



# Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB

## SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPÓSITO QUITOSANA COM CARBONATO DE CÁLCIO EXTRAÍDO DE CASCA DE OVO PARA POSSÍVEIS APLICAÇÕES COMO CURATIVO

Rodrigo Azevedo OLIVEIRA<sup>1</sup>; Paulo Adolfo Barboza FREITAS<sup>2</sup>; Marcio José Batista CARDOSO<sup>3</sup>,  
Rossemberg Cardoso BARBOSA<sup>3</sup>; Maria Roberta de Oliveira PINTO<sup>3</sup>; Marcus Vinicius Lia FOOK<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Engenharia de Materiais - Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, Campus I, Campina Grande-PB/Brasil. E-mail: [rodrigoazevedooliveira@gmail.com](mailto:rodrigoazevedooliveira@gmail.com). Telefone: (83) 3337 3273.

<sup>2</sup> Departamento de Engenharia Química - Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, Campus I, Campina Grande-PB/Brasil.

<sup>3</sup> Programa de Pós Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais - Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, Campus I, Campina Grande-PB/Brasil

### RESUMO

A quitosana é um polímero natural, biodegradável e bioabsorvível e seus produtos de degradação são atóxicos, não imunogênicos e não carcinogênico. Quando aplicada na Biomedicina, a quitosana é um biomaterial que favorece a reconstituição fisiológica da pele. Características como cristalinidade, morfologia e tempo de degradação dos biomateriais obtidos a partir da quitosana são fundamentais e tais características podem ser trabalhadas de várias formas, o que vai depender da aplicação em questão. Acredita-se que a adição de carbonato de cálcio em filmes de quitosana pode alterar algumas destas características da quitosana. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar, química e morfologicamente, membranas de quitosana e compósitos quitosana/carbonato de cálcio de origem animal, extraído da casca do ovo de galinha. Membranas de quitosana e compósito quitosana/(CaCO<sub>3</sub>) nas proporções de 1%, 5% e 10%, foram preparadas e caracterizadas por Difração de raios X (DRX), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Ensaio de Biodegradação Enzimática. A técnica de DRX mostrou que, quanto maior a quantidade de CaCO<sub>3</sub>, maior é a cristalinidade do compósito. Quanto à topografia das amostras, o MEV revelou que as partículas de carbonato de cálcio formaram aglomerados de tamanhos e formas variadas, porém bem distribuídas nas membranas e os resultados de biodegradação apontaram que todas as membranas apresentaram-se biodegradáveis. Baseado nos dados obtidos neste trabalho pode-se concluir que a inserção de carbonato de cálcio aumentou a cristalinidade das membranas de quitosana além de servirem como fonte de cálcio na regeneração tecidual e de contribuir para a redução da poluição ao meio ambiente, já que o material utilizado para obtenção das membranas são biodegradáveis e renováveis.

**Palavras - chave:** Quitosana, Carbonato de cálcio, Biomaterial, Casca de ovo.



# Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB

## 1 INTRODUÇÃO

A quitosana é um polissacarídeo natural, derivado da desacetilação da quitina, encontrada principalmente em carapaças de crustáceos (SANTOS et al., 2006). Vários estudos avaliando potenciais aplicações da quitosana como revestimento curativo ou como suporte para crescimento de células e recuperação de tecido animal, foram publicados (KHAN; PEH, 2003).

Devido a todas as características até então conhecidas da quitosana, ela vem sendo utilizada na biomedicina, indústria de cosméticos, agricultura, como fibra têxtil e no tratamento de água (BIAGINI, et al., 1992). Entretanto, algumas das suas propriedades não são adequadas o suficiente para que a quitosana seja capaz de competir com polímeros sintéticos, desta forma a preparação de membranas de quitosana com carbonato de cálcio extraído da casca de ovo pode ser uma alternativa para adequação das propriedades desejadas. Desta forma, este trabalho objetiva desenvolver e caracterizar membranas de quitosana com carbonato de cálcio.

Segundo Dupoirieux et al. (1995) o pó da casca de ovo possui biocompatibilidade, com ausência de risco de transmissão viral e de salmonelose, uma vez que pode ser autoclavado.

Material produzido por substâncias originadas dos seres vivos tem sido uma grande fonte de interesse dos pesquisadores nos últimos anos e seu uso têm tido grande atenção pela importância em relação a fatores ecológicos, por serem de fontes renováveis e também pelo fato de que o descarte de algumas delas constituir fontes de poluição, causando muitos problemas ambientais (KUMAR, 2000).



# Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Materiais

Quitosana - Polymar – Fortaleza/CE com grau de desacetilação de 90%;

Carbonato de cálcio, extraído da casca de ovo de galinha (*Gallus gallus domesticus*).

Ácido acético glacial P.A., - Vetec;

Hidróxido de sódio P.A., - Vetec;

A lisozima e o tampão PBS foram adquiridos do fornecedor Sigma Aldrich.

### 2.2 Métodos

#### 2.2.1 Preparação das Membranas de Quitosana

A preparação das membranas de quitosana foi conduzida de acordo com a técnica de evaporação de solvente. Uma solução de quitosana foi preparada pela dissolução de 1g de quitosana em 100 mL de uma solução a 1% (v/v) de ácido acético glacial sob agitação magnética a 45 °C por 2 h. Em seguida, a solução polimérica foi filtrada a vácuo para remover o material insolúvel. O filtrado foi vertido em placas de petri com diâmetros de 115 mm e acondicionado em estufa a 50 °C por 24 h para evaporação do ácido e formação da membrana. Após a secagem das membranas, as mesmas foram retiradas da estufa e, em seguida, foi adicionado 50 mL de solução de hidróxido de sódio 1 mol/L sobre a membrana permanecendo por 2 h a fim de assegurar a completa neutralização. Em seguida, as membranas foram lavadas em água destiladas para retirada do excesso da solução de hidróxido de sódio e conseqüentemente a sua neutralização. Depois da neutralização, as membranas foram secas por 24 h a temperatura ambiente e caracterizadas.



## Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB

### 2.2.2 Preparação das Membranas com Carbonato de Cálcio

Para obtenção das membranas com carbonato de cálcio, o procedimento de preparação foi realizado em duas etapas:

#### 1ª Etapa: Extração do carbonato de cálcio da casca do ovo

Cascas de ovos de galinhas foram coletadas em ambiente doméstico, lavadas, secadas ao sol e colocadas dentro de um recipiente com solução a 2% de ácido acético glacial (v/v) por 72 h. Após esse período, o sedimentado de carbonato de cálcio foi separado da solução de ácido acético. Após a retirada do ácido, foi colocada água destilada sobre o carbonato de cálcio para lavagem e retirada do excesso de ácido acético. Este procedimento foi repetido três vezes. Depois da última lavagem, o carbonato de cálcio foi colocado para secar por 24 h a 110 °C. Em seguida, o pó foi triturado em almofariz e passado em peneira malha 325 (abertura da malha 45 microns) para ser usado neste experimento.

#### 2ª Etapa: Preparação das Membranas de Quitosana com Carbonato de Cálcio

A solução de quitosana foi preparada de acordo com o item 2.2. Obtida a solução polimérica, foram preparadas dispersões de carbonato de cálcio, colocando-as na solução de quitosana sob temperatura ambiente e agitação magnética por 2 h. Passado este tempo, as dispersões, nas proporções de 1%, 5% e 10% de carbonato de cálcio em solução de quitosana foram vertidas em placas de petri, com 115 mm de diâmetro e acondicionadas em estufa, a 50°C, por 24 h para obtenção das membranas. As membranas passaram pelo mesmo método de neutralização descrito



# Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB

para as membranas de quitosana. Todas as membranas foram secas por 2 h, a 50°C antes de serem caracterizadas.

### 3.3 Caracterização

O pó de carbonato de cálcio foi caracterizado por Difração de Raios X (DRX).

As membranas de quitosana pura e com diferentes proporções de carbonato de cálcio foram caracterizados por Difração de Raios X (DRX), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Ensaio de Biodegradação Enzimática.

As análises foram realizadas no Laboratório de Referência em Desenvolvimento e Avaliação de Biomateriais da Região Nordeste do Brasil (CERTBIO).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Difração de raios X (DRX)

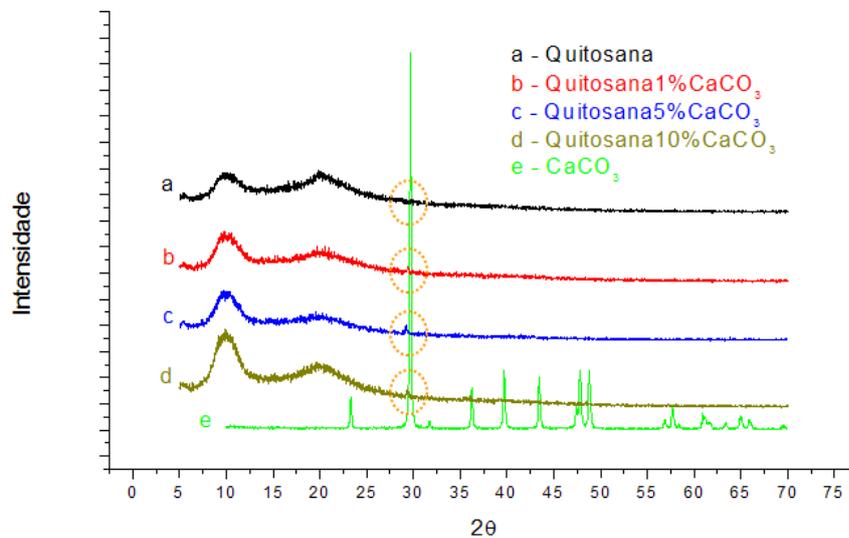
O pó de carbonato de cálcio e todas as membranas foram caracterizados por difração de Raios X com a finalidade de observar a influência do carbonato de cálcio na cristalinidade e conseqüentemente nas propriedades das membranas.

O pó extraído da casca do ovo e as membranas de quitosana e de quitosana com carbonato de cálcio foram examinados em um intervalo de  $2\theta$  entre 5,0 e 70,0 graus a uma velocidade de 1°/min. As análises de difração de Raios X foram conduzidas a temperatura ambiente em aparelho XRD-6000 Shimadzu, utilizando radiação  $K\alpha$  do cobre (1,5418 Å), tensão de 40 kV e corrente 30 mA.

Os difratogramas da membrana de quitosana, do carbonato de cálcio e dos compósitos quitosana/carbonato de cálcio (1%, 5% e 10%) estão apresentados na Figura 1.



Figura 1 – Difratoograma de Raios X do carbonato de cálcio, extraído da casca do ovo, da quitosana e compósitos com 1%, 5% e 10% de carbonato de cálcio



O difratograma da membrana de quitosana apresentou picos típicos de material semicristalinos, com base larga em torno de  $2\theta = 10^\circ$  e  $2\theta = 20^\circ$  e corrobora com Luo et al., (2011) e Lima (2010). A quitosana possui um perfil semicristalino devido às fortes interações intra e intermolecular, caracterizado pelas pontes de hidrogênio formadas entre os grupos amina, álcool, amida e outros grupos funcionais presentes na molécula de quitosana. Essas fortes interações fornecem certa organização à estrutura cristalina da quitosana (URAGAMI; TOKURA, 2006).

Já os difratogramas dos compostos quitosana/carbonato de cálcio mostram que, quanto maior a quantidade de carbonato de cálcio na membrana maior a cristalinidade do compósito, confirmado através do estreitamento e intensificação dos picos dos compósitos e ainda, com o aparecimento de um pequeno pico em  $30^\circ$  nos compósitos como observado na Figura 1

A adição de carbonato de cálcio pode influenciar em propriedade, como tempo de degradação das membranas, já que, quanto maior a cristalinidade do material, maior dificuldade terá para a água entrar nesses sítios, pois segundo Dallan



## Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB

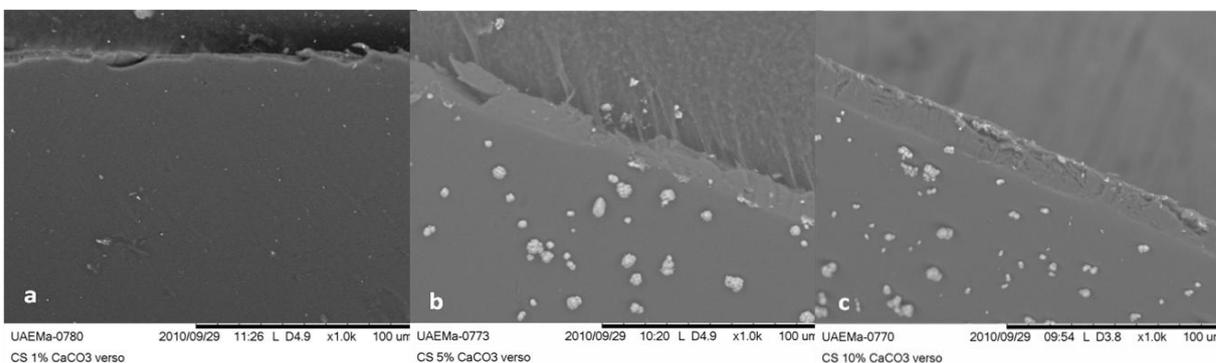
(2005), o solvente de uma determinada solução é suficiente para degradação de membranas de quitosana.

### 4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para realização das análises de microscopia eletrônica de varredura foram retirados fragmentos de aproximadamente  $0,5 \text{ cm}^2$  de cada membrana. Foi utilizado microscópio eletrônico de varredura de bancada, modelo TM-1000, marca Hitachi, com aumento de 10000x, profundidade de foco de 1 mm, resolução de 30 nm, 15 KV, baixo vácuo e pressão variada (1 a 270 Pa), sem recobrimento metálico, mesmo em amostras não condutoras.

Na Figura 2 observam-se as microfotografias do material estudado. Assim como na microscopia ótica pode-se observar a distribuição e forma das partículas de carbonato de cálcio nas membranas.

Figura 2 - Micrografias das membranas de quitosana com 1% (a), 5% (b) e 10% (c) de carbonato de cálcio. Imagem com aumento 1000x.



Também foi observada a presença de partículas de vários tamanhos e formas com grandes quantidades de aglomerados de carbonato de cálcio. Pela forma das partículas pode-se afirmar que trata-se de cristais de calcita que foram



## Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB

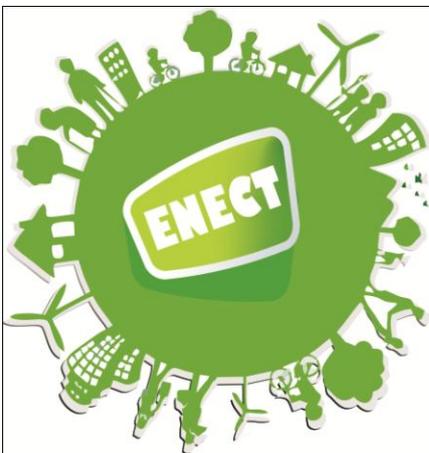
confirmados pelos resultados da análise por difração de raios X, segundo os quais foram identificados picos característicos do carbonato de cálcio, na forma de calcita e corrobora com Neves (1998).

### 4.3 Ensaio de Biodegradação Enzimática

Para este ensaio empregou-se como base as normas ASTM F1635-04 e a ASTM F2103-01. As membranas secas foram cortadas na dimensão de 2,0 cm<sup>2</sup>, pesadas em balança analítica e lavadas com álcool a 70%. Em seguida as membranas foram isoladas em placas de petri. As amostras foram divididas em dois grupos para avaliação da biodegradação. O primeiro grupo contendo uma solução de lisozima/*Phosphate Buffered Saline* – PBS com concentração de 1mg/mL, o segundo apenas com a solução de PBS para controle.

Foram utilizadas cinco amostras da membrana de quitosana e cinco amostras de cada membrana composta de quitosana/carbonato, tanto para a solução de lisozima como para o tampão PBS, em dois lotes, resultando em 40 amostras. As membranas foram incubadas em estufa microbiológica, à temperatura de 37 °C, sendo retiradas da estufa após 30 dias, seguindo um procedimento de lavagem em água destilada, secagem por 48 horas em estufa a 50 °C e pesagem em balança analítica. As diferenças percentuais das massas das amostras antes e após o ensaio forneceram os resultados referentes à degradação das membranas, observados a partir da média de ensaios repetidos em cinco amostras.

Para avaliação deste ensaio, foi considerada a perda de massa das amostras degradadas como observada na Tabela 1.



# Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB

Tabela 1. Perda de massa percentual das membranas de quitosana (CS) e quitosana/carbonato de cálcio submetidos a ensaios de biodegradação e respectivos desvios padrão. 90%GD

Ensaio	Perda de massa das membranas			
	1 mês de ensaio			
	PBS (pH=6,89)		Lisozima/PBS (pH=6,85)	
	Média (%)	D. Padrão	Média (%)	D. Padrão
CS (quitosana)	14,2	0,7	12,0	0,5
CS+1% CaCO <sub>3</sub>	15,1	0,7	12,2	0,5
CS+5% CaCO <sub>3</sub>	16,0	0,0	12,4	0,3
CS+10% CaCO <sub>3</sub>	15,5	0,6	13,2	0,3

Neste trabalho, a degradação das membranas ocorreu basicamente devido a presença do tampão PBS e não devido à ação da lisozima, e também por influência do pH das soluções, pois em todas as situações, houve uma maior perda de massa das membranas que ficaram por um mês em PBS, quando comparado com as membranas que ficaram em solução de PBS + Lisozima. Isto pode ter ocorrido devido ao comportamento eletrostático da quitosana e da lisozima que são diferenciados de acordo com o pH do meio.

## 5 CONCLUSÃO

Baseado nos dados obtidos neste trabalho pode-se concluir que a inserção de carbonato de cálcio aumentou a cristalinidade das membranas de quitosana além de servirem como fonte de cálcio na regeneração tecidual e de contribuir para a redução da poluição ao meio ambiente, já que os materiais utilizados para obtenção das membranas são biodegradáveis e renováveis.



# Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB

## REFERÊNCIAS

BIAGINI, G.; MUZZERELLI, R. A. A.; GIARDINO, R. E.; CASTALDINI, C. Biological Material for wound healing. In: BRINE, I.; CHARLES, J. Advanced in chitin and chitosan. **Elsevier Science Publishers**, London, p. 16-24, 1992.

DALLAN, P. R. M. **Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele**. 2005, 195f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. Campinas, 2005.

DUPOIRIEUX, L.; POURQUIER, D.; SOUYRIS, F. Powderd eggshell: a pilot study on a new bone substitute for use in maxillofacial surgery. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**. Edinburgh, v. 22, n. 3, p. 187-194. 1995.

KHAN, T. A.; PEH, K. K. A preliminary investigation of chitosan film as dressing for punch biopsy wounds in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. [S. I.], v. 6, n. 1, p. 20-26, 2003.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, p. 1-27, 2000.

LIMA, R. S. C. **Desenvolvimento de Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos: Quitosana/Insulina**. 2010. 112f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos). Curso de Engenharia de Processos da Universidade Federal de Campina Grande. 2010.

LUO, D.; SANG, L.; WANG, X.; XU, S. LI, X. Low temperature, pH-triggered synthesis of collagen-chitosan-hydroxyapatite nanocomposites as potential bone grafting substitutes. **Materials Letters**, v. 65, p. 2395-2397, 2011.

NEVES, M. A., **Alternativas para valorização da casca de ovo como complemento alimentar e em implantes ósseos**. 1998. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil. 1998.

SANTOS, C.; SEABRA, P.; VELEIRINHO, B.; DELGADILLO, I.; SILVA, J. A. L. Acetylation and molecular mass effect on barrier and mechanical properties of shortfin squid chitosan membranes. **European Polymer Journal**, v. 42, p. 3277-3285, 2006.

URAGAMI T.; TOKURA S, (eds.) **Material Science of Chitin and Chitosan**, Japan: Kodansha Ltd., Springer, 2006.