

Metodologia simplificada para preparação de biofilmes de quitosana

Simplified methodology for preparing chitosan biofilms

Guilherme Dilarri⁽¹⁾Carolina Rosai Mendes⁽²⁾Amarildo Otavio Martins⁽³⁾

Resumo. A busca por tecnologias alternativas e sustentáveis tem se tornado cada vez mais necessária. Muitas dessas novas tecnologias já são estudadas e avaliadas por diversos centros universitários brasileiros. A quitosana é um biopolímero, derivada de fontes renováveis, sendo o potencial substituto para muitos polímeros sintéticos, possuindo diversas aplicações comerciais, sendo um dos biopolímeros mais estudados do Brasil. Muitos laboratórios e centros de ensino, porém, não possuem equipamentos ou condições para estudar esse biopolímero. Desta forma, o objetivo do trabalho foi desenvolver uma metodologia simplificada e de baixo custo para a preparação de biofilmes de quitosana. Vários centros de ensino e laboratórios poderão produzir esse biopolímero, contribuindo, desta maneira, para a disseminação do conhecimento e estudo sobre esse material em vários âmbitos. Com esta finalidade, o experimento foi realizado com alterações na preparação inicial do gel de quitosana, modificando a quantidade e concentração do ácido usado, além da alteração do tempo necessário para a formação completa do gel de quitosana, utilizando poucos recursos e materiais laboratoriais. Além da alteração na metodologia de confecção do gel, o trabalho apresentou um molde de filme em polietileno sobreposto em placa de Petri para a formação dos biofilmes, sendo uma alternativa aos moldes de Teflon®, diminuindo os custos. Os biofilmes formados apresentaram características regulares, similares a outros biofilmes de quitosana confeccionados de formas mais elaboradas. Comprova-se, assim, a eficiência da metodologia elaborada neste trabalho para a confecção de biofilmes

de quitosana. **Palavras-chave:** Biopolímero; método alternativo; preparo de biofilmes.

Abstract. The search for alternative and sustainable technologies has become increasingly necessary. Many of these new technologies have been studied and evaluated by several Brazilian universities. Chitosan is a biopolymer derived from renewable sources and the potential replacement for many synthetic polymers, having various commercial applications; it is one of the most studied biopolymers in Brazil. However, many laboratories and learning centers do not have equipment or conditions to study this biopolymer. Therefore, the present study points out a simplified and low cost methodology for the preparation of chitosan biofilms; thus, various learning centers and laboratories could produce this biopolymer, contributing to the dissemination of knowledge and study of this material in several areas. For such purpose, the experiment was performed with changes in the initial preparations of chitosan gels, modifying the amount and concentration of acid used, and changes in time required to complete chitosan gel formation, with the use of few resources and laboratory materials. Besides the technical change to make the gel, the work presents a cast polyethylene film overlaid on a Petri dish for the formation of biofilms, being an alternative to Teflon® molds, with cost reduction. Biofilms produced had regular features, similar to other chitosan biofilms made more elaborately. We have proved, then, the efficiency of the developed methodology for chitosan biofilms preparation. **Keywords:** Biopolymer; alternative methodology; biofilms preparation.

⁽¹⁾ Aluno de Graduação do curso de Ciências Biológicas da UFSCar. Atualmente realiza pesquisas na UFSCar, atuando em dois grupos de pesquisa da instituição, sendo eles o Grupo de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM), e o Núcleo de Estudos Ambientais UFSCar - NEA/UFSCar. É bolsista do CNPq na categoria de Iniciação Tecnológica. Correspondência: Rod. Anhanguera, km 174, Araras - SP; e-mail: dilarri@hotmail.com

⁽²⁾ Aluna de graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas da UFSCar *campus* Araras. Atualmente atua no NEA/UFSCar desenvolvendo pesquisas relacionadas à despoluição ambiental e biotecnologia ambiental.

⁽³⁾ Professor Adjunto da UFSCar. Professor e Orientador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental (UFSCar/Sorocaba).

(Recebido em: 08 mai. 2014; aceito em: 12 jun. 2014; publicado em: 14 jul. 2014).

1 Introdução

Cada vez mais se torna necessário o uso de recursos alternativos e renováveis, diminuindo os impactos ambientais causados pelo homem, buscando tecnologias mais sustentáveis. A quitosana é o se-

gundo polissacarídeo mais abundante da natureza; é encontrado nos crustáceos, em exoesqueletos de alguns insetos e na parede celular de muitos fungos e algas (HUERTA *et al.*, 2012). A quitosana é um biopolímero estruturado por ligações β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose, derivado da desacetilação da quitina, que é constituída de unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose unidas por ligações β -(1 \rightarrow 4).

A quitosana possui propriedades singulares devido ao grau de desacetilação submetida e a massa molecular do biopolímero; conseqüentemente, os biofilmes de quitosana também terão propriedades intrínsecas de acordo com o tipo de quitosana inicial utilizada. Desse modo, cada tipo de quitosana possui um preparo diferencial na formação de biofilmes. A qualidade e as propriedades da quitosana final, tais como pureza, viscosidade, grau de desacetilação, massa molecular e estrutura polimorfa podem variar grandemente dependendo das condições em que a reação ocorre (SANTOS, 2006).

Existem diferentes metodologias na preparação de biofilmes de quitosana, sendo alguns preparos complexos e difíceis, descritos por Mark (1990), Dureja e colaboradores (2001), Nunthanid (2001), Zhang e colaboradores (2002); cada uma dessas técnicas agrega características diferentes nos biofilmes formados. Os filmes de quitosana Tipo Base de Schiff modificados por Huerta e colaboradores (2012) é um exemplo de modificação na formação de biofilmes de quitosana, fazendo com que esta tenha propriedades únicas, diferentemente dos demais biofilmes.

Muitos centros universitários brasileiros (UFSCar, UFSC, UFRN, UFC, UFPE e USP) realizam pesquisas utilizando biofilmes de quitosana e analisando suas aplicações, já que esses biofilmes são derivados de fontes inesgotáveis e renováveis, como casca de camarão, exoesqueleto de alguns insetos e parede celular de fungos e algas, com diversas aplicações, sendo, também, potenciais substitutos para vários polímeros sintéticos.

A produção global anual de cascas de camarão, lagostins, lagostas, caranguejos etc., calculada em peso seco, está estimada em 1,44 milhões de toneladas (KNORR, 1991).

Por ser um polímero, a quitosana possui um potencial de aplicação multidimensional desde aplicações na área alimentícia a aplicações em nutrição, biotecnologia, ciências dos materiais, drogas e produtos farmacêuticos, agricultura e proteção ambiental; recentemente, também na terapia genética (AZEVEDO *et al.*, 2007).

As proporções de participação no mercado mundial da quitosana são: 50% nutracêuticos, 17% agentes floculantes, 10% usos em alimentos, 5% uso em cosméticos, 5% agricultura, 6,5% nas indústrias têxteis e de papel e 6,5% na indústria farmacêutica e médica (KRISTBERGSON, 2003).

Outra característica importante deste biopolímero é a sua degradabilidade. Pode-se afirmar que a biodegradabilidade não é apenas um requerimento funcional, mas também um atributo ambiental muito importante (KESTER & FENNEMA, 1986). Vikhoreva e colaboradores (2002) concluíram que os biofilmes de quitosana atingem a biodegradação no solo no período de cinco a sete dias, sem impactos ambientais.

Muitos centros de ensino, como escolas técnicas e de ensino médio, não possuem acesso a materiais adequados para modificações poliméricas e biopoliméricas, não podendo, assim, realizar estudos e pesquisas com estes materiais.

A quitosana é um dos polímeros mais estudados no Brasil, porém a falta de metodologias simples para a sua modificação e confecção de materiais poliméricos dificulta a difusão de conhecimento e estudos destes materiais em vários centros de ensino.

O objetivo deste trabalho é criar uma metodologia simples, utilizando materiais de fácil aquisição, de forma a ser facilmente reproduzida em qualquer ambiente didático. O trabalho contribui, desta forma, para a formação educacional em laboratórios didáticos com baixos recursos, de forma a ampliar o conhecimento sobre biopolímeros, especificamente a quitosana, uma possível alternativa tecnológica para a substituição de polímeros feitos a base de fontes não renováveis a custos elevados.

2 Materiais e métodos

2.1 Quitosana

A quitosana utilizada no desenvolvimento deste trabalho foi adquirida da empresa Purifarma (São Paulo – SP), sendo derivada da casca de camarão com as seguintes características físico-químicas: 90% de grau de desacetilação (correspondentes a $5,6 \cdot 10^{-3}$ mols de grupos amino por grama de biopolímero), granulometria de 80 mesh, pH de 7,5 e densidade de $0,38 \text{ g.mL}^{-1}$ (MARTINS, 2005).

O preço da quitosana pode variar conforme a empresa fornecedora. O preço cotado para a quitosana no respectivo experimento é de R\$ 52,00/500 g de pó de quitosana. A quitosana pode ser facilmente adquirida, sendo vendida por várias empresas como a Purifarma Ltda., Polymar S.A., Bionatus Ltda., Tiaraju Ltda., entre outras empresas que vendem quitosana no mercado nacional.

2.2 Preparação do gel de quitosana

Para a preparação do gel de quitosana dissolveram-se 2 g de quitosana em 100 mL de ácido acético a 5% (5 mL de CH_3COOH em 95 mL de H_2O). Ao colocar quitosana no ácido acético é necessário misturar a solução com um bastonete de vidro até que toda quitosana seja misturada com o ácido. Em seguida, a solução formada seguiu em agitação constante durante 24 horas, sendo tampada para evitar a volatilização da solução ácida durante o período. Na ausência de agitador magnético, foi testada uma forma alternativa de preparação do gel de quitosana: dissolveram-se 2 g de quitosana em 120 mL de ácido acético 5% (5 mL de CH_3COOH em 95 mL de H_2O). A mistura formada foi agitada manualmente com um bastonete de vidro até o ponto de homogeneização, quando não mais havia a presença de grumos do biopolímero observado visualmente. Neste ponto, todo o pó de quitosana encontrava-se dissolvido no ácido, formando o gel inicial de quitosana. Em seguida, a solução foi deixada sobre repouso por um período de 48 horas, tampada e na ausência de luz para evitar o aquecimento e catalisação das reações químicas de hidrólise das moléculas de quitosana. Este período de repouso é necessário para a formação completa do gel.

2.3 Preparação das superfícies para formação de biofilme

Os biofilmes de quitosana geralmente são formados em moldes com superfícies de Teflon®, facilitando sua retirada.

O vidro é um material inapropriado para a formação do biofilme; isto se deve à superfície do vidro que contém silanóis em suas terminações Si-OH, os quais têm uma interação muito forte com os grupos amino da quitosana, além da interação da sílica por afinidade com relação aos grupos OH do biopolímero, dificultando a retirada; conseqüentemente, ocorre o rompimento ou má formação do biofilme (HUERTA *et al.*, 2012).

Desta forma, o experimento utilizou dois moldes para a formação do biofilme de quitosana. Um deles foi um molde de Teflon® apropriado para a preparação dos biofilmes.; o outro foi um molde preparado utilizando vidro (placa de Petri) e polietileno. Este último molde torna-se uma forma alternativa para laboratórios didáticos.

Utilizaram-se placas de Petri preenchidas com um filme de polietileno para que não houvesse a interação do biofilme de quitosana com a superfície de vidro, servindo como suporte para a formação do biofilme. O material plástico de polietileno é facilmente comprado em mercados (utilizado para envolver alimentos).

2.4 Confeção dos biofilmes de quitosana

Depois de realizadas todas as outras etapas, o gel foi adicionado com uma bureta de 20 mL de titulação nos seus respectivos moldes (placas de Petri contendo os filmes de polietileno), com uma altura de aproximadamente 3,5 mm na placa de Petri, titulando-se 20 mL do gel em cada placa.

Em seguida, os moldes devem ser secados em temperatura ambiente na ausência de luz. O período de secagem pode variar, dependendo da temperatura ambiente e da umidade relativa. No entanto, o mes-

mo processo pode ser reproduzido em estufa controlada a 30°C. Após o período de secagem, os biofilmes de quitosana foram separados do polietileno.

2.5 Neutralização dos biofilmes

Após a secagem, os biofilmes recém-formados apresentavam um potencial hidrogeniônico (pH) ácido, devido à solução de ácido acético utilizado para a obtenção do gel; portanto, fez-se a neutralização com a imersão dos biofilmes em uma bacia plástica contendo água destilada. Rapidamente, os biofilmes eram retirados e colocados para secar em temperatura ambiente. A quitosana é facilmente rompida ao entrar em contato com a água, por isso esse processo deve ser meticuloso para não causar sua fragmentação ou deformação. A reticulação que envolve ligações cruzadas nas cadeias biopoliméricas é uma alternativa para aumentar a resistência e tenacidade.

3 Resultados e discussão

O gel preparado utilizando-se a metodologia proposta apresentou boa viscosidade, além de fácil homogeneização. As concentrações utilizadas foram ideais para a formação do gel de quitosana, sem a necessidade de agitação magnética, sendo que o gel formado apresentou as mesmas características de outros géis de quitosana confeccionados de formas diferentes (MARUCA *et al.*, 1982; MARK, 1990; MARTINS, 2005). Cada gel de quitosana irá variar nas suas propriedades devido à característica inicial da própria quitosana utilizada, sendo que alguns géis devem passar por processos de filtração e adição de outros reagentes (DIAS *et al.*, 2008). Entretanto, o gel formado no experimento, com concentração e volume maior de ácido acético (CH_3COOH) e tempo de repouso prolongado, demonstrou não haver a necessidade de filtração ou adição de outros reagentes, apresentando características de viscosidade regulares, produzindo um biofilme com propriedades físicas e estruturais para diferentes tipos de aplicações.

As superfícies moldadas com polietileno (Fig. 1) também se mostraram uma forma alternativa como molde para a confecção dos filmes de quitosana. Sua preparação deve ser meticulosa, evitando ao máximo más formações ou ondulações na superfície; essa técnica, porém, possibilita a formação de biofilmes de quitosana com vários moldes diferentes, não apresentando o problema de aderência no vidro, facilitando sua retirada sem se romper do molde (Fig. 2).



Figura 1. Superfícies de placas de Petri moldadas com polietileno para a formação e secagem dos biofilmes de quitosana.

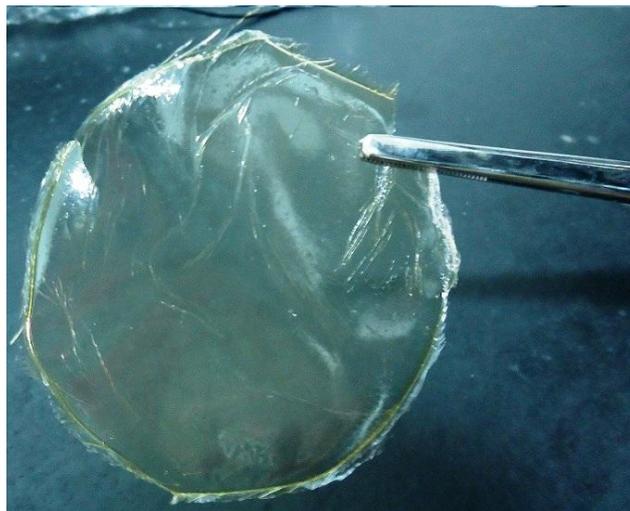


Figura 2. Biofilme de quitosana confeccionado nas placas de Petri com polietileno. O biofilme não apresentou nenhum rompimento pela retirada do molde.

A estrutura elaborada com filmes de quitosana suportado em polietileno apresentou uma remoção por decalque similar ao destaque de figuras adesivas; isso ocorre devido à estrutura da quitosana (Fig. 3), cujas interações de grupos funcionais não são formadas, gerando duas camadas distintas facilmente destacadas.

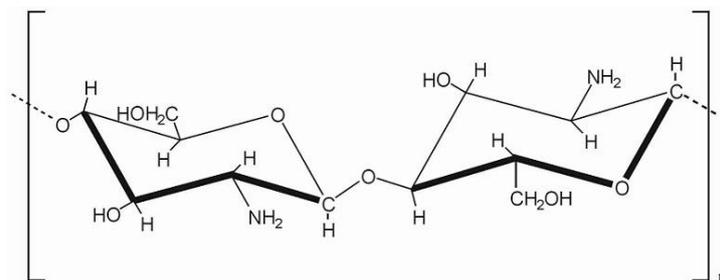


Figura 3. Estrutura química da quitosana.

Mesmo com a superfície de Teflon® é necessário ter cuidado quando da remoção para não danificar o biofilme; os custos para a obtenção de placas de Teflon® são maiores ao se comparar com os moldes apresentados neste trabalho.

As propriedades físicas dos biofilmes de quitosana formados nos moldes de Teflon® descritas por Huerta e colaboradores (2012) são similares às estruturas físicas dos biofilmes formados nos moldes revestidos com polietileno, não apresentando nenhuma irregularidade ou má estruturação que desqualifique os biofilmes de quitosana confeccionados desta forma.

Uma desvantagem da técnica é que qualquer dobramento do filme de polietileno será uma deformação presente no biofilme de quitosana; com isso, toda a preparação do molde com polietileno deve ser precisa e minuciosa, evitando essas más formações.

Todos os biofilmes confeccionados por esta metodologia apresentaram as mesmas características, com propriedades regulares, demonstrando que esta técnica é reprodutível.

O biofilme lavado com água destilada também apresentou propriedades regulares similares aos biofilmes não lavados. Apesar disso, destacaram-se características singulares, tais como a mudança de coloração, sendo que o filme lavado com água destilada apresentou uma transparência maior que o biofilme não lavado (Fig. 4).



Figura 4. Comparação dos biofilmes de quitosana neutralizados (à esquerda) e não neutralizados (à direita) com água destilada.

Outra característica importante é a redução do pH ácido inicial do biofilme, sendo que muitas vezes esse pH ácido pode ter efeitos negativos ou insatisfatórios no uso do biofilme em certas aplicações. Tentativas preliminares em reduzir o pH da solução de quitosana resultaram na formação de géis não satisfatórios para revestimento (ASSIS *et al.*, 2002). A imersão e retirada do biofilme em água destilada demonstraram ser possíveis alternativas para neutralizar o pH do biofilme de quitosana.

4 Considerações finais

Os biofilmes formados neste trabalho apresentaram características similares a outros biofilmes confeccionados de formas mais elaboradas, mostrando uma regularidade em suas principais características.

Mesmo sendo simples, este método provou ser eficiente, produzindo biofilmes regulares, com características importantes como transparência, neutralidade de pH, sendo essas características importantes para aplicações tecnológicas.

O experimento também pode ser usado em aulas práticas de ensino médio e técnico, já que necessita de um mínimo de recursos e todos os materiais podem ser facilmente adquiridos. Portanto, este trabalho apresenta uma metodologia simples e de fácil reprodução para a preparação de biofilmes de quitosana.

5 Agradecimentos

Os autores agradecem ao NEA/UFSCar (Núcleo de Estudos Ambientais – UFSCar) pelo apoio financeiro e estrutura para a realização e desenvolvimento do experimento, incentivando a pesquisa e a extensão.

Referências

ASSIS, O. B. G.; VIEIRA, D. C.; BERNARDES-FILHO, R.; CAMPANA-FILHO, S. P. AFM characterization of chitosan self-assembled films. **International Journal of Polymeric Materials**, v. 51, n. 7, p. 633-638, 2002.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA-FOOK, M. V.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista electronica de materiais e processos**, v. 23, p. 27-34, 2007.

DIAS, F. S.; QUEIROZ, D. C.; NASCIMENTO, R. F.; LIMA, M. B. Um sistema simples para preparação de microesferas de quitosana. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 160-163, 2008.

DUREJA, H.; TIWARY, A.; GUPTA, S. Simulation of skin permeability in chitosan membranes. **Journal of Controlled Release**, v. 213, p. 193-198, 2001.

- HUERTA, A. C.; RICÓN, M. C.; INCIARTE, A. C. V.; LÓPEZ, A. Obtención y caracterización de película de quitosano elaborado a partir de los desechos de la industria cangrejera. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 13, n. 3, p. 77-88, 2012.
- KESTER, J. J.; FENNEMA, O. Edible films and coatings: A review. **Food Technology**, v. 40, n. 12, p. 47-59, 1986.
- KNORR, D. Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. **Food Technology**, v. 45, p. 114-122, 1991.
- KRISTBERGSON, K.; EINARSSON, J. M.; HAUSSON, S. P.; GILLASION, J. **Recent Developments in deacetylation of chitin, and possible applications in food formulations**. New York: Print Current Journal, 2003.
- MARK, C. **Handbook of industrial membrane technology**. New Jersey: Westwood, 1990.
- MARUCA, R.; SUDER, B. J.; WIGHTMAN, J. P. Interaction of heavy metals with chitin and chitosan. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 27, p. 4827, 1982.
- MARTINS, A. O. Síntese, caracterização e aplicação analítica do biopolímero quitosana funcionalizado com quelantes hidroxibenzopiridínicos. **Tese** (Doutorado em Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Florianópolis, 2005.
- NUNTHANID, J. Physical properties and molecular behavior of chitosan films. **Drug Delivery Ind. Pharmaceutics**, v. 27, n. 2, p. 143-157, 2001.
- SANTOS, C. A. N. S. Propriedades de filme de quitosano – Influência do grau de acetilação e da massa molecular do biopolímero. **Dissertação** (Mestrado em Química e Qualidades dos Alimentos). Universidade de Aveiro, Departamento de Química, Aveiro, 2006.
- ZHANG, M. *et al.* Properties and biocompatibility of chitosan film modified by blending with PEG. **Biomaterials**, v. 23, p. 2641-2648, 2002.

Como citar este artigo científico

DILARRI, G.; MENDES, C. R.; MARTINS, A. O. Metodologia simplificada para preparação de biofilmes de quitosana. *Scientia Vitae*, vol. 2, n. 5, ano 2, jul. 2014, p. 63-69. Disponível em: <www.revistaifpsr.com/>; acesso em: __/__/__.