13° CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS
NATAL - RN
18 a 22 de outubro de 2015

INFLUÊNCIA DO MÉTODO DE SECAGEM NA ETAPA DE PURIFICAÇÃO DE QUITOSANAS

Ana C. M. Fonseca[1*] (M), Jorge G. S. Batista[1] (M), Antônio Bettega (M), Nelson B. de Lima (Dr)[1]

1 – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN, São Paulo – SP
acmfonseca.acf@gmail.com

Resumo: Atualmente, o estudo das propriedades de biopolímeros extracelulares tem ganhado destaque por serem de fácil extração e purificação. A quitosana tem sido uma proposta atraente para aplicações em diversas áreas, como engenharia, biotecnologia, medicina e farmacologia. Para tais aplicações, faz-se necessária a purificação da quitosana para se obter um produto mais concentrado e livre de impurezas indesejáveis. Entretanto, nessa etapa do processo de obtenção do biopolímero podem ocorrer alterações morfológicas e físico-químicas. O presente trabalho avaliou a influência do processo de secagem após a purificação de uma amostra de quitosana comercial bem como a importância dessa etapa e sua relação custo/benefício em aplicações que exijam um elevado grau de pureza. O método de secagem influenciou nas propriedades organolépticas e nas principais características do material. A análise da estrutura cristalina por difração de raios X mostrou que o grau de cristalinidade, X (%), foi inferior nas quitosanas purificadas quando comparado com a amostra não purificada. O grau de acetilação, GA (%), foi analisado por espectroscopia na região do infravermelho, não apresentando alterações significativas perante os três métodos de secagem avaliados, ao contrário da massa molecular viscosimétrica, M_v, determinada por viscosimetria capilar.

Palavras-chave: *purificação de quitosana, grau de cristalinidade, grau de acetilação, peso molecular viscosimétrico, propriedades físico-químicas.*

Influence of the Drying Method in Chitosans Purification Step

Abstract: Currently, the study of extracellular biopolymers properties has received prominence for being easy extraction and purification. Chitosan has been an attractive proposition for applications in various fields such as engineering, biotechnology, medicine and pharmacology. For such applications, it is necessary purification of chitosan to obtain a product more concentrated and free of undesirable impurities. However, at this stage of the process of obtaining the biopolymer may occur morphological and physicochemical changes. This study evaluated the influence of the drying process after purification of a commercial chitosan sample and the importance of this step and its cost/benefit in applications requiring a high degree of purity. The method of drying influenced in the organoleptic properties and in the main characteristics of material. Analysis of the crystal structure by X-ray diffraction showed that the degree of crystallinity, X (%), in the purified chitosan samples was lower when compared with the unpurified sample. The degree of acetylation, DA (%), was analyzed by spectroscopy infrared with no significant changes on the three drying methods assessed, unlike the viscosimetric molecular weight, M_v, determined by capillary viscometry.

Keywords: *purification of chitosans, degree of crystallinity, degree of acetylation,* viscosimetric molecular weight, physical-chemical properties.

Introdução

A quitina é, depois da celulose, o biopolímero mais abundante na natureza. A quitosana é o seu principal derivado, produzida naturalmente por fungos *Macoraceae sp* [1]. Comercialmente, a quitosana é preparada por N-desacetilação química da quitina obtida a partir do processamento das cascas de crustáceos oriundas da indústria pesqueira sob fortes condições alcalinas [2]. Dependendo da natureza da fonte e das condições de extração da quitina, diferentes quitosanas podem ser obtidas, diferindo no tamanho (peso molecular médio, M_w) e grau de acetilação (GA). Tais parâmetros influenciam diretamente nas propriedades físico-químicas, polidispersividade (M_w/M_N), cristalinidade e/ou nos padrões de acetilação (P_A) [1], ou seja, na distribuição dos grupos acetil na cadeia polimérica. Sendo assim, quitosanas com diferentes propriedades podem ser obtidas, tornando-se um material versátil na confecção de produtos que atendam às necessidades específicas

de diversas áreas, tais como farmacêutica, biomédica, cosmética, tratamentos de água e proteção de plantas [3,4].

Para tais aplicações, a purificação torna-se uma importante etapa do processo para se obter um produto livre de impurezas indesejadas, sais remanescentes da desacetilação (principalmente acetato de sódio) e materiais insolúveis (tais como quitina insuficientemente desacetilada) [5]. Isso aumenta a capacidade de interação do material uma vez que mais grupos polares são disponibilizados. Entretanto, uma etapa a mais para a obtenção de um material onera custos à produção. Com base nessa perspectiva, o presente trabalhou visou a importância do método de secagem das quitosanas purificadas com base nos custos energéticos envolvidos nessa etapa. Foram utilizadas três metodologias diferentes após a purificação de uma amostra comercial de quitosana: secagem do material por liofilização, em temperatura ambiente e em estufa a 70 °C.

As amostras obtidas de cada processo foram avaliadas qualitativamente quanto as suas propriedades organolépticas e quantitativamente quanto a variações na viscosidade intrínseca ([η]) e grau médio de acetilação (GA) a fim de determinar a influência do processo de secagem nesses parâmetros. As análises foram feitas com uma quitosana da marca Aldrich, considerada como padrão analítico.

Experimental

Obtenção das quitosanas purificadas

A quitosana (CS) utilizada no presente trabalho é da marca Chitosan Brazil fornecida pela Tríade Soluções em Resíduos LTDA., localizada em Cananéia – SP. Os reagentes utilizados foram de grau analítico e usados conforme adquirido. Cerca de 10 g de quitosana, previamente tamisada em # 60 mesh, foram adicionados a 1 L de solução de ácido acético 1%. A suspensão foi mantida em agitador magnético à temperatura ambiente por aproximadamente 24h. Após esse período, a solução resultante foi filtrada a vácuo com filtro de porosidade 0,3 µm. A solução remanescente foi neutralizada com NH_4OH concentrado (pH ~ 12) para a precipitação da quitosana. A suspensão permaneceu em repouso, onde o sobrenadante foi retirado com auxílio de uma bomba e mais água destilada foi adicionada. Esse procedimento foi repetido até a obtenção da neutralidade do sobrenadante. O excesso de água do precipitado foi retirado com auxílio da bomba de vácuo e, em seguida, fracionado em três placas de Petri.

Secagem das amostras

Cada placa contendo a amostra recebeu um tratamento de secagem diferente. A primeira foi seca em liofilizador, à -40 °C sob vácuo; a segunda foi deixada sob a bancada, à temperatura ambiente média de 27 °C; e a terceira em estufa normal a temperatura média de 70°C. O tempo gasto em horas para a obtenção do material seco é mostrado na Tabela 1.

Tabela 1: Tempos de obtenção e o gasto energético do material seco.

AMOSTRA	MÉTODO DE SECAGEM	TEMPO (h)
CS 1	Liofilizador	~ 24 h
CS 2	Temperatura ambiente	~ 60 h
CS 3	Estufa a 70 °C	~ 24 h

Caracterizações

- *Difração de raios X*

As medidas de difração de raios X foram realizadas em difratômetro da marca Rigaku, modelo Multiflex, com radiação de CuKα (λ=1,54 Å) com potência de 40 kV, corrente de 20 mA, 2θ = 2° a 90°, ao passo de 1°/min.

As amostras foram comparadas quanto ao seu grau de cristalinidade, X (%), através da Eq. 1, onde I_o é a intensidade total do difratograma corrigido depois da subtração do background; Icr é a

intensidade do espalhamento cristalino; F_{cr} é a área do espalhamento cristalino; F_{am} é a área do espalhamento amorfo [6].

$$X = \int I_{cr}\, d\theta / \int I_o\, d\theta = F_{cr}/(F_{cr} + F_{am}) \qquad (1)$$

- *Espectroscopia na região do infravermelho*

As amostras foram trituradas com KBr na proporção de 1:100 m/m. As pastilhas foram confeccionadas com auxílio de uma prensa hidráulica e armazenadas em dessecador até o momento da leitura. As análises foram realizadas em espectrofotômetro da marca Thermo Scientific, modelo Nicolet 6700.

O grau médio de acetilação, GA (%) foi determinado a partir do aparecimento de bandas características nos espectros de absorção no IV (em 1320 cm^{-1} específica para N-acetil-glucasamina [amida] e em 1420 cm^{-1} usada como banda de referência para comparar quitina e quitosana) e pelas suas intensidades. Tal relação foi proposta por Brugnerotto et. al. [7], demonstrada pela Eq. 2. Essa curva foi escolhida para o tratamento dos dados devido a sua boa correlação linear (r = 0,99042). No entanto, esse é um método relativo uma vez que os dados GA (%) das diferentes amostras utilizadas pelos autores para construção da curva foram obtidos a partir de técnicas absolutas, tais como RMN ^{1}N, RMN ^{13}C e CP/MAS.

$$A_{1320}/A_{1420} = 0{,}3822 + 0{,}03133\ GA\ (\%) \qquad (2)$$

O espectro de absorção na Fig. 1 representa as linhas de base utilizadas para o tratamento dos dados em diferentes razões de absorbância testadas e mencionadas na literatura [7,8]. A razão A_{1320}/A_{1420} na Eq. 2 para cada amostra foi obtida através do programa computacional Origin Lab. 9.0 a partir do qual foi feito o cálculo da área das bandas referentes as linhas de base em destaque (b6 → A_{1320} e b9 → A_{1420}).

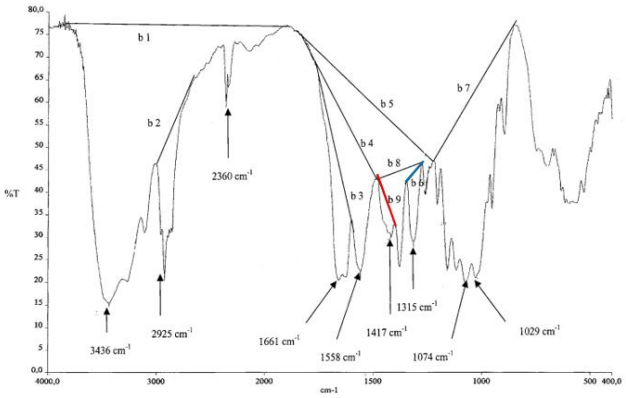

Figura 1: Representação das diferentes linhas de base testadas e mencionadas na literatura [7].

- *Viscosidade*

Para determinação da viscosidade intrínseca, [η], foi utilizado um viscosímetro capilar do tipo Cannon-Fenske (particle size 100). 0,100 mg de amostra purificada foi adicionado a 10 mL do sistema de solvente CH_3COOH 0,1 mol L^{-1}/ NaCl 0,2 mol L^{-1}. As diluições foram preparadas de forma tal que a viscosidade relativa, η_{rel}, fosse superior a 1,2. O tempo de escoamento foi medido com auxílio de um cronômetro à temperatura de 25,0 ± 0,1 °C. Foram feitas cinco leituras para o cálculo da média do tempo. Os termos de viscosimetria capilar estão relacionados de acordo com a Tabela 2 e, a partir deles, a viscosidade intrínseca de cada amostra foi determinada. A Eq. 3, conhecida como relação de Mark-Houwink, permitiu determinar a massa molar média viscosimétrica, M_v, das amostras, onde *k* é uma constante característica do polímero e depende da temperatura e do sistema de solvente e *a* é a constante característica da geometria da molécula. Os ensaios foram conduzidos nas mesmas condições propostas por Roberts et. al. [9] a fim de garantir o uso dessas constantes na equação, k = 1,81 x 10^{-3} cm^3 g^{-1} e a = 0,93.

$$[\eta] = k\,(M_v)^a \qquad (3)$$

Tabela 2: Definição de viscosidade.

Nome	Símbolo e definição	Unidades
Viscosidade relativa	$\eta_{rel} = t/t_o$	adimensional
Viscosidade específica	$\eta_{sp} = \eta_{sp} - 1$	adimensional
Viscosidade reduzida	$\eta_{red} = \eta_{sp} / C$	$[C^{-1}]$ = mL/g
Viscosidade inerente	$\eta_{inh} = \ln (\eta_{rel}) / C$	$[C^{-1}]$ = mL/g
Viacosidade intrínseca	$[\eta] = \lvert \eta_{sp} / C \rvert_{c\to 0} = \lvert \ln (\eta_{rel}) / C \rvert_{c\to 0}$	$[C^{-1}]$ = mL/g

Resultados e Discussão

As quitosanas secas foram padronizadas em tamis #60 mesh para as caracterizações. Além das diferenças na coloração, forma e tamanho dos grãos (Fig. 2), as amostras mostraram diferenças significativas nos seus principais parâmetros estudados, como mostra a Tabela 3, bem como os dados encontrados para a amostra padrão.

Figura 2: Amostras de quitosana purificadas e não purificada (da esquerda para direita: seca em temperatura ambiente, liofilizada e amostra não purificada).

Tabela 3: Valores dos principais parâmetros analisados: grau de cristalinidade, X (%), grau médio de acetilação, DA (%), viscosidade intrínseca, [η], e massa molar média viscosimétrica, M_v.

AMOSTRA	MÉTODO DE SECAGEM	X (%)	GA(%)	[η](mL g^{-1})	$M_v \times 10^4$ (g mol^{-1})
CS Aldrich	-	65,1	12,8	623	89,9
CS Chitosan Brazil	-	86,9	12,1	-	-
CS 1	Liofilizada	73,4	8,5	180	23,7
CS 2	Temp. amb.	58,1	8,4	325	44,6
CS 3	Estufa 70 °C	58,7	8,3	140	18,1

O grau de cristalinidade representa a fração cristalina presente no biopolímero. Na Fig. 3 é mostrado os difratogramas da quitosana Chitosan Brazil não purificada, do padrão Aldrich e das amostras purificadas. O método de purificação a partir da dissolução seguida de neutralização por solubilização promove uma diminuição significativa no percentual de cristalinidade devido a uma nova organização estrutural das cadeias diferente daquela adotada pelo polímero não purificado. Quanto ao tratamento de secagem adotado, os X (%) da amostra CS 2 e CS 3 tiveram valores próximos entre si e inferiores ao da amostra CS 1, o que leva a supor que a secagem por liofilização de certa forma preservou a estrutura cristalina da amostra não purificada devido ao processo de congelamento prévio, o que não ocorre nas outras duas metodologias de secagem avaliadas.

Os picos que apareceram no difratograma da amostra não purificada são referentes a impurezas contidas no material, o que garante que o processo de purificação adotado foi eficiente, independente do processo de secagem, pois os difratogramas das quitosanas purificadas no presente trabalho mostraram-se similares ao difratograma do padrão analisado.

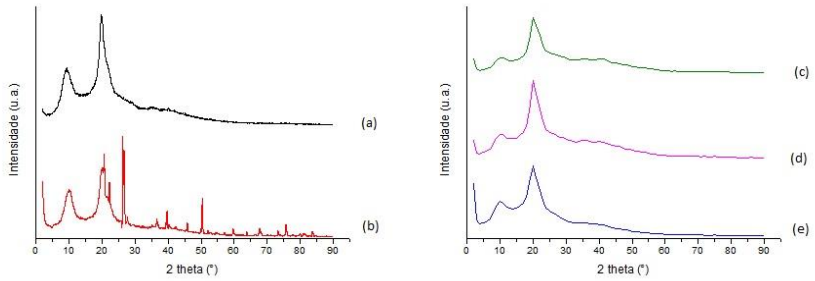

Figura 3: Difratogramas de raios X: (a) quitosana Aldrich; (b) quitosana Chitosan Brazil; (c) quitosana seca na estufa; (d) quitosana seca à temperatura ambiente; (e) quitosana liofilizada.

Os espectros de absorção no infravermelho das amostras analisadas no presente trabalho são mostrados na Fig. 4, onde as bandas características são muito semelhantes aquelas descritas na referida literatura [7]. Independentemente do método adotado na secagem da quitosana purificada, os espectros das amostras secas não apresentaram diferenças significativas.

A quitosana que deu origem as amostras purificadas, CS Chitosan Brazil, apresentou um GA (%) um pouco maior que o das amostras purificas, enquanto que para estas o GA (%) praticamente não variou. Este fato pode ser atribuído a presença de cadeias de quitina não desacetilada na amostra não purificada, eliminadas durante o processo de purificação, onde estas ficaram retidas no filtro, uma vez que quitina não se solubiliza em meio ácido.

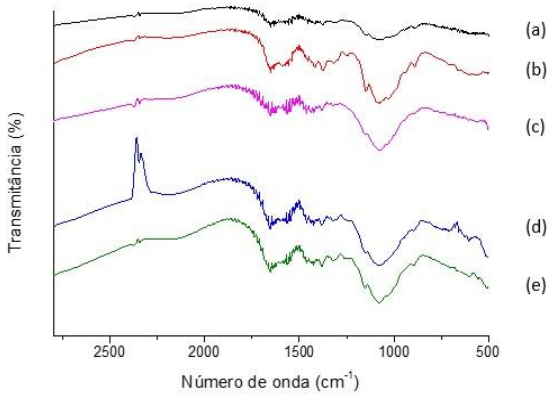

Figura 4: Espectros de absorção na região do infravermelho: (a) quitosana Aldrich; (b) quitosana Chitosan Brazil; (c) quitosana seca à temperatura ambiente; (d) quitosana liofilizada; (e) quitosana seca em estufa.

A massa molar de polímeros é comumente determinada pela viscosimetria. Neste trabalho, foi empregada a técnica de viscosimetria capilar, onde as medidas foram feitas com base no tempo de escoamento do solvente e das soluções diluídas das quitosanas analisadas, sendo, portanto, um método relativo.

A Fig. 5 mostra as curvas de viscosidade reduzida (η_{red}) em função da concentração das soluções do padrão e das amostras purificadas. O grau de pureza da amostra Chitosan Brazil não foi fornecido, sendo necessário para o cálculo da concentração real da solução e, por isso, a sua curva não foi obtida. A partir da extrapolação da região de linearidade à diluição infinita a viscosidade intrínseca, [η], foi determinada, satisfazendo a relação de Mark-Houwink (Eq. 3).

As três técnicas de secagem utilizadas variam muito de uma para outra, principalmente em termos de temperatura de processo, influenciando diretamente na [η] e, consequentemente, na determinação da M_v. A retirada da água na liofilização se deu a temperatura aproximada de -40 °C e por sublimação; na temperatura ambiente foi em torno de 27 °C (temperatura média dos dias em que ocorreram os ensaios) e na estufa foi a 70 °C, ambas por evaporação. Aparentemente, quando nenhum tratamento térmico é adotado, as cadeias poliméricas se preservam, o que justifica o fato da quitosana purificada seca em temperatura ambiente ter apresentado uma maior [η] e M_v, enquanto

que, tanto para a mostra liofilizada quanto para a amostra seca em estufa, esses valores foram menores e próximos entre si. Este fato é um indicativo de que a retirada de água por ambos os métodos pode causar fragmentação das cadeias poliméricas, contribuindo para a diminuição de tais valores. No caso da liofilização, é possível que durante o estágio de congelamento as tensões provocadas pela cristalização da água pudessem quebrar as cadeias do biopolímero. Já para a secagem em estufa, essa quebra poderia ter ocorrido por degradação térmica.

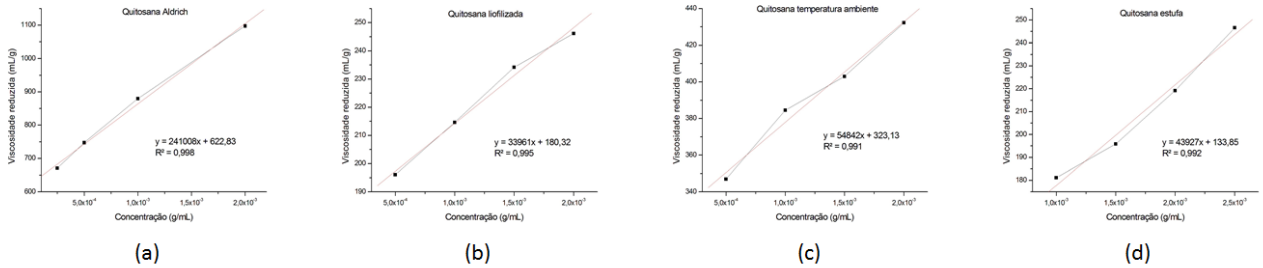

Figura 5: Curvas de viscosidade reduzida *versus* concentração das amostras de quitosana padrão e purificadas (a) quitosana Aldrich; (b) quitosana liofilizada; (c) quitosana seca à temperatura ambiente; (d) quitosana seca na estufa.

Conclusões

As técnicas utilizadas na caracterização das amostras mostraram diferenças significativas em relação ao processo de secagem adotado. O processo de purificação se mostrou efetivo ao eliminar impurezas indesejadas, tais como sais remanescentes do processo de desacetilação e quitina não desacetilada.

Embora o GA (%) não tenha variado significativamente em função do método de secagem, o X e a M_v apresentaram variações que acarretam diferenças estruturais e morfológicas ao produto final e, consequentemente, às suas propriedades.

Quanto aos custos de processamento, é nítido que a secagem da amostra a temperatura ambiente se mostra mais viável do que os demais métodos utilizados. Entretanto, a relação custo/benefício irá depender da aplicação a que se destina o proposto material e da demanda industrial.

Agradecimentos

À Fundação Pátria pelo fomento fornecido a esse trabalho.
Ao CQMA-IPEN pela disponibilidade da infraestrutura.

Referências Bibliográficas

[1] J. Kumirska; M. Weinhold; J. Thoming; P. Stepnowski. *Polymers* 2011, *3*, 1875-1901.
[2] M. Battisti; S. Campana-Filho. *Química Nova* 2008, *31*, 2014-2019.
[3] G. Roberts; *Chitin Chemistry*,The Macmillan Press Ltd, 1992.
[4] V. V. C. Azevedo; S. A. Chaves; D. C. Bezerra; M. V. Lia Fook; A. C. M. F. Costa. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos* 2007, 2.3, 27-34.
[5] F. Barros; R. Cavalcante; T. Carvalho; F. Dias; D. Queiroz; L. Vasconcellos; R. Nascimento. *Revista Iberoamericana de Polímero* 2006, *7(4)*, 232-246.
[6] M. Ioelovich. *Journal of Chemistry*, 2014, *3(3)*, 7-14.
[7] J. Brugnerotto; J. Lizardi; F. Goycoolea; W. Arguelles-Monal; J. Desbrières, M. Rinaudo. *Polymer*, 2000, *42*, 3569-3580.
[8] Y. Shigemasa; H. Matsuura; H. Sashiwa; H. Saimoto *Int. J. Biol. Macromol.* 1996, 18, 297-242.
[9] G. Roberts; J. Domszy. *Int. J. Biol. Macromol.*, 1982, *4*, 374-377.