

PRODUÇÃO DE NANOCRISTAIS DE QUITINA COMO AGENTE DE REFORÇO MECÂNICO EM HIDROGÉIS

Palavras-Chave: Nanoquitina, Hidrogéis, Reologia

Autores(as):

André Taveira de Freitas e Alceu de Assis, IQ – UNICAMP

Guilherme Henrique Vedovello Silva, IQ – UNICAMP

Prof^(a). Dr^(a). Watson Loh (orientador), IQ – UNICAMP

INTRODUÇÃO:

Polissacarídeos são macromoléculas compostas por unidades repetitivas glicosídicas, sendo os polímeros naturais mais abundantes do planeta, produzidos em diversos organismos, como plantas, algas, crustáceos e bactérias^[1] e possuindo diferentes funções biológicas como sustentação, adesão, estoque de energia e comunicação celular^[2]. O polissacarídeo de maior abundância é a celulose, que é o componente majoritário em diversas plantas e possui funções biológicas vitais.^[3] O segundo polissacarídeo mais abundante no planeta é a quitina, que pode ser encontrada principalmente nos exoesqueletos de crustáceos^[4,5], e também em insetos e bactérias, possuindo funções estruturais nestes organismos. A quitina se organiza de maneira hierárquica, em que as cadeias interagem fortemente por ligações de hidrogênio e de van der Waals, formando fibrilas nanométricas que contém regiões amorfas e cristalinas. A interação na escala nanométrica das cadeias de quitina resulta em estruturas helicoidais (estrutura de Bouligand), que, quando combinadas resultam na cutícula quitinosa de crustáceos e insetos, conferindo grande rigidez para o exoesqueleto dessas espécies.^[4]

Apesar de possuírem estruturas químicas similares, a troca da hidroxila presente no carbono 2 da celulose por um grupo acetilamino permite a realização de modificações químicas simples na quitina, como a deacetilação parcial desses grupos, resultando em grupos amino (NH_2) protonáveis em meios ácidos. A deacetilação de 50% ou mais da quitina leva à formação de seu principal derivado, a quitosana,^[6] que possui unidades acetiladas e deacetiladas, randomicamente distribuídas.^[1]

A quitina apresenta regiões amorfas e cristalinas e, dependendo do tratamento aplicado ao material, pode-se obter diferentes tipos de nanoquitina. Ao remover as partes amorfas, deixando somente as regiões cristalinas, obtém-se os nanocristais de quitina (ChNC), que são bastões nanométricos rígidos que podem ter sua superfície carregada positiva e/ou negativamente para promover estabilidade coloidal da dispersão. O tratamento mecânico, sem a remoção das regiões amorfas, forma as nanofibrilas de quitina, que possuem estrutura flexível e podem formar hidrogéis em baixas concentrações. Ambos os nanomateriais podem ser usados como agentes de reforço mecânico em hidrogéis, otimizando propriedades como resistência mecânica e módulo de armazenamento (G').^[7] Este projeto teve como objetivo otimizar a síntese dos nanocristais de quitina bem como caracterizar esses cristais e aplicá-los em hidrogéis para avaliar as mudanças de suas propriedades mecânicas.

METODOLOGIA:

Purificação da quitina comercial:

A quitina comercial foi purificada com ácido clorídrico (HCl) 1M por 20 minutos, sob aquecimento a 45°C e agitação constante. Após o tratamento ácido, a quitina e a solução ácida foram separadas por centrifugação. Após a centrifugação, a quitina foi lavada algumas vezes com água deionizada. Feita a lavagem, a quitina foi tratada com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1M por 4 horas sob aquecimento a 45°C e agitação constante. Após os tratamentos de purificação, a quitina foi levada para o liofilizador por cerca de 3 dias.

Deacetilação parcial:

O volume de reagentes, massa de quitina utilizada e tempo de reação foram otimizadas com base em metodologias descritas na literatura.^[8] A quitina purificada foi tratada com uma solução 30% (m/V) NaOH em água ultrapura. A reação foi feita em um Erlenmeyer vedado, que foi aquecido até uma temperatura de 90°C com o uso de uma chapa de aquecimento, sob agitação constante por 4 horas. Após o término da reação de deacetilação, o volume total da mistura contendo quitina e solução de NaOH foi fracionado em tubos de centrifugação, que foram levados para a centrífuga. A quitina precipitada foi lavada algumas vezes com água deionizada para remover o excesso da solução alcalina restante. A lavagem com água foi feita até que se notasse uma redução do pH do meio e, após isso, o pH foi ajustado para cerca de 3-4, pingando-se algumas gotas de solução de HCl 8%.

Preparo dos nanocristais:

A quitina dispersa em meio ácido foi levada para o ultrassom de ponteira (sonda) com 550 W de potência e amplitude de 40%. Foram feitos testes de preparo dos nanocristais utilizando diferentes tempos de exposição às ondas de ultrassom, de forma que foram testados tempos de 20, 40, 50 e 60 minutos de exposição. Para que não houvesse aquecimento do sistema foram utilizados pulsos de ultrassom com duração de 1 minuto, seguido de 1 minuto com ultrassom desligado. A etapa seguinte consistiu em centrifugar a dispersão de quitina após a exposição ao ultrassom e isolar a fase contendo os nanocristais. A porção contendo os cristais foi levada para diálise ácida (pH = 3-4) por três dias.

Espalhamento dinâmico de luz (DLS):

Uma alíquota de 1,5mL de cada amostra da dispersão de ChNC foi separada e lavada para análise, onde foi feita a medida da carga superficial por potencial Zeta e do tamanho aparente dos cristais, sendo o tamanho aparente determinado pela diferença entre os tempos de perda de correlação.

Microscopia de força atômica (AFM):

Para a realização das imagens por AFM foi calculada a concentração dos cristais nas dispersões por gravimetria. Após o cálculo da concentração uma alíquota de 1mL foi separada e diluída até um valor de concentração de 0,00025% (concentração ótima para se obter as imagens por AFM). A topografia das amostras foi examinada utilizando FlexAFM com C3000 controller operando sob atmosfera seca. Foram utilizadas micas como substrato no preparo das amostras.

Determinação de densidade de carga dos cristais:

Uma titulação foi realizada usando uma alíquota de 10mL da dispersão de ChNC e como titulante uma solução 0,01 mol/L de NaOH, com o objetivo de calcular a densidade de carga presente na amostra. Antes de se iniciar a titulação, a amostra foi saturada com ácido clorídrico até pH = 2,5, em seguida adicionou-se a base lentamente.

Preparo dos hidrogéis:

No preparo dos hidrogéis foram utilizados dois polímeros, sendo eles hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) K15M e carboximetilcelulose (CMC). Para a HPMC utilizou-se uma massa de 4% de polímero em relação à massa total de hidrogel, já para a CMC a massa utilizada foi de 3,5% de polímero. O preparo consistiu em pesar a massa de polímero em relação à massa total final e adicionar água quente (no caso da HPMC, por ser um polímero responsivo a temperatura) ou água na temperatura ambiente (no caso da CMC). Feito isso foi feita a agitação mecânica do sistema até que houvesse completa solubilização dos polímeros em água. Para a incorporação dos nanocristais foi feito um cálculo da concentração de cristais a ser adicionada em relação à massa de polímero usada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Determinação de densidade de carga dos cristais:

A curva de titulação (Figura 1) mostra duas inflexões: a primeira indica a neutralização do excesso de ácido e a segunda, a desprotonação dos grupos NH_3^+ da quitina. A densidade de carga dos nanocristais foi calculada pela

diferença entre os volumes correspondentes a essas inflexões, multiplicada pela concentração da base. Dividindo-se o número de mols obtido pela massa liofilizada da amostra, foi encontrada uma densidade de carga de 3,79 mmol/g, valor em concordância com a literatura^[8].

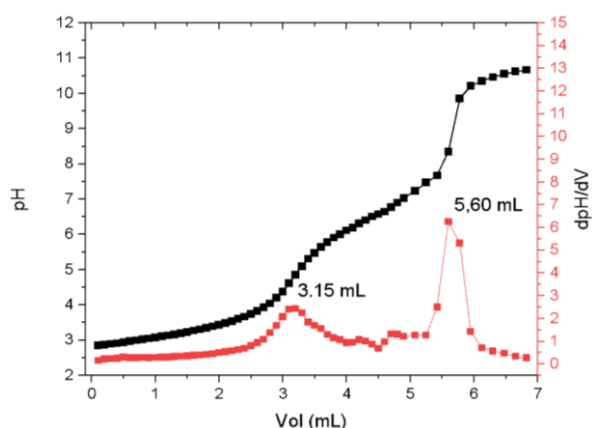


Figura 1. Curva de titulação da ChNC. Possível identificar duas inflexões, uma relacionada ao consumo do ácido e a outra a desprotonação de grupos NH_3^+ .

Potencial Zeta, tamanho aparente e perda de correlação:

Foi utilizado o equipamento Zetasizer (Malvern) para medir o potencial Zeta e o tamanho aparente das partículas. O potencial Zeta médio foi de 37 mV, indicando uma dispersão estável. Como o modelo do equipamento assume partículas esféricas, os valores de tamanho são apenas estimativas. Para avaliar o efeito do tempo de ultrassonicação no tamanho dos cristais foi construído um gráfico do coeficiente de correlação em função do tempo para cada amostra. Analisando a Figura 2 é notável que, aumentando o tempo de exposição ao ultrassom, há a formação de partículas que perdem correlação mais rapidamente, indicando a presença de partículas menores.

Ao fixar o tempo de exposição ao ultrassom em 60 minutos, foi avaliada a reprodutibilidade da metodologia através da comparação de ChNC produzidos em diferentes dias (Figura 2).

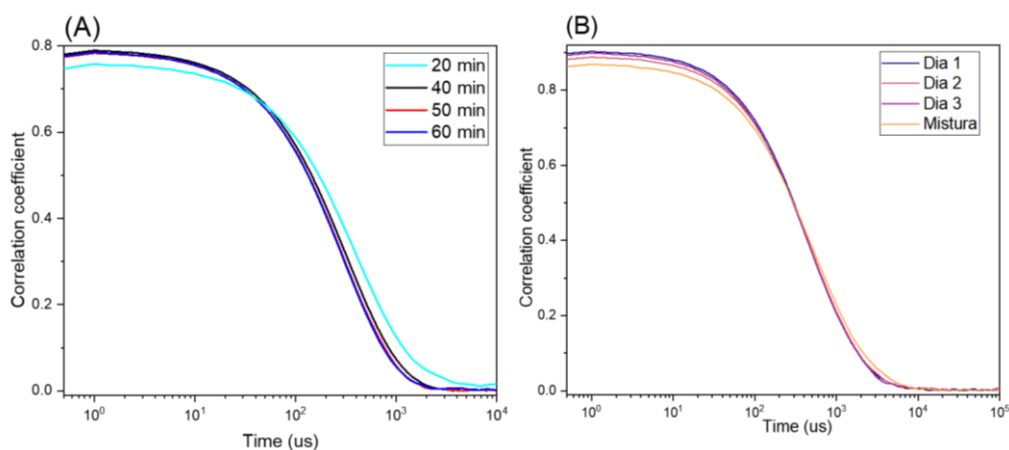


Figura 2. (A) Curvas de perdas de correlação dos ChNCs preparados com diferentes tempos de ultrassom. (B) Curvas de perdas de correlação dos ChNCs preparados com 60 minutos de exposição ao ultrassom, mas em diferentes dias.

Dessa forma é possível notar que, mesmo sendo produzidos em dias diferentes, a exposição ao ultrassom por 60 minutos foi capaz de gerar ChNC de dimensões próximas, podendo ser observado pela similaridade entre as curvas de perda de correlação das amostras.

Microscopia de força atômica (AFM):

Através da microscopia de força atômica foi possível obter imagens que possibilitam a visualização nítida dos cristais.

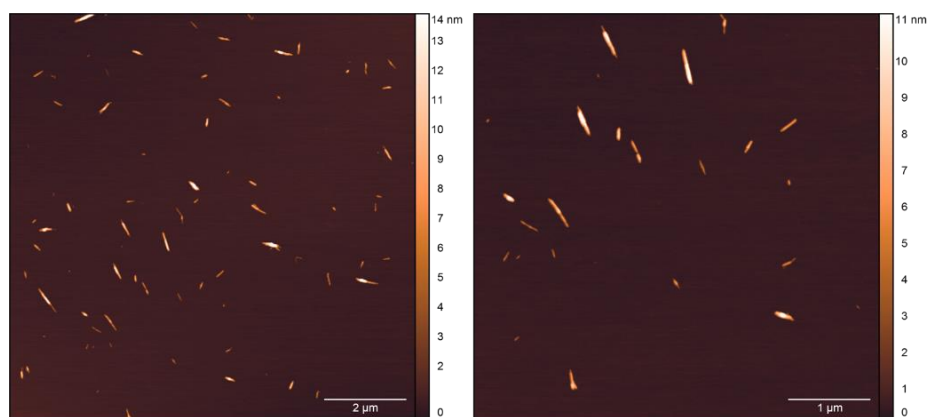


Figura 3. Imagem dos ChNCs obtidos por AFM.

Com as imagens foi possível confirmar o formato de “bastão” que os cristais apresentam e os tamanhos dos cristais variaram entre 100 e 540 nm. Vale ressaltar que as medidas de tamanho dos cristais pela microscopia não são valores de relevância estatística, visto que para isso são necessárias mais imagens dos cristais.

Análise reológica de hidrogéis com ChNC como agente de reforço mecânico:

Para avaliar de que forma os nanocristais influenciam nas propriedades mecânicas dos hidrogéis a base de HPMC foram feitas análises desses materiais por reologia. Os experimentos consistiram na obtenção de oscilatórios de amplitude, oscilatórios de frequência (Figura 4) e curvas de fluxo (Figura 5).

Nos oscilatórios de amplitude é possível observar que o aumento da concentração de ChNC nos géis leva a aproximação dos módulos de armazenamento (G') e perda (G''), e, em concentrações mais elevadas, leva a inversão desses módulos.

Nos oscilatórios de frequência pode-se observar que a frequência de cruzamento, ou seja, o ponto em que os módulos de armazenamento e perda se igualam diminui frente ao aumento da concentração de ChNCs. Esse comportamento indica que a transição de comportamento viscoso para elástico ocorre em frequências menores em géis que possuem maior concentração de ChNC em sua composição.

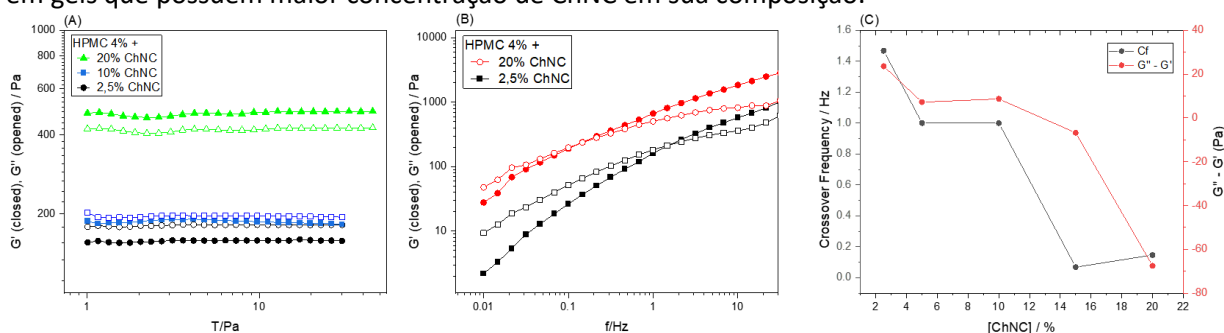


Figura 4. (A) Oscilatórios de amplitude do gel de HPMC 4% com diferentes concentrações de ChNC. (B) Oscilatórios de frequência do gel de HPMC 4% com diferentes concentrações de ChNCs. (C) Gráfico da frequência de cruzamento e da diferença entre os módulos G'' e G' em função da concentração de ChNC.

Outra forma de se avaliar a mudança nas propriedades mecânicas dos hidrogéis foi a construção de curvas de fluxo. Com esse tipo de experimento é possível observar mudanças na viscosidade do material em função da taxa de cisalhamento.

Os resultados obtidos nesse experimento salientam que, com o aumento da concentração de ChNC nos hidrogéis, é observado o aumento da viscosidade dos hidrogéis, especialmente nas regiões de baixa taxa de cisalhamento, também conhecida como platô newtoniano (η_0).

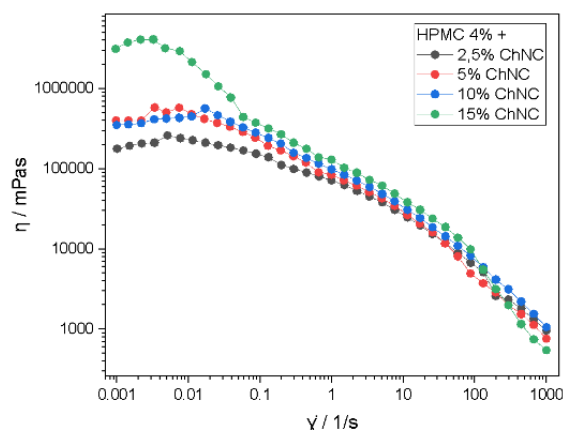


Figura 5. Curvas de fluxo relativas aos géis de HPMC 4% com diferentes concentrações de ChNC. Observa-se o aumento na viscosidade frente ao aumento da concentração de ChNC.

CONCLUSÕES

A quitina, por estar presente no exoesqueleto de diversos animais, é um material abundante na natureza, mas que muitas vezes é descartado, visto que as cascas de animais geralmente não apresentam grandes interesses comerciais. A utilização da quitina para a obtenção de um material que possa atuar como agente de reforço mecânico em hidrogéis é uma excelente forma de estudar opções mais sustentáveis e viáveis para otimizar as propriedades mecânicas de outros produtos.

Os resultados dos experimentos realizados evidenciaram que uma série de tratamentos químicos e físicos às partículas de quitina possibilitam a formação de um material nanométrico rígido, no caso, os nanocristais de quitina. Foi observado que, pelo cálculo de densidade de carga presente na superfície da quitina, a etapa de deacetilação foi feita com sucesso. Já a alteração dos tempos de exposição da quitina as ondas de ultrassom resultaram em uma mudança no tamanho das partículas, evidenciado pelas curvas de perda de correlação. A aplicação dos nanocristais nos hidrogéis mostrou que, com o aumento na concentração de nanocristais, os géis apresentaram aumento em propriedades como viscosidade e resistência mecânica, evidenciados pelas curvas de fluxo, inversão dos módulos de armazenamento e perda nos oscilatórios de amplitude e pela queda na frequência de cruzamento nos oscilatórios de frequência.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Jin, T., Liu, T., Lam, E. & Moores, A. Chitin and chitosan on the nanoscale. *Nanoscale Horizons* vol. 6 505–542
- [2] Mohammed, A. S. A., Naveed, M. & Jost, N. Polysaccharides; Classification, Chemical Properties, and Future Perspective Applications in Fields of Pharmacology and Biological Medicine (A Review of Current Applications and Upcoming Potentialities). *Journal of Polymers and the Environment* vol. 29 2359–2371
- [3] Rajai, H. & Isogai, A. Cellulose. In: *Polymers in Biology and Medicine*. ScienceDirect Topics. Preprint at <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/cellulose> (2025).
- [4] Bai, L. et al. Nanochitin: Chemistry, Structure, Assembly, and Applications. *Chemical Reviews* vol. 122 11604–11674
- [5] Pasquier, E. et al. Upcycling Byproducts from Insect (Fly Larvae and Mealworm) Farming into Chitin Nanofibers and Films. *ACS Sustain Chem Eng* 9, 13618–13629 (2021).
- [6] Mathaba, M. & Daramola, M. O. Effect of chitosan's degree of deacetylation on the performance of pes membrane infused with chitosan during amd treatment. *Membranes (Basel)* 10, (2020).
- [7] Liao, J., Wang, Y., Hou, B., Zhang, J. & Huang, H. Nano-chitin reinforced agarose hydrogels: Effects of nano-chitin addition and acidic gas-phase coagulation. *Carbohydr Polym* 313, (2023).
- [8] Jiang, J.; Yu, J.; Liu, L.; Wang, Z.; Fan, Y.; Saito, T.; Isogai, A. *Preparation and Hydrogel Properties of pH-Sensitive Amphoteric Chitin Nanocrystals*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 66, p. 11372–11379