

VISCOSIDADE DE SOLUÇÕES E PROPRIEDADES MECÂNICAS DE FILMES DE QUITOSANA/CASEINA

Rafael L.C.G. da Silva^{1*}, Nina S. Wang¹, Denise F. S. Petri¹

¹ – Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP
rafaelleonardocruz@gmail.com

Resumo: O desenvolvimento de novos biomateriais requer o conhecimento de suas propriedades físico-químicas. Este estudo investigou a interação entre quitosana (CHI) e caseína (CAS) em solução em dois valores de pH (3,0 e 5,5) e duas concentrações de CAS (1% e 10% v/v) através de medidas de viscosidade. Filmes preparados a partir dessas soluções foram avaliados por nanoindentação. As curvas de viscosidade foram ajustadas à lei das potências. Em pH 5,5 todos os sistemas apresentaram comportamento pseudoplástico (n entre 0,73 e 0,78) e a viscosidade em baixas taxas de cisalhamento (η_0) diminuiu de 164 mPa.s to 103 mPa.s na presença de 10% CAS porque as cadeias de CHI formaram complexos eletrostáticos com CAS, diminuindo o entrelaçamento entre suas cadeias. Consequentemente, os filmes formados em pH 5.5 demonstraram altos valores de módulo de Young (E), atingindo um valor de 861 kPa com 10% CAS. Em pH 3.0, CAS e CHI estão positivamente carregadas, o comportamento se aproximou mais de fluidos newtonianos (n entre 0,85 e 0,89) e os índices de consistência diminuíram de 202 mPa.s^{0,15} para 110 mPa.s^{0,10}, na presença de 10% CAS, indicando interações favoráveis entre CHI e CAS. Além disso, os valores de E aumentaram de 89 kPa para 127 kPa (10% CAS), indicando que possivelmente a presença de CHI regula o equilíbrio de ionização de grupos ácidos carboxílicos de CAS, permitindo interações favoráveis mesmo quando proteína e polieletrólito apresentam a mesma carga líquida. Esses resultados demonstram que o pH e a concentração de CAS são variáveis que permitem modular o comportamento de fluxo em solução e as propriedades mecânicas dos filmes resultantes dessas soluções.

Palavras-chave: *Quitosana; Caseína; Reologia; Nanoindentação*

Viscosity of Solutions and Mechanical Properties of Chitosan/Casein Films

Abstract: The development of new biomaterials requires a thorough understanding of their physicochemical properties. This study investigated the interaction between chitosan (CHI) and casein (CAS) in solution at two pH values (3.0 and 5.5) and two CAS concentrations (1% and 10% v/v) through viscosity measurements. Films prepared from these solutions were evaluated by nanoindentation. The viscosity curves were fitted to the power-law model. At pH 5.5, all systems exhibited pseudoplastic behavior (n between 0.73 and 0.78), and the low-shear viscosity (η_0) decreased from 164 mPa.s to 103 mPa.s in the presence of 10% CAS because CHI chains formed electrostatic complexes with CAS, reducing chain entanglement. Consequently, the films formed at pH 5.5 showed high Young's modulus (E) values, reaching 861 kPa with 10% CAS. At pH 3.0, CAS and CHI are both positively charged, and the flow behavior approached that of Newtonian fluids (n between 0.85 and 0.89). The consistency indices decreased from 202 mPa.s^{0.15} to 110 mPa.s^{0.10} in the presence of 10% CAS, indicating favorable interactions between CHI and CAS. Moreover, the E values increased from 89 kPa to 127 kPa (10% CAS), suggesting that the presence of CHI possibly regulates the ionization balance of CAS carboxylic acid groups, allowing favorable interactions even when the protein and the polyelectrolyte carry the same net charge. These results demonstrate that pH and CAS concentration are key variables for modulating the flow behavior in solution and the mechanical properties of the films obtained from these solutions.

Keywords: *Chitosan; Casein; Rheology; Nanoindentation*

Introdução

O desenvolvimento de novos biomateriais visa aplicações específicas como por exemplo, a formação de novos hidrogéis,¹ filmes para embalagens de alimentos e sistemas para entrega de fármacos.² Entre a vasta gama de biopolímeros, quitosana e caseína são particularmente dignas de nota devido as suas propriedades distintas, porém complementares. A quitosana (CHI), um polissacarídeo linear derivado da quitina, com caráter catiônico em pH < 6,3, sendo amplamente reconhecida por sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade e atividade antimicrobiana inerente,

tornando-a altamente versátil em aplicações biomédicas.³ Sua natureza catiônica, proveniente da protonação de seus grupos amino em ambientes ácidos ($pK_a \sim 6,3$), permite que ela forme complexos eletrostáticos facilmente com espécies negativamente carregadas, como membranas mucosas⁴ e micelas de tensoativos aniônicos.⁵

Caseína (CAS), uma família de fosfoproteínas que representa cerca de 80% do conteúdo proteico do leite de vaca, é composta por $\alpha S1$ -, $\alpha S2$ -, β - e κ -caseína, que se organizam em estruturas micelares estabilizadas por fosfato de cálcio coloidal, sendo a κ -caseína predominante na superfície externa.⁶ Embora as caseínas não possuam uma estrutura terciária bem definida, elas apresentam fortes interações hidrofóbicas e contêm numerosos grupos carboxila e fosfato livres, o que leva a sua precipitação em pH 4,6 (seu ponto isoelétrico) e a uma carga líquida negativa em pH acima de 4,6. Estruturas fibrilares de CHI e CAS formadas por interações eletrostáticas⁷ se mostraram eficientes como membranas anti-hemorrágicas.⁸ Porém, não há estudos sobre as possíveis interações entre CHI e CAS em pH 3,0, condição em que ambas apresentam carga líquida positiva. Considerando os diferentes grupos ionizáveis de CHI e CAS, este estudo investigou as interações entre CHI e CAS em duas condições de pH (3,0 e 5,5) e duas concentrações distintas de CAS (i) em solução através de medidas de viscosidade rotacional, e (ii) em filmes através de medidas nanomecânicas.

Experimental

Preparo de soluções de CHI e CAS

Soluções estoque de CHI (10 g/L) foram preparadas por dissolução em ácido acético 2% (v/v) (pH 3,0) sob agitação magnética por 24 h à temperatura ambiente, com posterior centrifugação a 3600 rpm por 45 min para remoção de impurezas. Paralelamente, CAS foi dissolvida em água deionizada (pH 5,5) na concentração de 5 g/L sob agitação magnética. As soluções contendo CHI e CAS foram preparadas sob condições de pH 3,0 e 5,5; para o sistema pH 5,5, a solução estoque de CHI (pH 3,0) foi primeiramente ajustada para pH 5,5 utilizando NaOH 1 M; para manter uma diluição consistente entre as amostras, a solução de CHI pH 3,0 foi diluída com ácido acético até atingir o volume final da solução ajustada anteriormente. Finalmente, soluções de CAS preparadas em pH 3,0 e 5,5 foram adicionadas às soluções de CHI em pH 3,0 e pH 5,5, respectivamente, para obter concentrações finais de 1% (v/v) (CHI, 6,7 g/L/CAS, 0,034 g/L) e 10% (v/v) (CHI, 6,3 g/L/CAS, 0,34 g/L).

Curvas de viscosidade

Medidas de viscosidade foram realizadas utilizando um reômetro Anton Paar (MCR 302e) equipado com geometria de duplo gap (DG26.7), a 25 °C. As curvas de viscosidade foram obtidas registrando-se a viscosidade aparente em função da taxa de cisalhamento. Os dados experimentais em pH 5,5 foram ajustados ao modelo de Carreau-Yasuda (equação 1) e os dados experimentais em pH 3,0 foram ajustados à lei das potências (modelo Ostwald-de Waele) (equação 2) para avaliar o comportamento pseudoplástico (*shear-thinning*) das amostras:⁹

$$\eta(\dot{\gamma}) = \eta_{\infty} + (\eta_0 + \eta_{\infty})[1 + (\lambda\dot{\gamma})^a]^{\frac{n-1}{a}} \quad (1)$$

$$\eta_{ap} = K(\dot{\gamma})^{(n-1)} \quad (2)$$

Onde $\eta(\dot{\gamma})$ representa a viscosidade em uma determinada taxa de cisalhamento $\dot{\gamma}$, η_0 e η_{∞} correspondem às viscosidades nas baixas e altas taxas de cisalhamento, respectivamente. O parâmetro λ é uma constante de tempo relacionada ao início do comportamento pseudoplástico (*shear-thinning*). η_{ap} , K e $\dot{\gamma}$ representam a viscosidade aparente, índice de consistência e taxa de cisalhamento. “n” é o

índice adimensional que indica o grau de comportamento não newtoniano; quando $n = 1,0$, o fluido apresenta comportamento newtoniano.

Preparo dos filmes de CHI e CAS

Filmes provenientes da mistura entre CHI e CAS (1% e 10% v/v) foram produzidos pela técnica de *film casting* em moldes plásticos. Para isso as soluções de CHI pura e das respectivas misturas com CAS nos diferentes pHs foram secas a temperatura ambiente em capela com fluxo de ar ligado.

Nanoindentação com AFM

A indentação por AFM envolve um cantiléver com uma ponta fina ou uma sonda coloidal, que se aproxima da superfície da amostra sob controle preciso. Quando a sonda entra em contato com a superfície, ela aplica uma força controlada, e a profundidade resultante da indentação é medida. A interação entre a sonda e a amostra gera uma curva de força-deslocamento, ou curva de força, que é registrada em tempo real. A força resultante (F) depende da geometria do indentador e da profundidade da indentação (δ), conforme descrito na equação 3. Para uma esfera que indenta uma superfície plana com profundidade δ :¹⁰

$$F(\delta) = \frac{4}{3} \frac{E\sqrt{R}}{(1-\nu^2)} \delta^{3/2} \quad (3)$$

onde E representa o módulo de Young da amostra, R o raio da sonda coloidal e ν o coeficiente de Poisson da amostra, o qual foi considerado 0,5. É importante observar que essa abordagem é válida apenas para pequenas profundidades de indentação, puramente elásticas e lineares, em que $\delta \ll R$. O módulo de elasticidade dos filmes intumescidos foi determinado usando um AFM Bruker Multimode-8 como nanoindentador. Sondas coloidais foram esferas de sílica com diâmetro nominal de 10 μm fixadas na extremidade de *cantilevers* sem ponta, com constante de mola de 8,9 N/m (MikroMasch HQ:NSC35/tipless/No Al, Estados Unidos). Os filmes foram intumescidos em tampão fosfato PBS por no mínimo 24 h antes das medições para garantir equilíbrio de intumescimento de todos os filmes. As medidas foram realizadas com a sonda coloidal e filme imersos em PBS.

Resultados e Discussão

As curvas de viscosidade mostraram comportamento pseudoplástico de todos os sistemas. Em pH 5,5 (Figura 1a) CAS e CHI estão opostamente carregadas; as curvas experimentais se ajustaram bem ao modelo de Carreau-Yasuda (equação 1), com $R^2 > 0,996$, como mostra a Tabela 1. As curvas apresentaram um platô newtoniano, representando a viscosidade em baixas taxas de cisalhamento (η_0), entre aproximadamente 5–15 s^{-1} , seguido por uma região claramente pseudoplástica, com valores de n variando entre 0,73 e 0,78. A adição de 1% e 10% de CAS levou à diminuição de η_0 de 164 mPa.s para 146 mPa.s e 103 mPa.s, respectivamente, indicando que na presença de CAS, cadeias de CHI deixam de formar redes entrelaçadas entre si para interagir com as estruturas micelares de CAS por interações eletrostáticas. Quanto maior a quantidade de micelas de CAS, maior é a probabilidade de interação com cadeias de CHI, diminuindo o entrelaçamento intercadeias e, portanto, a viscosidade.

Em pH 3,0 (Figura 1b), as curvas experimentais se ajustaram melhor à lei das potências (equação 2), com $R^2 > 0,991$, como mostra a Tabela 2. Nesta condição, CAS e CHI estão positivamente carregadas, o platô em baixas taxas de cisalhamento foi menos evidente. Os valores de n variaram de 0,85 a 0,89,

ficando mais próximos a um comportamento newtoniano e indicando uma rede menos coesa devido à repulsão eletrostática entre as cadeias de CHI e CAS. Os índices de consistência diminuíram de 202 mPa.s^{0,15} para 110 mPa.s^{0,10}, na presença de 10% CAS, indicando interações favoráveis entre CHI e CAS. Essa mesma tendência também foi observada em pH 5,5 (Figura 1a), indicando que mesmo em pH 3,0 ocorrem interações entre CAS e CHI. Uma possível explicação para esse efeito é a regulação de carga da CAS pela presença de CHI, que favoreceria uma alteração do equilíbrio de ionização de grupos ácidos para valores maiores de pH.¹¹

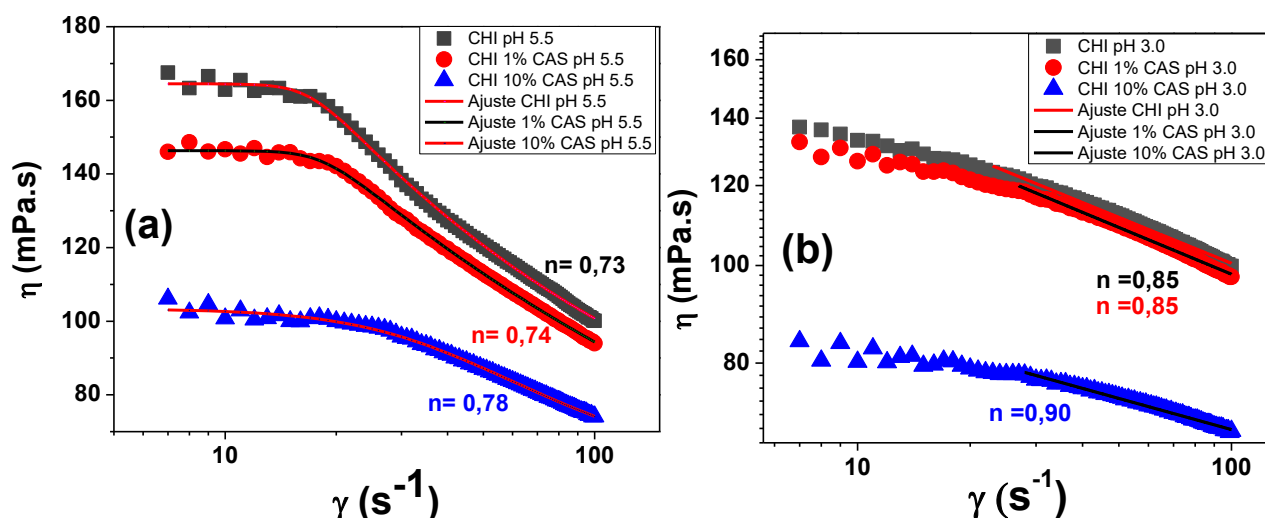


Figura 1. Viscosidade em função da taxa de cisalhamento para soluções de CAS e CHI em pH 5,5 (a) e pH 3,0 (b). Os valores de n correspondem às composições indicadas em diferentes cores na legenda

Tabela 1. Parâmetros de ajuste obtidos para as curvas de viscosidade em pH 5,5 com o modelo de Carreau-Yasuda.

	Qui pH 5,5	Qui 1% CAS pH 5,5	Qui 10% CAS pH 5,5
η_0	164,48 ± 0,30	146,34 ± 0,17	103,40396 ± 0,43338
η_∞	38,55 ± 6,88	5,62 ± 1,12	51,91 ± 18,17
λ	0,05852 ± 9,19002E-4	0,05439 ± 6,79421E-4	0,02615 ± 0,00876
γ	8,99 ± 1,34	8,51 ± 0,91	2,33 ± 0,37
n	0,73 ± 0,03	0,74 ± 0,03	0,78 ± 0,07
R^2	0,9987	0,9993	0,9961

Tabela 2. Parâmetros de ajuste obtidos para as curvas de viscosidade em pH 3, com o modelo de Ostwald de Waele.

	Qui pH 3,0	Qui 1% CAS pH 3,0	Qui 10% CAS pH 3,0
K	201,84 ± 0,17	199,07 ± 0,13	110,15 ± 0,11
n	0,850 ± 0,006	0,846 ± 0,005	0,893 ± 0,009
R^2	0,9942	0,9937	0,9909

Os resultados de nanoindentação com AFM (Figura 2) mostraram que em pH 3,0, os filmes de CHI puro e com 1% CAS apresentaram valores médios relativamente baixos de módulo de Young ($E \approx 89$ kPa) devido à repulsão eletrostática entre as cadeias. Já a adição de 10% de CAS em pH 3.0 levou a um aumento expressivo no valor de E ($\approx 127,3$ kPa), indicando interações favoráveis entre CAS e CHI e corroborando com o comportamento reológico. Em pH 5.5, os valores de E foram substancialmente maiores devido à atração eletrostática. Filmes de CHI pura apresentaram valor médio de $E \approx 534$ kPa, ao passo que os filmes contendo 1% e 10% de CAS apresentaram módulos de ≈ 695 kPa e ≈ 861 kPa, respectivamente. Tendência semelhante foi observada para hidrogéis de CHI contendo teores crescentes de micropartículas de PDMS, um elastômero mais rígido que CHI.¹²

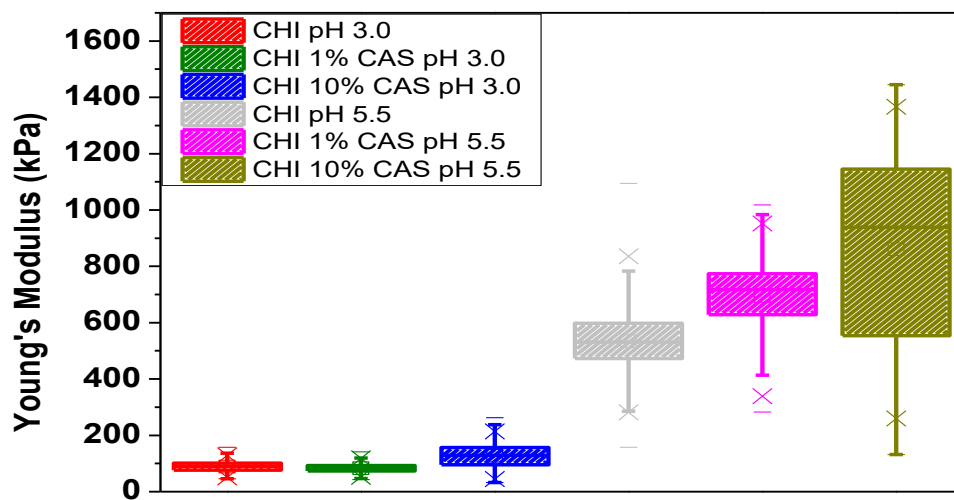


Figura 2. Valores médios de módulo de Young (E) calculados para 500 curvas de indentação com AFM para os filmes de CHI pura, na presença de 1% e 10% de CAS preparados a partir de soluções em pH 3,0 e 5,5, e intumescidos em PBS

Conclusões

O presente estudo demonstrou a forte dependência do pH nas interações entre a quitosana e a caseína, com implicações diretas nas propriedades reológicas das soluções e na rigidez mecânica dos filmes formados. Em pH 5.5, a atração eletrostática favorável resultou na formação de uma microestrutura em solução mais estável e coesa, que se manifestou nos filmes mais rígidos, com o módulo de Young atingindo 861 kPa na presença de 10% CAS. Em pH 3,0 CAS e CHI estão ambas positivamente carregadas, mas para sistemas com 10% CAS, a diminuição da viscosidade e aumento de E indicaram interações favoráveis. Tais resultados evidenciam que pH e concentração de CAS permitem a modulação do comportamento de fluxo das soluções e das propriedades mecânicas dos filmes, os quais são cruciais no desenvolvimento de materiais para engenharia de tecidos ou sistemas de entrega de medicamentos.

Agradecimentos

Agradecemos ao apoio financeiro da FAPESP (2018/13492-2, 2020/05632-9 e 2024/20008-0) e a Victor Basile Astuto pela assistência durante as medidas de viscosidade. O presente trabalho foi realizado com o apoio do Instituto de Química e de sua Central Analítica – Código CAIQUSP/100.

Referências

1. Shi, J.; Liu, Y.; Ling, Y.; Tang, H.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2024**, *274*, 133495. [[Crossref](#)]
2. Thivya, P.; Gururaj, P. N.; Reddy, N. B. P.; Rajam, R.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2024**, *268*, 131757. [[Crossref](#)]
3. Panda, P. K.; Sadeghi, K.; Park, K.; Seo, J.; *Polymers* **2023**, *15*, 1. [[Crossref](#)]
4. Cheung, R. C. F.; Ng, T. B.; Wong, J. H.; Chan, W. Y.; *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 5156. [[Crossref](#)]
5. da Silva, R. L. C. G.; Bernardinelli, O. D.; Frachini, E. C. G.; Ulrich, H.; Sabadini, E.; Petri, D. F. S.; *Carbohydr. Polym.* **2022**, *292*, 119725. [[Crossref](#)]
6. Peniche, H.; Razonado, I. A.; Alcouffe, P.; Sudre, G.; Peniche, C.; Osorio-Madrado, A.; David, L.; *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 1768. [[Crossref](#)]
7. Mishra, B.; Hossain, S.; Mohanty, S.; Gupta, M. K.; Verma, D.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *185*, 525. [[Crossref](#)]
8. Santesarti, G.; Marino, M.; Viola, F.; Verzicco, R.; Vairo, G.; J. Non-Newton. *Fluid Mech.* **2025**, *342*, 105438. [[Crossref](#)]
9. Barnes, H. A.; Hutton, J. F.; Walters, K.; *An introduction to rheology*, Elsevier: Amsterdam, 1989.
10. da Silva, R. L. C. G.; Ando, R. A.; Petri, D. F. S.; *Gels* **2025**, *11*, 496. [[Crossref](#)]
11. Barroso da Silva, F. L.; Boström, M.; Persson, C.; *Langmuir* **2014**, *30*, 4078. [[Crossref](#)]
12. da Silva, R. L. C. G.; Bezjak, D.; Corrales, T. P. Kappl, M.; Petri, D. F. S.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2025**, *286*, 138445 [<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.138445>].