

# Produção de Esferas de QUITOSANA

Meio para interação com metais em fase aquosa

## Rejane Celi Goy, MSc

PPG Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais - Universidade de São Paulo - USP  
São Carlos, SP.  
rejanegy@terra.com.br

## Odílio B. G. Assis, Dr.

Embrapa Instrumentação Agropecuária  
São Carlos, SP.  
odilio@cnpdia.embrapa.br

## Sérgio P. Campana-Filho, Dr.

Instituto de Química de São Carlos - IQSC  
Universidade de São Paulo - USP  
São Carlos, SP.  
scampana@iqsc.usp.br

Ilustrações cedidas pelos autores

## Introdução

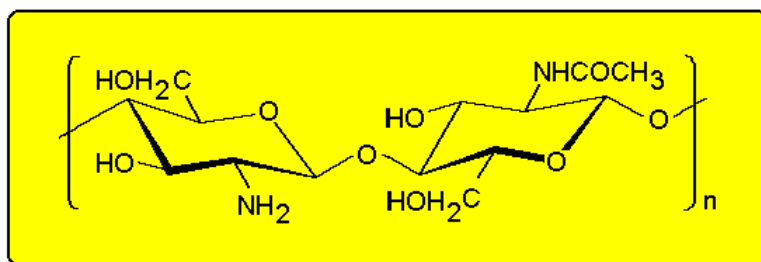
A quitina é um polissacarídeo extremamente abundante na natureza, perdendo somente para celulose em disponibilidade. Pode ser encontrada em diversos organismos como em insetos e crustáceos, sendo o principal constituinte das cascas de camarão e das carapaças de caranguejo. A quitosana também é um polissacarídeo que ocorre naturalmente em alguns fungos, mas que geralmente é obtido pela desacetilação da quitina, uma reação que pode ser executada em diferentes condições empregando diferentes alcalis. Entretanto, a execução da reação de desacetilação de quitina em temperaturas elevadas e empregando soluções concentradas de NaOH é o método mais usual para a obtenção de quitosana (Campana & Desbrières, 2000).

A quitosana pode ser definida como um copolímero de 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose e 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranosose, de composição variável em função do grau residual de acetilação, cujas unidades também estão unidas por ligações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) (Figura 1). O termo quitosana é usado para identificar

60% de unidades desacetiladas, enquanto quitina corresponde a produtos muito mais acetilados. Como consequência de seus diferentes conteúdos de unidades acetiladas, quitina e quitosana possuem diferentes graus de solubilidade, sendo que quitina é insolúvel na maioria dos solventes, enquanto a quitosana é solúvel em soluções aquosas de ácidos orgânicos e inorgânicos.

As características e propriedades de quitosanas comerciais variam de acordo com os fatores do processo de manufatura. Tais propriedades incluem grau de pureza, solubilidade, viscosidade, grau de desacetilação, massa molecular e a capacidade de interagir com diferentes substâncias. A habilidade de adsorver metais, por exemplo, depende do processo de hidrólise dos grupos acetamido. Assim, a desacetilação homogênea de quitina resulta em quitosana com maior capacidade de adsorção do que aquela preparada por processo heterogêneo, ainda que os polímeros tenham o mesmo grau de acetilação (Li, 1992).

De fato, uma das mais importantes propriedades da quitosana é a de agir como quelante (Li, 1992), pois esta pode se ligar seletivamente a substâncias como o colesterol, gorduras, proteínas, células tumorais, e também a íons metálicos, o que tem originado sua exploração em diversas aplicações nos últimos vinte e cinco anos (Mathur, 1990; Roberts, 1992; Kurita, 1986). A capacidade da quitosana em interagir fortemente com íons metálicos dissolvidos em meios aquosos é consideravelmente superi-



**Figura 1:** Representação esquemática da estrutura primária idealizada de quitosana, sendo  $n$  = grau de polimerização.

or à apresentada pela quitina. Contudo, sua aplicação em processos de descontaminação fica limitada a efluentes de baixa acidez ( $\text{pH} > 6-7$ ), considerando que a quitosana é solúvel em meios de acidez moderada a forte, o que impede, ou pelo menos dificulta, sua utilização na forma de filtros, membranas ou colunas (Roberts, 1992; Li, 1992; Kurita, 1986). As alternativas viáveis para estender as possibilidades de emprego de quitosana como quelante de íons metálicos a uma faixa mais ampla de pH são: *i*) a introdução de substituintes acila portadores de cadeias relativamente longas (Guibal, 1997); *ii*) a introdução de substituintes quelantes, como grupos aldeídos (Peter, 1995) e *iii*) o estabelecimento de um certo número de entrecruzamentos ou ligações covalentes intercadeias (Kurita, 1986; Guibal, 1997; Koyama, 1986; Goy et al., 2002).

### Algumas aplicações de quitosana

A produção industrial e o uso de quitina e seus derivados, principalmente a quitosana, encontra-se em constante crescimento. Os principais fatores para este interesse podem ser atribuídos a: *i*) abundância de matéria-prima; *ii*) possibilidade de utilização de rejeitos fartos e de baixo custo oriundos da indústria pesqueira e *iii*) volume de pesquisas confirmando e ampliando continuamente o potencial de aplicação desses materiais. A Tabela 1 exemplifica de forma sucinta algumas áreas nas quais a quitosana tem sido aplicada, sendo a medicina e biotecnologia os campos mais investigados.

### Esferas de quitosana e entrecruzamento

Quitosanas no formato de esferas e microesferas têm sido produzidas e amplamente empregadas em diversas áreas de biotecnologia, principalmente como veículos de transporte e liberação de drogas ou substâncias no organismo (Genta, 1998; Josué, 2000). Trabalho recente (Chiou & Li, 2003) também relata o seu uso como meio de interação e remoção de tintas pre-



**Figura 2:** Gotejamento manual da solução de quitosana com seringa de insulina.

sentes em efluentes industriais. O formato esférico é preferencialmente desejado por apresentar a vantagem de uma melhor caracterização superficial, permitindo o estabelecimento de parâmetros geométricos úteis para reprodutibilidade do processo e para comparações, além de aspectos como otimização de empacotamento em reatores e dispositivos de filtração.

Indústrias têxteis, de papel, couro, plásticos, etc, invariavelmente ge-



**Figura 3:** Esferas em processo de neutralização de pH.

ram quantidades de efluentes que precisam de tratamento adequado e a quitosana presta-se a essa aplicação por sua alta capacidade de adsorção. Os agentes usualmente utilizados em escala industrial para a adsorção de tintas apresentam capacidades de remoção que podem variar de 50g/Kg a até 600kg/Kg. Contudo, a capacidade de adsorção pode ser elevada para valores próximos de 1000g/kg-1100g/kg quando quitosana é empregada como composto coadjuvante (Chiou, 2003). Essa capacidade deve-se a protonação dos grupos amino da

quitosana em solução ácida, facilitando assim a interação eletrostática com as cargas negativas dos corantes e pigmentos presentes nas tintas. Como em pH baixo a quitosana pode se dissolver, o entrecruzamento das suas cadeias tem sido sugerido para tornar o polímero mais estável e para facilitar a sua recuperação. Diversos reagentes entrecruzantes bifuncionais podem ser aplicados, contudo, o glutaraldeído é o mais empregado.

Nesse sentido, Koyama e colaboradores, 1986, compararam o comportamento de quitosanas solúveis e quitosanas homogêneas entrecruzadas com glutaraldeído no que diz respeito à adsorção de íons cobre numa ampla faixa de pH. Observaram que o entrecruzamento das cadeias de quitosana diminuiu a cristalinidade do polímero, contribuindo para aumentar a capacidade de adsorção de íons cobre. Constataram também que a razão molar grupos aldeído (do glutaraldeído) / grupos amino (da quitosana) empregada na reação de entrecruzamento exerce forte influência sobre a capacidade de adsorção do material resultante. Enquanto a quitosana original adsorveu cerca de 74% de íons  $\text{Cu}^{2+}$ , este valor elevou-se para 96% quando foi utilizada a quitosana entrecruzada empregando razão aldeído/amino=0,7/1. Porém, foi observado que a utilização de excesso de glutaraldeído resultava em diminuição da capacidade de adsorção. O aumento inicial na capacidade de adsorção foi atribuído ao aumento da hidrofobicidade do material e a maior acessibilidade aos grupos quelantes resultante da destruição parcial da estrutura cristalina da quitosana causada pelo seu entrecruzamento. Por outro lado, a subsequente diminuição da capacidade de adsorção foi atribuída ao aumento da hidrofobicidade do material e devido a formação das bases de Schiff. Assim, pode ser concluído que o grau de entrecruzamento deve ser otimizado para garantir a insolubilidade do polímero sem entretanto diminuir sua capacidade de interação. Além disso, o grau de entrecruzamento deve se adequar a aplicação, levando-se em consideração a massa molar da quitosana e a acidez do meio em que

estará interagindo.

## Obtenção de quitosana a partir da quitina

Neste estudo, quitina comercial extraída de cascas de caranguejo (Sigma; lote nº 84H7175, C-7170), foi empregada para a preparação de quitosana. Para a execução da reação de desacetilação de quitina, adotou-se a seqüência estabelecida por Horton & Lineback, 1965, sendo a quitina triturada e então suspensa em solução aquosa de NaOH (40%), sob agitação mecânica constante a temperatura de  $115 \pm 2^\circ\text{C}$ . A reação prosseguiu nessas condições por 6 horas. O meio reacional foi então filtrado e o precipitado abluído com água destilada até a neutralidade, sendo em seguida lavado com metanol. O precipitado foi transferido para uma

placa de Petri e seco à temperatura ambiente.

## Purificação da quitosana

Embora não seja um procedimento estritamente necessário nas aplicações industriais, a quitosana pode passar por um processo de purificação para a remoção de sais remanescentes da desacetilação (principalmente acetato de sódio), impurezas e materiais insolúveis (principalmente quitina insuficientemente desacetilada). Assim, a purificação disponibiliza mais grupos polares, aumentando a capacidade de interação (Assis, et al., 2004). Como procedimento de purificação adotou-se a seqüência proposta por Signini & Campana-Filho, 2001, ou seja, dissolveu-se 1,0g de quitosana lentamente em 300mL de ácido acético

(0,5M), mantendo a suspensão resultante sob agitação contínua por aproximadamente 24 horas a temperatura ambiente. Após este período a solução foi seqüencialmente filtrada sob pressão positiva através de uma série de membranas com tamanhos de poros decrescentes ( $8,0\mu\text{m}$ ,  $5,0\mu\text{m}$ ,  $0,8\mu\text{m}$  e  $0,45\mu\text{m}$ ) para remoção de frações insolúveis e géis. O material filtrado foi neutralizado com  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado provocando a precipitação da quitosana. O precipitado foi separado do sobrenadante por filtração e então lavado exaustivamente com água destilada, seguido de imersão em metanol e secagem a temperatura ambiente.

## Preparação das esferas

Três metodologias podem ser empregadas para a obtenção de esferas de quitosana com dimensões controladas: *i)* Por coagulação, na qual a quitosana é dissolvida em meio ácido e gotejada sobre um banho alcalino coagulante para formação das esferas; o entrecruzamento é executado após a obtenção e neutralização das esferas; *ii)* Por inversão de fases, sendo as microesferas obtidas *in situ* pela dissolução da quitosana em meio ácido contendo o agente de entrecruzamento e dispersão da fase aquosa em uma fase oleosa de maneira a obter materiais insolúveis e, *iii)* Pela técnica de spray-drying, na qual a quitosana purificada é dissolvida em meio ácido e a esta é adicionado o agente entrecruzante. A solução é então sugada por uma bomba peristáltica e as microesferas são formadas pela ação de ar comprimido que "interrompe" o fluxo e promove a formação das esferas.

A técnica mais simples é, sem dúvida, a de coagulação em meio alcalino pelo gotejamento do polissacarídeo dissolvido em ácido e que foi aqui adotada. Assim, cerca de 1,5g de quitosana purificada foram dissolvidas em 37,5mL de solução de ácido acético 5% (m/v). A solução obtida, extremamente viscosa, foi gotejada manualmente com o auxílio de uma seringa sobre solução de hidróxido de sódio concentrado (2,5M), o que provoca a imediata coagulação do gel

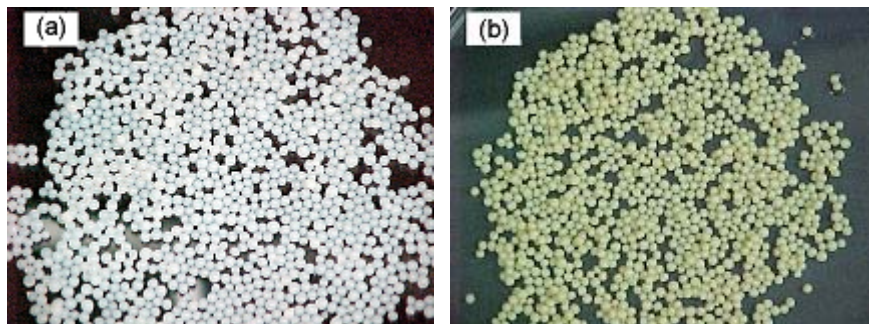
**Tabela 1:** Algumas aplicações da quitosana (Sanford, 1988, Laranjeira, 1995; Jameela, 1995; Gupta, 2000; Assis et al., 2003).

Aplicações	Exemplos
Tratamento de água	Na remoção de íons metálicos através da quelatação; como agente floculante para a eliminação de substâncias como proteínas, corantes e herbicidas; clarificação e filtração a partir de membranas a base quitosana.
Polpa e papel	No tratamento de superfícies celulósicas com a finalidade de aumentar a dureza sem alteração do brilho; na obtenção de papel isolante resistente ao envelhecimento; no uso em papel fotográfico para elevar as propriedades antiestáticas.
Medicina e biotecnologia	Em formulações contendo quitosana contra o colesterol; no combate de células cancerígenas, como no tratamento da leucemia; na preparação de lentes de contato; na produção de membranas para diálise; como agente anticoagulante sanguíneo; na produção de curativos inteligentes e na fabricação de microesferas para liberação controlada de drogas.
Cosméticos	Na remoção de sobras de goma em xampu; em cremes de limpeza e demais compostos de tratamentos de pele e cabelo.
Agricultura e processamento de alimentos	No tratamento na superfície da semente para a inibição de fungos; na remoção de corantes em sucos cítricos; na remoção de sólidos, b-caroteno e substâncias ácidas de sucos de maçã e de cenoura; na clarificação de vinhos e em coberturas comestíveis protetoras para frutos.

**Tabela 2:** Viscosidades intrínsecas ( $[\eta]$ ), constantes de Huggins ( $k_H$ ), massas molares médias viscosimétricas ( $\overline{M}_v$ ) e graus médios de acetilação ( $\overline{GA}$ ) da quitosana.

(%) $\overline{GA}$	$[\eta]$ (mL/g)	$k_H$	$\overline{M}_v$ (g/mol) <sup>(a)</sup>
$10,2 \pm 0,6$	$730 \pm 24$	$0,43 \pm 0,02$	$174051 \pm 7540$

$$(a)[\eta] = K^*M^a \text{ sendo } K = 0,076 \text{ e } a = 0,76$$



**Figura 4:** Esferas de quitosana: (a) sem entrecruzamento e (b) após entrecruzamento com glutaraldeído (sem escala).

em formato esférico, Figura 2. A altura do gotejamento, as características da seringa e da viscosidade (concentração) são parâmetros fundamentais que devem ser observados para a reprodutibilidade do processo.

As esferas coaguladas foram mantidas na solução alcalina por 16 horas, filtradas e lavadas abundantemente com água destilada até o equilíbrio do pH da água de lavagem (Figura 3). Após esta etapa as esferas foram divididas em três frações para a obtenção de dados comparativos: (a) parte das esferas foi submetida à reação de entrecruzamento com glutaraldeído, (b) parte foi seca a temperatura ambiente sem entrecruzamento e (c) uma fração, não entrecruzada, congelada em nitrogênio líquido e liofilizada.

O entrecruzamento consistiu na reação de quitosana com solução aquosa contendo o agente entrecruzante durante uma noite. A concentração do glutaraldeído foi fixada em 2,5% e a razão entre glutaraldeído e quitosana foi de aproximadamente 15mL/g. Após o tempo de reação as esferas foram exaustivamente lavadas com água destilada, sendo a água de lavagem testada com reagente de Feder (Morita & Assumpção, 1995) até que o sobrenadante aparecesse isento do aldeído.

### Características das esferas

As principais características da quitosana obtida pela desacetilação da quitina comercial estão apresentadas na Tabela 2. Os dados caracterizam um material com alto grau de desacetilação (em torno de 90%) e média massa molar.

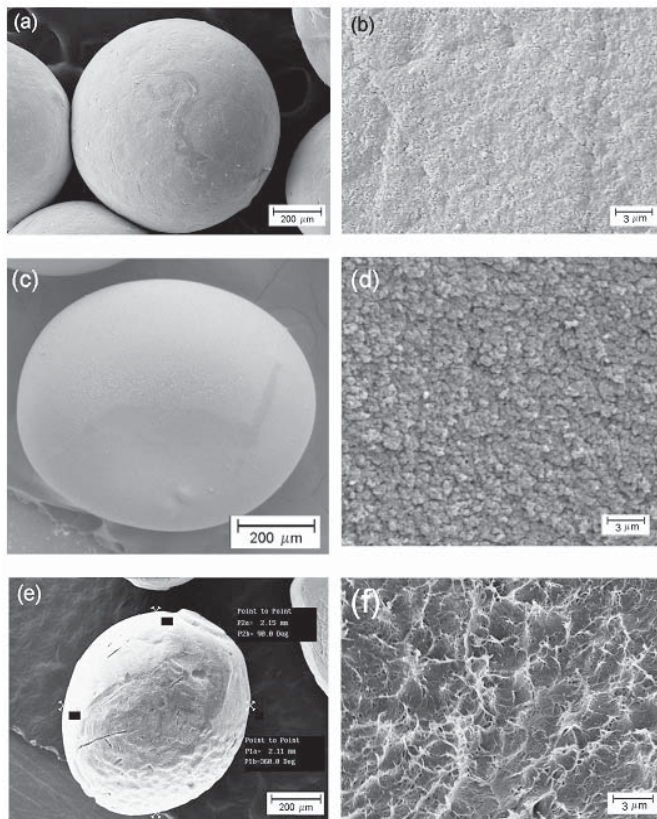
Os valores das constantes de Huggins encontrados demonstram que as soluções são de boa qualidade, embora esses valores não sejam indicativos definitivos que não possam agregados. Para uma comprova-

ção final seria necessário a utilização de demais técnicas complementares como a cromatografia de permeação em gel e métodos de espalhamento de luz, para obter evidências definitivas.

Relativamente às esferas, o entrecruzamento com glutaraldeído modifica o aspecto visual do material, introduzindo alteração da cor, tendendo a amarelo, Figura 4.

O caráter hidrofóbico da quitosana entrecruzada é plenamente comprovado por testes de solubilidade, assim como alterações, não apenas na coloração, mas na morfologia podem ser melhor observadas por microscopia eletrônica. A Figura 5 apresenta as micrografias das esferas nas condições avaliadas.

Pelas micrografias pode ser observado que no caso das esferas secas à temperatura ambiente e sem entrecruzamento (Figura 5 (a) e (b)) não há a ocorrência de poros em sua superfície e as esferas possuem diâmetro de aproximadamente 800µm.



**Figura 5:** Fotomicrografias das esferas de quitosana obtidas por MEV: (a) esfera seca a temperatura ambiente; (b) idem a (a), características da superfície; (c) esfera entrecruzada com glutaraldeído; (d) idem a (c), aspecto superficial; (e) esfera liofilizada e superfície resultante (f).

Após o entrecruzamento observa-se a formação de pequenas estruturas granulares uniformemente distribuídas na superfície, originalmente não rugosa. Constatou-se, contudo, que o entrecruzamento não gera poros na superfície, preservando praticamente as dimensões originais das esferas antes do reticulamento. A condição que mais se diferencia é a da liofilização (Figuras 5 (e) e (f)), em que as esferas apresentam maior diâmetro ( $\approx 2 \times 10^3 \mu\text{m}$  ou  $2 \mu\text{m}$ ) e superfície altamente porosa, caracterizando uma estrutura do tipo esponja.

A ocorrência de poros na superfície das esferas não é uma característica indesejável, pelo contrário. De fato, esta característica pode se tornar um fator determinante na interação do polissacarídeo com o meio, considerando que quanto maior a área superficial melhor será sua interação e consequentemente a capacidade de adsorver metais.

### Testes de interação com $\text{Cu}^{2+}$ em meio aquoso

Para avaliar a interação dessas esferas com íons  $\text{Cu}^{2+}$  foram realizados testes simples nos quais 50 mg de esferas (isoladamente em cada condição) foram mantidas em solução aquosa de  $\text{CuCl}_2$  (50 mg) sob agitação constante por três dias,  $\text{pH} \approx 5,3$  e temperatura média de  $25^\circ\text{C}$ . Após este período o sobrenadante foi removido e analisado quanto ao conteúdo de íons cobre por espectroscopia de absorção atômica, sendo os resultados apresentados na Tabela 3.

Como pode ser constatado pelos dados acima, a presença de poros nas esferas parece ser um fator fundamental para promover a adsorção dos íons de cobre. De fato, as esferas liofilizadas, que possuem superfícies porosas conforme constatado por microscopia eletrônica de varredura,

**Tabela 3:** Quantidades de moles de íons Cu<sup>2+</sup> remanescentes nas soluções e a porcentagem de remoção desses íons por esferas de quitosana não entrecruzadas, entrecruzadas e liofilizadas.

Amostra	Moles de Cu <sup>2+</sup> remanescentes na solução	Remoção de íons Cu <sup>2+</sup> (%)
Esfera não-entrecruzada	6,69 x 10 <sup>-5</sup>	43
Esfera entrecruzada	9,02 x 10 <sup>-5</sup>	23
Esfera liofilizada	1,03x10 <sup>-6</sup>	91

apresentaram capacidade de remoção de íons cobre muito superior àquelas exibidas pelas esferas de quitosana, entrecruzadas ou não. Assim, tal fato é atribuído a maior acessibilidade dos íons cobre aos sítios quelantes (grupos amino) da quitosana. Por outro lado, a menor capacidade de interação exibida pelas esferas entrecruzadas de quitosana deve ser atribuída ao estabelecimento de ligações entrecruzadas, as quais se formam por reação dos grupos amino de quitosana com moléculas de glutaraldeído. Assim, o consumo de grupos amino na reação de entrecruzamento é responsável pela menor capacidade de quelação das esferas entrecruzadas, pois uma menor quantidade de sítios quelantes fica disponível para a interação com os íons cobre presentes na solução.

Cabe salientar, entretanto, que esses resultados se referem a uma condição físico-química específica, i. e., os experimentos de interação foram realizados em pH=5,3 e, considerando que o grau de intumescimento dos materiais à base de quitosana é função do pH, assim como a especiação dos íons cobre também depende da acidez do meio, outras condições devem ser investigadas para permitir uma comparação mais abrangente entre esses materiais.

Embora as esferas entrecruzadas adsorveram uma menor quantidade de íons, cabe salientar que as análises aqui apresentadas foram conduzidas em pH da água destilada, no qual nenhum dos materiais é solúvel. Para pHs mais ácidos os resultados evidentemente serão diferentes, em decorrência da insolubilidade do material entrecruzado.

### Referências bibliográficas

ASSIS, O. B. G.; LEONI, A. M. Filmes

comestíveis de quitosana: Ação biofúngica sobre frutas fatiadas. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**. n.30, p.33 - 38, 2003.

ASSIS, O.B.G.; BALDO, E.F.; SUAZO, C.A. Effect of purification step on wetting properties of chitosan thin-films. In The 6<sup>th</sup> International Conference of the European Chitin Society (EUCHIS '04), Poznan, Poland, 2004

CAMPANA, S.P.; DESBRIÈRES, J. Chitin, Chitosan and Derivatives. **Natural Polymers and Agrofibers Composites**; (E. Frollini; A. LLeão; L. H. C. Mattoso eds.), USP; UNESP; EMBRAPA. p.41-71, 2000.

CHIOU, M.S.; LI, H.Y. Adsorption behavior of reactive dye in aqueous solution on chemical cross-linked chitosan beads. **Chemosphere**, 50, p.1095-1105, 2003.

GENTA, I. et al. Influence of glutaraldehyde on drug release and mucoadhesive properties of chitosan microspheres. **Carbohydrate Polymers**, v.36, p.81-88, 1998

GOY, R. C.; ASSIS, O. B. G.; CAMPANA FILHO, S.P. Chitosan crosslinking by Glutaraldehyde and Epichlorohydrin and their interaction with CU<sup>2+</sup> ions in aqueous medium In Proceedings of The VIII Latinamerican Symposium on Polymers (SLAP'2002). Sociedad Polimérica de México A.C., Acapulco. 2002, p.602 - 603

GUIBAL, E.; MILOT, C.; ROUSSY, J. **Chitin Handbook** (R.A.A.Muzzarelli; M.G. Peter eds),

European Chemical Society; 1997, p.423.

HORTON, D.; LINEBACK, D. R. N-Deacetylation Chitosan from Chitin. **Methods Carbohydrate Chemistry**, v5, p. 403-406, 1965.

KOYAMA, Y.; TANIGUCHI, A. Studies on Chitin X. Homogeneous Cross-linking of Chitosan for Enhanced Cupric Ion Adsorption. **Journal of Applied Polymer Science**, v.31, p.1951-1954, 1986.

KURITA, K.; KOYAMA, Y.; TANAGUCHI, A. Studies on Chitin. IX. Crosslinking of Water-Soluble Chitin and Evaluation of the Products as Adsorbents for Cupric Ion. **Journal of Applied Polymer Science**, v.31, p.1169-1176, 1986.

LI, Q. et al. Applications and Properties of Chitosan. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v.7, p. 370-397, 1992.

MATHUR, N.K.; NARANG, C.K. Chitin and Chitosan, Versatile Polysaccharides from Marine Animals. **Journal of Chemical Education**, v. 67, n. 11, p. 938-942, 1990.

MORITA, T.; ASSUMPCÃO, R.M.V. **Manual de Soluções, Reagentes e Solventes: Padronização, Preparação e Purificação**. Ed. Edgard Blücher Ltda, São Paulo, SP, 1995, 627p.

SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S. P. Características e propriedades de quitosanas purificadas nas formas neutra, acetato e cloridrato. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.11, no.2, p.58-64.

PETER, M.G. Applications and Environmental Aspects of Chitin and Chitosan. **Journal of Macromolecular Science**, v. A32, p. 629-640, 1995.

ROBERTS, G. **Chitin Chemistry**. London, The Macmillan Press LTD, 1992. 349p.