

FORMAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA E APLICAÇÃO NA DE-EMULSIFICAÇÃO DE EFLUENTES DE LATICÍNIOS

LOPES, Isadora de Souza¹; CUNHA, Rosiane Lopes², Carolina Siqueira Franco³

¹ Mestranda em Tecnologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Limeira, São Paulo, isasouzalopes@yahoo.com.br.

² Professora Dra. da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, rosiane@fea.unicamp.br

³ Professora Dra. da Faculdade de Tecnologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Limeira, São Paulo, carolina@ft.unicamp.br.

RESUMO – Resíduos contendo lipídeos são frequentemente gerados pela indústria petroquímica, indústrias de óleos comestíveis, sorvetes, laticínios, curtumes e matadouros. A remoção destes lipídeos é realizada por caixas de gordura ou então por flotadores com ar dissolvido quando o óleo está emulsionado. A quitosana é um biopolímero catiônico, ou seja, possui carga total positiva, o que permite que suas nanopartículas se adsorvam mais facilmente na interface negativa da emulsão óleo/água, podendo ser portanto utilizada em resíduos emulsionados, representando assim uma alternativa mais eficiente aos processos convencionais de tratamento de resíduos oleosos. O objetivo deste trabalho é a formação de nanopartículas de quitosana através da hidrólise enzimática (processo *top down*) com a enzima papaína. Estas nanopartículas serão aplicadas em uma emulsão modelo baseada em um resíduo de laticínio para estudo do processo de de-emulsificação.

Palavras-chave: quitosana; nanopartículas; de-emulsificação.

INTRODUÇÃO

A indústria de laticínios é de importância mundial, tanto para a alimentação humana quanto para a economia: de acordo com a FAO (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação), em 2012 foram produzidos aproximadamente 754 bilhões de litros de leite. No Brasil, no ano de 2013 foram produzidos cerca de 35 bilhões de litros de leite, ocupando com esta produção a 3ª posição no ranking mundial, atrás da Índia e Estados Unidos. Estima-se que a indústria de laticínios gera aproximadamente de 0,2 a 10 L de resíduos por litro de leite processado (KARADAG *et al.*, 2015). Os maiores constituintes deste tipo de resíduo são: lactose, proteínas solúveis, lipídeos (óleos, graxas, gorduras e ácidos graxos livres) e sais minerais. As características dos efluentes da indústria de laticínios varia de acordo com o tamanho da fábrica, os métodos utilizados para limpeza e também do tipo de processamento utilizado e produto fabricado: o resíduo da produção de sorvete tem pH geralmente neutro, enquanto o do soro do leite é ligeiramente ácido, aproximadamente 4,46 (GUIA, 2013 ou 2014; KARADAG *et al.*, 2015; MENDES *et al.*, 2006)

A remoção de lipídeos em estado livre, normalmente é realizada por caixas de gordura que permitem a separação da fração lipídica por retirada manual ou através de raspadores na superfície. Flotadores com ar dissolvido também são utilizados, principalmente quando o óleo está emulsionado, como é o caso dos resíduos de laticínios. Apesar de apresentar maior eficiência na remoção de lipídeos, o tratamento por flotação possui custos operacionais elevados, além de gerar lodo químico, que deve ter uma destinação adequada (MENDES *et al.*, 2005), os flotadores não são

eficientes quando a emulsão é estável. A separação química dos lipídeos contidos em resíduos emulsionados, apresenta-se como uma alternativa aos tratamentos convencionais através do processo de de-emulsificação.

Uma emulsão é formada por dois líquidos imiscíveis, normalmente água e óleo, em que um dos líquidos está disperso no outro na forma de pequenas gotas esféricas (MCCLEMENTS, 2005), sendo os tipos mais comuns de emulsão as emulsões óleo/água (O/A), em que gotículas de óleo estão dispersas em água e água em óleo (A/O), quando gotículas de água estão dispersas em uma fase oleosa. Por ser formada por líquidos imiscíveis, as emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis, ou seja, podem ser desestabilizadas ao longo do tempo. Vários mecanismos promovem a instabilidade das emulsões, a qual está relacionada a velocidade de deslocamento das gotas em um meio líquido e a ruptura da interface, levando a coalescência das gotas. A consequência da instabilidade observada em sistemas emulsionados é a de-emulsificação, na qual a emulsão é convertida na fase aquosa e oleosa que a originaram. (TADINI *et al.*, 2016)

A desestabilização da emulsão pode ser alcançada através de métodos físicos, como por exemplo centrifugação em alta velocidade ou por métodos químicos, através da adição de agentes de-emulsificantes, que atuam nas etapas de floculação e de coalescência do processo de separação da emulsão (HEREES *et al.*, 2014). Os resíduos oleosos são, em sua maioria, emulsões do tipo óleo/água que em razão da grande quantidade de grupamentos hidroxilas presentes na molécula de água possuem a interface negativa e com isso dificultam sua coalescência. Devido a repulsão eletrostática entre as gotas a desestabilização deste tipo de emulsão pode ser obtida pela adição de moléculas com carga positiva, como por exemplo a quitosana, que diminuirá a repulsão eletrostática permitindo desta forma sua aproximação e coalescência das gotas (MCCLEMENTS, 2012; MARINOVA *et al.*, 1996)

A partir da desacetilação química ou da hidrólise enzimática da quitina, encontrada em resíduos de pescado, é obtida a quitosana. A quitosana é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, composto de resíduos de β -(1,4)-2-amino-2-deóxi-D-glicopiranosose (glicosamina) e pouca ou nenhuma unidade de N-acetil-D-glicosamina, de acordo com seu grau de desacetilação. Os grupos amino presentes na quitosana possuem pKa menor que 6,5, ou seja, os grupos amino possuem carga predominantemente positiva em valores de pH abaixo do pKa. (DAMIAN *et al.*, 2015; NYGAARD *et al.*, 2015). Na estrutura da quitosana também estão presentes grupos amino e hidroxilas reativos que permitem a funcionalização química da molécula, podendo produzir diversas formas químicas modificadas, com propriedades como as antimicrobianas, antiinflamatórias e mucoadesivas mais intensas (CHIAPPISI & GRADZIELSKI 2015). As propriedades polietrolíticas

da quitosana permitem que ela seja empregada em processos de coagulação/floculação para o tratamento de águas residuárias com elevada concentração de lipídeos emulsionados

O objetivo do trabalho como um todo é produzir nanopartículas de quitosana para aplicação na de-emulsificação de efluentes lipídicos emulsionados e entender como este biopolímero atua no processo de-emulsificação, bem como a influência de sua concentração e grau de acetilação. Além disso, pretende-se também avaliar como as técnicas utilizadas na produção das nanopartículas interferem em sua funcionalidade. Especificamente esta etapa do trabalho, teve como objetivo obter hidrolisados de quitosana de baixo peso molecular através de sua hidrólise com a enzima papaína, além de caracterizar os hidrolisados em relação à tamanho, carga superficial e a variação da carga superficial das partículas com o pH e avaliar as diferenças destas propriedades em relação às da quitosana comercial.

MATERIAIS

A quitosana comercial de baixo peso molecular foi adquirida da enzima Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e a enzima papaína foi gentilmente doada pela empresa Prozyn BioSolutions (São Paulo, São Paulo, Brasil).

METODOLOGIA

O estudo como um todo pode ser dividido em duas grandes partes: produção das nanopartículas de quitosana e estudo do processo de de-emulsificação. (Figura 1).

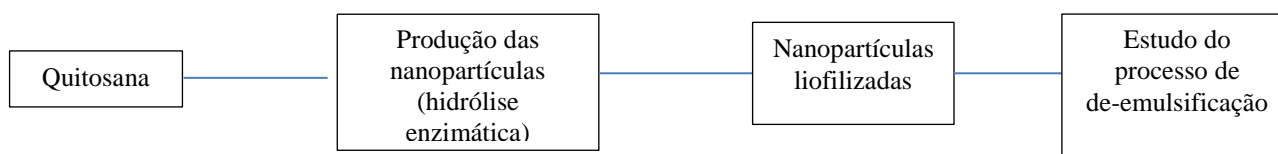


Figura 1: Diagrama de blocos do presente estudo.

Para o presente trabalho foi utilizada a metodologia descrita a seguir:

I. Teor de umidade da quitosana comercial

O teor de umidade da quitosana comercial foi determinado em estufa (Orion 515, Fanem, São Paulo, Brasil) por 24h a temperatura de 105 °C. O teor de umidade calculado de acordo com a equação 2 abaixo:

$$\% \text{ umidade} = \frac{g \text{ amostra seca}}{g \text{ amostra}} \times 100 \quad (2)$$

II. Análise de FT-IR

O espectro infravermelho das amostras foi determinado em um FT-IR (IRPrestige – 21, Shimadzu, Kyoto, Japão) por varredura entre 4000 cm⁻¹ a 500 cm⁻¹ no Laboratório de Apoio Central (LAC) da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp.

III. Hidrólise da quitosana

A hidrólise da quitosana comercial a partir da papaína (*Carica Papaya*) foi realizada com base na metodologia proposta por Pan e colaboradores (2015): em uma solução de quitosana $8,0 \text{ g.L}^{-1}$ preparada em tampão acetato ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ / pH 4,55) foi adicionado aproximadamente 0,10 g de papaína (Brauzin 100, Prozyn, São Paulo, Brasil). Esta solução foi aquecida em béquer encamisado através de um banho termostatizado (Q214M2, Quimis, São Paulo, Brasil) a $45 \text{ }^\circ\text{C}$ por 50 minutos. Logo em seguida a solução foi colocada em frascos *schott* e aquecida novamente em banho termostatizado (SP 20/100 ID, Pentax, São Paulo, Brasil) a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 minutos com o objetivo de interromper a reação enzimática. Após seu resfriamento, seu pH foi ajustado para 7,0 com NaOH $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ e as amostras foram centrifugadas (Allegra 25R, BeckMan Coulter, Califórnia, EUA) a 3000 rpm por 4 minutos e temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Após a centrifugação, o sobrenadante foi separado do precipitado, sendo o último liofilizado.

IV. Tamanho, densidade de carga e varredura de pH

O tamanho das partículas e a carga superficial tanto da quitosana comercial quanto dos hidrolisados foram analisados pelo método de espalhamento dinâmico de luz (*DSL*), após a diluição para 0,01 % (p/v) em tampão acetato (100 mM/ pH 3,0), em um ZetaSizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Reino Unido) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, conforme metodologia proposta por Picone & Cunha (2013). A variação da carga superficial das partículas com o pH foi estudada por varredura de pH entre 3,0 e 9,0

RESULTADOS

Obteve-se para a quitosana comercial uma umidade em base seca de $6,63 \pm 0,09 \%$. A amostra de quitosana comercial apresenta-se na forma de um pó fino e seco, desta forma esperava-se um valor baixo para o teor de umidade

Na Figura 2 abaixo está representado o espectro da quitosana comercial em que cada pico de absorção corresponde às frequências de vibrações entre as ligações dos átomos que compõem o material. Observa-se a presença de bandas com os seguintes comprimentos de onda: 3500 cm^{-1} que é atribuída a presença de grupos OH, 2800 cm^{-1} que indica a presença de ligações C-H, 1650 cm^{-1} correspondente ao grupo CONH₂, 1550 cm^{-1} está relacionada a presença de grupos NH₂.

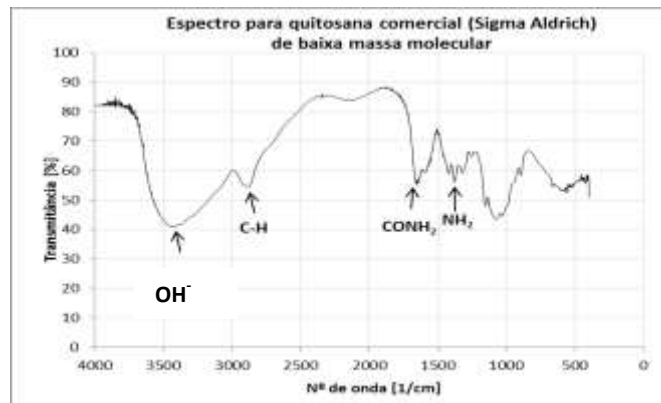


Figura 2: Espectro de FT-IR da quitosana comercial

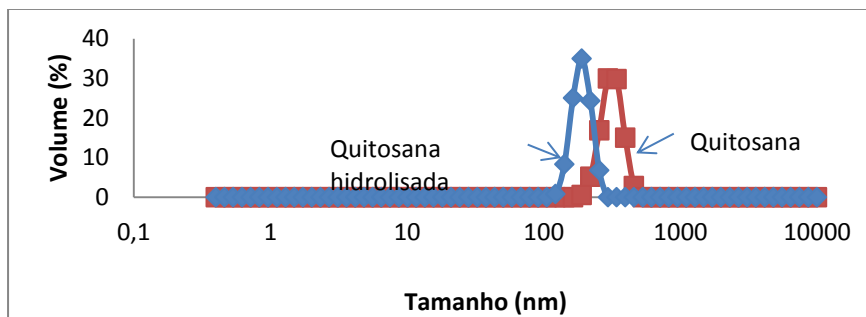


Figura 3: Distribuição de tamanho para quitosana comercial e hidrolisada

A partir da curva de distribuição de tamanho, representada na Figura 3 acima, nota-se que cerca de 35,0 % das partículas de quitosana hidrolisada possuem um tamanho de aproximadamente 190,1 nm. Já para a quitosana comercial, 29,9 % das partículas medem aproximadamente 295,3 nm. Após a hidrólise houve uma redução de 64,37 % no tamanho

A quitosana é um polissacarídeo catiônico (Picone & Cunha 2013), apresentando portanto carga superficial positiva. A partir das medidas de potencial zeta obteve-se tanto para a quitosana comercial quanto para a quitosana hidrolisada uma distribuição monomodal das cargas. Para a quitosana comercial o valor médio do potencial zeta foi de $46,56 \pm 4,74$ mV, enquanto para a quitosana hidrolisada o valor foi de $53,02 \pm 0,86$ mV. Apesar de durante a hidrólise ocorrer maior exposição das cargas positivas, a carga total da quitosana não se alterou, uma vez que a diferença apresentada entre os valores de potencial zeta não foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

A Figura 4 abaixo apresenta as curvas da varredura do potencial zeta em função do pH para a quitosana hidrolisada e para a quitosana comercial. A papaína, uma cisteína protease, atua na hidrólise da quitosana entre as unidades de glicosamina e N-acetilglicosamina, sendo estas unidades os produtos de sua hidrólise (BUCKE, 1999; MOURYA & INAMDAR, 2008). Nota-se que no pH 3,0 o potencial zeta da quitosana hidrolisada é menor que da quitosana comercial, pois devido a hidrólise há a presença de um grupo hidroxila (OH^-) nas unidades de N-acetilglicosamina e

glicosamina, que contribui para a redução do potencial zeta. A medida que o pH aumenta, ocorre a desprotonação tanto da quitosana comercial quanto da hidrolisada, resultando em uma diminuição do potencial zeta.

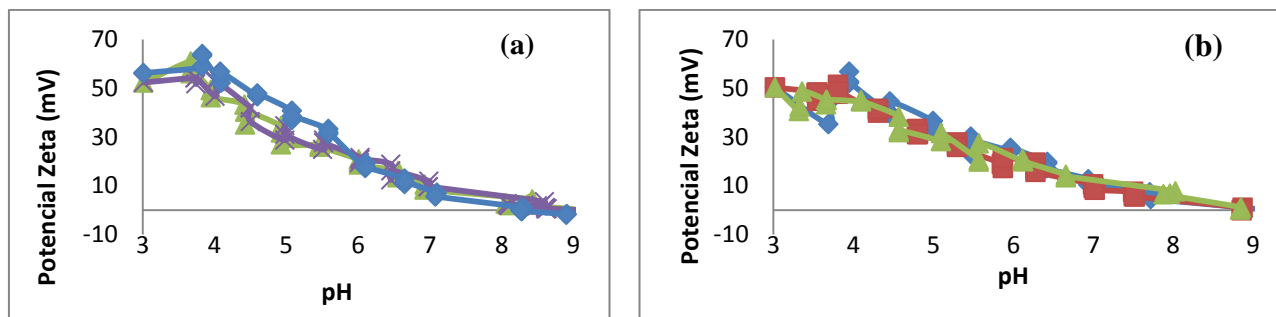


Figura 4: Varredura do potencial zeta em função do pH para quitosana comercial (a) e para a quitosana hidrolisada (b)

CONCLUSÕES

. A hidrólise não alterou a carga superficial da molécula, permanecendo a quitosana hidrolisada com a carga positiva o que é desejável para ocorrer a de-emulsificação, já que a interface óleo/água é negativa. Para avaliar a hidrólise, é interessante utilizar outras técnicas, como medida de viscosidade e peso molecular, aliadas a técnica de *DLS*.

REFERÊNCIAS

- BUCKE, C. **Carbohydrate Biotechnology**, 10^a edição, Humana Press Inc, Totowa, New Jersey, 1999.
- CHIAPPISI, L.; GRADZIELSKI, M. *Co-assembly in chitosan-surfactant mixtures: thermodynamics, structures, interfacial properties and applications*. **Advances in Colloid and Interface Science**, 220, 92-107, 2015
- DAMIAN, C.; BEIRÃO, L. H.; FRANCISCO, A.; ESPÍRITO SANTO, M. L. P.; TEIXEIRA, E. *Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais*. **Alimentos e Nutrição**, 16,195-205, Araraquara, 2005
- GUIA Técnico ambiental da indústria de laticínios. **Fundação das Indústrias do Estado de Minas Gerais (FIEMG) e Fundação Estadual do Meio Ambiente (FEAM)** 2013.
- HEERES, A. S.; PICONE, C. S. F.; VAN DER WIELEN, L. A. M.; CUNHA, ROSIANE L.; CUELLAR, M. C. *Microbial advanced biofuels production: overcoming emulsification challenges for large-scale operation*. **Trends in Biotechnology**, 32, 221-229, 2014
- KARADAG, D.; KÖROGLU, O. E.; OZKAYA, B.; CAKMAKCI, M. *A review on anaerobic biofilm reactors for the treatment of dairy industry wastewater*. **Process Biochemistry**, 50, 262-271, 2015
- MCCLEMENTS, D. J. *Food emulsions : principles, practice, and techniques*. **CRC Press**, 2005
- MENDES, A. A.; CASTRO, H. F. *Apliação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos*. **Química Nova**, 28, 296-305, 2005
- MENDES, A. A.; PEREIRA, E. B.; CASTRO, H. F. *Biodegradação de águas residuárias de laticínios previamente tratadas por lipases*. **Brazilian Journal of Food Technology**, 9, 143-149, 2006
- MOURYA, V. K.; INAMDAR, N. N. *Chitosan-modifications and applications: opportunities galore*. **Reactive & Functional Polymers**, 68, 1013-1051, 2008.
- NYGAARD, J. N.; STRAND, S. P.; VARUM, K. M.; DRAGET, K. I.; NORGARD, C. T. *Chitosan: gel and interfacial properties*. **Polymers**, 7, 552-579, 2015
- PAN, A-D; ZENG, H-Y; FOUA, G. B.; ALAIN, C.; LI, YU-QIN. *Enzymolysis of chitosan by papain and its kinetics*. **Carbohydrate Polymers**, 135, 199-206, 2015
- PICONE, C. S. F.; CUNHA, R. L. *Chitosan-gellan electrostatic complexes: influence of preparation conditions and surfactant presence*. **Carbohydrate Polymers**, 94, 695-703, 2013
- TADINI, C. C.; TELIS, V. R. N.; MEIRELLES, A. J. A.; FILHO, P. A. P. *Operações unitárias na indústria de alimentos*. Volume I, 1^a edição, **LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora Ltda**, Rio de Janeiro, 2016.