

EXTRAÇÃO, ESTRUTURAS E PROPRIEDADES DE α - E β -QUITINA

Sergio P. Campana-Filho*, Douglas de Britto, Elisabete Curti, Fernanda R. Abreu, Marcia B. Cardoso, Marcos V. Battisti, Priscilla C. Sim, Rejane C. Goy, Roberta Signini e Rodrigo L. Lavall

Departamento de Físico-Química, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 780, 13560-970 São Carlos – SP, Brasil

Recebido em 8/3/06; aceito em 14/6/06; publicado na web em 10/1/07

EXTRACTION, STRUCTURES AND PROPERTIES OF α - AND β -CHITIN. The fact that α - and β -chitin adopt different arrays in the solid state is explored to emphasize their different properties and distinct spectral characteristics and X ray diffraction patterns. The methods for their extraction from the biomass in view of the preservation of their native structures and aiming to fulfill the claims of purity and uniformity for potential applications are discussed. The different arrays adopted by α - and β -chitin also result in distinct reactivities toward the deacetylation reaction. Thus, the deacetylation of β -chitin is more efficient owing to the better accessibility to amide groups due to the lower crystallinity of this polymorph.

Keywords: polymorphs; chitin; chitosan.

INTRODUÇÃO

A quitina foi isolada por Braconnot em 1881, trinta anos antes do isolamento da celulose, mas a falta de conhecimento básico sobre suas propriedades, incluindo a reatividade química, limitou severamente suas aplicações industriais até o início dos anos 1970¹. A partir de então, o interesse progressivo na química de quitina resultou no desenvolvimento de muitos estudos que visaram aumentar o conhecimento sobre as relações estruturas/propriedades deste polímero e seus derivados. Atualmente, os usos industriais e em larga escala de quitina ainda são muito menos importantes que os de celulose, mas alguns importantes segmentos do mercado já são ocupados por derivados de quitina. A quitosana, por ex., é um polímero muito versátil com aplicações nas indústrias cosmética² e alimentícia³ e que a mais de 25 anos é empregado como agente de floculação no tratamento de efluentes aquosos⁴. Sua capacidade de interagir com variada gama de substâncias, tais como proteínas, lipídeos, pesticidas, corantes, íons metálicos e radioisótopos, qualifica a quitosana para aplicações voltadas tanto para detecção e análise dessas substâncias como para sua concentração ou recuperação^{1,5}. Além disso, a quitosana exibe atividade antimicrobiana e devido a sua atoxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade também tem grande potencial para aplicações na agricultura, em medicina, odontologia e formulações farmacêuticas^{1,5-10}. As possibilidades de aplicações são ainda enriquecidas pelo fato que a quitosana pode ser preparada em diferentes formas, tais como soluções de viscosidade controlada, géis, filmes e membranas, microesferas e nanopartículas.

Nos últimos 40 anos foram realizados muitos estudos que demonstraram haver uma estreita relação de dependência entre as características estruturais e morfológicas de quitina, quitosana e seus derivados, suas propriedades e aplicações potenciais. De fato, o interesse comercial nas aplicações de quitosana e derivados aumentou vertiginosamente nas últimas três décadas, o que pode ser constatado pelo depósito de patentes no Japão, Europa, China, Coreia e, principalmente, nos EUA. Assim, conforme o "United States Patent and Trademark Office", foram registradas 5946 pa-

tentes relacionadas à quitosana no período 1976-2006 apenas nos EUA¹¹. Entretanto, apesar da enorme potencialidade e do conhecimento acumulado sobre quitina e quitosana, algumas de suas mais importantes aplicações - principalmente na medicina, como biomateriais, na área farmacêutica, como vetores de medicamentos e vacinas e em dispositivos para liberação controlada de fármacos, mas também nas indústrias alimentícia e cosmética - não vêm sendo implementadas na extensão esperada.

Alguns países, como Noruega, Coreia, Itália e Japão, aprovaram o uso de quitosana em alimentos e, no caso deste último, tal prática está aprovada a pelo menos 15 anos⁵. Devido ao propalado efeito anticolesterolêmico da quitosana, sua aplicação em produtos dietéticos tem conhecido um aumento explosivo nos últimos anos em todo o mundo, porém a "U.S. Food and Drug Administration (FDA)" não reconhece a relação estrutura/funcionalidade divulgada pelos fabricantes de alguns produtos que contêm quitosana, como "Super Chitosan"¹². O uso de quitosana como excipiente em medicamentos também não dispõe de aprovação da FDA, visto que não consta da lista de ingredientes inativos desse órgão regulador, mas pelo menos três produtos que contêm quitosana foram aprovados como ingredientes de pesticidas no EUA e, muito provavelmente, outras solicitações de registro/aprovação estão sendo consideradas. Assim, fica claro que ainda são necessários investimentos em pesquisa e desenvolvimento de modo a superar as dificuldades encontradas para realizar o potencial de aplicações da quitosana. Parte dos obstáculos a serem vencidos diz respeito ao grau de pureza das preparações contendo quitina e quitosana, que nem sempre atendem aos padrões exigidos nas áreas ligadas à saúde pública e alimentos¹³, mas as dificuldades também estão associadas à falta de uniformidade desses polímeros, o que provoca variações em propriedades e funcionalidades e dificulta sua inserção nas linhas de produção¹⁴.

O fato que quitina pode ser extraída da biomassa, e mesmo a partir de matérias-primas abundantes e relativamente baratas - consideradas como refugos da atividade pesqueira voltada para exploração industrial de frutos do mar - tem sido destacado como um fator importante em favor de sua produção, visando a utilização em larga escala. Entretanto, deve ser reconhecido que, em se tratando de produto natural cuja biossíntese não está sob estrito controle genético, ocorrem variações de composição e, além disso, a

*e-mail: scampana@iqsc.usp.br

quitina raramente ocorre em forma pura. Assim, a completa eliminação das substâncias com as quais a quitina ocorre naturalmente associada não é uma tarefa simples e é por vezes muito difícil atingir um padrão de pureza condizente com determinadas aplicações. Por outro lado, embora a hidrólise alcalina dos grupos acetamido presentes em quitina, e que leva à obtenção de quitosana, seja uma reação relativamente simples esta não ocorre de maneira homogênea e completa ao longo de todas as cadeias, pois a quitina é um polímero semicristalino e a acessibilidade aos sítios reativos contidos nos domínios cristalinos é limitada. Além disso, é comum a ocorrência concomitante de despolimerização e de outras reações colaterais. Como consequência desses fatos a desacetilação de quitina, como é geralmente executada nos laboratórios de pesquisa e em escala industrial, leva à produção de copolímeros de composição e massa molar variáveis em função das condições e da extensão da reação. Dessa forma, a reprodutibilidade de características e de propriedades nem sempre se verifica, mesmo quando condições racionais semelhantes são empregadas na desacetilação de quitina visando a preparação de quitosana.

Neste artigo são abordados os aspectos fundamentais sobre a quitina, sua ocorrência, extração e caracterização. As estruturas das polimorfos α - e β -quitina e os métodos empregados para a preparação de quitosana, seu principal derivado, são discutidos. Assim, os processos de extração de α - e β -quitina da biomassa e sua adequação no que tange à natureza da matéria-prima, à preservação da estrutura nativa do polissacarídeo e ao grau de pureza da preparação são discutidos. A distinção entre α - e β -quitina em função de suas diferentes estruturas e as conseqüentes diferenças em termos de suas propriedades e reatividade são exploradas. A susceptibilidade de α - e β -quitina à reação de desacetilação, que resulta em quitosanas com características distintas quanto a grau médio de acetilação e massa molar média viscosimétrica, são discutidas para ressaltar a influência que as estruturas polimórficas de quitina têm sobre a reatividade do polissacarídeo. O emprego de condições que favorecem a desacetilação de quitina e minimizam a ocorrência de despolimerização são também discutidos.

QUITINA

Estruturas e propriedades

Quitina é um polímero linear no qual a unidade repetitiva é o dissacarídeo formado por 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose e 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose unidos por ligação glicosídica (Figura 1). Assim como na celulose as ligações são do tipo $\beta(1\rightarrow4)$, definindo-se assim os terminais redutor e não-redutor das cadeias poliméricas, os quais correspondem às extremidades que contêm grupo hidroxila livre ligado ao carbono 1 (terminal redutor) e carbono 4 (terminal não-redutor) do anel de glicopiranosose. Em quitina predominam as unidades repetitivas formadas exclusivamente por 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose, mas o processamento da biomassa para sua extração resulta em desacetilação parcial, mesmo quando são empregadas condições brandas nas etapas de desmineralização e desproteínização. A quitina contém uma quantidade pequena, usualmente 5-10%, de unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose. Por outro lado, alguns autores^{15,16} ressaltam que a quitina nativa, tal como ocorre associada a outros materiais para constituir, por ex., as carapaças de caranguejos e cascas de camarões, é um produto natural de composição variável quanto ao comprimento das cadeias, conteúdo de unidades de glicosamina acetiladas e desacetiladas e sua distribuição ao longo das cadeias. Adicionalmente, também podem ocorrer variações em função da espécie considerada, bem como de seu estágio de desenvolvi-

to. A única exceção conhecida é a quitina obtida a partir de algas diatomáceas (*Thalassiosira fluviatilis* e *Cyrtolletta cryptica*), cuja análise revela que se constitui exclusivamente de unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose⁵.

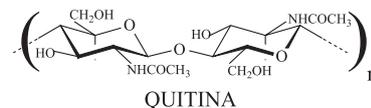


Figura 1. Estrutura primária de quitina, onde n é o grau de polimerização

A quitina é a segunda substância orgânica mais abundante na biosfera sendo superada apenas pela celulose, mas supera esta última em termos de taxa de reposição, que chega a ser duas vezes maior que a da celulose. Quitina e celulose possuem características estruturais semelhantes e atuam como invólucros protetores e materiais de suporte e defesa nos organismos em que ocorrem. A quitina encontra-se na matriz da estrutura esquelética de invertebrados, como artrópodes, anelídeos, moluscos e celenterados, em algas diatomáceas, e também está presente nas paredes celulares de alguns fungos, como ascomicetos, zigomicetes, basidiomicetos e deuteromicetos (Tabela 1).

Em função do organismo considerado, mas também do papel que desempenha, a quitina adota estruturas polimórficas denominadas α -, β - e γ -quitina. A α -quitina é encontrada em estruturas rígidas e resistentes, como a cutícula de artrópodes, e nesses casos ocorre fortemente associada a proteínas, materiais inorgânicos ou ambos. As formas β - e γ -quitina ocorrem em estruturas flexíveis embora também resistentes. Nas lulas do gênero *Loligo* a α -quitina constitui uma fina capa que reveste as paredes do esfago e do estômago, a β -quitina ocorre como o principal componente dos gládios, ou plumas, e a γ -quitina integra uma espessa cutícula que recobre outras zonas do estômago⁵. A α -quitina é a forma mais abundante e é também considerada a mais estável, visto que a conversão das duas últimas formas na primeira é irreversível¹.

As polimorfos de quitina correspondem a diferentes arranjos no estado sólido, decorrentes de disposições distintas das cadeias do polímero nas lamelas ou folhas que constituem os domínios cristalinos (Figura 2). A α -quitina corresponde a um empacotamento denso resultante da disposição antiparalela das cadeias poliméricas em diferentes lamelas ou folhas, o que favorece a existência de numerosas ligações hidrogênio inter- e intra-cadeias da mesma lamela e de lamelas vizinhas. No caso de β -quitina as cadeias pertencentes a diferentes lamelas dispõem-se paralelamente, o que dificulta o estabelecimento de ligações hidrogênio intermoleculares envolvendo cadeias de lamelas adjacentes e resulta em material menos densamente empacotado. Em γ -quitina parece ocorrer uma combinação dos dois arranjos anteriormente descritos, pois as cadeias de duas lamelas em disposição paralela são intercaladas por lamela em que as cadeias se dispõem antiparalelamente. Essa estrutura é a menos estudada e conhecida e sugere-se que possa ser uma distorção das duas estruturas anteriores¹.

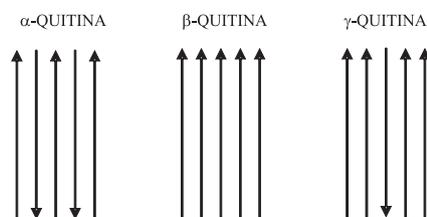


Figura 2. Representação esquemática das estruturas polimórficas de quitina, sendo que as setas representam as cadeias poliméricas no sentido do terminal não-redutor para o redutor

Tabela 1. Quantidade média de quitina em alguns organismos^{17,18}

Crustáceos	Quitina (% em massa)
<i>Cancer</i> (caranguejo)	72,1 ^(c)
<i>Carcinus</i> (caranguejo)	0,4-3,3 ^(a)
<i>Callinectes</i> (caranguejo azul)	14,0 ^(a)
<i>Chionectes</i> (caranguejo Matsuba)	25,9 ^(d)
<i>Erimacrus</i> (caranguejo)	18,4 ^(d)
<i>Paralithodes</i> (caranguejo rei)	10,6 ^(d)
<i>Pleuroncodes</i> (caranguejo vermelho)	35,0 ^(b) , 10,4 ^(a) , 1,3-1,8 ^(b)
Camarão do Alasca	28,0 ^(d)
<i>Crangon</i> (camarão)	5,8 ^(d) , 11,6 ^(d) , 69,1 ^(c)
<i>Macrobrachium rosenbergii</i> (camarão de água doce) ⁽³⁰⁾	25,3±0,2 ^(c) , 24,4±1,0 ^(d)
<i>Metapenaeus</i>	32,4 ^(d)
<i>Nephrops</i> (lagosta)	69,8 ^(c)
<i>Homarus</i> (lagosta)	60,8-77,0 ^(c)
<i>Peneus</i>	25,0 ^(d)
<i>Lepas</i>	58,3 ^(c)
“Krill” (zooplankton de mares frios) (concha desmineralizada)	40,2-42,0 ^(d)
Insetos	
<i>Blattella</i> (barata)	10 ^(b) , 18,4 ^(c) , 35 ^(c)
<i>Bombyx</i> (bicho-da-seda)	44,2 ^(c)
Coleoptera (besouro)	5,0-15,0 ^(b)
Diptera (mosca verdadeira)	54,8 ^(c)
<i>Galleria</i> (minhoca)	33,7 ^(c)
Gafanhoto	2,0-4,0 ^(a)
Besouro de Maio	16,0 ^(b)
<i>Periplaneta</i> (barata)	2,0 ^(c)
<i>Pieris</i> (borboleta)	64,0 ^(c)
Aranha	38,2 ^(d)
Moluscos	
Conchas de molusco	6,1
Conchas de ostras	3,6
Gládios de lulas	40,0
Fungos	
<i>Aspergillus niger</i>	42,0 ^(g)
<i>Lactarius vellereus</i> (cogumelo)	19,0
<i>Mucor rouxii</i>	44,5
<i>Penicillium chrysogenum</i>	20,1 ^(g)
<i>Penicillium notatum</i>	18,5 ^(g)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,9 ^(g)

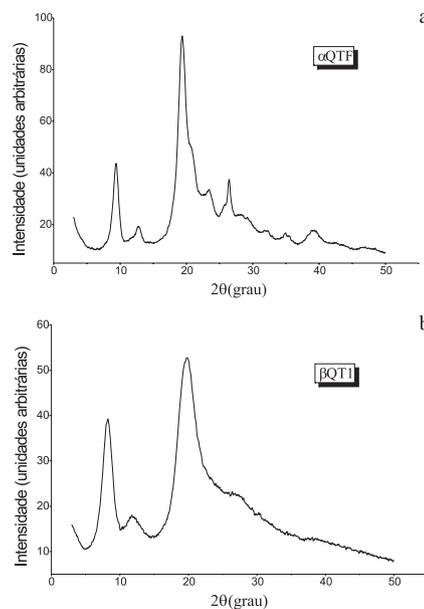
a) massa úmida do corpo; b) massa seca do corpo; c) fração orgânica da cutícula; d) massa total seca da cutícula; e) massa seca do abdômen; f) massa seca das cascas; g) massa seca da parede celular.

Os arranjos propostos para α -, β - e γ -quitina dão origem a diferentes padrões de difração de raios X e parâmetros característicos das respectivas celas unitárias (Tabela 2).

Tabela 2. Características das celas unitárias das estruturas polimórficas da quitina^{19,21}

Estrutura Polimórfica	a(Å)	b(Å)	c(Å)	Grupo Espacial	γ (grau)
α -quitina	4,74	18,86	10,32	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	90,0
β -quitina	4,85	9,26	10,38	P2 ₁	97,5
γ -quitina	4,70	28,4	10,30	P2 ₁	90,0

O espectro de α -quitina (amostra de origem comercial – Fluka/Biochimica) mostra vários picos cristalinos, sendo os mais intensos relativos aos planos cristalográficos (020) e (110,040) correspondentes a $2\theta=9,37$ e $2\theta=19,35$, respectivamente²²⁻²⁵ (Figura 3a). Por outro lado, o espectro de β -quitina extraída de gládios de lulas exhibe apenas dois picos cristalinos, referentes aos planos (010) e (020,110), os quais correspondem a $2\theta=8,21$ e $2\theta=19,76$, respectivamente²³⁻²⁵ (Figura 3b). A relativa escassez de reflexões e a presença de picos relativamente mais largos e menos intensos demonstram que a β -quitina extraída de gládios de lulas possui estrutura menos ordenada que a amostra de α -quitina comercial. Assim, a utilização do método proposto por Foch e colaboradores²⁶, após a normalização dos espectros à intensidade constante, permitiu calcular os índices de cristalinidade dessas amostras como sendo 85% (α -quitina) e 72,3% (β -quitina)²³⁻²⁵. Deve ser ainda salientado que a cristalinidade das amostras depende de vários fatores, tais como a natureza do organismo do qual a quitina foi extraída e as condições empregadas na extração do polímero. Dessa maneira, amostras de β -quitina obtidas de algas diatomáceas e tubos de verticilliferanas possuem um padrão de difração com picos bem definidos e cristalinidade elevada²⁷⁻²⁹. Por outro lado, amostras de α -quitina extraídas de cefalotórax de *Macrobrachium rosenbergii* (camarão de água doce conhecido como “gigante da Malásia”) exibiram cristalinidades variáveis, no intervalo 88-92%, em função do emprego de diferentes seqüências de tratamentos da matéria-prima²².

**Figura 3.** Difração de raios X de α -quitina comercial (3a) e β -quitina extraída de gládios de lulas (3b)

A espectroscopia no infravermelho também permite distinguir as estruturas polimórficas da quitina, porém as diferenças são sutis e a distinção não é tão simples, pois as mesmas bandas características ocorrem nos espectros de α - e β -quitina (Figura 4).

As bandas de deformação axial OH próximas de 3480 e 3440 cm^{-1} , referentes às ligações hidrogênio O-6-H \cdots O=C e O-3-H \cdots O-5^{30,31}, respectivamente, não são facilmente verificadas nos espectros devido à ocorrência de superposição. Entretanto, as bandas de deformação axial NH (próximas de 3264 e 3106 cm^{-1}), correspondentes às ligações hidrogênio intermoleculares C=O \cdots H-N^{30,31}, são bem evidenciadas no espectro da α -quitina (Figura 4a), mas são menos definidas e ligeiramente deslocadas no caso da β -quitina (Figura 4b)

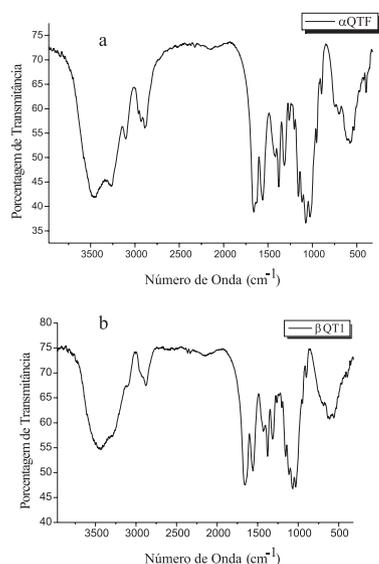


Figura 4. Espectros no infravermelho de α -quitina comercial (3a) e β -quitina extraída de gládios de lulas (3b)

As modificações quanto à forma e intensidade das bandas de deformações axial e angular do grupamento CH_2 estão relacionadas a mudanças de ambiente dos grupos CH_2OH e, portanto, ao estabelecimento de diferentes ligações hidrogênio. No espectro da β -quitina, um pequeno ombro é observado em 1417-1421 cm^{-1} e uma banda definida em 1428-1435 cm^{-1} . No caso da α -quitina o oposto é observado, pois uma banda definida é observada em 1416-1418 cm^{-1} e um pequeno ombro em 1429-1430 cm^{-1} . Entretanto, o forte acoplamento entre as bandas de deformação angular de CH_2 não permite a distinção quanto ao tipo de ligação hidrogênio envolvendo os grupos CH_2OH ³¹. Também, o alargamento e a superposição de bandas na região correspondente às vibrações de deformação axial de CH_2 ($\bar{\nu} \approx 2840 \text{cm}^{-1}$) não permite a clara distinção entre α - e β -quitina.

As diferenças nos espectros no infravermelho de α - e β -quitina não são grandes e a maneira mais fácil de distinguir as estruturas polimórficas é o exame da região onde ocorrem as bandas devidas às vibrações de deformação axial de $\text{C}=\text{O}$. De fato, o desdobramento da banda de amida I é observado no espectro da α -quitina mas isso não ocorre no caso da β -quitina (Figura 5). Assim, uma banda em 1652 cm^{-1} e um pequeno ombro em 1619 cm^{-1} são observados no espectro de α -quitina. A banda é atribuída apenas aos grupos $\text{C}=\text{O}$ envolvidos em ligações hidrogênio intermoleculares com grupos NH enquanto o ombro abrange também a contribuição das ligações hidrogênio intramoleculares $\text{C}=\text{O} \cdots \cdots \text{HOCH}_2$ ^{1,31,32}. Apenas uma banda é observada ($\bar{\nu} \approx 1660 \text{cm}^{-1}$) no espectro da β -

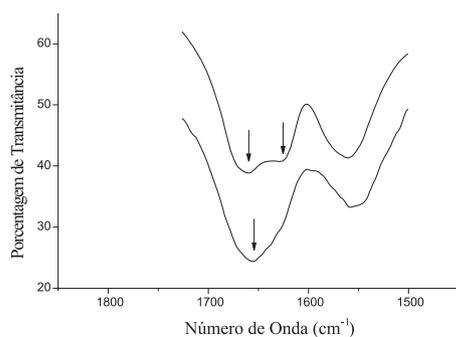


Figura 5. Região ampliada dos espectros de infravermelho α -quitina comercial e β -quitina extraída de gládios de lulas mostrando as bandas de amida I

quitina, indicando que todos os grupamentos amida estão envolvidos em ligações hidrogênio de mesma energia³².

Como conseqüência de seus diferentes arranjos no estado sólido, α - e β -quitina exibem propriedades diferentes. A α -quitina é um sólido denso, insolúvel em água, mas capaz de adsorver e reter umidade. A β -quitina tem aspecto fibroso e também não se solubiliza em água mas, como seu empacotamento é menos denso, adsorve mais umidade que a α -quitina. De fato, após armazenagem em condições de umidade controlada, foi determinado por termogravimetria que a α -quitina apresentava 5-6% de umidade enquanto que 8-12% da massa de β -quitina correspondia à água adsorvida na rede polimérica, o que foi atribuído à menor cristalinidade e morfologia mais favorável de β -quitina²³.

A solubilidade da quitina é restrita a uns poucos sistemas solventes e embora possa ser dissolvida em ácido fórmico anidro (β -quitina) e em soluções concentradas de ácidos fortes, como clorídrico, fosfórico e sulfúrico, a dissolução é muito lenta, tanto de α - como de β -quitina, e provoca severa despolimerização^{1,33,34}. Deve ser ainda ressaltado que no caso da dissolução em ácido sulfúrico além da degradação das cadeias também ocorre O-sulfatação e, portanto, é um derivado da quitina que se solubiliza nesse caso. Soluções concentradas a quente ($>95^\circ\text{C}$) de sais neutros - LiCNS , $\text{Ca}(\text{CNS})_2$, CaI_2 , CaBr_2 e CaCl_2 - também são utilizadas para dissolução da quitina, sendo que a forma β se dissolve mais rapidamente que a α -quitina⁵. Os sistemas binários de solvente, tais como N,N -dimetilformamida/tetraóxido de dinitrogênio e N,N -dimetilacetamida/cloreto de lítio, são os mais empregados para dissolução da quitina embora permitam apenas a formação de soluções relativamente pouco concentradas ($C_p < 2 \text{g/L}$), pois não alteram a estrutura química do polímero^{1,5,35,36}. O sistema solvente constituído pela mistura binária N,N -dimetilacetamida/cloreto de lítio ($\text{DMAc}/5\% \text{LiCl}$) é empregado para caracterização de ambas polimórficas em solução, mas a α -quitina é menos solúvel que a β -quitina e suas soluções contêm agregados³⁷. De fato, a β -quitina também é mais solúvel que α -quitina em ácidos clorados, como ácido di e tricloroacético^{23,36}.

Fontes e processos de obtenção

As principais matérias-primas para produção industrial de quitina são as carapaças de crustáceos originadas do processamento industrial de frutos do mar^{1,5,18}. De fato, a síntese química de quitina é uma tarefa demasiadamente difícil e custosa e sua produção pela via biotecnológica ainda não é economicamente atrativa. O Japão, os EUA e a China são os maiores produtores mundiais de quitina, mas o polímero também é produzido, ainda que em menor escala, na Índia, Noruega, Canadá, Itália, Polônia, Chile e Brasil, entre outros⁵. Em 1990 a produção mundial de quitina e quitosana foi estimada em 10.000 t e já se aproximava de 30 mil t em 2004, correspondente ao processamento de aproximadamente 1.440.000 t de rejeitos ricos em quitina gerados naquele ano, em nível mundial, pela indústria pesqueira⁵.

As cascas secas de crustáceos possuem 15-20% de quitina, 25-40% de proteína e 40-55% de carbonato de cálcio, além de pigmentos e lipídeos em pequena quantidade. A partir dessa matéria-prima, refugo abundante e relativamente barato da indústria de alimentos marinhos, é produzida a α -quitina. Os gládios de lulas, moluscos que também são processados industrialmente, contêm 35-40% de β -quitina, 60-65% de proteínas e uma quantidade mínima de sais inorgânicos, constituindo-se em uma fonte potencialmente importante para a produção industrial de quitina em futuro próximo³².

A extração de quitina a partir da biomassa, a exemplo do que acontece com a extração de celulose de fibras vegetais, envolve a

execução de tratamentos químicos seqüenciais destinados a eliminar as substâncias que a acompanham. Em função do valor de mercado, algumas dessas substâncias, como as proteínas e os pigmentos, principalmente a astaxantina, também podem ser comercialmente exploradas, dependendo do processamento adotado para sua dissociação da quitina. A matriz dos exoesqueletos é formada por epicutícula, que é a camada mais superficial e não contém α -quitina, e endocutícula, na qual três camadas se sobrepõem: pigmentada, calcificada e não-calcificada⁵. A α -quitina ocorre na endocutícula associada a pigmentos, carbonatos e proteínas e, assim, sua extração a partir de exoesqueletos de crustáceos envolve, geralmente, a seqüência desmineralização, desproteínização e despigmentação^{1,5}. Embora essa seqüência possa ser alterada – a execução da desproteínização como primeira etapa leva à obtenção de quitina calcárea, a qual tem suas próprias aplicações⁵ – esta parece ser a mais adequada à preservação da quitina, pois a associação proteínas/quitina preserva, em certa medida, a estrutura nativa do polissacarídeo do ataque ácido³⁸.

As soluções aquosas de diferentes ácidos, como HCl, HNO₃, H₂SO₄, HCOOH, H₃CCOOH, podem ser empregadas na desmineralização, etapa na qual são eliminados os sais minerais, principalmente carbonato e fosfato de cálcio. O tratamento pode ser executado em diferentes condições – a temperatura e o tempo do tratamento podem variar entre 0 e 100 °C e de 30 min até 48 h, respectivamente^{1,5,39} – mas as condições vigorosas devem ser evitadas, pois provocam severa despolimerização e a conseqüente degradação das propriedades ligadas ao caráter macromolecular da quitina. O tratamento com soluções de EDTA é muito mais brando, mas também muito menos eficiente que o tratamento com ácido diluído. O tratamento com soluções diluídas de HCl por tempos curtos e à temperatura ambiente assegura a completa remoção dos sais minerais sem promover a degradação das cadeias, mas a otimização do processo deve levar em conta a determinação prévia do teor de minerais da matéria-prima^{5,40}. No caso dos gládios de lulas, visto o baixíssimo teor de minerais – o teor de cinzas é inferior a 3% – a etapa de desmineralização não é necessária, o que permite que a β -quitina resultante tenha massa molar elevada (>10⁶ g/mol) e alto teor de unidades N-acetilglicosamina (\overline{GA} >90%)^{23-25,41}.

As proteínas podem ser eliminadas por tratamento com soluções aquosas de diferentes bases, como NaOH, Na₂CO₃, NaHCO₃, KOH, K₂CO₃, Ca(OH)₂, mas o emprego de NaOH (1-10%) e de temperaturas relativamente elevadas (65-100 °C) é a prática mais comum. Entretanto, as condições reacionais devem ser brandas para evitar, ou minimizar, a ocorrência de hidrólise dos grupos acetamida presentes na quitina e também sua despolimerização. Os tratamentos enzimáticos – pepsina, tripsina, alcalases e outras proteases não-quinolíticas podem ser empregadas – são mais brandos e menos eficientes que o tratamento químico e, embora ainda não sejam empregados em larga escala, propiciam o aproveitamento potencial do hidrolisado proteico pela indústria alimentícia.

A remoção dos pigmentos, quando presentes, pode ser realizada por extração com solventes, sendo que etanol e acetona são os mais empregados, ou por branqueamento, com KMnO₄, NaOCl ou H₂O₂. O aproveitamento de astaxantina, pigmento mais abundante nos exoesqueletos de crustáceos, na indústria alimentícia é possível se a extração por solvente for adotada.

As condições empregadas nos tratamentos seqüenciais e a natureza da matéria-prima empregada para extração de α -quitina afetam o rendimento do processo, a qualidade do produto e também da quitosana, o derivado mais importante da quitina. De fato, problemas de reprodutibilidade das características de quitina e quitosana comerciais têm sido relatados^{14,42}, os quais aparentemente podem ser explicados com base nos fatores mencionados acima. Assim, é

importante ressaltar que a pesca industrial de crustáceos resulta na coleta de animais de diferentes espécies e em estágios diferentes de desenvolvimento, diretamente no seu complexo habitat natural. Além disso, as diferentes partes dos exoesqueletos dos crustáceos não têm composições idênticas e, adicionalmente, as proteínas e a quitina sofrem processo de biodegradação se os exoesqueletos não forem conservados, seja por congelamento ou secagem e adição de excesso de sal, desde a despesca até o momento do processamento⁴⁰. Dessa maneira, a matéria-prima empregada para produção industrial de α -quitina tem natureza intrinsecamente heterogênea e pode estar parcialmente degradada em função das condições de estocagem, o que pode explicar a variação das características e falta de uniformidade de produtos comerciais³⁸. Nesse caso, o processamento de diferentes partes dos exoesqueletos de camarões cultivados em condições controladas pode representar uma alternativa interessante para a produção de α -quitina com características mais uniformes. O emprego dessa abordagem em laboratório de pesquisa tem permitido investigar a importância dos fatores citados acima sobre as características e propriedades da α -quitina extraída de abdomens, cefalotórax e quelípodos de *Macrobrachium rosenbergii*^{22,37}, que é a espécie de camarão mais cultivada no mundo^{43,44}. Seu cultivo em larga escala foi introduzido no Brasil em 1977 e o fato de ser, em nível mundial, a espécie mais importante de camarão cultivada sob condições controladas faz do *M. rosenbergii* um dos crustáceos mais estudados pela Aqüicultura. Assim, os exoesqueletos de *M. rosenbergii* empregados nesses estudos são coletados no Centro de Aqüicultura da UNESP (CAUNESP/Jaboticabal) a partir de indivíduos cultivados, desde o estado larval, sob condições controladas, o que assegura a homogeneidade da matéria-prima e a ausência de contaminantes e poluentes. Para preservar ao máximo a matéria-prima até o início de seu processamento, os exoesqueletos são armazenados à baixa temperatura (<-10 °C) até que sejam separadas as suas diferentes partes, a saber, cefalotórax, quelípodos e abdomens, as quais são em seguida processadas para permitir a extração de α -quitina. Outros trabalhos têm relatado o uso de matéria-prima originada da indústria pesqueira, a qual foi previamente submetida à secagem e salga e, então, os cefalotórax foram separados, exaustivamente lavados e submetidos à seqüência de tratamentos para extração de α -quitina^{40,45}. No caso de gládios de lulas, é também importante que estes sejam conservados à baixa temperatura até o momento do processamento visando a extração de β -quitina^{23-25,37,41}.

Independentemente da origem da quitina – comercial ou extraída da biomassa em laboratório de pesquisa, α - ou β -quitina – é importante determinar suas características básicas e sua pureza, principalmente se o objetivo é empregá-la em aplicações na medicina, área farmacêutica e indústria alimentícia. Nesses casos pode ser importante determinar o conteúdo residual de metais, principalmente metais pesados. Quitinas comerciais podem apresentar teores de ferro e manganês até cem vezes mais elevados que os encontrados em β -quitina extraída de gládios de *Loligo plei* e *L. sanpaulensis*²³⁻²⁵. De fato, os exoesqueletos de crustáceos contêm uma quantidade muito maior de sais minerais que os gládios de lulas, entretanto a extração de α -quitina de cefalotórax de *M. rosenbergii* também resultou em preparação com teores de metais muito mais baixos que aqueles encontrados em produtos comerciais²². Tais diferenças podem ser atribuídas aos custos do processamento industrial de grandes quantidades de exoesqueletos, os quais não permitem que sejam executadas lavagens exaustivas como as realizadas em laboratório. Entretanto, a comparação acima é útil para enfatizar a necessidade de determinar a pureza da quitina permitindo, assim, que a qualidade de diferentes produtos seja comparada e que seja determinada a necessidade ou não de proceder sua purificação. É importante ressaltar que, embora

seja possível eliminar os metais residuais presentes em quitina, os procedimentos empregados para esse fim podem causar modificações estruturais no polímero, tais como a desacetilação e ruptura das cadeias, com conseqüente degradação das características e propriedades ligadas ao caráter macromolecular de quitina¹.

Desacetilação

A desacetilação da quitina leva à obtenção de quitosana, seu mais importante derivado, cuja estrutura primária é idêntica à da quitina a não ser pelo fato que em quitosana predominam as unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (Figura 6). De fato, a completa desacetilação da quitina raramente é realizada, pois são necessárias muitas reações consecutivas, que também favorecem a sua progressiva despolimerização. Assim, o termo quitosana abrange o conjunto de copolímeros que contém ao menos 50-60% de unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose. O grau médio de acetilação (\overline{GA}) define a porcentagem de unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose presentes, em média, nas cadeias do polímero^{1,5}. Não há limites bem definidos em termos dos conteúdos de unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose e 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose para a distinção de quitina e quitosana mas, em função de suas composições distintas os polímeros exibem propriedades bem diferentes. Do ponto de vista prático é a solubilidade que permite a distinção mais simples e rápida, pois quitosanas são solúveis em soluções aquosas diluídas de vários ácidos – as soluções de ácido acético e clorídrico são as mais comumente empregadas – mas quitina não é solúvel nesses meios, sendo dissolvida apenas em poucos sistemas solventes^{1,5}.

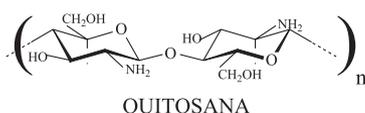


Figura 6. Estrutura primária de quitosana, onde n é o grau de polimerização

A desacetilação da quitina pode ser realizada por processos químicos ou enzimáticos, porém esses últimos não são empregados em escala industrial, devido aos custos elevados de extração das desacetilases bem como sua baixa produtividade. Os processos químicos da desacetilação de quitina podem ser realizados pela via homogênea, a qual se realiza com álcali-quitina⁴⁶, ou heterogênea, sendo esta a mais extensivamente usada e estudada. Geralmente a quitina é suspensa em soluções aquosas concentradas de NaOH ou KOH (40 - 60%) por tempo variáveis (0,5 - 24 h) e a temperaturas relativamente elevadas (50 - 130 °C). As características da quitosana obtida são determinadas pela concentração da solução alcalina e razão quitina/solução alcalina, tamanho das partículas de quitina, temperatura, tempo e atmosfera de reação^{1,5,39}. As condições mais severas são geralmente empregadas no sentido de favorecer a eficiência da desacetilação, porém disso resulta acentuada despolimerização via hidrólise alcalina. Embora o mecanismo da despolimerização não esteja estabelecido, a suposição que oxigênio molecular participe do processo tem suscitado o emprego de aditivos e de condições reacionais específicas para evitar seu efeito oxidante^{1,5}. O borbulhamento do meio reacional com gases inertes^{47,48} e a adição de agentes redutores^{49,50} são medidas relativamente eficazes no sentido de minimizar a despolimerização. Outras medidas incluem o tratamento de explosão a vapor²⁶, a extrusão reativa⁵¹ e a irradiação com microondas⁵² e ultra-som⁵³.

Em função de suas diferentes estruturas, α - e β -quitina não são igualmente susceptíveis à reação de desacetilação. A execução das reações de desacetilação de α -quitina comercial e β -quitina extraída de gládios de lulas nas mesmas condições – [NaOH]=40%; razão lí-

quido/sólido=48/1; temperatura=115 °C, tempo=6 h) – resultou em quitosanas com $\overline{GA} \cong 12\%$ e $\overline{GA} \cong 3\%$, respectivamente. Entretanto, ambas quitosanas apresentaram massas molares médias viscosimétricas (\overline{M}_v) próximas de 10^5 g/mol, mostrando a ocorrência de severa despolimerização^{23-25,54}. Um estudo recente relata que a execução de ciclos térmicos de congelamento à temperatura do nitrogênio líquido e aquecimento à temperatura ambiente intercalados com sucção do reator com bomba de vácuo resulta em desacetilação eficiente e menor taxa de despolimerização quando comparado a processos executados na mesma condição, porém sem a execução dos ciclos mencionados⁵⁵. A eficiência do processo é máxima após a execução de ao menos oito ciclos térmicos e também nesse caso é observado que a β -quitina reage mais completamente que α -quitina. A exclusão do oxigênio molecular do meio reacional e a destruição parcial dos domínios cristalinos são, segundo os autores, responsáveis por minimizar a ocorrência de despolimerização e promover a acessibilidade aos sítios reativos do polímero, respectivamente⁵⁵. Resultados semelhantes foram obtidos em estudo no qual as suspensões de α - e β -quitina em solução aquosa de NaOH 40% foram previamente submetidas a tratamento de ultra-som, sugerindo que a sonicação também favorece a exclusão do oxigênio molecular e a acessibilidade aos domínios cristalinos⁵⁶.

CONCLUSÕES

É comum encontrar problemas de reprodutibilidade das características de quitina e quitosana comerciais mesmo quando a mesma matéria-prima e o mesmo fabricante, mas diferentes lotes da produção, são considerados. Tais problemas podem estar vinculados à intrínseca variabilidade da matéria-prima empregada pelos produtores de quitina, seja porque as diferentes partes dos exoesqueletos não são processadas separadamente e/ou porque esta é proveniente, essencialmente, de uma indústria pesqueira que coleta os animais, sem discriminação de espécie, idade e fase de desenvolvimento, diretamente da natureza. Constatações dessa natureza, i. e., associadas à variabilidade das características e propriedades de quitinas e quitosanas comerciais, têm sido freqüentemente relatadas em congressos internacionais e artigos científicos e muitos grupos de pesquisa têm se dedicado, recentemente, a estudar a influência dos vários fatores que afetam as características e propriedades desses polímeros, desde a natureza da matéria-prima até as condições empregadas nos tratamentos que levam à sua obtenção e, também, a escolha da seqüência de tratamentos. Assim, as diferenças entre α - e β -quitina, a disponibilidade de produtos comerciais e a possibilidade de extrair o polímero sob condições controladas no laboratório de pesquisa podem ser mais bem exploradas no sentido de fornecer alternativas e para subsidiar os estudos fundamentais e as aplicações desses polímeros e de seus derivados. Também, o controle da qualidade e pureza da quitina através de análises espectrais e a determinação do teor de metais pode contribuir para validar suas aplicações nas áreas em que um elevado grau de pureza é exigido.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP, ao CNPq e à CAPES, que apoiaram os trabalhos dos autores concedendo bolsas e auxílios à pesquisa e ao Prof. Dr. W. C. Valenti (CAUNESP/UNESP) pela valiosa colaboração.

REFERÊNCIAS

1. Roberts, G. A. F.; *Chitin Chemistry*, Mc Millan Press Ltd: London, 1992, cap 1.

2. Damour, A.; Gueugniard, P. Y.; Berthin-Maghit, M.; *Clinical Matter* **1994**, *15*, 273.
3. Wadstein, J.; Thom, E.; Heldman, S.; Gudmunsson, S.; Lilja, B. Em *Chitosan per os: from dietary supplement to drug carrier*; Muzzarelli, R. A. A., ed.; Atec.: Grottamare 2000, p. 65.
4. Bough, W. A.; *J. Food Sci.* **1975**, *40*, 297.
5. Abram, A. P.; Higuera, I. Em *Quitina y quitosano: obtencion, caracterizacion y aplicaciones*; Abram, A. P., ed.; Programa Cyted 2004, - Pontificia Universidad Catolica del Peru/Fondo Editorial: Lima, 2004, cap 1.
6. Muzzarelli, R. A. A. Em *Encyclopedia of Polymers Science Engineering*; 2nd ed.; Mark, H. F.; Bikales, N. M.; Overberger, C. G.; Mendes, G., eds.; John Wiley: New York, 1985, vol.3, p. 430.
7. Li, Q.; Dunn, E. T.; Grandmaison, M. F. A.; Goose, M. F. A.; *J. Bio. Comp. Polym.* **1992**, *7*, 370.
8. Onishi, H.; Nagal, T.; Machida, Y. Em *Applications of Chitin and Chitosan*; Goosen, M. F. A., ed.; Technomic: Lancaster 1997, p. 205.
9. Synowiecki, J.; Al-Khateeb, N. A. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2003**, *43*, 145.
10. Khor, E.; Lim, L. Y.; *Biomaterial* **2003**, *24*, 2339.
11. <http://www.uspto.gov/patft/index.html>, acessada em Fevereiro 2006.
12. <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/wl-ltr4.html>, acessada em Fevereiro 2006.
13. Khor, E.; *Curr. Opin. Sol. St. Mat. Sci.* **2002**, *6*, 313.
14. Dornish, M.; *Proceedings of the 5th International Conference of the European Chitin Society*, Trondheim, Noruega, 2002.
15. Richard, A. G.; *The integument of arthropods*, University of Minnesota Press: Minneapolis, 1951, p. 110.
16. Hackman, R. H.; *Aust. J. Biol. Sci.* **1960**, *13*, 530.
17. Rha, C. K.; Rodriguez-Sanches, D.; Kienzle-Sterzer, C. Em *Biotechnology of marine polysaccharides*, Colwell, R. R.; Pariser, E. R.; Sinskey, A. J., eds.; Hemisphere Publishing Corporation: Washington, 1985, p. 283.
18. Hirano, S.; *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, VCH: New York, 1986, vol. A6, p. 231.
19. Dweltz, N. E.; *Biochim. Biophys. Acta* **1961**, *51*, 283.
20. Gardner, K. H.; Blackwell, J.; *Biopolymers* **1975**, *14*, 1581.
21. Minke, R.; Blackwell, J.; *J. Molec. Biol.* **1978**, *120*, 167.
22. Battisti, M. V.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2002.
23. Lavall, R. L.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2003.
24. Lavall, R. L.; Assis, O. B. G.; Campana Filho, S. P.; *Proceedings of the V International Symposium on Natural Polymers and Composites*, São Pedro, Brasil, 2004.
25. Lavall, R. L.; Assis, O. B. G.; Campana Filho, S. P.; III *Simpósio Iberoamericano de Quitina*, Córdoba, Espanha, 2004.
26. Foche, B.; Beltrame, P. L.; Naggi, A.; Torri, G.; *Carbohydr. Polym.* **1990**, *1*, 405.
27. Gow, N. A. R.; Goodway, G. W.; *Carbohydr. Res.* **1987**, *165*, 105.
28. Saito, Y.; Okano, T.; Gaill, F.; Chanzy, H.; Putaux, J.-L.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2000**, *28*, 81.
29. Saito, Y.; Kumagai, H.; Wada, M.; Kuga, S.; *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 407.
30. Pearson, F. G.; Marchessault, R. H.; Liang, C. Y.; *J. Polym. Sci.* **1960**, *43*, 101.
31. Foche, B.; Naggi, A.; Torri, G.; Cosani, A.; Terbojevich, M.; *Carbohydr. Polym.* **1992**, *18*, 43.
32. Kurita, K.; Tomita, K.; Tada, T.; Ishii, S.; Nishimura, S. I.; Shimoda, K.; *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* **1993**, *31*, 485.
33. Foster, A. B.; Webber, J. M.; *Adv. Carbohydr. Chem.* **1960**, *15*, 371.
34. Austin, P. R.; *US pat. 3.892.731* **1975**.
35. Striegel, A. M.; *Carbohydr. Polym.* **1997**, *34*, 267.
36. Poirier, M.; Charlet, G.; *Carbohydr. Polym.* **2002**, *50*, 363.
37. Sim, P. C.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2005.
38. Campana Filho, S. P.; *Tese de Livre-Docência*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2002.
39. No, H. K.; Meyers, S. P. Em *Chitin handbook*; Muzzarelli, R. A. A.; Peter, M. G., eds.; European Chitin Society: Grottammare, 1997, p. 475.
40. Percot, A.; Viton, C.; Domard, A.; *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 12.
41. Chaussard, G.; Domard, A.; *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 559.
42. Signini, R.; Campana Filho, S. P.; *Polym. Bull.* **1999**, *42*, 159.
43. Valenti, W. C.; New, M. B. Em *Freshwater prawn culture: the farming of Macrobrachium rosenbergii*; Malden, M. A., ed.; Blackwell Science, 2000.
44. Valenti, W. C.; Polin, C. R.; Pereira, J. A.; Borghetti, J.; R. Em *Aqüicultura no Brasil: Bases para um desenvolvimento sustentável*; CNPq – MCT eds., Brasília, 2000.
45. Lamarque, G.; Viton, C.; Domard, A.; *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 992.
46. Sannan, T.; Kurita, K.; Iwakura, Y.; *Makromol. Chem.* **1975**, *176*, 1191.
47. Domard, A.; Rinaudo, M.; *Int. J. Biol. Macromol.* **1983**, *5*, 49.
48. Campana-Filho, S. P.; Signini, R.; *Int. J. Polym. Mat.* **2002**, *51*, 701.
49. Batista, I.; Roberts, G. A. F.; *Makromol. Chem.* **1990**, *191*, 429.
50. Campana Filho, S. P.; Signini, R.; *Pol. Ciên. Tecnol.* **2001**, *XI*, 169.
51. Rogovin, S.; Akopova, T. A.; Vikhoreva, G. A.; *J. Appl. Polym. Sci.* **1998**, *70*, 927.
52. Goycoolea, F. M.; Higuera-Ciajara, I.; Hernandez, G.; Lizardi, J.; Garcia, K. D. Em *Advances in Chitin Science*; Domard, A.; Roberts, G. A. F.; Vårum, K. M., eds.; Jacques André Publisher: Lyon, 1997.
53. Cardoso, M. B.; Signini, R.; Campana-Filho, S. P.; *Polym. Bull.* **1999**
54. Lavall, R. L.; Assis, O. B. G.; Campana Filho, S. P.; *Bioresour. Technol.*, no prelo.
55. Lamarque, G.; Cretenet, M.; Viton, C.; Domard, A.; *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 1380.
56. Campana-Filho, S. P.; Thouygnon, R.; Viton, C.; Domard, A.; trabalho não publicado.