústria pesqueira diz respeito ao destino apropriado para seus resíduos, de modo que as agressões ao meio ambiente sejam cada vez mais reduzidas. Uma vez que a geração de resíduos de camarões e siris é significativa e que tais resíduos são constituídos por quitina, proteínas, carbonato de cálcio e pigmentos, tem havido grande interesse em reaproveitar esse material, como alternativa à sua disposição final, com vistas ao desenvolvimento de produtos de valor agregado (MOURA et al., 2006).

Uma das preocupações da indústria pesqueira é o aproveitamento de resíduos de pescados, já que isso diminui o risco de poluição ambiental além de contribuir para o aumento do consumo de proteína animal, como também fornecer matéria-prima de baixo custo (STEVANATO, 2006).

A fibra natural quitina, precursora da quitosana, é a mais abundante da natureza depois da celulose, e sua estrutura se assemelha a essa fibra vegetal. A quitosana é obtida por meio da desacetilação alcalina da quitina (*N* – acetilglucosamina). As condições dessa reação conferem à quitosana suas características principais, como o peso molecular médio do biopolímero e o grau de desacetilação. De acordo com as características se determinam os ramos de utilização da quitosana obtida (MOURA et al., 2006).

A quitosana é um polímero natural, atóxico, biodegradável e advindo de fontes naturais. Como todo polímero a quitosana também possui uma vasta aplicação no mercado, com enfoque aplicação na indústria biomédica, contudo outras áreas também fazem grande uso desse polímero, algumas delas são, a agricultura, o tratamento de água, a indústria alimentícia, a indústria de cosméticos e a indústria biofarmacêutica (AZEVEDO, 2007).

A quitosana tem sido considerada como produto de investimentos de diversas áreas industriais, dentre as quais podem-se destacar as indústrias farmacêuticas e biomédicas, sendo essas as maiores áreas de aplicação dela, devido à sua ação farmacológica, que torna possível o emprego da quitosana como agente cicatrizante, aditivo de medicamentos, liberação controlada de drogas, biomembranas artificiais, dentre outras (AZEVEDO, 2007).

O fato de ser um biopolímero, têm influenciado para que a cada dia mais venha-se optar por utilizar a quitosana em vários ramos, além do mais, ela tem um grande potencial para realização de muitos estudos e de investimentos nas áreas médicas e industriais. Na indústria farmacêutica acontece da mesma forma, a quitosana possui propriedades que aumentam consideravelmente seu leque de atuação nessa indústria, tanto sozinha, quanto associada a fármacos, já que ela não causa efeitos colaterais ao corpo humano por ser biocompatível e não tóxica, esse é o seu diferencial (PIRES et al., 2015).

Em seu trabalho Chandy e Sharma (1993) utilizaram um determinado método para preparação de microesferas de quitosana com aspecto gelatinoso. Os autores prepararam uma solução aquosa de quitosana em ácido acético e a adicionaram, gota-a-gota, usando uma seringa, dentro de uma solução de hidróxido de sódio e metanol. Posteriormente a obtenção dos sistemas particulados, o fármaco antimicrobiano ampicilina foi incorporado através do processo de adsorção.

Em consequência disso, o uso de microesferas associadas a fármacos poderia levar a uma ainda mais ampla utilização desse biopolímero, onde ela poderia substituir outros componentes que poderiam causar efeitos nocivos ao corpo humano, além disso a quitosana pode ser utilizada em liberação controlada de medicamentos. Para tal fim é necessário entender o poder que esse polímero tem de adsorver certos tipos de fármacos (SCHAFFAZICK et al., 2003).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O trabalho tem como objetivo a produção e caracterização de microesferas de quitosana a partir das carapaças de camarão.

2.2 Objetivos específicos

- Produção de quitosana;
- Caracterizar a quitosana via teor de sólidos, massa molar média e grau de desacetilação;
- Produção de microesferas de quitosana;
- Caracterizar as microesferas através do grau de degradação, grau de intusmecimento e teor de sólidos;

3. REFERENCIAL TEÓRICO

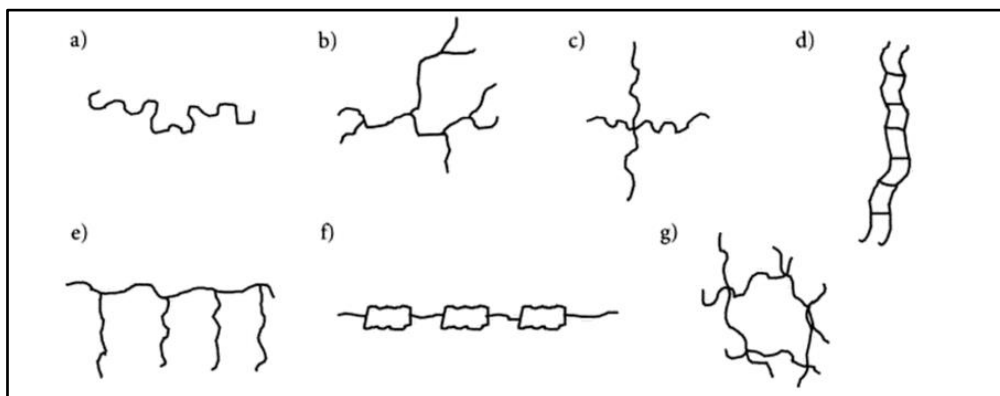
3.1. Polímeros

Os polímeros são materiais amplamente utilizados nos dias de hoje, em vários campos de atuação. Eles são macromoléculas inorgânicas ou orgânicas que tem origem sintética ou natural, e suas moléculas são estruturadas pela repetição de unidades simples designadas de meros (AKCELRUD, 2007).

Tanto os polímeros naturais, como os sintéticos são gerados por reações químicas que envolvem moléculas simples, chamadas de monômeros, formando assim cadeias poliméricas com quantidades vastas de repetições criando assim, os polímeros em questão (AKCELRUD, 2007).

Segundo a forma com a qual essas ligações entre monômeros ocorrem, são gerados uma variedade de polímeros, com diferentes características físico-químicas (AKCELRUD, 2007). Alguns dos principais tipos estão ilustrados na Figura 1:

Figura 1: Tipos de polímeros de acordo com suas ligações. a) linear; b) ramificado; c) ramificações em estrela; d) escalar; e) enxertado; f) semi-escalar; g) reticulado.



Fonte: AKCELRUD (2007).

3.2. Biomateriais

De acordo com He e Benson (2016) o campo dos biomateriais é altamente multidisciplinar e excitante, e retrata que esses materiais amadurecem em um elemento indispensável para, na era moderna, melhorar a qualidade de vida e a saúde humana.

Segundo Salazar (2015) desde as décadas passadas podemos identificar os biopolímeros como qualquer substância ou combinação delas, farmacologicamente inerte, que tem origem sintética ou natural, que foi pensado para ser implantada por um período de tempo qualquer a fim de substituir ou complementar um sistema que trata, substitui ou aumenta qualquer órgão, função ou tecido.

Salazar (2015) cita em seu trabalho que certas macromoléculas são usadas frequentemente como biomaterias. Podendo ser de origem natural, como por exemplo o colágeno, borracha natural, proteínas e a celulose, ou produzidos de forma sintética, como é o caso do nylon, polietileno e os silicones. As macromoléculas têm como característica a elevada massa molar, e são formadas por longas cadeias de átomos. Uma macromolécula é descrita por uma unidade constitucional que se repete, essas unidades nos polímeros são denominadas monômeros. Em certos casos a cadeia se apresenta de forma linear, já em outros são ramificadas ou interconectadas formando retículos tridimensionais.

De acordo com Salaza (2015) os polímeros são os biomateriais utilizados em aplicações biomédicas, porém, para escolher uma macromolécula ou polímero que serão destinados a certas aplicações é imprescindível que os matérias detenham propriedades específicas, ou seja, para sua aplicação se faz necessário o estudo de parâmetros como propriedades mecânicas, a pureza, a estabilidade do material, a metodologia de fabricação, a tolerabilidade do organismo ao material, a caracterização físico-química, entre outras.

3.3. Quitina

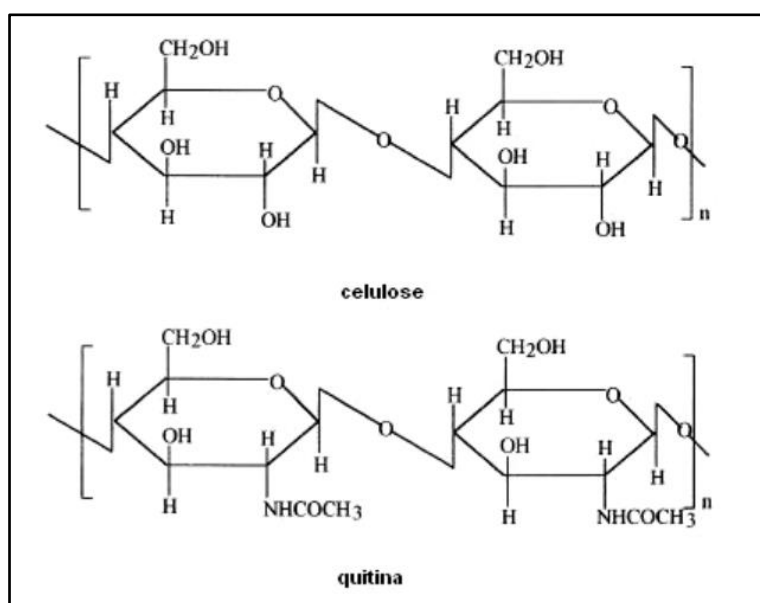
Relata-se que a primeira vez que a quitina foi isolada, foi no ano de 1811 por Braconnot, no momento em que trabalhava com fungos. O autor afirma em seu trabalho que nos mesmos havia uma no substância, que era completamente distinta da encontrada nas madeiras (ANTONINO, 2007).

A denominação “quitina” é derivado da palavra grega “khitón”, a qual significa carapaça ou caixa de revestimento. Esse significado se dá pelo fato da quitina apresentar

função estrutural na natureza pois constitui a parede celular dos fungos, o exoesqueleto dos artrópodes e carapaça dos crustáceos, assim, oferecendo revestimento e proteção para estes organismos (BERGER, 2013).

A quitina é largamente distribuída na natureza, a sua fibra natural é a mais abundante depois da celulose, e sua estrutura é semelhante a essa fibra vegetal. A diferença estrutural entre as duas fibras deve-se ao grupo hidroxila localizado na posição 2, que na quitina está substituído por grupos acetoamino (MOURA et al., 2006), como pode ser vista na figura 2.

Figura 2: Comparação das estruturas moleculares da celulose e da quitina.

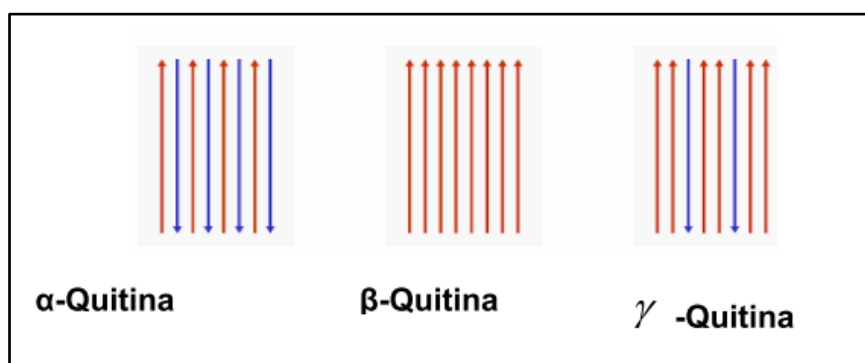


Fonte: (AZEVEDO, 2010).

A quitina é classificada como sendo um polissacarídeo de cadeia linear formado por unidades de N-acetil-2- dioxi-D-glicopiranoose, essas são interligadas por ligações glicosídicas $\beta(1 \rightarrow 4)$. A quitina é caracterizada por ser um material biodegradável, não-tóxico, insolúvel em água e em muitos solventes orgânicos, ela é despolimerizada na presença de ácidos minerais fortes, sendo parcialmente solúvel em solução de dimetilacetamida com 5% de cloreto de lítio (DMAc- LiCl) (ANTONINO, 2007).

Estudos feitos por difração de raio-X evidenciam que a fase cristalina da quitina é ordenada, ocorrendo em três diferentes formas denominadas α , β e γ , as quais diferem no arranjo de suas cadeias nas regiões cristalinas (ANTONINO, 2007). Podemos observar suas distintas estruturas na figura 3:

Figura 3: Estrutura polimórfica da quitina.



Fonte: (ANTONINO, 2007).

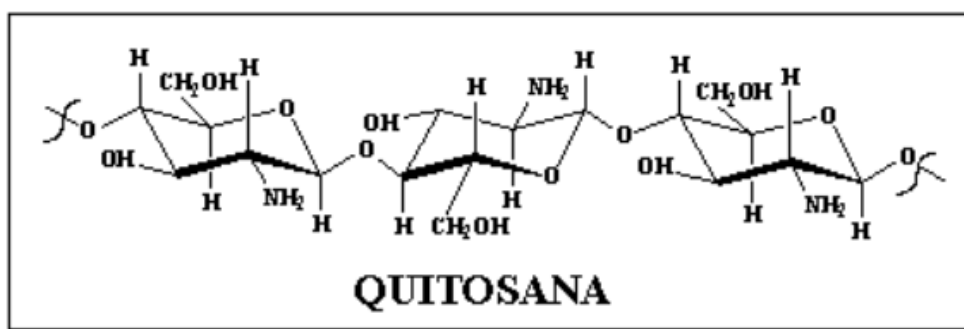
As três estruturas polimórficas estão provavelmente relacionadas a diferentes empregos no organismo. A forma α encontra-se onde se é necessária uma extrema dureza (resistência), como em cutículas de artrópodes e frequentemente, é associada com proteínas ou materiais inorgânicos ou então com ambos. Já as formas β e γ são encontradas onde se faz necessária a flexibilidade e dureza. A forma dominante, α - quitina é mais estável que as formas β e γ , porém estas últimas, β e γ , podem ser convertidas à forma α se passarem por tratamentos adequados (ANTONINO, 2007).

A quitina é separada de diversos componentes da carapaça quando passa por um processo químico que envolve as etapas de desproteinização e desmineralização das carapaças com soluções diluídas de HCl e NaOH, seguida de descoloração com KMnO_4 e ácido oxálico, por exemplo. A quitina é obtida, e passa pelo processo de desacetilação com solução concentrada de NaOH, esse processo define-se como a retirada dos grupos acetil (NHCOCH_3), e assim produzindo-se quitosana (AZEVEDO, 2007).

3.4. Quitosana

Pode-se definir a quitosana como sendo um copolímero de 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose e 2-acetamida-2-desoxi-D-glicopirranose, de composição variável em função do grau residual de acetilação, em que as unidades também são unidas por ligações glicosídicas β -(1,4) (Figura 4) (ANTONINO, 2007).

Figura 4: Estrutura da Quitosana.



Fonte: (ANTONINO, 2007).

A quitosana é obtida pelo processo desacetilação da quitina em soluções alcalinas. Durante a reação, os grupamentos acetamido ($-\text{NHCOCH}_3$) da quitina são transformados, em graus variados, em grupos amino ($-\text{NH}_2$), dando origem a quitosana. (ANTONINO, 2007).

A quitosana vêm sendo bastante explorada em aplicações tecnológicas e industriais há quase 70 anos, e isso se deve muitos a suas propriedades, pois é um polímero biodegradável, biocompatível e atóxico além de ser produzido por fontes naturais renováveis (ASSIS, 2008).

Na indústria farmacêutica é empregada na liberação de fármacos e seu sucesso maior está na absorção de gordura, pois ao ser ingerida antes da refeição, é solubilizada. A quitosana (carga positiva) se transforma em gel ao entrar em contato com os ácidos do estomago, e então atrai moléculas gordas (cargas negativas), dessa forma, formando um grupo que é arrastado até o intestino, onde se solidifica, sendo assim excretado do organismo junto com as fezes. Portanto, a gordura não é absorvida pelo organismo, ajudando ainda no controle do colesterol (ASSIS, 2008).

Há na quitosana características físico-químicas que derivam em propriedades como fácil formação de gel, e com propriedades de barreiras mecânicas. Estudos sobre polímeros afirmam que esse polímero apresenta variados comportamentos relacionados a solubilidade em função do pH, pois dependendo no meio em que se encontra, é possível formar filmes comestíveis com a simples adição de dado solvente (ASSIS, 2008).

3.4.1. Propriedades farmacológicas da quitosana

Estudos têm evidenciado que a quitosana tem sido eficiente em tratamentos de hemorragias, além de ser utilizada como componente de atadura. Há uma interação entre as cargas positivas dos grupos amina e as membranas dos eritrócitos e plaquetas carregadas negativamente, dessa forma, ativando a cascata de coagulação (TAVARES, 2011).

Pode-se atribuir a quitosana uma multiplicidade de outros efeitos, como ação antimicrobiana, antitumoral, antiulcerosa, osteogênicas, protetor renal, “modificação imunológica”, além do uso na “engenharia de tecidos” como bio-suporte com o intuito de permitir o crescimento da pele e dos ossos (TAVARES, 2011).

O biopolímero tem sido escolhido para desenvolvimento de fármacos de liberação controlada, pois sua capacidade de ficar carregado positivamente o caracteriza mucoadesivo, permitindo um aumento no tempo residual do fármaco no local de absorção. A quitosana é um compatível com tecidos vivos, ao passo que não causa reações alérgica ou rejeições no ser humano, ela é degradada a metabólitos (amino açúcares) que são completamente absorvidos pelo corpo humano (TAVARES, 2011).

Enfim, vale-se destacar como Tavares (2011) cita em seu trabalho, que várias aplicações terapêuticas têm sido desenvolvidas com foco na liberação controlada de fármacos em sistemas nanoparticulados, sobretudo, para administração parenteral, oral e oftálmica (TAVARES, 2011).

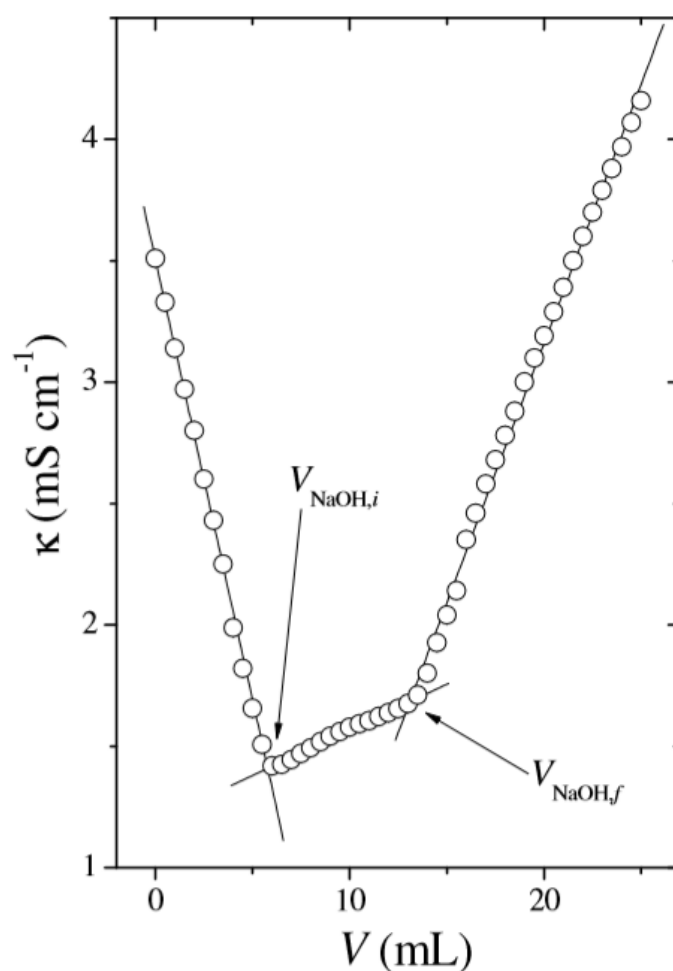
3.5. Caracterização da quitosana

Algumas características da quitosana devem ser monitoradas a fim de saber a qualidade desse polímero, podemos citar algumas dessas: o grau de desacetilação, o teor de sólidos e a massa molar média. Assim para que se saiba a procedência do produto em questão, se faz necessário realizar tais testes, pois, de acordo com Branco (2014) essas características podem ser alteradas facilmente de acordo com o modo pelo qual a quitosana é obtida.

3.5.1. Determinação do Grau de Desacetilação

O grau médio de desacetilação (GD) pode ser definido como o número de grupos amino em relação aos grupos amida da cadeia polimérica, podendo ser determinado por algumas técnicas. No trabalho em questão, descreveu-se os resultados obtidos por titulação condutimétrica (SANTOS et al., 2003), a técnica escolhida foi adaptada segundo o trabalho de Fernandes (2004), onde, de acordo com os dados obtidos, é possível plotar o gráfico que relaciona a condutividade com o volume de base utilizado. A representação dele está expressa na Figura 5.

Figura 5 - Gráfico de titulação condutimétrica relacionando a condutividade com a variação de volume de NaOH.



Fonte: (CARONI, 2009)

A partir das três retas obtém-se por extrapolação dois pontos de inflexão, esses correspondem ao volume de base necessário para neutralizar os grupos amino protonados (SANTOS et al, 2003).

A valor do grau de desacetilação pode ser encontrado através da Equação (1), adaptada do trabalho de Caroni (2009):

$$X_D = 100 \cdot M_A \cdot \frac{\Delta V \cdot C_{NaOH}}{\Delta V \cdot C_{NaOH} \cdot \Delta M + m_c} \quad (1)$$

Em que:

- X_D - Grau médio de desacetilação da quitosana;
- M_A - Massa molar da unidade acetilada;
- ΔV - Volume de solução de hidróxido de sódio necessário para a protonação dos grupos amino da quitosana;
- C_{NaOH} - Concentração molar da solução de hidróxido de sódio;
- ΔM - Diferença entre a massa molar da unidade acetilada e massa molar da unidade desacetilada;
- m_c - Massa da amostra de quitosana;

3.5.2. Determinação da Massa Molar Média

A massa molar média é obtida por uma técnica de viscosimetria capilar adaptada do trabalho de Signini e Campana (1998), essa técnica consegue produzir informações da massa molar de algum polímero por meio de soluções diluídas do mesmo utilizando a viscosidade intrínseca dessa substância.

A determinação da viscosidade intrínseca se dá em função da viscosidade relativa (η_r), da viscosidade específica (η_{sp}), da viscosidade reduzida (η_{red}) e da viscosidade inerente (η_{iner}), as quais variam de acordo com a concentração da solução. As mesmas são calculadas pelas equações expostas na Tabela 1 (LUCAS, 2001).

Tabela 1: Definições dos tipos de viscosidade e suas respectivas relações.

Nome	Equação que define	Unidade
Viscosidade relativa	$\eta_r = \frac{t}{t_0}$ (2)	Adimensional
Viscosidade específica	$\eta_{sp} = \eta_r - 1$ (3)	Adimensional
Viscosidade reduzida	$\eta_{red} = \frac{1}{C} \left(\frac{t}{t_0} - 1 \right) = \frac{\eta_{sp}}{C}$ (4)	dL/g
Viscosidade inerente	$\eta_{iner} = \frac{\ln(\eta_r)}{C}$ (5)	dL/g

Fonte: Lucas, 2001

A viscosidade intrínseca $[\eta]$ é calculada de acordo com a Equação (6), de Huggins:

$$\eta_{red} = [\eta] + k[\eta]^2 C \quad (6)$$

Onde: η_{red} – Viscosidade reduzida

$[\eta]$ – Viscosidade intrínseca (coeficiente linear)

$[\eta]^2$ – Viscosidade intrínseca (coeficiente angular)

k – Constante de Huggins

Sabendo-se os valores da viscosidade intrínseca da solução de quitosana, é possível assim, determinar a massa molecular viscosimétrica pela Equação (7), de Mark-Houwink.

$$[\eta] = k \cdot M_v^\alpha \quad (7)$$

Onde: M_v - Massa molar média do polímero

$[\eta]$ – Viscosidade intrínseca (coeficiente linear)

$k = 0,076$ (constante característica do polímero)

$\alpha = 0,76$ (constante característica da geometria da molécula do polímero)

Obs.: Os valores de α e de k são para a quitosana em solução tampão de ácido acético/ acetato de sódio.

3.5.3. Determinação do Teor de Sólidos

O teor de sólidos é o parâmetro corresponde ao valor real da massa da amostra, já que nessa análise o material em questão passa por uma secagem onde toda a água e outras substâncias presentes na mesma são esvaecidas restando apenas a quitosana (BRANCO, 2014).

A técnica empregada foi adaptada de Branco (2014), desta forma a massa real é obtida ao se fazer a razão entre a massa após a secagem e a massa inicial, como é visto na Equação (8).

$$T_s = \frac{m_s}{m_0} \cdot 100 \quad (8)$$

Onde:

T_s = Teor de sólidos;

m_s = Massa constante da amostra após secagem;

m_0 = Massa inicial da amostra.

3.6. Microesferas de quitosana

De acordo com Azevedo (2007), preparar microesferas de quitosana é uma técnica estrategicamente pensada para incrementar a capacidade de adsorção da quitosana, já que as microesferas têm uma área superficial em média 100 vezes maior do que a quitosana em flocos. Outra propriedade apresentada pelas microesferas é a cinética de adsorção mais rápida além da maior facilidade de manuseio e operação, dessa forma é visto em vários estudos recentes que a preparação de microesferas pode ser destinada a diferentes propósitos. O biopolímero caracteriza-se por sua versatilidade, o que permite que o mesmo possa produzir microesferas de diferentes formas e tamanhos, envolvendo diversos produtos e derivados. Usar quitosana porosa em partículas oferece inúmeros benefícios no processo de imobilização de enzimas. Entre as principais vantagens, podemos citar:

- I. Que por ser um biopolímero, ou seja, de origem natural, a quitosana é um material seguro para o uso e biocompatível.
- II. Sua grande quantidade de poros que se apresentam de maneira uniforme desde a superfície até seu interior, o que não acontece com outras resinas sintéticas, permitindo assim, uma grande difusão do substrato.
- III. A abundância de grupos amina altamente reativas disponíveis para imobilizar enzimas por ligação covalente e pelo fato de que a quitosana, por si própria, possuir uma grande afinidade com enzimas, permitindo a ela, desta maneira, que uma grande quantidade de enzimas possa ser imobilizada na quitosana.

Além de todos os pontos positivos enumerados anteriormente, ainda pode-se destacar o fato que sendo a quitosana um polissacarídeo, ela apresenta vantagens como a alta estabilidade em solventes orgânicos em adição a hidrofiliabilidade e a porosidade dos produtos formados (AZEVEDO, 2007).

3.7. Adsorção de fármaco

O fato de ser um biopolímero possibilita que a quitosana possa ser amplamente utilizada na indústria farmacêutica. Ela já tem sido destinada para algumas finalidades, como agente acelerador de cicatrização bem como para o uso em suplementos alimentícios (TAVARES, 2011). Porém, é esperado que a quitosana seja utilizada para outras coisas além disso, como a liberação controlada de fármacos no corpo humano. Para que isso ocorra, pode-se escolher o método de adsorção de fármaco em microesferas de quitosana, já que o polímero oferece potencial positivo a superfície do fármaco, o que facilita a interação deste com as membranas biológicas do corpo humano (SCHAFFAZICK, et al, 2003).

3.8. Caracterização das microesferas de quitosana

3.8.1. Teor de sólidos

Da mesma forma como já foi citado na caracterização da quitosana o teor de sólidos é a propriedade que diz respeito ao valor real da massa da amostra (BRANCO, 2014). A mesma técnica que foi utilizada para caracterizar a quitosana, também será

utilizada aqui, ou seja, para que a massa real seja obtida se faz necessário determinar a razão entre a massa após a secagem e a massa inicial, como já foi mostrado anteriormente na Equação (8).

3.8.2. Determinação da Granulometria

As dimensões das partículas têm influência direta em sua dissolução no meio, já que quanto menor o grão maior será sua área superficial, assim, a substância será dissolvida, adsorvida ou absorvida com maior facilidade (BONAMICI, 2009), dessa forma é notória a importância da análise granulométrica das microesferas de quitosana, visto que as mesmas irão passar pelo processo de adsorção de um fármaco.

É válido ressaltar que se o fármaco determinado já possuir boa absorção do mesmo pelo corpo humano, os níveis de absorção não irão se alterar com o aumento da área superficial, porém, existem vários tipos de fármacos que possuem baixa absorção e solubilidade no corpo humano, assim é interessante ter as informações sobre a granulometria das microesferas produzidas (BONAMICI, 2009),

3.8.3. Determinação do Grau de Intumescimento

O intumescimento é a característica que diz respeito ao aumento do volume do polímero quando este está submerso em determinado solvente. “Os mecanismos de intumescimento de polímeros são dependentes da difusão do solvente penetrante e da estabilidade polimérica” (ZANCHETTA, 2009)

Tanto em instituições de ensino como nas indústrias o grau de intumescimento é amplamente estudado, pois é uma característica importante para determinar o melhor polímero para revestir medicamentos e amplias aplicar também em células combustíveis. Há assim um campo amplo de estudo e aplicação para essa área (ZANCHETTA, 2009).

A técnica escolhida para utilização foi adaptada de Lacerda et al. (2007), Pasparakis e Bouropoulos (2006), Tanuma et al. (2009) e Fernandes (2009) de modo que o grau de intumescimento em porcentagem é calculado segundo a Equação (9):

$$\%GI = \left| \frac{m_1 - m_2}{m_1} \right| \cdot 100 \quad (9)$$

3.8.4 - Teste de Degradação das Microesfera: Simulação do ambiente estomacal

Esta metodologia de caracterização tem o intuito de simular o ambiente estomacal, sendo assim necessário o uso de uma solução tampão (Clark-Lubs) de pH 1,2 pela mistura de 50 mL de KCl 0,2 mol/L e de 64,5 mL de HCl 0,2 mol/L. Técnica adaptada de Josué et al. (2000).

3.9. Liberação de fármaco

Existem muitas desvantagens associadas ao uso de determinadas drogas. Estas são distribuídas no corpo segundo suas propriedades físicas, como solubilidade, coeficiente de partição e carga. Logo, os medicamentos podem atingir uma grande variedade de locais nos quais podem estar fora de sua faixa terapêutica, que são inativos, ou cuja ação é indesejada ou prejudicial e, assim, com efeitos colaterais negativos (SAÉZ; HERNÁEZ; LÓPEZ, 2004).

Atualmente, existem dois métodos para melhorar a ação de drogas:

I - Liberação controlada: esta tenta eliminar ou reduzir os efeitos colaterais, produzindo uma concentração terapêutica da droga que é estável no corpo. Com objetivo de alcançar uma cinética de liberação de ordem zero e geralmente não há mudanças na concentração do fármaco presente no corpo (quando comparadas com mudanças intermitentes na concentração em dosagens convencionais) (SAÉZ; HERNÁEZ; LÓPEZ, 2004).

II - Liberação dirigida a lugares específicos: esta tenta garantir que a droga seja liberada no local desejado e, ao passo que, mantém a droga inativa em qualquer outro lugar do corpo (SAÉZ; HERNÁEZ; LÓPEZ, 2004).

4. METODOLOGIA

4.1. Materiais

O trabalho em questão necessitou dos reagentes que se encontram listados na Tabela 2 para sua realização:

Tabela 2 - Reagentes utilizados para realização do presente trabalho

Reagentes	Fabricante
Acetato de Sódio (P.A., 99%)	Impex
Ácido Acético (P.A., 99,7%)	Impex
Ácido Clorídrico (P.A., 37%)	Proquímicos
Álcool Etílico (P.A., 99,5%)	Dinâmica Química Contemporânea LTDA
Cloreto de potássio (P. A., 99%-100%)	Dinâmica
Cloreto de Sódio (P.A., 99%)	Sciavico
Fosfato de Sódio Dibásico Anidro (P.A., 99%)	Aphatec Química Fina
Fosfato de Sódio Monobásico Anidro (P.A., 99%)	Impex
Hidróxido de Sódio (P.A., 99%)	Aphatec Química Fina

Fonte: Autoria própria, 2019.

Foi necessária também a utilização dos equipamentos expostos na Tabela 3:

Tabela 3 - Equipamentos utilizados para realização do presente trabalho

Equipamento	Fabricante
Agitador Magnético	Quimis Modelo 0261M23
Agitador Mecânico	Edutec Modelo EEQ-9034
Balança Analítica	Shimadzu Modelo AUY220
Balão fundo redondo com 1 junta	Qualividros
Banho Maria	Nova Instruments
Condensador 300 mm	Diogolab
Condutivímetro	MS TecnoPON® Instrumentação Modelo mCA 150
Estufa	Lucadema
pHmetro	pHmeter Modelo JK-PHM-005
Série de Peneiras	TPL – Tamis Produtos Laboratoriais Ltda e A Bronzinox Telas Metálicas e Sintéticas Ltda
Viscosímetro Ubbelohde 1C	Qualividros

Fonte: Autoria própria, 2019.

O presente trabalho foi executado nos laboratórios de Química Geral e Química Aplicada à Engenharia, ambos da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) – Campus Caraúbas.

4.2. Detenção de quitosana a partir de casca de camarão

Os procedimentos listados no processo de obtenção da quitosana a partir da carapaça de camarões foram técnicas adaptadas do trabalho realizado por Antonino (2007).

4.2.1. Lavagem

As cascas de camarão foram separadas e lavadas manualmente para retirada de resíduos, como: restos vegetais, de carne e ovas. Em seguida a amostra foi seca durante 3 horas ao ar livre, exposto ao sol e logo depois passou 24 horas na estufa a 40 °C.

Após a secagem do material por completo, o mesmo passou por trituração, a princípio em um liquidificador e depois pelo processo de trituração com almofariz e pistilo a fim de diminuir ao máximo o tamanho das partículas.

4.2.2. Desmineralização

Pesou-se 2g do pó da casca de camarão e adicionou-se 40 mL de solução de HCl 0,25 mol/L, após isso deixou-se sob agitação constante por 2 horas. Filtrou-se o pó e foi lavado até que chegasse em um pH por volta de 7,0, em seguida colocou-se o material em placas de Petri que foram levadas a estufa por 12 horas a 40 °C.

É importante ressaltar que o processo de desmineralização tem como finalidade retirar o carbonato de cálcio (CaCO_3) presente no exoesqueleto do camarão.

4.2.3. Desproteínização

Após o material seco, o mesmo foi tratado com uma solução de NaOH a 10%, sob temperatura de 50 °C e agitação constante por 3 horas. Em seguida o material foi filtrado e lavado com água destilada até chegar em um pH em torno de 7,0. Por fim, o material ficou na estufa por 24 horas a 40 °C até secagem.

Essa etapa tem por objetivo retirar as proteínas presentes no exoesqueleto do camarão.

4.2.4. Despigmentação

Com o material totalmente seco, ele foi tratado com uma solução 1% de NaClO (Hipoclorito de sódio) durante 8 horas sob agitação constante, logo após foi filtrado e lavado com água destilada até chegar no pH neutro, por último o material foi para estufa por 24 horas a 40 °C até secagem.

A despigmentação tem por finalidade oxidar pigmentos e compostos orgânicos que podem resultar em mal cheiro.

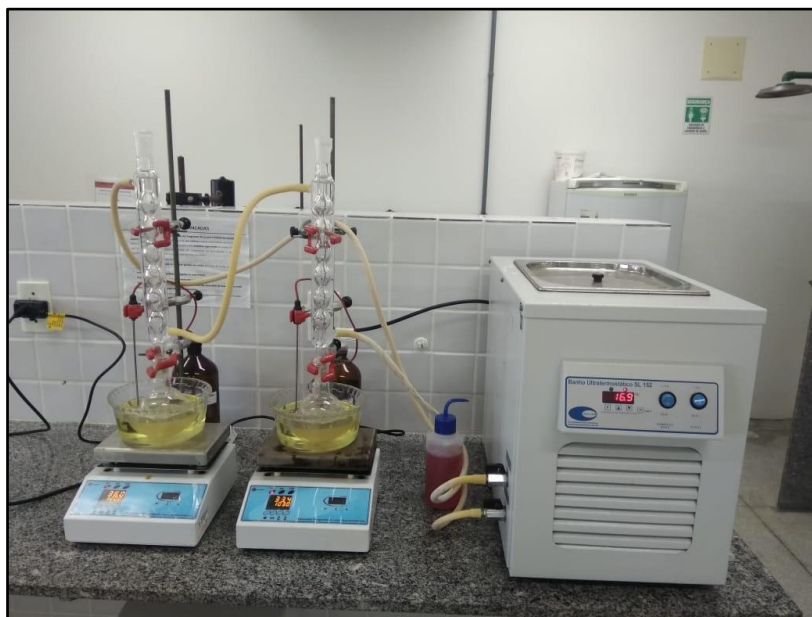
4.2.5. Desacetilação

Em posse do material seco por completo, 2 g de quitina que passaram por todos os procedimentos anteriores foram convertidas em quitosana pelo processo da desacetilação.

Para 2 g de quitina obtida, adicionou-se 100 mL de solução de NaOH 50% e colocou-se em um balão sob sistema de refluxo e aquecimento constante a 100 °C durante 5 horas. Após a reação está completa, filtrou-se a quitosana obtida e lavou-se até pH = 7,0. A quitosana obtida foi lavada com etanol para acelerar o processo de secagem. A secagem foi feita a temperatura ambiente por 24 horas.

O sistema de refluxo para o processo de desacetilação pode ser visto na Figura 6.

Figura 6: Sistema de refluxo para desacetilação da quitina.



Fonte: Autoria própria, 2019.

4.3. Purificação da quitosana

Uma massa de 6,92 g de quitosana foi dissolvida em 346 mL de uma solução de ácido acético (CH_3COOH) a 0,5 mol/L sob agitação constante por 24 horas, logo em seguida foi feita uma filtragem e descarte de compostos insolúveis. No produto dissolvido foi adicionado uma solução 50 g/L de hidróxido de sódio (NaOH) até precipitação (Figura 7) completa da quitosana purificada. Em seguida o produto foi filtrado e lavado com água destilada até que o pH da água de lavagem ficasse em torno de 7 para que nenhum resquício de hidróxido de sódio restasse na amostra. Por último, a mesma foi lavada com etanol, e colocada para secar em placas de Petri a temperatura ambiente por 48 horas, como pode ser observado na Figura 8.

Figura 7: Solução de quitosana precipitada



Fonte: Autoria própria, 2019

Figura 8: Quitosana purificado secando.



Fonte: autoria própria, 2019

4.4. Caracterização da Quitosana

4.4.1. Determinação do Grau de Desacetilação

A técnica escolhida para determinação do grau de desacetilação da quitosana foi a titulação condutimétrica adaptada por Fernandes (2004).

Inicialmente pesou-se uma massa de 0,2005 g de quitosana previamente purificada, onde essa massa foi dissolvida em 40 mL de uma solução aquosa de ácido clorídrico (HCl) a 0,05 mol/L sob agitação constante por 18 horas. Após isso adicionou-se 100 mL de água a amostra e a mesma foi titulada com uma solução padronizada de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1463 mol/L. As variações de medidas da condutividade, temperatura e de pH da mesma foram observadas utilizando um condutivímetro e um pHmetro, como pode ser visto na representação do sistema exposta na Figura 9.

Figura 9: Sistema montado para titulação condutimétrica.



Fonte: Autoria própria, 2019

O procedimento foi feito em duplicata e a partir dos dados obtidos foi possível plotar o gráfico que inter-relaciona a condutividade com a variação do volume de hidróxido de sódio utilizado na titulação. Em posse dos dados fornecidos pelo gráfico determinou-se o grau de desacetilação.

4.4.2. Determinação da Massa Molar Média

A análise de viscosimetria capilar foi adaptada de Signini e Campana (1998) e escolhida para determinar a massa molar média da amostra.

Pesou-se 0,2037 g da quitosana purificada anteriormente. Ela foi diluída sob agitação constante durante 15 horas em 100 mL de uma solução tampão de ácido acético (CH_3COOH) e acetato de sódio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) com pH aproximadamente 4,5. Em seguida a solução foi aquecida em banho-maria por 2 minutos a uma temperatura de 80 °C. Então deixou-se esfriar até que atingisse a temperatura ambiente, assim foi adicionado mais 100 mL da solução tampão, aqueceu-se novamente em banho-maria por 2 minutos a 80 °C e deixou-se esfriar a temperatura ambiente.

Primeiramente, para se medir a viscosidade foi feita a viscosidade da solução tampão utilizando um viscosímetro Ubbelohde 1C, a uma temperatura de $25\text{ °C} \pm 0,1\text{ °C}$. A medida foi feita pela medida do tempo de escoamento do tampão viscosímetro numa média de 6 vezes. Da mesma forma foi feito com as amostras de quitosana, onde essa foi

diluída 5 vezes com o tampão de ácido acético/acetato de sódio, adicionando-o a cada 1 mL. Para cada 1 mL adicionado a viscosidade foi medida também numa média de 6 vezes. O sistema montado pode ser observado na Figura (10).

Figura 10: Sistema montado para obtenção da massa molar média.



Fonte: Autoria própria, 2019.

A partir desses dados utilizou-se um software gráfico para análise de dados e estatística, assim foi possível obter a viscosidade intrínseca e posteriormente a massa molar média. Para determinar a viscosidade intrínseca, como já foi dito, utilizou-se a Equação (6), conhecida como equação de Huggins. Dessa forma, conhecendo a viscosidade intrínseca determinou-se a massa molar média da quitosana purificada a partir da equação de Mark-Houwink, como mostrado na Equação (7).

4.4.3. Determinação do Teor de Sólidos

O teor de sólidos foi determinado pela secagem de uma amostra de quitosana purificada a fim de obter-se o valor real de sua massa. Essa técnica foi adaptada de Branco (2014).

A massa real foi obtida após uma amostra de 0,3007 g de quitosana ficar em uma estufa sem circulação de ar a uma temperatura de aproximadamente 105°C até que a massa pesada apresentasse valor constante. Com esse dado obtido pela pesagem o teor de sólidos foi calculado através da Equação (8).

4.5. Produção de microesferas de quitosana

Para produção das microesferas, escolheu-se aplicar uma metodologia adaptada de um roteiro de aula prática de Laboratório de Engenharia Química III da UFERSA Campus Mossoró, onde foi produzido uma solução de quitosana (purificada) 4%. Para isso a quitosana foi solubilizada em uma solução de ácido acético 4%, em seguida a solução foi gotejada em uma solução de hidróxido de sódio 10%, utilizando-se um funil de separação (Figura 11), formando as esferas. Após 40 minutos as esferas foram lavadas com o intuito de atingir pH neutro. Por fim, foram secas a temperatura ambiente, como mostra a Figura 12.

Figura 11: Aparato usado para gotejar a solução de quitosana 4%.



Fonte: Autoria própria, 2019.

Figura 12: Microesferas de quitosana.



Fonte: Autoria própria, 2019.

4.6 Caracterização das microesferas de quitosana

4.6.1. Determinação do Teor de Sólidos

O teor de sólidos foi determinado secando uma amostra das esferas de quitosana purificado a fim de se obter o valor real de sua massa. Essa técnica foi adaptada de Branco (2014).

Assim como na determinação do teor de sólidos da quitosana para que a massa real fosse pesada, uma amostra de massa 0,3003 g de microesferas de quitosana foi aquecida em uma estufa sem circulação de ar a uma temperatura de aproximadamente 105°C até que a massa pesada tornasse constante. Com os dados obtidos a partir das pesagens foi possível obter o teor de sólidos utilizando a Equação (8).

4.6.2. Determinação do Grau de Intumescimento

Para a determinação do grau de intumescimento das microesferas de quitosana pesou-se duas amostras de aproximadamente 0,3 g, logo após elas foram imersas em água destilada e tiveram suas massas pesadas após 1 hora, 2 horas e 4 horas. A análise foi feita em duplicata. Após serem coletadas todas as massas foi possível calcular o grau de intumescimento segundo a Equação (9).

4.6.3. Teste de Degradação das Microesfera com simulação do ambiente estomacal

A solução tampão (Clark-Lubs) de pH 1,2 foi preparado pela mistura de 155,04 mL de uma solução de KCl 0,2 mol/L e de 200 mL de uma solução de HCl 0,2 mol/L. Em seguida elas foram colocadas em duas placas de Petri. A simulação do ambiente estomacal foi adaptada da técnica de Josué et al. (2000). O processo foi feito em duplicata.

4.6.4. Determinação da Granulometria

A amostra de 1,9744 g de microesferas de quitosana passaram por uma determinada série de peneiras (Figura 14) TPL - Tamis Produtos Laboratoriais Ltda e A Bronzinox Telas Metálicas e Sintéticas Ltda, dessa forma em cada peneira ficava retida uma parte da amostra. A metodologia aplicada foi adaptada do método de peneiramento a seco de Sampaio e Silva (2007). O processo foi feito manualmente devido ser uma pequena massa de amostra. Após o peneiramento cada fração que ficou retida nas peneiras de abertura de 2,0 mm, 1,7 mm, 1,4 mm e 1,0 mm foi pesada para que fosse possível descobrir a porcentagem que cada fração representava do todo.

Figura 13 - Peneiras usadas para determinar granulometria das esferas.



Fonte: Autoria própria, 2019

5. RESULTADOS

Todos os trabalhos citados nos resultados, a cargo de comparação com os resultados do presente trabalho, foram obtidos a partir de quitosana comercial, o que não é o caso dessa pesquisa, onde os valores são advindos de quitosana natural, esta, sintetizada da quitina extraída a partir da carapaça de camarões.

5.1. Caracterização da quitosana

5.1.1. Teor de Sólidos

Com a determinação das massas requeridas, inicial (M_0) e final (M_s), foi possível determinar o valor real do teor de sólidos da quitosana, segundo a equação (8).

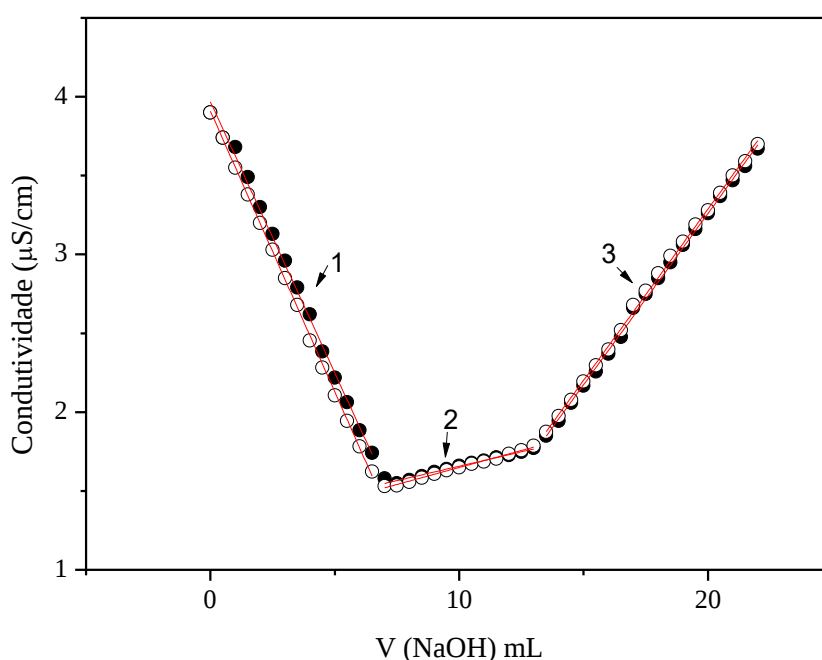
$$T_s = \frac{m_s}{m_0} \cdot 100$$

O valor do teor de sólidos obtido foi 90,65 %, o que condiz com os valores observados na literatura, pois Caroni (2009) e Tavares (2011) chegaram aos seguintes valores: 89% e 86,31%, respectivamente.

5.1.2. Determinação do Grau de Desacetilação

De acordo com o procedimento descrito na metodologia, foi possível plotar um gráfico que relaciona condutividade com o volume da base que foi utilizada na titulação, como visto na Figura 14.

Figura 14: Condutividade da solução de quitosana em meio ácido em função da solução de NaOH. ●: condutividade da solução de quitosana. ○: réplica da condutividade da solução de quitosana.



Fonte: autoria própria, 2019

Como pode ser visto na Figura 14, observamos o gráfico repartido em 3 regiões específicas:

1. O primeiro ramo linear representa a neutralização do ácido presente (H^+). Observa-se nessa região uma redução da condutividade ao passo que o volume de NaOH aumenta, uma vez que a condutividade está diretamente ligada a mobilidade iônica em solução, e o íon OH^- é maior que o íon H^+ , comprovando assim a diminuição da condutividade da solução;
2. O segundo ramo é referente à neutralização dos grupos amino ($-\text{NH}_3^+$) da quitosana, como o íon Na^+ é menor se comparado aos grupos amino, gera um aumento da condutividade da solução;
3. O terceiro conjunto de pontos corresponde ao excesso de base (íons Na^+ e OH^-), como os íons OH^- são menores do que os grupos amino ($-\text{NH}_3^+$), isso implica em uma maior mobilidade, demonstrando um aumento mais acentuado da condutividade da solução.

A partir da extrapolação das retas feitas por um software computacional, com os dados obtidos é possível determinado o grau de desacetilação (X_D) de acordo com Equação (1).

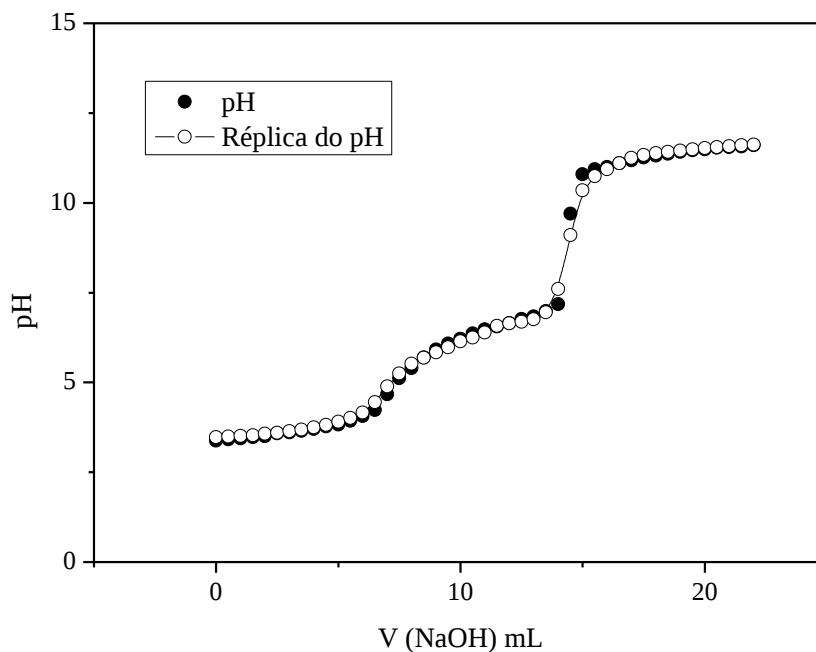
$$X_D = 100 \cdot M_A \cdot \frac{\Delta V \cdot C_{NaOH}}{\Delta V \cdot C_{NaOH} \cdot \Delta M + m_c}$$

O grau de desacetilação é parâmetro capaz de influenciar as características físicas, químicas e biológicas do polímero, ele exerce influência sobre determinadas propriedades, como, hidrofobia, capacidade de reticulação na presença de dados agentes de solubilidade e viscosidade de suas soluções (SILVEIRA, 2013).

Para Fernandes (2009), para que um polímero possa ser considerado quitosana o seu grau de desacetilação tem que apresentar valores superiores a 50%. Já para Canella e Garcia (2001), pode-se considerar quitosana um polímero que tem grau de desacetilação entre 70% e 95%. O resultado obtido no presente trabalho foi 76,21%, o que consequentemente nos diz que o percentual de quitina da amostra é 23,79%.

Pode-se observar melhor na Figura 15 a neutralização expressa pelos ramos 1, 2 e 3 da Figura 14. Nota-se que quando o volume fica em torno de 14 mL há uma neutralização total dos grupos H^+ e grupos amino, já que o valor do pH está em torno de 7,4. A partir do momento que o volume de NaOH vai pra 15 mL, o pH fica em torno de 10,75, o que caracteriza o excesso de NaOH. De acordo com que a solução de hidróxido de sódio vai aumentando aumenta-se também o pH. O pH tem o aumento considerável até chegar num valor próximo a 11,6, demonstrando que o sistema apresenta excesso de base, o que aumenta a condutividade da solução de quitosana.

Figura 15 - pH em função da concentração de NaOH da solução ácida de quitosana.



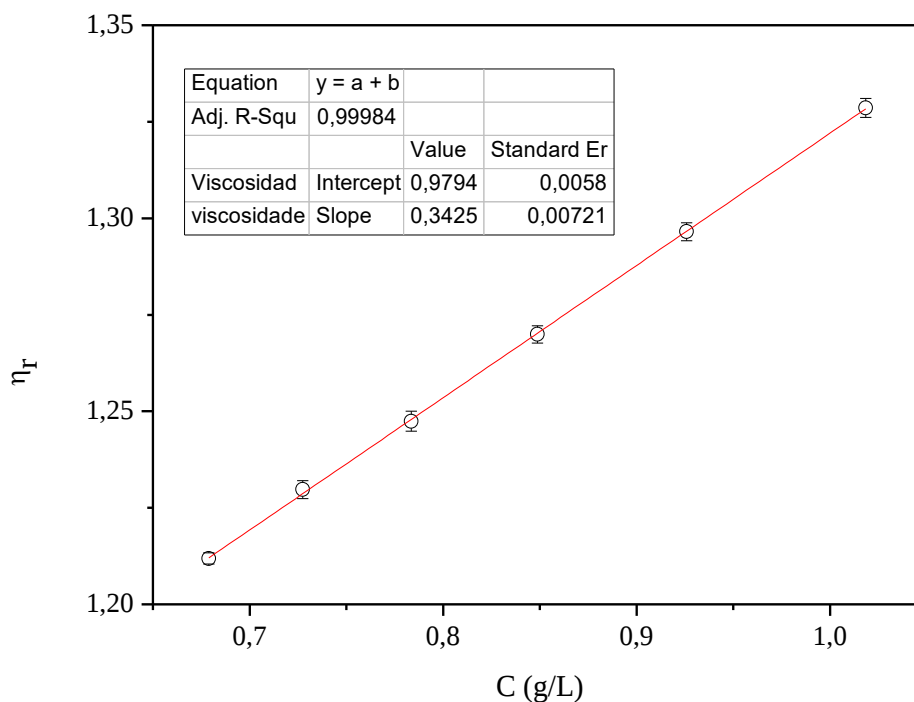
Fonte: Autoria própria, 2019

5.1.3 Determinação da Massa Molar Média

A Figura 16 mostra a relação entre a viscosidade relativa (η_r) e a concentração de quitosana. Como pode ser observado a viscosidade aumenta com o aumento da concentração de quitosana.

A viscosidade de um composto está relacionada com as interações das moléculas, nesse caso, macromoléculas poliméricas e com a resistência ao escoamento. Logo, quanto maior a massa molar de composto e as forças intermoleculares, maior será a viscosidade (BROWN, 2005).

Figura 16: viscosidade relativa em função da concentração de quitosana.



Da mesma forma como foi descrito na metodologia, tendo posse dos dados da análise foram obtidas todas as viscosidades que são necessárias para determinar a viscosidade inerente e em seguida a massa molar média.

As viscosidades foram obtidas de acordo com as Equações (2), (3), (4) e (5), podendo ser observadas na Tabela 4:

Tabela 4 - Viscosidades determinadas a partir da viscosimetria capilar. Viscosidade relativa (η_r), viscosidade específica (η_{sp}), viscosidade reduzida (η_{red}) e viscosidade inerente (η_{iner}).

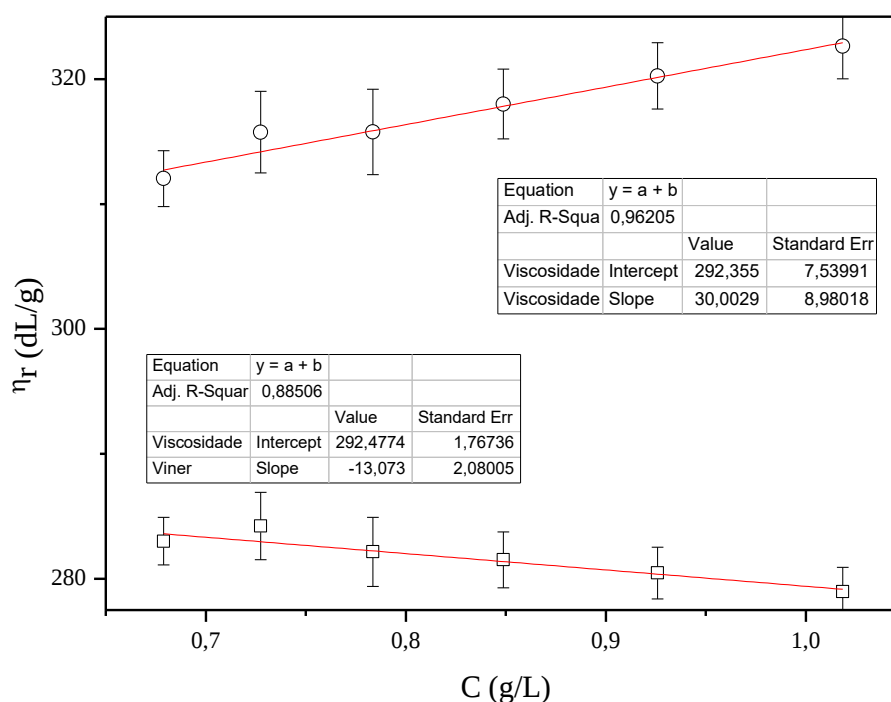
Concentração	η_r	η_{sp}	η_{red} (dL/g)	η_{iner} (dL/g)
1,0185	1,32859	0,32859	322,62428	278,95961
0,9259	1,29653	0,29653	320,25652	280,4709
0,8488	1,26992	0,26992	318,00659	281,52339
0,7835	1,24741	0,24741	315,77729	282,15777
0,7275	1,22971	0,22971	315,75719	284,23519

Fonte: Autoria própria, 2019.

Com os valores da viscosidade relativa, foi possível calcular a viscosidade específica (η_{sp}), viscosidade reduzida (η_{red}), e a inerente (η_{iner}).

A Figura 17 mostra a relação entre a viscosidade reduzida (η_{red}) e a inerente (η_{iner}) em função da concentração de quitosana.

Figura 17: viscosidade reduzida/inerente em função da concentração de quitosana. $\circ$ é a viscosidade reduzida. $\square$ viscosidade inerente.



Fonte: Autoria própria, 2019.

A extrapolação das retas da η_{red} e η_{iner} , através de software computacional, e aplicando-os na equação de Huggins, se pode calcular a viscosidade intrínseca, $[\eta]$. Como é visto na Equação (6).

$$\eta_{red} = [\eta] + k[\eta]^2 C$$

onde, $[\eta]$ é o coeficiente linear, $[\eta]^2$ o coeficiente angular e k é a constante de Huggins. O coeficiente linear, ou, viscosidade intrínseca obtido foi $[\eta] = 292,4162 \pm 0,0612 \text{ dL} \cdot \text{g}^{-1}$. A viscosidade intrínseca é a viscosidade teoricamente que se aproxima a de uma única molécula polimétrica.

Após a determinação da viscosidade intrínseca da solução foi possível obter a massa molecular viscosimétrica média por meio da equação Mark-Houwink.

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

onde k , é uma constante característica do polímero, e também depende da temperatura e do solvente, o α é a constante característica da geometria da molécula do polímero e o M_v a massa molar média do polímero. Por meio desta equação foi obtida a massa molar média igual a $M_v = 5,2162 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$.

Comparando o resultado encontrado com o de Penha (2017) que foi $8,4 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$, nota-se resultados são bastante satisfatórios, pois se aproximam dos de um trabalho realizado com quitosana comercial.

Observa-se que o valor de M_v da quitosana foi bastante alta, com valores em torno de 10^4 o que caracteriza um polímero. Para que uma substância seja caracterizada como um polímero é necessário que a massa desta substância seja de no mínimo 10^3 g.mol^{-1} (PENHA, 2017).

5.2 Caracterização das microesferas de quitosana

5.2.1 - Determinação do Teor de Sólidos

Do mesmo modo como foi feito no teor de sólidos da quitosana, o teor das microesferas procedeu encontrando-se as massas inicial (M_o) e final (M_s), obtendo assim o teor de sólidos pela equação (8).

$$T_s = \frac{m_s}{m_o} \cdot 100$$

O valor médio obtido se aproximou bastante do valor determinado para a quitosana (90,71%). Este comportamento se deu em função das microesferas terem sido produzidas a partir da quitosana purificada.

5.2.2 - Determinação do Grau de Intumescimento

Como descrito na metodologia, o intumescimento foi feito com as esferas submersas em água destilada, como mostra a Tabela 5.

Tabela 5 - Massas das microesferas de quitosana secas e após o intumescimento.

Amostras (g)	Início	Após 1h	Após 2h	Após 4h
I	0,3008	1,2160	1,1523	1,0824
II	0,3000	1,2407	1,1543	1,1210

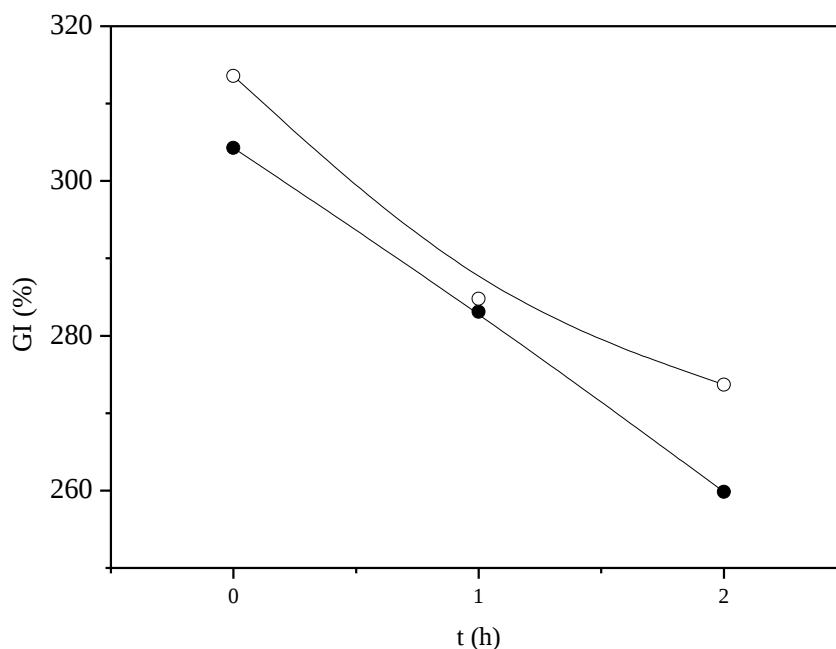
Fonte: Autoria própria, 2019.

De acordo com os dados da Tabela 5, foi possível obter-se o grau de intumescimento (% GI) das microesferas de quitosana, com 1h, 2h e 4h de imersão em água destilada, como mostra a Equação (9).

$$\%GI = \left| \frac{(m_1 - m_2)}{m_1} \right| \cdot 100$$

Os valores obtidos estão expressos graficamente na Figura 18, que relaciona o percentual de grau de intumescimento em função do tempo.

Figura 18: Grau de intumescimento em função do tempo para as esferas de quitosana obtida. ●: grau de intumescimento. ○: réplica do grau de intumescimento.



Podemos observar na Figura 18 e na Tabela 6 que há um crescimento significativo na primeira hora, em seguida existe uma tendência a redução do intumescimento das mesmas, que, de acordo com Fernandes (2009) isso é um indício de que as microesferas chegaram ao equilíbrio do processo de adsorção de água para esse tempo.

Tabela 6 - Grau de intumescimento das microesferas de quitosana com 1h, 2h e 4h de imersão.

Amostras	Após 1h (%)	Após 2h (%)	Após 4h (%)
I	304,26	283,08	259,84
II	313,57	284,77	273,67
Média	$308,915 \pm 4,655$	$283,925 \pm 0,845$	$266,755 \pm 6,915$

Fonte: Autoria própria, 2019.

De acordo com a literatura, podemos analisar o valor obtido como sendo satisfatório.

Fernandes (2009) obteve em sua pesquisa um grau de intumescimento na primeira hora para suas membranas de quitosana pura uma média de 648,08%, enquanto que na primeira hora as microesferas de quitosana obtida nesse trabalho tiveram grau de

intumescimento $308,915 \pm 4,655$ %. É válido ressaltar o fato de a quitosana estar em dois estados diferentes, membrana e microesfera, mas continua tendo o mesmo arranjo molecular e por isso a microesfera acaba sendo mais resistente do que a membrana, pois absorve menos água, dessa forma pode-se afirmar que possui uma maior estabilidade molecular.

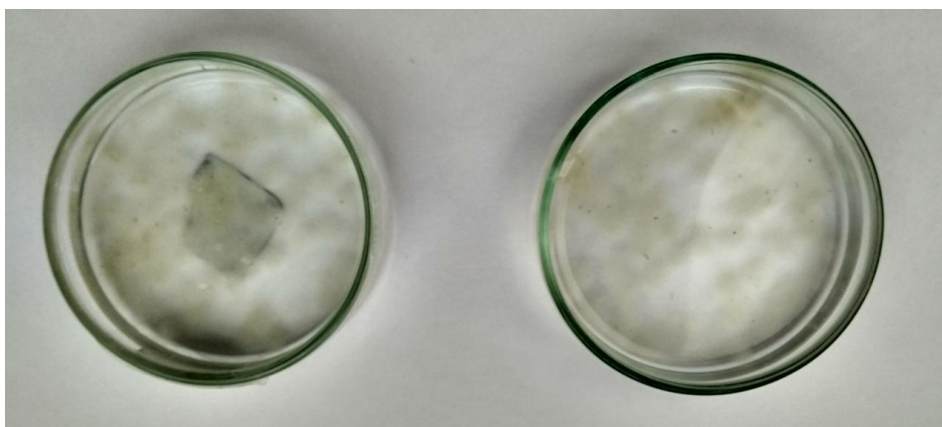
Já Penha (2017), em seu trabalho de obtenção de microesfera de quitosana comercial, na primeira hora obteve 111,23 %. Comparado os valores obtidos nesse trabalho com os valores obtidos do trabalho de Penha (2017), a diferença de é de 197,685 %, valor alto em relação a microesfera obtida da quitosana comercial, mas inferior ao obtido com as membranas também de quitosana comercial.

A elevada taxa de absorção de água pode trazer consequências indesejáveis, por exemplo a redução da estabilidade estrutural do polímero, ou seja, pode causar o intumescimento da matriz com consequente degradação das fibras e destacamento do filme, como também o aceleração da degradação por ataque de microorganismos (FERNANDES, 2009)

5.2.3 - Teste de Degradação das Microesfera

De acordo com Fernandes (2009) a biodegradabilidade é uma das propriedades mais importantes da quitosana. Dessa forma esta característica foi testada nas microesferas, pela imersão das mesmas em uma solução Clarck- Lubs com pH 1,2, e o resultado pode ser observado na Figura 19. Após uma hora e meia as microesferas se apresentaram quase que completamente degradadas.

Figura 19 - esferas degradadas em solução de pH 1,2.



Fonte: Autoria própria, 2019.

Podemos observar na literatura que o polímero empregado para liberar o princípio ativo de forma controlada pode atuar retardando a dissolução do fármaco, dessa forma inibindo a difusão do fármaco para fora do sistema terapêutico, ou controlando o fluxo da solução de fármaco (FERNANDES, 2004).

Assim, a degradação ou alteração das propriedades de um polímero é resultante de reações químicas de diversos tipos, que podem ser intra ou intermoleculares. Pode ser um processo de despolimerização, de oxidação, de reticulação ou de cisão de ligações químicas. A degradação pode ser causada por eventos diferentes, dependendo do material, da forma de processamento e do seu uso.

5.2.4 - Determinação da Granulometria

A massa de quitosana destinada ao ensaio de granulometria foi de 1,97 g, consideravelmente pequena devido à dificuldade de se obter uma quantidade maior de amostra nas condições apresentados no local da pesquisa.

A partir do ensaio granulométrico foi possível determinar a porcentagem de cada tamanho na amostra, como pode ser observado na Tabela 7.

Tabela 7 - Dados referentes ao ensaio de granulometria com relação a porcentagem de massa retida em cada peneira.

Granulometria (mm)	Massa Retida (g)	Porcentagem (%)
2,0	0,0218	1,104
1,7	1,6874	85,464
1,4	0,2640	13,371
1,0	0,0012	0,061
TOTAL	1,9744	100

Fonte: Autoria própria, 2019.

Em posse dos resultados, pode-se perceber que a granulometria das microesferas varia entre 2 e 1 mm, e a maior quantidade (87,46%) de esferas tem tamanho próximo ao 1,7 mm, dessa forma, apresentando em sua maioria uma homogeneidade.

6. CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos foi possível adquirir uma série de informações acerca da quitosana obtida a partir da carapaça de camarão e das microesferas formuladas a partir dela.

- O grau de desacetilação, 76,21%, mostra que a conversão quitina/quitosana foi satisfatória;
- O teor de sólidos e massa molar viscosimétrica média estavam de acordo com os dados encontrados na literatura;
- Os resultados de teor de sólidos para as microesferas, foram bem próximos do teor de sólidos para a quitosana em pó e superior aos resultados da quitosana comercial;
- A baixa taxa de absorção de água (GI) em relação a membrana tomada por base na literatura, indica uma estabilidade estrutural maior na molécula polimérica;
- A degradação da microesfera ocorreu após uma hora de imersão na solução Clark-Lubs com pH 1,2, indica uma boa biodegradabilidade, uma das propriedades mais importantes da quitosana;
- A granulometria mostra que as esferas estão em sua maioria (87,46%) com tamanho próximo a 1,7 mm, mostrando sua homogeneidade.

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

AKCELRUD, L. **Fundamentos da Ciência dos Polímeros**. Barueri, SP: Manole. 291 f. 2007.

ANTONINO, N. D. A.. **Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundos da indústria pesqueira paraibana**. 89 f. 2007.

ASSIS, A. S.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M.. **Bioconversão de resíduos de camarão *litopenaeus vannamei* (Booner, 1931) para produção de biofilme de quitosana**. Revista Iberoamericana de Polímeros Volumen Iberoam. Polim, 9(95), 12 f. 2008.

AZEVEDO, V. V. C. et al. **Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais**. Revista Eletrônica de Materiais e Processos. Campina Grande, v. 2. 3, 27-34 f, nov./dez. 2007.

BENTO, D. M; BEMVENUTI, M. A. **Os peixes de água doce da pesca artesanal no sul da Lagoa dos Patos, RS. Caderno de Ecologia Aquática**. Universidade Federal do Pampa – Unipampa, Bagé, 2008.

BONAMICI, D. **Sistema de Classificação Biofarmacêutica e Bioisenções**. 171 f. Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo (USP). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo, 2009.

BRANCO, F. A. A. C. **Síntese, caracterização e revestimento da quitosana com Ni metálico**. 2014. 45 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso de Bacharel em Ciência e Tecnologia, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2014.

BROWN, Theodore *et al.* **Química a ciência central**. [S. l.]: PEARSON, 2005.

CANELLA, K. M. N. C.; GARCIA, R. B. **Caracterização de Quitosana por Cromatografia de Permeação em Gel –Influência do Método de Preparação e do Solvente**. Quim. Nova, Vol. 24, No. 1, 13-17, 2001.

CARONI, A. L. P. F. **Estudos de adsorção de tetraciclina em partículas de quitosana**. Tese (doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

CHANDY, T., SHARMA, C.P. **Chitosan matrix for oral sustained delivery of ampicillin**. *Biomaterials*. v. 14, n. 12, p. 939-944, 1993.

FERNANDES, A. L. P. **Obtenção e caracterização de nanopartículas de quitosana para fins farmacêuticos**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2004.

- FERNANDES, L. L. **Produção e caracterização de membranas de quitosana e quitosana com sulfato de condroitina para aplicações biomédicas.** Dissertação (Trabalho de Conclusão de Curso), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.
- HE, W.; BENSON, R.. **Polymeric Biomaterials. Applied Plastics Engineering Handbook: Processing, Materials, and Applications.** 2. d. Elsevier. 2016.
- JOSUÉ, A. et al. **Liberação controlada da eosina impregnada em microesferas de copolímero de quitosana e poli(ácido acrílico).** 116-121 f. Polímeros [online]. 2000.
- LACERDA, L. et al. **Caracterização e avaliação do grau de intumescimento de microesferas de malonil quitosana.** Anais da 6ª Semana de Ensino, Pesquisa e Extensão. Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.
- LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. E. C.. **Caracterização de Polímeros:** Determinação de peso molecular e análise térmica. 366 f. Proceedings of the International Computer Music Conference. 2001.
- 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.** 182 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.
- MOURA, C. et al. **Quitina e quitosana produzidas a partir de resíduos de camarão e siri:** avaliação do processo em escala piloto. 37–45 f. VETOR - Revista de Ciências Exatas e Engenharias. 2006.
- PASPARAKIS, G.; BOUROPOULOS, N. **Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate–chitosan beads.** Department of Materials Science, University of Patras. Greece, 2006.
- PENHA, V. C. S.. **Produção de microesferas de quitosana para fins farmacêuticos.** 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciência e Tecnologia) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Caraúbas - RN, 2017.
- PIRES, A. L. R. et al. **Biomateriais:** Tipos, Aplicações e Mercado. *Quim. Nova*, Vol. 38, Nº 7. p. 957 - 971, 2015
- SÁEZ, V.; HERNÁEZ E.; LÓPEZ L..**Liberación controlada de fármacos.** *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 5(2), 111–122 f. 2004.
- SALAZAR, M. J. C. **Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana-gelatina e quitosana-colágeno visando a liberação de fármacos.** 114 f. 2015.
- SAMPAIO, J.A.; SILVA, F.A.N.G. **Análise Granulométrica por Peneiramento.** In: Sampaio, J.A., França, S.C., Braga, P.F.A. (Eds.) *Tratamento de Minérios Práticas Laboratoriais*, Cap. 3, Rio de Janeiro, Brasil, Centro de Tecnologia Mineral, 2007.

SANTOS, C.. **prevenção a poluição industrial: identificação de oportunidades, análise dos benefícios e barreiras**. 304 f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo – São Carlos, 2005.

SANTOS, J. E. et al. **Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. Polímeros**. 242–249 f. 2003

SCHAFFAZICK, S. R. et al. **Caracterização e Estabilidade Físico-Química de Sistemas Poliméricos Nanoparticulados Para Administração de Fármacos**. *Quim. Nova*, Vol. 26, 5 d. 726 -737 f. 2003.

SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S.P. **Polímeros: Ciênc. Tecnol.** 4(4). 63 f. 1998.

SILVEIRA, M. M.. **Síntese e caracterização de membranas de quitosana para uso em osmose direta**. 49 f.. 2013

STEVANATO, F. B. **Aproveitamento de cabeça de tilápia de cativeiro na forma de farinha como alimento para Merenda Escolar**. Maringá, Dissertação (Pós-Graduação em Química). Departamento de Ciências do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá. 69 f. 2006.

TANUMA, H. et al. **Preparation and characterization of PEG-cross-linked chitosan hydrogel films with controllable swelling and enzymatic degradation behavior**. Department of Biomolecular Engineering, Tokyo Institute of Technology. Japan, 2009.

TAVARES, I. S.. **Obtenção e caracterização de nanopartículas de quitosana**. 56 f. 2011.

ZANCHETTA, D. F. **QBQ5825 - Prática de Ensino de Química e Bioquímica**. Relatório de sugestão para Disciplina QFL2453 – Físico Química Experimental. 7 f. 2009.