



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade De Engenharia Química

CYNTHIA REGINA ALBRECHT MAHL

ADSORÇÃO DE ÍONS COBRE EM ESFERAS DE QUITOSANA  
MODIFICADA QUIMICAMENTE E ALGINATO NA PRESENÇA DO  
PEPTÍDEO  $\beta$ -AMILÓIDE OU HISTIDINA

Campinas – São Paulo  
Fevereiro/2018



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade De Engenharia Química

CYNTHIA REGINA ALBRECHT MAHL

ADSORÇÃO DE ÍONS COBRE EM QUITOSANA MODIFICADA  
QUIMICAMENTE E ALGINATO NA PRESENÇA DO PEPTÍDEO  $\beta$ -  
AMILÓIDE OU HISTIDINA

*Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de  
Engenharia Química como parte dos requisitos  
exigidos a obtenção do título de Doutora em  
Engenharia Química*

Orientadora: Profa. Dra. Marisa Masumi Beppu

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO FINAL DA TESE DE  
DOUTORADO DEFENDIDA PELA ALUNA CYNTHIA REGINA  
ALBRECHT MAHL, E ORIENTADA PELA PROFA. Dra. MARISA  
MASUMI BEPPU

Campinas – São Paulo  
Fevereiro/2018

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** CNPq, 142445/2013-4

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura  
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

M278a Mahl, Cynthia Regina Albrecht, 1987-  
Adsorção de íons cobre em esferas de quitosana modificada quimicamente e alginato na presença do peptídeo beta-amilóide ou histidina / Cynthia Regina Albrecht Mahl. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Marisa Masumi Beppu.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Cobre. 2. Quitosana. 3. Alginatos. 4. Histidina. 5. Beta-amilóide. I. Beppu, Marisa Masumi, 1972-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Copper ions adsorption in chemically modified chitosan and alginate beads in the presence of amyloid-beta peptide and histidine

**Palavras-chave em inglês:**

Copper  
Chitosan  
Alginate  
Amyloid-beta  
Histidine

**Área de concentração:** Engenharia Química

**Titulação:** Doutora em Engenharia Química

**Banca examinadora:**

Marisa Masumi Beppu [Orientador]  
Eduardo José de Arruda  
Sônia Maria Alves Bueno  
Igor Tadeu Lazzarotto  
Bresolin Bronislaw  
Polakiewicz

**Data de defesa:** 19-02-2018

**Programa de Pós-Graduação:** Engenharia Química

Tese de doutorado defendida por Cynthia Regina Albrecht Mahl e aprovada em 19 de fevereiro de 2018 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

---

Profa. Dra. – Marisa Masumi Beppu – Orientadora

---

Prof. Dr. Eduardo José de Arruda

---

Profa. Dra. Sônia Maria Alves Bueno

---

Prof. Dr. Igor Tadeu Lazzarotto Bresolin

---

Prof. Dr. Bronislaw Polakiewicz

\*A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”. (Isaac Newton)

Dedico este trabalho a minha mãe Edith.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força, paciência e sabedoria que me deu pra chegar até aqui.

Agradeço a minha família, Edith, Celio, Vilton e Felipe pelo apoio, compreensão, amor sem medida, que sempre me deram sem vocês nada disso seria possível, essa conquista também é de vocês.

À minha orientadora Profa. Dra. Marisa Masumi Beppu, que nunca desistiu de mim nem por um instante, pela sua dedicação na orientação deste trabalho, presteza nos ensinamentos, paciência e apoio em cada etapa do desenvolvimento desta pesquisa, e também pela confiança depositada para que isto acontecesse.

À grande amiga Kaciane Andreola que sempre esteve presente em todos os momentos durante esta caminhada, comemorando minhas vitórias e me ajudando a seguir em frente quando necessário, obrigada por sempre estar por perto.

Aos colegas de LEQUIP, Mariana, Rogério, Bruno, Giovana, Laíse, João, em especial Juliana Vaz e Thiago Taketa que sempre conseguem de alguma maneira deixar meus dias mais alegres.

Ao professor e amigo Classius Ferreira da Silva que foi o grande incentivador a trilhar o caminho da pesquisa científica.

À Profa. Dr. Wanda P. Almeida do Laboratório de Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos (LAFAME) do Instituto de Química da Unicamp, pelos auxílios e ensinamentos prestados na realização dos experimentos com o peptídeo amiloide.

Ao Prof. Rodnei Bertazzoli da FEM/Unicamp por ceder seu laboratório e equipamentos para realização das leituras no absorção atômica.

À equipe do LRAC (FEQ/Unicamp) pelas análises de MEV- EDX, DRX e FTIR. Ao Prof. Michael Rubner e Robert Cohen pela oportunidade de realizar as análise de XPS no laboratório CMSE-MIT e também a técnica Libby Shaw pelo treinamento e ensinamentos recebidos sobre o XPS.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPQ e FAPESP.

## RESUMO

Um dos principais marcadores da Doença de Alzheimer é a ligação anômala que ocorre entre o peptídeo  $\beta$ -amilóide ( $\beta$ A) e íons metálicos, tal como o cobre, realizada por resíduos de histidina (HIS). Polímeros naturais como a quitosana e o alginato, que possuem grupos funcionais capazes de quelatar íons cobre podem ser usados como modelos para melhor entender as interações biopolímero-cobre na DA. Com esta pesquisa, pretendeu-se estudar o comportamento de três biopolímeros na bioadsorção de cobre: alginato com quantidade elevada de grupos gulurônicos (AlgGEL), alginato com quantidade elevada de grupos manurônicos (AlgCOL) e quitosana funcionalizada com histidina (QuiHIS). A capacidade de interação com íons cobre foi testada na presença de histidina ou  $\beta$ A. Estudos de equilíbrio mostraram que os três adsorventes estudados apresentaram elevada capacidade de adsorção de íons cobre: 2,47; 2,51 e 2,41 mmol de Cu(II)/g de adsorvente para QuiHIS, AlgGEL e AlgCOL respectivamente. Embora as capacidades de adsorção tenham apresentado valores semelhantes, na presença de histidina o adsorvente que se destacou foi o AlgGEL que apesar do decréscimo de aproximadamente 20% na capacidade de adsorção após adição de histidina, foi o único que apresentou equilíbrio cinético semelhante para os diferentes sistemas estudados mostrando-se portanto mais estável. Mesmo apresentando estruturas químicas diferentes, os dois tipos de alginato, mostraram capacidades de adsorção semelhantes entre si, constatando então que a quantidade de grupos gulurônicos x grupos manurônicos não exerceu influência na capacidade de adsorção de íons cobre. Além da troca iônica, percebeu-se que, o mecanismo de adsorção do AlgGEL envolve principalmente os grupos carboxílicos do alginato e ligações hidroxilícas. Esses grupos foram observados através das análises de FTIR e XPS. O FTIR apontou que possivelmente ocorreu uma ligação bidentada via quelação metálica entre o alginato e o íon metálico. Com o FTIR e o XPS, também foi possível analisar a interação entre AlgGEL e HIS. A análise não detectou nenhuma interação, portanto, a diminuição da capacidade de adsorção ocorre provavelmente pela competição entre AlgGEL e HIS pelos íons cobre. Para finalizar, a isoterma realizada com o peptídeo  $\beta$ A mostrou resultados semelhantes aos resultados adquiridos com histidina.

## ABSTRACT

One of the hallmarks of Alzheimer's Disease (AD) is the anomalous binding that occurs between  $\beta$ -amyloid ( $\beta$ A) peptide and metal ions, such as copper, carried out through histidine residues. Natural polymers such as chitosan and alginate, which have functional groups capable of chelating copper ions, could be used as models to better understand biopolymer-copper interactions in DA. The aim of this research was to study the behavior of three biopolymers in copper adsorption: alginate with high amount of guluronic groups (AlgGEL), alginate with high amount of mannuronic groups (AlgCOL) and chitosan functionalized with histidine (QuiHIS). The ability to interact with copper ions was verified in the presence of histidine) or  $\beta$ A. Equilibrium studies showed that the three adsorbents presented high adsorption capacity of copper ions 2,47; 2,51 e 2,41 mmol of Cu (II) / g dry adsorbent respectively to QuiHIS, AlgGEL and AlgCOL. Despite similar adsorption capacities, in the presence of histidine the adsorbent that stood out was the AlgGEL that even with a decrease of approximately 20% in adsorption capacity after addition of histidine, was the only one that presented similar kinetic equilibrium for the different systems studied showing stability. Even with different chemical structures, the two types of alginate, showed a similar adsorption capacity with each other, showing that the amount of guluronic and mannuronic groups doesn't affect the adsorption capacity. In addition to ion exchange, it has been observed that the adsorption mechanism of AlgGEL mainly involves alginate carboxylic groups and hydroxylic bonds. These groups were observed through FTIR and XPS analyzes. FTIR results showed that adsorption occurs by bidentate bonds via metal chelation between alginate and metal ion. With FTIR analysis it was observed that, there is no interaction between AlgGEL and histidine, showing that possibly occurs a competition between histidine and AlgGEL by copper ions, which leads to its adsorption capacity reduction. Finally, the adsorption isotherm employing A $\beta$  peptide was like those obtained with histidine.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Processo proteolítico da proteína precursora amilóide (PPA) via secretases, geração do peptídeo $\beta$ A (CARRILLO-MORA; LUNA; COLIN-BARENQUE, 2014). .....	20
Figura 2 - Possíveis modelos de coordenação Cu(II) – $\beta$ A (STRELTSOV <i>et al.</i> , 2008). .....	22
Figura 3 - Estrutura linear da quitosana (RAVI KUMAR, 2000). ....	24
Figura 4 - Fórmula estrutural da L-histidina. ....	26
Figura 5 – Distribuição de várias formas protonadas da L-histidina em função do pH (DESCHAMPS <i>et al.</i> , 2005). ....	28
Figura 6 - Representação das moléculas dos ácidos que compõem o alginato. ....	29
Figura 7 - Rearranjo das cadeias de alginato devido à presença de metal divalente (BRACCINI; PEREZ, 2001). ....	30
Figura 8 - Esquema do processo de obtenção das esferas. ....	36
Figura 9 – Reações propostas para funcionalização da histidina na matriz de quitosana (RAJ ADHIKARI <i>et al.</i> , 2008). ....	37
Figura 10 – Ilustração dos procedimentos utilizados nos ensaios de adsorção. ....	39
Figura 11 – Esferas dos adsorventes utilizados, antes e após adsorção de íons cobre, a) Qui, b) QuiHIS, c) QuiHIS+Cu (II), d) AlgGEL, e) AlgGEL+Cu (II), f) AlgCOL e g) AlgCOL+Cu (II). Régua com escala em mm. ....	46
Figura 12 - Microscopia eletrônica de varredura das esferas liofilizadas de a) Qui, b) QuiHIS, c) QuiHIS+Cu(II) e d) (Cu(II)+His)+QuiHIS.....	48
Figura 13 - Microscopia eletrônica de varredura das esferas liofilizadas de a) AlgGEL, b) AlgGEL+Cu(II) e c) (Cu(II)+His) + AlgGEL. ....	48
Figura 14 - Microscopia eletrônica de varredura das esferas liofilizadas de a) AlgCOL, b) AlgCOL+Cu(II) e c) (Cu(II)+His) + AlgCOL. ....	49
Figura 15 - Difratogramas de Raios-X para amostras de quitosana natural e funcionalizada com histidina, antes e após adsorção de íons cobre e adição de histidina. ....	50
Figura 16 - Difratogramas de Raios-X para amostras de AlgCOL, antes e após adsorção de íons cobre.....	51
Figura 17 - Difratogramas de Raios-X para amostras de AlgGEL, antes e após adsorção de íons cobre.....	51

Figura 18 - Curva de titulação potenciométrica e sua derivada primeira para esferas de quitosana natural (Qui) e quitosana funcionalizada com histidina (QuiHIS).....	53
Figura 19– Espectros de FTIR das esferas de Qui, QuiHIS, QuiHIS+Cu(II) e (Cu(II)+HIS)+QuiHIS .....	54
Figura 20 – Espectros de FTIR realizados a partir de um teste onde as esferas de quitosana funcionalizada foram colocadas em contato com uma solução de histidina 100 µM durante 24h e após isso a análise foi efetuada. ....	55
Figura 21 - Espectros de infravermelho para os alginatos AlgCOL rico em blocos manurônicos e AlgGEL rico em blocos gulurônicos. ....	56
Figura 23 - Espectros de infravermelho antes e após adsorção de íons cobre e adição de histidina em AlgGEL. ....	58
Figura 24– Diferentes tipos de coordenação para o complexo metal-carboxilato (PAPAGEORGIOU <i>et al.</i> , 2010). ....	59
Figura 25 - Espectros de fotoelétrons de alta resolução do C1s e suas respectivas deconvoluções para o AlgGEL antes e após adsorção e adição de histidina. ....	62
Figura 26 - Identificação dos picos que sofreram deconvolução com base nas energias de ligação para o C1s com suas respectivas concentrações atômicas para cada sistema estudado. ....	63
Figura 27 - Espectros de fotoelétrons de alta resolução do O1s e suas respectivas deconvoluções para o AlgGEL antes e após adsorção e adição de histidina. ....	65
Figura 28 - Identificação dos picos deconvolucionados com base nas energias de ligação para o O1s com suas respectivas concentrações atômicas para cada sistema estudado. ....	66
Figura 29 – Espectro de alta resolução do Cu2p para o AlgGEL após adsorção de cobre e adição de histidina.....	67
Figura 30– Cinética de adsorção das esferas de quitosana funcionalizada com histidina, utilizando, temperatura de 25°C, pH 5 e concentração inicial de 0,47 mmol/L de nitrato de cobre. ....	68
Figura 31 - Cinética de adsorção das esferas do alginato AlgGEL, utilizando temperatura de 25°C, pH 5 e concentração inicial de 0,47 mmol/L de nitrato de cobre. ....	69
Figura 32 - Cinética de adsorção das esferas do alginato AlgCOL, utilizando temperatura de 25°C, pH 5 e concentração inicial de 0,47 mmol/L de nitrato de cobre .....	70

Figura 33 – Cinética de dessorção de íons cobre após adição de histidina para QuiHIS, AlgGEL e AlgCOL utilizando banho finito com T:25°C e pH:5.....	71
Figura 34 – Isotermas de adsorção das esferas de quitosana funcionalizada com histidina, utilizando temperatura de 25°C e pH 5.....	75
Figura 35– Isotermas de adsorção das esferas do alginato AlgGEL, utilizando temperatura de 25°C e pH 5.....	76
Figura 36 – Isotermas de adsorção das esferas do alginato AlgCOL, utilizando temperatura de 25°C e pH 5.....	76
Figura 37 - Isoterma de adsorção do sistema AlgGEL+Cu(II) e (Cu(II)+βA)+AlgGEL em pH 5 e T=36,5°C.....	80

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Caracterização dos alginatos quanto á sua origem e quantidade de blocos gularônicos e manurônicos, onde, fração molar dos Blocos M ( <b>FM</b> ) , fração molar dos Blocos G ( <b>FG</b> ), fração molar dos Blocos GG ( <b>FGG</b> ) e fração molar dos Blocos MM ( <b>FMM</b> ) dos alginatos.....	38
Tabela 2- Nomenclatura dos sistemas estudados. ....	40
Tabela 3- Diâmetro médio dos adsorventes utilizados QuiHIS, AlgGEL e AlgCOL. Os resultados foram obtidos a partir do <i>software</i> ImageJ <sup>®</sup> .....	45
Tabela 4 - Valor da separação das bandas assimétrica e simétrica para os espectros de FTIR dos alginatos e sistemas estudados. ....	59
Tabela 5 - Composição química dos adsorventes antes e após adsorção de cobre e adição de histidina determinada por XPS.....	61
Tabela 6– Parâmetros cinéticos obtidos para os modelos de pseudo-primeira e pseudo-segunda ordem para QuiHIS, AlgGEL e AlgCOL antes e após adição de histidina. Adsorção em banho estático com T: 25°C e pH 5.....	73
Tabela 7 – Parâmetros de equilíbrio obtidos para os modelos de Langmuir e Freundlich para QuiHIS, AlgGEL e AlgCOL antes e após adição de histidina. Adsorção em banho estático com T: 25°C e pH 5.....	78
Tabela 8 – Valores de capacidade de adsorção de íons cobre para diferentes adsorventes (Li & Bai, 2005; Ngah et al., 2010; Ngah, Kamari, & Koay, 2004; Ngah & Fatinathan, 2008; Popuri, Vijaya, Boddu, & Abburi, 2009; Wan Ngah, Endud, & Mayanar, 2002).....	79
Tabela 9 - Parâmetros de equilíbrio obtidos para os modelos de Langmuir e Freundlich para os sistemas AlgGEL-Cu(II) e (Cu(II)- $\beta$ A)-AlgGel. Adsorção em banho estático com T: 25°C e pH 5. ....	81

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	<b>17</b>
2.1	Objetivos Específicos .....	17
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>18</b>
3.1	A doença de Alzheimer .....	18
3.2	Peptídeo $\beta$ A .....	19
3.3	O cobre e sua relação com o peptídeo $\beta$ A .....	21
3.4	Agentes quelantes .....	23
3.5	Quitosana .....	23
3.6	Funcionalização da quitosana .....	25
3.6.1	Histidina .....	26
3.7	Alginato .....	28
3.8	Princípios teóricos de bioadsorção .....	31
3.9	Isotermas de adsorção .....	32
3.9.1	Isoterma de Langmuir .....	32
3.9.2	Isoterma de Freundlich .....	33
3.10	Cinética de adsorção .....	33
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
4.1	Reagentes e matérias-primas .....	35
4.2	Preparação dos adsorventes .....	35
4.2.1	Preparação das esferas de quitosana .....	35
4.2.2	Funcionalização das esferas de quitosana com histidina .....	36
4.2.3	Preparação das esferas de alginato .....	37
4.3	Ensaio de adsorção .....	38
4.3.1	Cinética de adsorção .....	40
4.3.2	Isotermas de adsorção .....	40
4.3.3	Isoterma de adsorção de íons cobre na presença do peptídeo $\beta$ A .....	41
4.4	Métodos de Caracterização .....	41
4.4.1	Morfologia da superfície dos adsorventes .....	41
4.4.2	Diâmetro médio dos adsorventes .....	42
4.4.3	Determinação da estrutura química dos adsorventes .....	42

4.4.4	Determinação da cristalinidade dos adsorventes .....	42
4.4.5	Determinação do Grau médio de Desacetilação (GD) das esferas de quitosana.....	43
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>45</b>
5.1	Caracterização dos adsorventes .....	45
5.1.1	Diâmetro médio das esferas.....	45
5.1.2	Morfologia dos adsorventes.....	47
5.1.3	Determinação da cristalinidade dos adsorventes .....	49
5.1.4	Determinação do Grau Médio de Desacetilação (GD) das esferas de quitosana.....	52
5.1.5	Determinação da estrutura química dos adsorventes.....	53
5.1.6	Determinação da composição química das esferas de AlgGEL.....	60
5.2	Ensaio de adsorção dos íons cobre na presença de histidina.....	67
5.2.1	Cinética de adsorção .....	67
5.2.2	Isotermas de Adsorção.....	74
5.3	Isoterma de adsorção de íons cobre na presença do peptídeo $\beta$ A.....	79
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO FINAL .....</b>	<b>82</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>85</b>
<b>8</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>86</b>
<b>9</b>	<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>97</b>
<b>10</b>	<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>98</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A quitosana é um aminopolissacarídeo composto por dois açúcares, glicosamina N-acetilglicosamina, com propriedades físico-químicas e biológicas únicas. É biocompatível, não tóxica para células e biodegradável. Além do mais, é um polímero funcional relevante para aplicações farmacêuticas e biomédicas. As matrizes de quitosana podem ser formuladas como gel, membranas, nanoestruturas e esferas (GUIBAL, 2004).

O alginato é um copolímero linear de alto peso molecular constituído de dois ácidos urônicos,  $\beta$ -D-manurônico (M) e  $\alpha$ -L-gulurônico (G). As diferenças na conformação molecular entre os blocos M e G dependem da fonte originária do alginato, sendo esse, um fator influente nas propriedades físico-químicas, reológicas e mecânicas do polímero (PAPAGEORGIU *et al.*, 2006). Assim como a quitosana, o alginato é biodegradável, biocompatível, atóxico, sendo empregado largamente em ramos industriais como médico-farmacêutico, biotecnológico e alimentício (MANCINI *et al.*, 1996; ERTESVÅ; VALLA, 1998).

Uma das características mais relevantes e comuns para os dois polímeros é a alta afinidade que estes possuem com muitas classes de corantes, proteínas e íons metálicos. Os sistemas cobre-quitosana e alginato-cobre têm sido extensivamente estudados devido a preocupações ambientais. De acordo com Rhazi *et al.* (2001), o íon cobre se liga à quitosana por meio de um mecanismo de quelação e o processo de adsorção ocorre com ligações covalentes, nas quais os íons se ligam preferencialmente aos grupos amino e hidroxila do quitosana. Para o alginato, o principal mecanismo é a troca iônica e as ligações ocorrem principalmente através de grupos carboxílicos. (PAPAGEORGIU *et al.*, 2010).

A habilidade da quitosana e do alginato para se ligarem a íons cobre pode ser estendida para outros campos além do ambiental. Atualmente, a Doença de Alzheimer (DA) vêm sendo associada ao desequilíbrio na homeostase de determinados metais, particularmente os que possuem atividade redox como o cobre e o ferro. Outro fator é a síntese anormal do peptídeo  $\beta$ -amilóide ( $\beta$ A), sendo altamente influenciada pelos íons metálicos (Al, Cu, Fe e Zn). Sabe-se que o peptídeo  $\beta$ A tem elevada afinidade com o íon cobre, o que pode promover a sua toxicidade. Ao se ligar ao íon cobre, ele reduz de  $\text{Cu}^{2+}$  para  $\text{Cu}^{+}$  e catalisa a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS)

além de produzir agregados insolúveis causando a morte de células neuronais (CHAUHAN; CHAUHAN, 2006; RIVERA-MANCIA *et al.*, 2010).

Prox *et al.* (2012) apontou que o peptídeo  $\beta$ A apresenta sítios de coordenação com íons cobre, e que resíduos de histidina localizados na parte N-terminal do peptídeo são os principais responsáveis pela ligação do peptídeo com o íon metálico.

Não existe um consenso sobre um único alvo patogênico a ser tratado na DA. Deste modo, entende-se que é necessário haver ação sobre os agregados, emaranhados neurofibrilares bem como todos os mecanismos que promovem a deposição do peptídeo  $\beta$ A. Quanto mais se conhecer sobre mecanismos patofisiológicos da doença, maior será a possibilidade de se encontrarem novos fármacos que venham evitar a progressão da DA. As pesquisas atuais abrangem cada vez mais a interdisciplinaridade, combinando estudos químicos, bioquímicos, biológicos e toxicológicos, permitindo uma compreensão mais completa dos mecanismos subjacentes e a formulação de terapias mais eficazes para compor o arsenal químico contra a DA, que desafia a comunidade científica há mais de um século.

Neste trabalho, alginato e quitosana atuaram como quelantes de íons cobre na presença de histidina (HIS) ou  $\beta$ A. Foram estudadas suas capacidades de adsorção frente a estes competidores, e também estes sistemas foram caracterizados a fim de estudar o comportamento dos polímeros no processo de adsorção.

Espera-se com isso entender os mecanismos de adsorção, bem como localizar sítios de coordenação e ligação entre o íon metálico cobre e os polímeros alginato e quitosana e qual a mudança observada quando o peptídeo  $\beta$ A ou a histidina se fazem presentes nestes sistemas. Com os resultados deste estudo, teremos um melhor entendimento da interação metal-biopolímero como as encontradas na DA que podem no futuro servir de modelo para compreendermos de forma completa a ligação entre  $\beta$ A e cobre, avançando assim, no entendimento da doença.

## 2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi estudar a ação quelante dos polímeros naturais quitosana e alginato por íons cobre, na presença do peptídeo beta amiloide e de histidina, bem como os mecanismos envolvidos no processo de adsorção.

### 2.1 Objetivos Específicos

- Preparação dos adsorventes: Nos ensaios de adsorção de íons cobre foram utilizados três tipos de adsorventes. Esferas de quitosana funcionalizada com histidina (QuiHIS), alginato com quantidade elevada de blocos gulurônicos (AlgGEL) e alginato com quantidade elevada de blocos manurônicos (AlgCOL).
- Caracterização das esferas QuiHIS, AlgGEL e AlgCOL utilizando análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de Raios-X (DRX), espectroscopia de infravermelho por transformada de fourier (FTIR-ATR) e Espectroscopia de fotoelétrons excitados por Raios-X (XPS). Estas análises foram realizadas antes e após a adsorção de íons cobre e posterior adição de histidina ao sistema
- Ensaios de adsorção de íons cobre adicionando alternadamente histidina ao sistema empregando as esferas de QuiHIS, AlgGEL e AlgCOL como adsorvente. Foram obtidos dados experimentais de isothermas e cinéticas de adsorção.
- Obtenção de isoterma de adsorção de íons cobre empregando o peptídeo  $\beta$ A a fim de comparar dados obtidos com a histidina.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 A doença de Alzheimer

De acordo com a *Alzheimer's Association*, demência é um termo genérico que descreve uma variedade de doenças e condições que se desenvolvem quando os neurônios morrem ou deixam de funcionar normalmente. A doença de Alzheimer (DA) é, atualmente, a principal demência que acomete a população idosa, sendo responsável por cerca de 60 a 80% de todas as demências, sua prevalência vem aumentando devido ao envelhecimento da população. Foi descrita pela primeira vez por Alois Alzheimer no início do século XX, mas as pesquisas voltadas a desvendar seus sintomas, causas, fatores de risco e tratamento ganhou impulso somente nos últimos 30 anos. Embora, as pesquisas tenham tido grandes avanços sobre o entendimento da DA, as alterações precisas no cérebro que desencadeiam a doença, e a ordem que elas ocorrem, em grande parte, permanecem desconhecidas (ASSOCIATION, 2013).

Em pouco menos de quarenta anos, o mundo terá três vezes mais pessoas com doenças causadoras de demência. Essa é a estimativa atualizada de um estudo publicado pela *Alzheimer's Disease International*, federação internacional que reúne organizações destinadas a estudar e apoiar pacientes de demência, sendo a doença de Alzheimer a mais comum entre elas. O estudo estima que existam hoje no mundo cerca de 44 milhões de pessoas com a condição. O número deve aumentar para 76 milhões em 2030 e para 135 milhões em 2050 (AL'HANATI, 2013).

A DA afeta as pessoas de maneiras diferentes, o sintoma mais comum começa com um gradual agravamento da capacidade de lembrar novas informações, isto ocorre, porque os primeiros neurônios a morrer ou ter mau funcionamento são aqueles envolvidos na formação de novas memórias. Os sintomas mais comuns da doença são descritos as seguir:

- Perda de memória;
- Dificuldades em planejar ou resolver problemas;
- Dificuldades em completar tarefas em casa, no trabalho ou lazer;
- Confusão com tempo ou espaço;
- Problemas em entender imagens visuais e relações espaciais;
- Problemas com palavras tanto na fala quanto na escrita;
- Perder coisas ou perder a capacidade de refazer os passos;

- Diminuição ou falta de bom senso;
- Desistência do trabalho e atividades sociais;
- Mudanças no humor e na personalidade.

Os dois fatores mais comuns que estão ligados à DA são: a idade (aparece em geral por volta de 60-70 anos e nem sempre é diagnosticado) e o fator hereditário. Sabe-se que um terço de pacientes com Alzheimer já tiveram parentes de primeiro grau afetados pela DA. Outros fatores não tão frequentes que podem estar associados com o desenvolvimento da DA, incluem traumatismo craniano, baixos níveis de educação, o sexo feminino, casos de depressão e fatores vasculares (ASSOCIATION, 2013).

A DA é uma doença complexa, na qual, muitos fatores podem estar envolvidos e algumas hipóteses têm sido propostas para explicar a iniciação e o progresso do processo neurodegenerativo. As duas principais características morfológicas relacionadas a DA são as placas senis ou neuríticas e os emaranhados neurofibrilares. As placas senis são formadas pela deposição extracelular de fibrilas do peptídeo  $\beta$ A e os emaranhados neurofibrilares, por agregados intraneuronais da proteína tau hiperfosforilada. Estas características morfológicas conduziram a elaboração de uma das principais hipóteses que tentam explicar a patogênese da DA: a hipótese da cascata amilóide (GAGGELLI *et al.*, 2006).

A hipótese da cascata amilóide é a mais definida e mais estudada teoria conceitual da DA. Foi formalizada em 1992 por Hardy e Higgins onde foi estabelecido que “a deposição do peptídeo  $\beta$ -amilóide, o principal componente das placas amilóide, é o agente causador da patologia e os emaranhados neurofibrilares, danos celulares, danos vasculares seguido da demência, são resultado direto desta deposição” (HARDY; HIGGINS, 1992).

### 3.2 Peptídeo $\beta$ A

A identificação do peptídeo  $\beta$ A nas placas senis, por meio de análises histológicas *post mortem* em cérebros de pacientes com DA, levantou a hipótese de que este evento pudesse estar relacionado ao desencadeamento da patologia. Segunda esta hipótese, a neurodegeneração da DA começa com o processamento anormal da proteína precursora amilóide (PPA) e resulta na produção, agregação e deposição do peptídeo  $\beta$ A. Aparentemente, a cascata amilóide pode facilitar a formação dos emaranhados neurofibrilares e a morte celular (GAGGELLI *et al.*, 2006).

O peptídeo  $\beta$ A possui de 39 a 42 resíduos de amino ácidos e é usualmente produzido em todos os neurônios por um processo sequencial proteolítico de uma proteína de membrana, a PPA, utilizando duas enzimas complexas: a  $\beta$  e a  $\gamma$ -secretase (VETRIVEL; THINAKARAN, 2006).

A PPA pode ser processada através de dois caminhos enzimáticos distintos: o caminho “amiloidogênico” e o “não amiloidogênico”. O primeiro caminho “amiloidogênico” é iniciado pela enzima  $\beta$ -secretase que cliva a região extracelular da PPA. Após a clivagem, a enzima  $\gamma$ -secretase que contém, presenilina 1(PS1), presenilina 2(PS2) e nicastrina, hidrolisa a PPA no meio de seu domínio intracelular, gerando um fragmento volumoso e solúvel denominado PPAs- $\beta$ , um outro fragmento denominado domínio intracelular PPA (DIPPA) e o peptídeo  $\beta$ A. O caminho alternativo da clivagem da PPA denominado “não amiloidogênico” é iniciado pela  $\alpha$ -secretase, o qual cliva a PPA no domínio  $\beta$ A. Neste caso, a  $\gamma$ -secretase produz o p3, um peptídeo contendo 24 ou 26 amino ácidos, a PPAs- $\alpha$  uma proteína volumosa e solúvel liberada extracelularmente e o DIPPA (TISCHER; CORDELL, 1996; VASSAR *et al.*, 1999). A Figura 1 ilustra o processo.

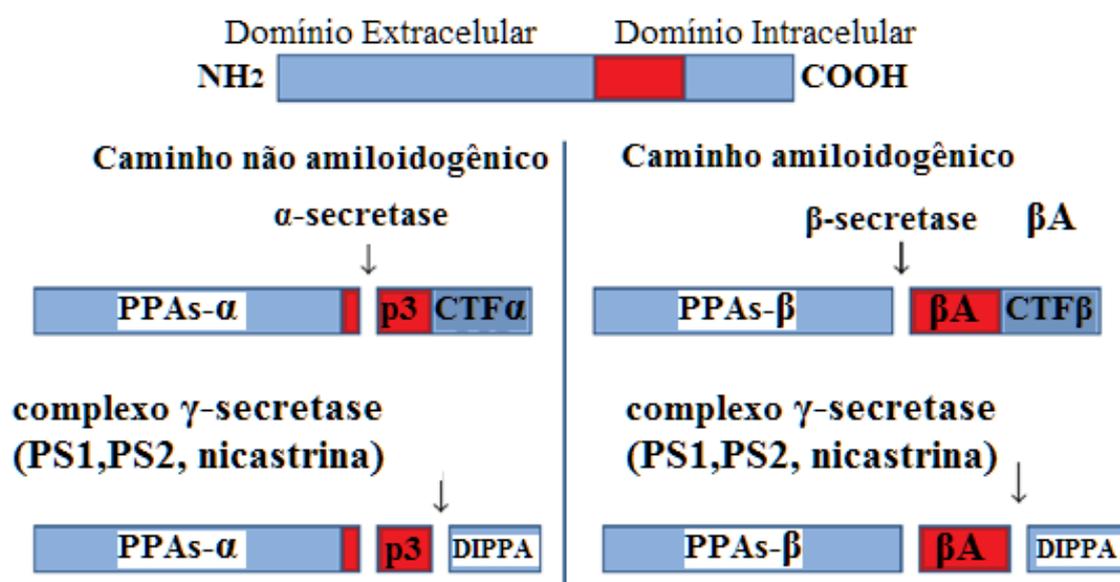


Figura 1- Processo proteolítico da proteína precursora amilóide (PPA) via secretases, geração do peptídeo  $\beta$ A (CARRILLO-MORA; LUNA; COLIN-BARENQUE, 2014).

A hipótese da cascata amilóide sugere que o peptídeo  $\beta$ A tenha um papel importante na origem e progresso dos danos nos tecidos nervosos encontrados nos pacientes com DA. Algumas evidências que suportam esta hipótese são: (1) a

constatação da  $\beta$ A ser o principal componente tanto das placas neuríticas quanto da angiopatia amilóide observadas em pacientes com DA; (2) a observação na qual as mutações responsáveis pelas formas familiares encontradas na DA de algum modo aumentam a produção de  $\beta$ A e (3) os inúmeros efeitos tóxicos que o  $\beta$ A tem mostrado tanto em experimentos *in vivo* quanto *in vitro* e que reproduz algumas das alterações observadas na DA (ATWOOD *et al.*, 2003; VETRIVEL; THINAKARAN, 2006).

### 3.3 O cobre e sua relação com o peptídeo $\beta$ A

O cobre é de fundamental importância para o metabolismo humano, pois tem o papel de catalisar processos biológicos como respiração, transporte de ferro, produção de hormônios peptídicos, coagulação do sangue e crescimento normal das células. Além disso, está presente em diversas enzimas que fazem parte do sistema nervoso cerebral, controlando etapas da síntese dos tecidos cognitivos (LINDER; HAZEGH-AZAM, 1996).

Em excesso ou na forma livre dentro da célula o cobre é tóxico pois coordena-se facilmente a diferentes grupos funcionais e tem a capacidade de promover a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) como  $H_2O_2$ ,  $O_2$  e  $OH^-$  via reações de Haber-Weiss e Fenton (HUANG *et al.*, 1999).

A DA está associada a alterações nos níveis de cobre e a mudanças no metabolismo do metal. Estas mudanças são caracterizadas por alterações na homeostase do metal, que contribuem de forma direta ou indireta para o aumento do estresse oxidativo, que é consequência da presença excessiva de radicais livres, um importante fator na toxicidade neural. O íon  $Cu(II)$  forma complexos com  $\beta$ A que induzem a formação das fibras amilóide (DONG *et al.*, 2007; HUANG *et al.*, 1999; JIANG *et al.*, 2007). Elevadas concentrações de cobre foram encontrados em pacientes com DA, onde a concentração de cobre chega a ser 400 vezes maior se comparado com uma pessoa saudável que possui ao redor de 0,2 – 1,7  $\mu$ M de cobre (SMITH *et al.*, 2007).

Diversos estudos mostraram que as EROS são formadas provavelmente como consequência da coordenação do peptídeo ( $\beta$ A 1-42) com íons cobre. Quando o cobre se liga ao  $\beta$ A 1-42, o peptídeo consegue reduzir o íon  $Cu(II)$  à  $Cu(I)$ , e os complexos formados por  $\beta$ A- $Cu(I)$  são responsáveis por reduzir cataliticamente  $O_2$  a  $H_2O_2$  neurotóxicos. A formação destas espécies reativas de oxigênio é um dos fatores que

levaram o cobre a ser considerado como potencializador da toxicidade da placa amilóide (OPAZO *et al.*, 2002; RAFFA; RICKARD; RAUK, 2007).

Estudos recentes indicam que resíduos de histidina estão envolvidos na coordenação do Cu(II). Streltsov *et al.* (2008), relataram que o sítio de ligação preferencial do cobre na  $\beta$ A é um “*distorted six-coordinated*” (arranjo piramidal quadrado dissimétrico) com três resíduos de histidina ( His-6, His-13 e His-14) e com os ligantes axiais consistindo em uma molécula de água e oxigênio carboxilato podendo ser Glu-11 ou Asp-1 (YUGAY *et al.*, 2016). Os dois possíveis modelos são apresentados na Figura 2.

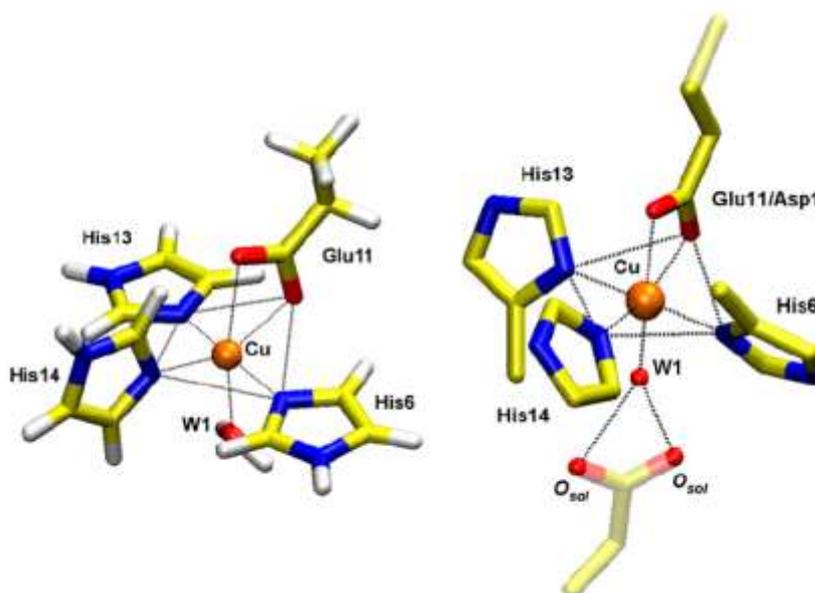


Figura 2 - Possíveis modelos de coordenação Cu(II) –  $\beta$ A (STRELTSOV *et al.*, 2008).

Desde que o peptídeo  $\beta$ A foi encontrado em pacientes com doenças degenerativas, realizaram-se estudos para se descobrir uma maneira de solubilizá-la (HUREAU; FALLER, 2009). Uma dessas estratégias é o uso de agentes quelantes. Foi constatado que a solubilização da  $\beta$ A no tecido cerebral de pacientes com DA aumentou na presença de quelantes de metais como N,N,N',N' – tetraquis ( 2 – piridil-metil), etileno diamina e *bathocuproine* (CHERNY *et al.*, 1999). Estudos *in vivo* foram realizados com tratamento oral de clioquinol, um quelante moderado de  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ , resultando em um decréscimo de 49% na deposição de  $\beta$ A (CHERNY *et al.*, 2001).

Nos últimos anos, o interesse em relação ao papel que os metais desempenham na DA tem sido altamente citado após a publicação de vários artigos. Estes, por sua vez indicam que estratégias terapêuticas voltadas para a reversão do desequilíbrio na

homeostase dos metais provocaram mudanças positivas, pois são capazes de interromper a agregação do  $\beta$ A, dissolver as placas amilóides e retardar a deterioração cognitiva relacionada com a DA (ADLARD *et al.*, 2008; CHERNY *et al.*, 2001; OPAZO *et al.*, 2003).

### 3.4 Agentes quelantes

Agentes quelantes são moléculas capazes de formar complexos com íons metálicos através de suas ligações covalentes dativas e a estrutura deste complexo geralmente se dá em forma de anel. Para um composto ser quelante deve possuir pelo menos dois grupos funcionais capazes de se ligar ao metal. Podem ser grupos ácidos, que ao ficarem na forma básica podem coordenar-se com metais ou podem ser grupos básicos que contêm um átomo com um par de elétrons não ligante para interagir com o íon metálico (BELL, 1977).

Os agentes quelantes possuem átomos que formam ligações covalentes com um íon metálico central, onde o número de ligações depende do tamanho do metal, da identidade do quelante e das interações eletrônicas. O número máximo de ligações que se pode estabelecer entre o íon metálico e os átomos doadores dos quelantes denomina-se, número de coordenação do metal (SHRIVER; ATKINS, 2008).

Estes compostos apresentam capacidade para se ligar a vários íons metálicos e, desta forma, proporcionar ao organismo a redução da concentração destes metais. Para utilização de agentes quelantes no tratamento da DA, estes devem obedecer alguns parâmetros como, atravessar a barreira hemato - encefálica (BHE) para escolher seletivamente o alvo metálico no cérebro, não devem alterar o equilíbrio homeostático no organismo e devem possuir afinidade pelo íon metálico desejado, reduzindo assim, a concentração de íons metálicos no cérebro que influenciam a DA. Os quelantes atuam na DA, adsorvendo os íons metálicos e, conseqüentemente, dissolvendo o peptídeo  $\beta$ A (ZHENG; FRIDKIN; YODIM, 2010).

### 3.5 Quitosana

A quitina é um dos polímeros naturais mais abundantes na natureza, sendo o principal componente de exoesqueleto de caranguejo, camarão e siri. É um homopolímero linear composto por unidades de 2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glicose

com configuração tridimensional  $\alpha$ -helicoidal estabilizada por ligações de hidrogênio. A quitosana, por sua vez é composta de unidades de 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose (N-acetil-glucosamina), é um polímero natural hidrofílico obtido pela hidrólise dos grupos aminoacetil da quitina através de tratamento alcalino (SKJÅK-BRAEK; ANTHONSEN; SANDFORD, 1989).

A quitosana é uma poliamina linear onde os grupos amino estão disponíveis para realizar reações químicas. É solúvel em ácidos diluídos como ácido acético, ácido fórmico, etc. Algumas de suas características intrínsecas são o peso molecular, a viscosidade, o grau de desacetilação, a cristalinidade, o número de unidades monoméricas e o pKa. Sabe-se que tem a capacidade de quelar íons metálicos através da coordenação dos grupos amino. Suas propriedades biológicas são: biocompatibilidade (não tóxica, biodegradável, natural), hemostática, bacteriostática, dentre outras (FERREIRA., 1994).

Além dos grupos amino, a quitosana é constituída de outros dois grupos funcionais, um grupo de hidroxilas primárias e outro de hidroxilas secundárias que se encontram respectivamente nos carbonos C-2, C-3 e C-6 mostrado na Figura 3 que apresenta sua estrutura (FURUSAKI *et al.*, 1996).

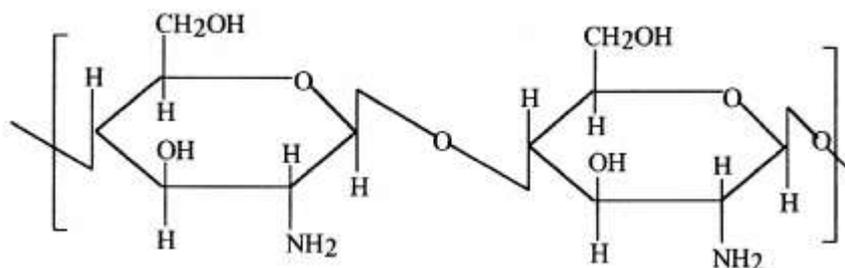


Figura 3 - Estrutura linear da quitosana (RAVI KUMAR, 2000).

Existe uma variedade de aplicações e produtos da quitosana, devido às suas propriedades físicas, químicas e biológicas. Para cada diferente aplicação, diferentes propriedades são exigidas (DUTTA, 2004). É utilizada principalmente em produtos farmacêuticos, cosméticos e biomédicos para tratamento de cabelo, cuidados com a pele e cicatrização de feridas, também atua na área alimentícia, na gestão de resíduos e na agricultura como quelante de metais tóxicos ou radioativos, revestimento de sementes dentre outros (KAS, 1997).

A quitosana evidencia notável capacidade adsorvente, devido ao par de elétrons livres disponíveis no átomo de nitrogênio, o que torna os grupos aminos

fortemente reativos com íons metálicos. Além disso, tem alta hidrofiliçidade devido aos grupos hidroxil, um grande número de grupos funcionais, alta reatividade destes grupos e flexibilidade da cadeia polimérica (CRINI, 2005).

Segundo a literatura, a adsorção de íons cobre ocorre através de ligações covalentes, principalmente com os grupos amino e hidroxilas da quitosana, esse mecanismo também é chamado de quelação (RHAZI *et al.*, 2002).

Utilizando-se medidas de Raios-X para complexos de quitosana com Cd(II), Zn(II) e Cu(II), foi proposto um modelo que demonstra o mecanismo de coordenação do complexo quitosana-metal chamada de “*pendant model*”, este modelo estabelece que uma espécie metálica liga-se a um grupo amino como se fosse um pingente (OGAWA; OKA; YUI, 1993). Outro modelo, “*bridge model*”, sugere que os íons metálicos são coordenados por vários grupos amino originários da mesma ou de diferentes cadeias do polímero (SCHLICK, 1986).

Estudos mostraram a adsorção de alguns metais utilizando quitosana como adsorvente, e pode-se encontrar capacidades máximas de adsorção para os íons  $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  de 815, 222, 164 e 75 mg/g respectivamente (MCKAY, G.; BLAIR; FINDON, 1989). Outro estudo mostrou que 1 g de quitosana pode adsorver até 4,7 mg de  $Cu^{2+}$ , à um pH de 6,2 (NGAH; ISA, 1998).

Mahl (2013) estudou a adsorção de íons cobre em esferas de quitosana, na presença de histidina, um agente quelante de metais. Observou-se uma competição entre quitosana e histidina por íons cobre, que mesmo na presença deste quelante, continuou a adsorver cobre.

### 3.6 Funcionalização da quitosana

Pela literatura, sabe-se que as propriedades físico-químicas e biológicas da quitosana levaram ao reconhecimento deste polímero como um biomaterial promissor, especialmente na área da adsorção. A existência de grupos amino e hidroxila em suas moléculas contribui para possíveis interações entre a quitosana e diferentes tipos de poluentes (corantes, íons metálicos, fenóis, fármacos, pesticidas, herbicidas, etc.). A presença destes grupos em sua cadeia polimérica é o ponto de partida para inúmeras modificações químicas na matriz da quitosana.

O elevado percentual de grupos amino reativos distribuídos na matriz polimérica da quitosana, possibilita inúmeras modificações químicas (INOUE;

YOSHIZUKA; OHTO, 1999). Muitas modificações têm sido realizadas com o propósito de melhorar suas propriedades, como tamanho de poros, resistência mecânica, estabilidade química, hidrofiliicidade e biocompatibilidade, assim como, aumentar a sua seletividade e capacidade de adsorção de vários íons metálicos (NGAH; ENDUD; MAYANAR, 2002).

Dentre estas modificações, a funcionalização de agentes quelantes na matriz polimérica da quitosana surgiu como alternativa interessante, devido a introdução de novos grupos complexantes, podendo formar diferentes quelatos que irão aumentar a capacidade de adsorção e a seletividade de íons metálicos em solução (BECKER; SCHLAAK; STRASDEIT, 2000). Os agentes quelantes podem ser bidentados, tridentados, etc., dependendo do número de ligações de coordenação que formam com o íon metálico. Em geral, quanto mais polidentado for o agente quelante, mais estáveis são os quelatos formados entre o suporte e o metal (RIBEIRO, 2006).

### 3.6.1 Histidina

A histidina é um dos 20 aminoácidos mais comuns presentes nas proteínas. Pode existir em duas formas isoméricas, L-histidina e D-histidina, entre eles, somente o isômero L é bioativo. O anel imidazol e o pKa (6.0) da histidina indicam que mudanças relativamente pequenas no pH celular alterarão a sua carga. Por esta razão este aminoácido tem um uso considerável como um ligante de coordenação em metal-proteínas e, também, como um sítio catalítico em certas enzimas (MARTI *et al.*, 2004). A Figura 4 mostra a fórmula estrutural da L-histidina.

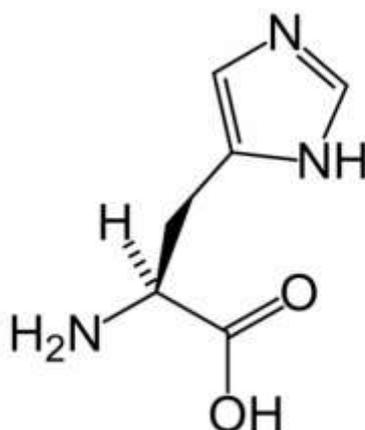


Figura 4 - Fórmula estrutural da L-histidina.

Este aminoácido é conhecido por estar envolvido em vários processos biológicos relacionados à ação enzimática. Possui aplicações médicas como anti-inflamatório, atuando como agente no crescimento e reparo de tecidos e em casos de artrites e reumatismos (PICKUP *et al.*, 1980).

É um potencial ligante tridentado, possuindo três sítios de coordenação: grupos amino, imidazol e carboxila. Sua molécula possui um anel imidazólico, sendo considerado um importante ligante para o íon metálico cobre em vários sistemas biológicos. Desta forma, a histidina é considerada um dos ligantes mais fortes que coordena metais dentre os amino ácidos (CARLSON; BROWN, 1966).

Segundo um estudo realizado sobre as interações da histidina com o íon metálico cobre, aponta-se que o cobre realiza ligações covalentes, com átomos de nitrogênio do grupo  $\text{NH}_2$  e/ou átomos de oxigênio do grupo  $\text{COO}^-$ , presentes na estrutura da histidina. Em solução aquosa, o complexo cobre (II)-histidina assume vários modos de coordenação dependendo do valor do pH (MARTI *et al.*, 2004).

A Figura 5 apresenta a distribuição de quatro diferentes formas da L-histidina em função do pH. As abreviações  $\text{H}_3\text{L}$ ,  $\text{H}_2\text{L}$ , HL e  $\text{L}^-$  correspondem a diferentes formas protonadas de L-histidina. Os valores de pKa para o grupo amina, anel imidazol e grupo carboxil são respectivamente 1,8; 6,0 e 9,8. Em pH fisiológico a principal forma encontrada da L-histidina é a HL. Quando o pH aumenta, a amina é desprotonada promovendo a formação de ânions mononegativos ( $\text{L}^-$ ). Por outro lado, quando o pH diminui, o anel imidazol e o grupo carboxil são protonados. Como pode ser observado, L-histidina pode se ligar através de ligantes mono, bi e tridentados, seu modo de coordenação irá depender principalmente do pH da solução (DESCHAMPS *et al.*, 2005).

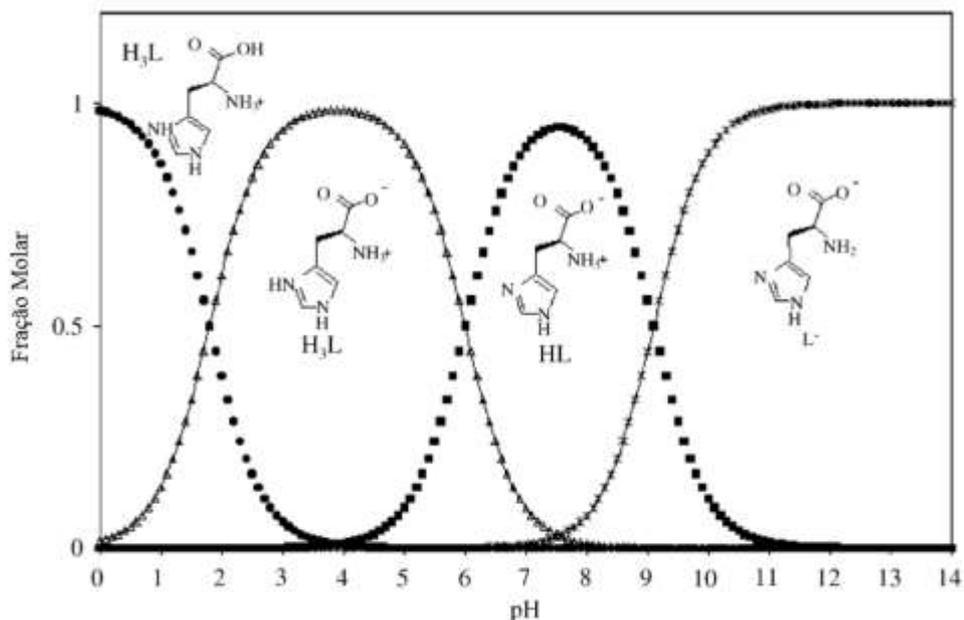


Figura 5 – Distribuição de várias formas protonadas da L-histidina em função do pH (DESCHAMPS *et al.*, 2005).

### 3.7 Alginato

O ácido algínico, também conhecido como alginato, é um polissacarídeo encontrado em grandes proporções em algas marrons, principalmente dos gêneros *Macrocystis*, *Laminaria* e *Ascophyllum*. É considerado parte constituinte das paredes celulares e do material intracelular destas algas, podendo representar de 10 a 40% de sua massa seca (ONSØYEN, 1997).

Alginato é um copolímero de alta massa molecular composto pelo ácido β-D-manurônico (M) e o ácido α-L-gulurônico (G). A proporção (relação M/G) e a estrutura sequencial dos alginatos (MM, MG, GG), assim como as suas funcionalidades, variam de acordo com a estação de coleta da alga, da espécie da qual se extrai o alginato, e até mesmo do local e da época em que o alginato foi extraído. A Figura 6 mostra a estrutura química dos dois ácidos que compõem uma molécula de alginato (DRAGET; SKJAK-BRAEK; SMIDSROD, 1997; HAUG; LARSEN; SMIDSROD, 1974).

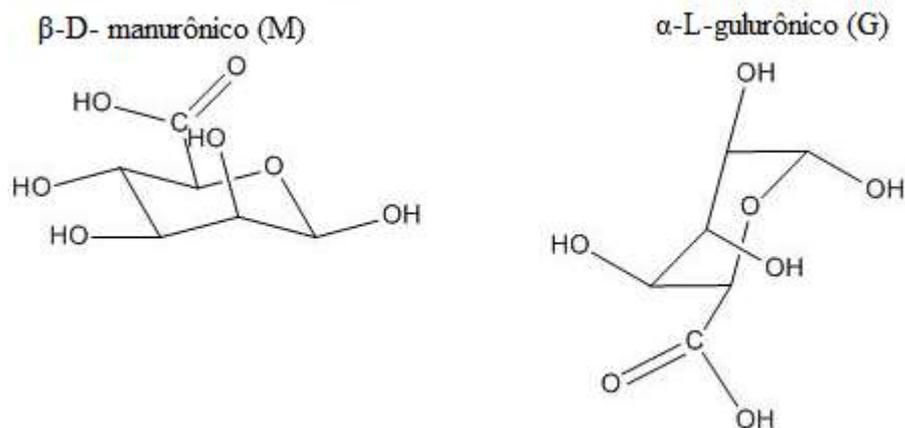


Figura 6 - Representação das moléculas dos ácidos que compõem o alginato.

O alginato é considerado o único polissacarídeo que contém, naturalmente, grupos carboxílicos em cada unidade constituinte, possuindo várias características funcionais, uma delas é a afinidade por metais pesados. A variabilidade observada em sua conformação molecular é a principal responsável pela afinidade do alginato por metais pesados. A forma das sequências manurônicas e gulurônicas propicia um alinhamento de duas seções de cadeias apresentando uma série de sítios coordenados, chamado de estrutura “zigue-zague”, com cavidades apropriadas para acomodar cátions divalentes (IKEDA; TAKEMURA; ONO, 2000).

As regiões do alginato ricas em resíduos G apresentam maior seletividade por íons metálicos bivalentes, em função de um ambiente bidentado para complexação dos íons. Em regiões ricas em ácido manurônico, a complexação será predominantemente monodentada e, portanto, mais fraca (DAVIS; VOLESKY; MUCCI, 2003).

Um modelo que descreve a ligação entre o alginato e um íon metálico é o modelo denominado “caixa de ovo”, usado para caracterizar a formação de gel do alginato de cálcio. Esse modelo considera a associação de duas ou mais cadeias, e sua união resulta em uma estrutura bidimensional, onde nos interstícios encontram-se os íons de cálcio, como se pode observar na Figura 7 (MCHUGH, 1987).

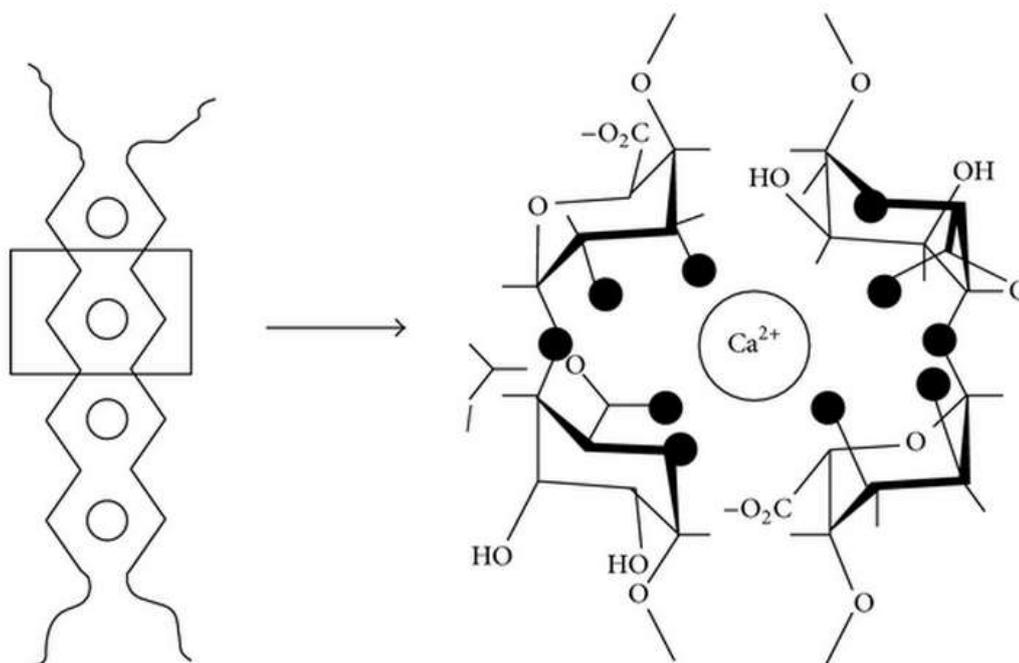


Figura 7 - Rearranjo das cadeias de alginato devido à presença de metal divalente (BRACCINI; PEREZ, 2001).

Devido à abundância natural do alginato, que pode ser extraído de algas marrons e por ser um polissacarídeo não tóxico possuindo grupos carboxílicos, ele é usado como espessante na indústria de alimentos, em molhos, coberturas, maioneses e iogurtes. Na indústria farmacêutica, este composto tem sido usado na liberação controlada de vários fármacos e produtos químicos devido a sua sensibilidade ao pH (GEORGE; ABRAHAM, 2006).

Vários estudos mostram que o alginato possui alta afinidade pela quelação de vários metais como,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$ , esta quelação leva a formação de complexos metálicos de alginato. Desta forma, o alginato tem sido utilizado para o tratamento de água devido a sua biocompatibilidade e seu menor custo se comparado com outros materiais poliméricos (HASSAN *et al.*, 1989; PAPAGEORGIU *et al.*, 2006).

Papageorgiou *et al.* (2006), investigaram a capacidade do alginato de cálcio em adsorver íons cobre de soluções aquosas. Eles encontraram uma capacidade máxima de adsorção de  $88,95 \text{ mg g}^{-1}$ , considerado um valor satisfatório em se tratando de adsorção de metais pesados.

### 3.8 Princípios teóricos de bioadsorção

Adsorção é um fenômeno no qual moléculas que estão presentes em um fluido, líquido ou gasoso, concentram-se espontaneamente sobre uma superfície sólida. Essas moléculas podem apresentar característica iônica (ou não iônica), polar (ou não-polar), monoatômica (ou poliatômica). Usualmente, a espécie adsorvida é denominada adsorvato e a fase densa, na qual ocorre a adsorção, é denominada de adsorvente.

As forças atrativas responsáveis pela interação entre adsorvente-adsorvato podem ser classificadas como interações químicas ou físicas. A adsorção química, ou quimissorção, ocorre devido a efetiva troca de elétrons entre o sólido e a molécula adsorvida, e como resultado temos as seguintes características: formação de uma única camada sobre a superfície sólida, irreversibilidade e liberação de uma quantidade de energia considerável (da ordem de uma reação química). A adsorção física, ou fisissorção, constitui o princípio da maioria dos processos de purificação e separação. É um fenômeno reversível no qual se observa normalmente a deposição de mais de uma camada de adsorvato sobre a superfície adsorvente. As forças de Van der Waals atuam na adsorção física onde as energias liberadas são relativamente baixas e atingem rapidamente o equilíbrio (TREYBAL, 1981).

A adsorção pode ser imaginada como ocorrendo em três estágios: 1º) ocorre a transferência de massa externa do adsorvato em solução para a superfície do adsorvente; 2º) ocorre a difusão do adsorvato para os sítios de adsorção no interior do adsorvente e 3º) acontece a adsorção propriamente dita. Os estágios de transferência de massa externa e de difusão do adsorvato são as etapas limitantes no processo de adsorção. Enquanto que, o último estágio não proporciona nenhuma resistência ocorrendo em uma velocidade muito maior que os outros dois. Embora os três estágios sejam descritos como ocorrendo em sequência, na prática, todos os três podem estar acontecendo simultaneamente em diferentes partes do adsorvente, uma vez que as condições não são uniformes ao longo do material (MCKAY, 1996).

A bioadsorção se apresenta como uma opção tecnológica voltada para a remoção de baixas quantidades de íons metálicos em soluções aquosas (CHU, 2002). Os íons metálicos são removidos da solução pela complexação dos mesmos dissolvidos em solução, pela atividade química da biomassa do adsorvente. Vários grupos químicos podem ser responsáveis pela fixação das espécies metálicas como

grupos amino, fosfato, sulfidrina, carboxila, hidroxilas dentre outros (VOLESKY; HOLAN, 1995).

Existem muitos parâmetros que podem influenciar no processo de adsorção como tipo de bioadsorvente, tipos de biomateriais, propriedades do metal na solução química, condições do ambiente como pH, temperatura, força iônica dentre outros (CRIST *et al.*, 1981). Este processo possui vários mecanismos, dentre eles os mais complexos são: troca iônica, quelação, adsorção por forças físicas, aprisionamento de íons em capilares inter e intrafibrilares e difusão através da parede celular e membranas. Estes mecanismos irão diferir de acordo com as espécies que estão sendo usadas, com a origem da biomassa e processamento (VOLESKY; HOLAN, 1995).

É de extrema importância analisar os dados de equilíbrio e a cinética de um processo de adsorção, pois proporciona um melhor entendimento do comportamento do processo, tanto do ponto de vista físico como do químico. A isoterma apresenta uma grande relevância quando se quer avaliar a capacidade de adsorção do bioadsorvente enquanto a análise cinética determina mudanças que ocorrem durante o processo com o tempo, sejam elas químicas ou físicas e fornecem informações mais exatas das taxas de remoção do bioadsorvente em solução.

### 3.9 Isotermas de adsorção

Com o objetivo de descrever os fenômenos que ocorrem na interface sólido/líquido, no processo de adsorção, foram desenvolvidos diferentes modelos de equilíbrio. Em termos práticos, são modelos matemáticos que permitem descrever a relação entre as concentrações de equilíbrio na fase sólida e na fase líquida, observadas experimentalmente. Muitas dessas equações são essencialmente empíricas e desenvolvidas de forma a melhor ajustar parâmetros aos dados experimentais. Na literatura observa-se que os modelos de Langmuir e Freundlich são os mais frequentemente empregados.

#### 3.9.1 Isoterma de Langmuir

A isoterma de Langmuir, é uma isoterma teórica desenvolvida em 1916 inicialmente para descrever o comportamento de gases. Posteriormente, seu uso foi

também adaptado para moléculas orgânicas, seu modelo baseia-se em poucas suposições:

- todos os sítios são idênticos e energeticamente equivalentes.

-a capacidade da molécula de ser adsorvida em determinado local é independente da ocupação dos sítios vizinhos, o que significa que não existirão interações entre as moléculas adjacentes na superfície e imobilizadas na adsorção, isto é, a transmigração do adsorvato no plano da superfície é impedido.

A isoterma de Langmuir é expressa pela equação 1 :

$$Q_e = \frac{bQ_{max}C_e}{1 + bC_e} \quad (1)$$

Onde  $C_e$  é a concentração do adsorvato na fase líquida no equilíbrio;  $Q_e$  é a quantidade de adsorvato adsorvida pela massa de adsorvente no equilíbrio,  $Q_{max}$  é a constante relacionada à máxima capacidade de adsorção;  $b$  é a constante relacionada com a energia de adsorção, ou a relação de afinidade entre o adsorvente e o adsorvato (AWALA; EL JAMAL, 2011).

### 3.9.2 Isoterma de Freundlich

A isoterma de Freundlich foi derivada empiricamente em 1912 e é utilizada para descrever a adsorção característica para uma superfície heterogênea, ela assume que a adsorção de solutos de um líquido através de uma superfície sólida ocorre através diferentes sítios com diferentes energias de adsorção. A isoterma de Freundlich pode ser expressa pela Equação 2.

$$Q_e = K_F C_e^{1/n} \quad (2)$$

Onde;  $K_F$  é a constante relacionada com a capacidade máxima de adsorção;  $n$  é a constante relacionada com a superfície heterogênea (adimensional), ou com a intensidade de adsorção;  $C_e$  e  $Q_e$  são a concentração do adsorvato na fase líquida no equilíbrio e a quantidade de adsorvato adsorvida pela massa de adsorvente no equilíbrio respectivamente (KUMAR; KIRTHIKA, 2009).

### 3.10 Cinética de adsorção

A remoção do adsorvato pelo adsorvente envolve etapas que transferem o soluto do fluido para sítios específicos no interior dos adsorventes. No caso da adsorção física, a própria adsorção pode ser considerada como uma etapa instantânea, e neste caso, a cinética é controlada principalmente pela resistência da transferência de massa. No caso de reações químicas, a própria cinética da reação pode interferir no controle da velocidade de adsorção (GUIBAL, 2004).

Com o intuito de avaliar o mecanismo que controla o processo de adsorção, assim como a transferência de massa e as reações químicas, diversos modelos cinéticos são usados para testar os dados experimentais.

O modelo de pseudo-primeira ordem é dado pela equação 3:

$$\log(Q_e - Q_t) = \log Q_e - \frac{k_1}{2.3} t \quad (3)$$

Onde  $Q_e$  e  $Q_t$  são as quantidades adsorvidas no tempo,  $t$ , e no equilíbrio respectivamente,  $k_1$  é taxa constante do processo de adsorção de pseudo-primeira ordem (LAGERGREN, 1898).

O modelo de pseudo-segunda é baseado na suposição de que a adsorção segue uma quimiossorção de segunda ordem. Foi proposto por Ho e McKay (2000) e pode ser expresso como:

$$\frac{t}{Q_t} = \frac{1}{K_2 Q_e^2} + \frac{1}{Q_e} \quad (4)$$

Onde  $t$  é o tempo de contato, min,  $Q_e$  e  $Q_t$  são as quantidades de adsorvato adsorvido, mg/g, no equilíbrio e no tempo  $t$ .

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Reagentes e matérias-primas

- Quitosana (Sigma,  $\geq 75\%$  de desacetilação, E.U.A.)
- Ácido acético glacial (Chemco, 99,7%, Brasil)
- Alginato de Sódio Manucol DH (FMC Biopolymer, E.U.A.)
- Alginato de Sódio Manugel DM (FMC Biopolymer, E.U.A.)

Os reagentes apresentados a seguir são de grau analítico:

- Cloreto de Cálcio (Synth, Brasil)
- Epicloridrina (Synth, Brasil)
- NaOH (Synth, Brasil)
- HCl (Synth, 36,5-38,0%, Brasil)
- Nitrato de cobre trihidratado,  $\text{CuNO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (Merck, Brasil)
- L-histidina monoclóridrato (Synth, Brasil)
- *Beta-Amyloid Peptide* (1-42) (American Peptide Company, E.U.A) –  $\beta\text{A42}$
- 1,1,1,3,3,3 - hexafluoro -2 - propanol (Aldrich Chemistry, 99%, E.U.A)

### 4.2 Preparação dos adsorventes

#### 4.2.1 Preparação das esferas de quitosana

Uma solução de 2,5% em massa foi preparada através da dissolução da quitosana em uma solução acética com concentração de 3% em massa. A solução foi mantida em agitação mecânica (Fisatom, 713D, Brasil) à 3000 rpm em um recipiente devidamente fechado, por uma semana e em seguida, filtrada a vácuo para retirada de impurezas. Após isso foi estocada a 4°C, para posterior uso na obtenção das esferas de quitosana (BEPPU, 1999).

Na obtenção das esferas de quitosana, uma solução deste biopolímero foi gotejada à vazão constante, em uma solução de NaOH 1 mol/L, sob agitação regular. As esferas permaneceram em repouso por 24 horas na solução de NaOH 1mol/L e posteriormente, foram lavadas com água destilada até atingirem um pH neutro, e então acondicionadas em água milli-Q. A Figura 8 ilustra o processo de obtenção das esferas.

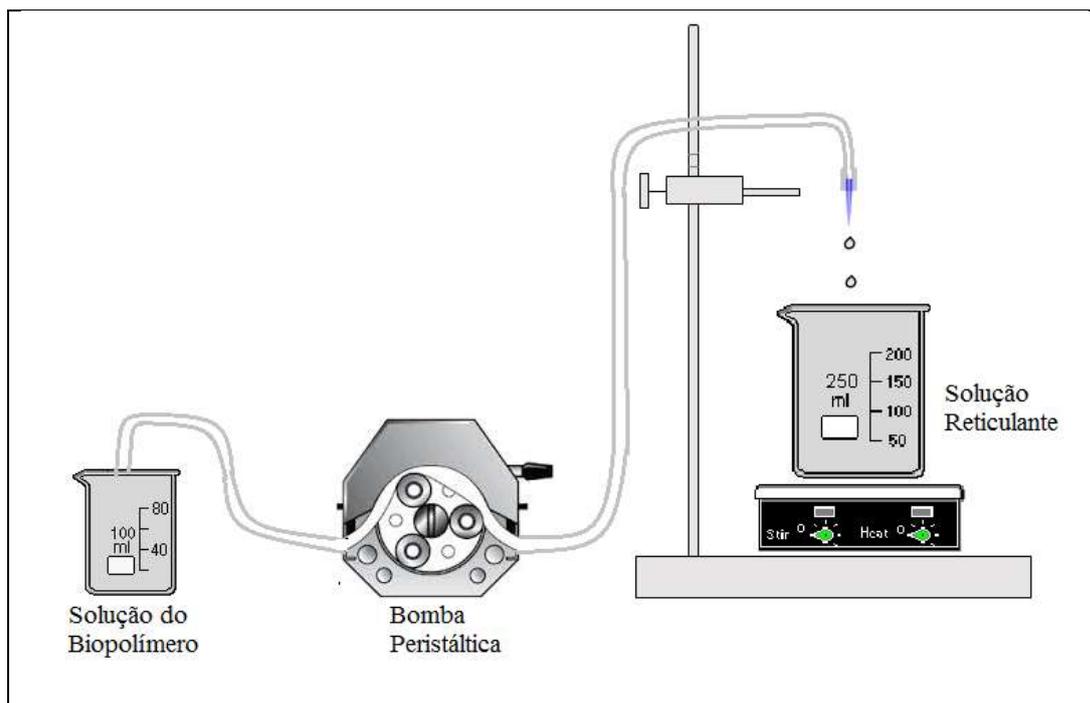


Figura 8 - Esquema do processo de obtenção das esferas.

#### 4.2.2 Funcionalização das esferas de quitosana com histidina

A funcionalização das esferas de quitosana foi realizada seguindo o método sugerido por Sano e Murase (1979), onde primeiramente epicloridrina e histidina são misturados em uma proporção equimolar, adicionando 0,78 mL de epicloridrina em uma solução de NaOH 2M contendo 2,09 de histidina. A solução resultante é colocada em um banho termostático por 4h à 60°C, seguida por um resfriamento até atingir 0°C. Após isso, 8 g de NaOH são adicionados à solução sob constante agitação e juntamente com isso 20g de esferas de quitosana. A reação foi conduzida por 16 h a 65°C. Em seguida, as esferas foram lavadas exaustivamente com água destilada até atingirem pH neutro e estocadas em água Milli-Q<sup>TM</sup> ultrapura a 4°C (RAJ ADHIKARI *et al.*, 2008). As esferas de quitosana funcionalizadas com histidina receberam a nomenclatura de QuiHIS. A Figura 9 mostra as supostas reações que ocorreram na funcionalização seguindo os mecanismos propostos por Raj Adhikari *et al.* (2008).

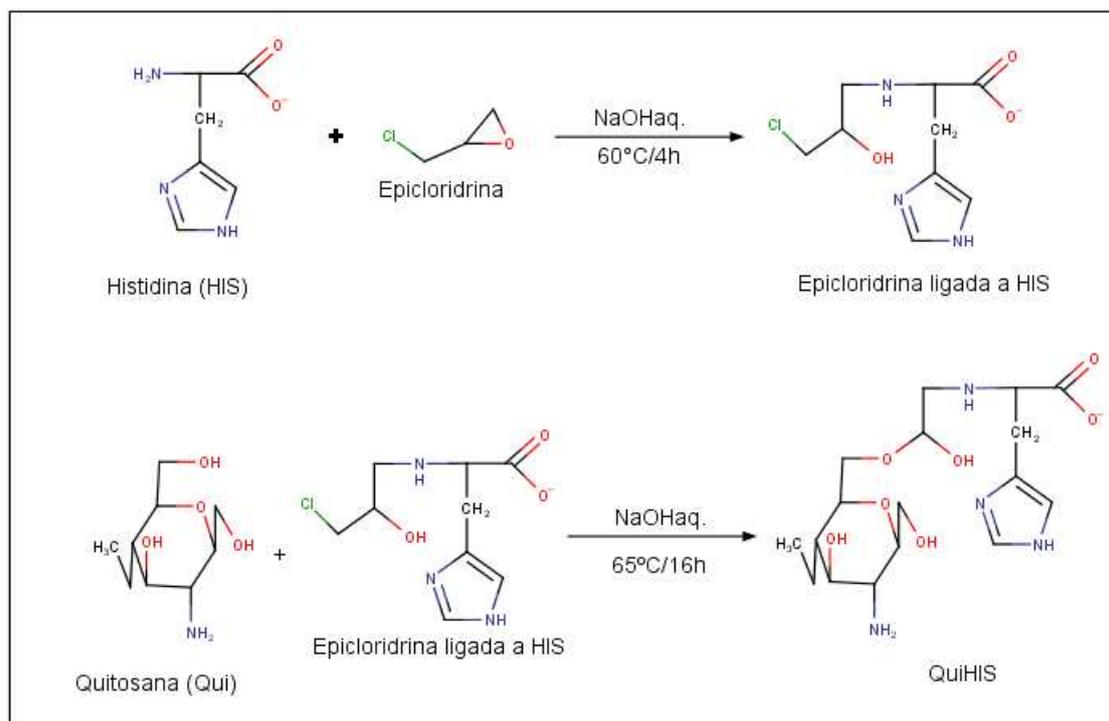


Figura 9 – Reações propostas para funcionalização da histidina na matriz de quitosana (RAJ ADHIKARI *et al.*, 2008).

#### 4.2.3 Preparação das esferas de alginato

Uma solução de 2,5% em massa de alginato foi preparada através da dissolução de alginato de sódio em água milli-Q sob alta agitação. A solução foi então gotejada, sob vazão constante, em uma solução aquosa de Cloreto de Cálcio a 4% em massa. As esferas de alginato formadas foram mantidas em contato com o cloreto de cálcio por 24 horas. Em seguida foi realizada a lavagem com água destilada até obtenção de pH neutro e estocadas para posterior uso nos experimentos de adsorção. Igualmente para as esferas de quitosana, o processo de obtenção das esferas de alginato pode ser visto na Figura 8.

A Tabela 1 apresenta as especificações dos dois alginatos utilizados neste trabalho que foram cedidos gentilmente pela FMC Biopolymer. As especificações foram retiradas do trabalho de Vaz (2012) que utilizou os mesmos alginatos. Os alginatos ricos em blocos manurônicos foram chamados de AlgCOL e os alginatos ricos em blocos gulurônicos de AlgGEL.

Tabela 1- Caracterização dos alginatos quanto á sua origem e quantidade de blocos gulurônicos e manurônicos, onde, fração molar dos Blocos M ( $F_M$ ), fração molar dos Blocos G ( $F_G$ ), fração molar dos Blocos GG ( $F_{GG}$ ) e fração molar dos Blocos MM ( $F_{MM}$ ) dos alginatos.

	<b>Origem</b>	<b>M/G</b>	<b><math>F_M</math></b>	<b><math>F_G</math></b>	<b><math>F_{MM}</math></b>	<b><math>F_{GG}</math></b>
<b>AlgCOL</b>	<i>Macrocystis pyrifera</i>	1,94	0,66	0,34	0,17	0,49
<b>AlgGEL</b>	<i>Laminaria hyperboria</i>	0,61	0,38	0,62	0,42	0,18

#### 4.3 Ensaios de adsorção

Decidiu-se pela utilização do sal nitrato de cobre nos ensaios de adsorção e pH 5. Estes parâmetros foram baseados no diagrama de especiação metálico realizado por Mahl (2013), onde esferas de quitosana foram utilizadas para adsorção de íons cobre na presença de histidina. Outro ponto que também justifica a utilização de pH 5 é a elevada concentração de hidrogênio encontrado em tecidos inflamados como os da DA, onde o pH se encontra abaixo de 5,4 (STEEN; STEEN; REEH, 1995).

Foram estabelecidos quatro procedimentos para investigar a atuação das esferas de QuiHIS, AlgGEL e AlgCOL na adsorção de íons cobre e na presença de histidina. O método utilizado para obtenção dos dados foi o estático. Os experimentos foram realizados a temperatura de 25°C empregando uma incubadora shaker (Novatécnica, NT 715, Brasil) com agitação de 150 rpm. Seguem abaixo a descrição dos procedimentos realizados seguido da ilustração de cada um deles através da Figura 10 seguido da nomenclatura utilizada na Tabela 2.

1º Procedimento: Foram estudados os fenômenos de adsorção envolvendo somente o sistema adsorvente + cobre, encontrando sua capacidade de adsorção e tempo de equilíbrio. Neste procedimento os adsorventes AlgGEL, AlgCOL e QuiHIS são adicionados separadamente à solução de nitrato de cobre para que ocorra o processo de adsorção, dados cinéticos e de isoterma foram adquiridos a fim de estudar a capacidade de adsorção e tempo de equilíbrio de cada sistema.

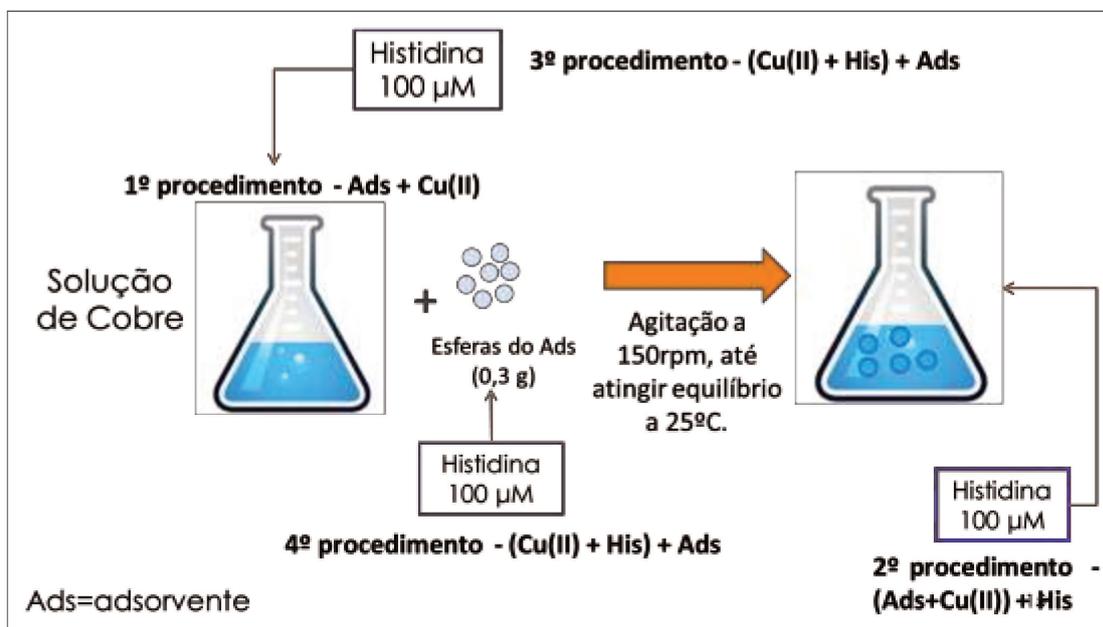
2º procedimento: Neste sistema, o adsorvente e os íons cobre foram colocados em contato, até atingirem o tempo de equilíbrio que foi encontrado no 1º procedimento através de experimentos de cinética. Após este período, uma alíquota de histidina

(100 $\mu$ mol/L) foi adicionada à solução e sua capacidade de adsorção e tempo de equilíbrio foram medidos.

Existem na literatura diversos valores de concentrações que são utilizados nos experimentos *in vitro* com o peptídeo  $\beta$ -amilóide. Estes estudos indicaram que o peptídeo promove a inibição significativa da viabilidade neuronal a partir de 10 nmol/L. Com esses resultados e realizando alguns ensaios preliminares decidiu-se por utilizar uma concentração de 100  $\mu$ mol/L para o peptídeo, valor este que também é utilizado nos experimentos com histidina (STINE *et al.*, 2003).

3º procedimento: Neste terceiro sistema, a solução de cobre foi colocada em contato primeiramente com histidina (100 $\mu$ mol/L). Após um tempo pré-estabelecido de 2h , o adsorvente foi adicionado ao meio, e novamente sua capacidade de adsorção e tempo de equilíbrio foram medidos (MIURA *et al.*, 2000).

4º procedimento: Finalmente, neste último sistema, o adsorvente foi colocado em uma solução de histidina (100 $\mu$ mol/L) por 24horas. Após isso, o adsorvente foi filtrado e colocado em uma solução contendo o íon cobre. O tempo de equilíbrio e a capacidade de adsorção foram determinados.



**Figura 10** – Ilustração dos procedimentos utilizados nos ensaios de adsorção.

Tabela 2- Nomenclatura dos sistemas estudados.

	<b>QuiHIS</b>	<b>AlgGEL</b>	<b>AlgCOL</b>
<b>1º procedimento</b>	QuiHIS+Cu(II)	AlgGEL+Cu(II)	AlgCOL+Cu(II)
<b>2º procedimento</b>	(QuiHIS+Cu(II))+HIS	(AlgGEL+Cu(II))+HIS	(AlgCOL+Cu(II))+HIS
<b>3º procedimento</b>	(Cu(II)+HIS)+QuiHIS	(Cu(II)+HIS)+AlgGEL	(Cu(II)+HIS)+AlgCOL
<b>4º procedimento</b>	(QuiHIS+HIS)+Cu(II)	(AlgGEL+HIS)+Cu(II)	(AlgCOL+HIS)+Cu(II)

#### 4.3.1 Cinética de adsorção

A cinética de adsorção foi realizada para todos os procedimentos e adsorventes. Foi preparada uma solução de 500 mL de íons cobre com concentração de 20 mg/L. A massa de adsorvente utilizada foi de aproximadamente 6 g. Em intervalos de tempo específicos, alíquotas destas soluções foram retiradas, e sua concentração foi medida utilizando um espectrômetro de absorção atômica (Shimadzu, AA-7000, Japão) no Laboratório de Engenharia Eletroquímica (LEE) /FEM/UNICAMP.

A quantidade de íons cobre adsorvida em cada tempo específico foi calculada usando a equação 6:

$$Q(\text{capacidade de adsorção}) = \frac{(C_0 - C_e)V}{m} \quad (6)$$

Onde  $C_0$  é a concentração inicial de íons cobre,  $C_e$  é a concentração final de íons cobre,  $V$  é o volume da solução de íons cobre e  $m$  é a massa das esferas de quitosana usada para o processo de adsorção em base seca.

#### 4.3.2 Isotermas de adsorção

Para obtenção dos dados de equilíbrio dos procedimentos descritos anteriormente, foi utilizada uma massa de 0,3 g de adsorvente em uma série de tubos falcon contendo 25 ml de solução de cobre em diferentes concentrações variando de 5 mg/L a 300 mg/L.

Após o sistema atingir o tempo de equilíbrio obtido através da cinética, foram retiradas alíquotas de cada solução para determinação de sua concentração através de

um espectrômetro de absorção atômica (Shimadzu, AA-7000, Japão) no Laboratório de Engenharia Eletroquímica (LEE) /FEM/UNICAMP.

Para o cálculo da capacidade de adsorção foi utilizada a Equação 6.

#### 4.3.3 Isoterma de adsorção de íons cobre na presença do peptídeo $\beta$ A

Foram realizadas isotermas do adsorvente AlgGEL na presença do peptídeo  $\beta$ A a temperatura de 37°C. O procedimento para aquisição da isoterma segue abaixo.

O peptídeo utilizado na realização deste experimento foi o  $\beta$ A42. Um filme desde peptídeo foi obtido através da dissolução do mesmo em 1,1,1,3,3,3 – hexafluoro-2 – propanol (HFIP) em quantidade para se obter uma solução de 1mM de  $\beta$ A42. A solução contendo o peptídeo e o HFIP foi então dividida igualmente em seis alíquotas de 35 $\mu$ L e para evaporação do HFIP, as alíquotas foram deixadas em uma capela por 90 min e centrifugadas sob vácuo para total evaporação do HFIP. Após este procedimento os filmes foram estocados a -80°C (STINE *et al.*, 2003).

Este procedimento foi realizado no Laboratório de Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos (LAFAME). A determinação da isoterma seguiu os passos descritos no item 3.3.2 utilizando-se quantidades menores de materiais, conforme disponibilidade de filme peptídico.

#### 4.4 Métodos de Caracterização

Depois de concluídos os ensaios de adsorção foram realizadas caracterizações com o objetivo de compreender melhor as interações que ocorreram entre QuiHIS, AlgGEL e AlgCOL com os íons cobre na presença de histidina

##### 4.4.1 Morfologia da superfície dos adsorventes

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi usada para verificar a morfologia da superfície. As análises foram realizadas nos microscópios do Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC)/Faculdade de Engenharia Química (FEQ)/ UNICAMP) com um microscópio eletrônico de varredura *LEO Electron Microscopy/Oxford* (Leo440i, Inglaterra).

As amostras foram liofilizadas, para retirada da água presente em seus poros sem destruí-los, congelando-as com nitrogênio líquido, com auxílio do equipamento de liofilização Labcomco (Freeze Dry System/Freezone 4.5, Brasil) no Laboratório de Engenharia Química e Produtos (LEQUIP)/ FEQ /UNICAMP, a um vácuo de  $35 \times 10^{-3}$  bar e uma temperatura de  $-45^{\circ}\text{C}$ .

Após a etapa de liofilização, as amostras foram fraturadas e cobertas com uma fina camada de ouro utilizando o sistema de metalização Polaron (SC7620, Inglaterra) no LRAC/ FEQ/UNICAMP.

#### 4.4.2 Diâmetro médio dos adsorventes

O diâmetro médio dos adsorventes foi analisado através do *software* ImageJ<sup>®</sup>. Analisaram-se 5 esferas de cada sistema para se estabelecer um valor médio para o diâmetro.

#### 4.4.3 Determinação da estrutura química dos adsorventes

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR – ATR) é uma técnica que visa o estudo da estrutura molecular, baseada na absorção de radiação no infravermelho pelos modos de vibrações das ligações dos átomos. Tais análises são usadas para identificar grupos funcionais como carboxilas, hidroxilas, aminas, amidas, estruturas alifáticas e outros.

Os espectros foram obtidos na faixa de  $4000\text{-}675\text{ cm}^{-1}$ , utilizando o equipamento FTIR da Thermo Scientific, Nicolet 6700 (E.U.A) com acessório ATR Smart Omni-Sampler. As análises foram realizadas nos adsorventes antes e depois dos experimentos de adsorção. A análise das amostras foi realizada no LRAC na FEQ/UNICAMP.

#### 4.4.4 Determinação da cristalinidade dos adsorventes

A difração de Raios-X (DRX) possibilita analisar vários parâmetros de cristalinidade presentes na amostra, permitindo a determinação real da estrutura e orientação dos cristais, análise química, investigação do equilíbrio de fases, estudo de deformação plástica, dentre outros (ALBUQUERQUE, 1985).

Para realização destas análises foi utilizado o equipamento de difração de Raios-X Philips Analytical X Ray (X'Pert-MPD, Netherlands). Os parâmetros utilizados foram, voltagem de 40 kV, corrente de 40 pA,  $2\theta$ : 5-90°, passo: 0,02°, velocidade 0,033 graus/segundo. As análises foram feitas no LRAC da FEQ/UNICAMP.

#### 4.4.5 Determinação do Grau médio de Desacetilação (GD) das esferas de quitosana

Um importante parâmetro na caracterização da quitosana é o grau médio de desacetilação. Este parâmetro mede o percentual de grupos amino disponíveis nas cadeias da quitosana e pode afetar propriedades físicas, químicas, biológicas e de adsorção. Grandes diferenças são observadas nas propriedades de interação metal quitosana, para o mesmo metal, utilizando-se quitosanas com diferentes GD (EIDEN; JEWELL; WIGHTMAN, 1980; GUIBAL, 2004; RINAUDO, 2006).

O grau médio de desacetilação da quitosana natural e funcionalizada com histidina foi determinado através de uma Titulação Potenciométrica, seguindo-se o procedimento estabelecido por Raymond *et al.* (1993). A Titulação Potenciométrica é um método simples e considerado de baixo custo devido aos equipamentos e reagentes utilizados. Neste método, as esferas de quitosana natural e funcionalizada com histidina (0,3g) foram secas em uma estufa até atingirem massa constante, a temperatura de 60°C. Após isso, foram dissolvidas em solução padrão HCl (25 mL; 0,02 mmol/L) por 24 h para protonação dos grupos amino disponíveis. A solução resultante foi titulada com NaOH (0,1 mol/L) para se obter uma curva típica de titulação potenciométrica.

O GD é então calculado pela equação 7.

$$GD(\%) = \frac{C_{NaOH} \cdot (V_2 - V_1) \cdot 161}{m_2} \cdot 100 \quad (7)$$

Onde,  $C_{NaOH}$  (mol L<sup>-1</sup>) é a concentração de solução de NaOH utilizada na titulação,  $V_1$  e  $V_2$  (L) são respectivamente o volume de NaOH utilizado para neutralizar o excesso de HCl e o volume de NaOH utilizada para neutralização dos grupos amino protonados da amostra, 161 (g mol<sup>-1</sup>) é a massa molecular de uma unidade de monômero de quitosana, e  $m_2$  (g) é a massa da amostra seca usada na titulação. Foram realizadas replicatas de cada amostra.

#### 4.4.5.1 Determinação da composição química das esferas de AlgGEL

A técnica analítica de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios – X (XPS) é utilizada na caracterização de superfícies, sendo empregada na análise de vários tipos de amostras: metais, polímeros, cerâmicas, compósitos, semicondutores e amostras biológicas; na forma de lâminas, fibras, pós, partículas ou filmes.

Na espectroscopia de fotoelétrons, uma fonte de radiação eletromagnética é usada para ejetar os elétrons da amostra. Dois tipos de fontes convencionais de fótons são utilizados: uma lâmpada de descarga de hélio, que produz radiação ultravioleta ( $h\nu = 21,2$  e  $40,8$  eV para He I e He II, respectivamente), dando origem à espectroscopia de fotoelétrons excitados por ultravioleta (ultraviolet photoelectron spectroscopy - UPS), e Raios-X moles ( $h\nu = 1253,6$  e  $1486,6$  eV para as linhas  $K\alpha$  do magnésio e do alumínio, respectivamente), usados em XPS (WATTS, J.F.; WOLSTENHOLME, 2005)

Os fotoelétrons têm uma distribuição de energia cinética que consiste de picos discretos associados aos níveis dos elétrons do átomo fotoionizado. A energia de ligação de um elétron pode ser obtida diretamente pela medida da sua energia cinética, uma vez que a energia dos fótons incidentes é conhecida. A identificação dos elementos presentes na superfície é feita pelas energias e ligação dos fotoelétrons. A intensidade (área integrada sob o pico fotoelétrico) é proporcional à quantidade dos átomos no volume detectado, permitindo, assim, a análise semiquantitativa da superfície (NASCENTE, 2005).

Esta análise foi realizada no Center for Materials Science and Engineering (CMSE) no Massachusetts Institute of Technology (MIT) em Cambridge, E.U.A, utilizando o equipamento *Physical Electronics Versaprobe II X-ray Photoelectron Spectrometer* com fonte de radiação monocromática Al ( $1486,6$  eV;  $50$  W). O processamento dos dados foi realizado pelo *software* CASAXPS.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Caracterização dos adsorventes

#### 5.1.1 Diâmetro médio das esferas

Através do *software* ImageJ<sup>®</sup> o diâmetro das esferas de quitosana natural (Qui), QuiHIS, AlgGEL e AlgCOL antes após os ensaios de adsorção foram determinados. Na Tabela 3 podem ser observados os resultados obtidos.

Observa-se que o processo de funcionalização das esferas de quitosana causou uma diminuição em seu diâmetro médio. Isso pode ser resultado do processo de reticulação que ocorre na presença de NaOH para formação das esferas, onde a água é expelida para fora da matriz da quitosana. Durante a funcionalização as esferas continuam sob ação do NaOH e em concentração maior, e isso possivelmente acarretou o encolhimento das esferas (MARK *et al.*, 2009). Porém, não foram observadas mudanças significativas nos diâmetros das esferas após adsorção e adição de histidina.

A Figura 11 apresenta um aspecto visual das esferas de QuiHIS, AlgGEL e AlgCOL antes e após a adsorção de íons cobre. A ligação dos íons cobre proporcionou uma coloração azul às esferas dos adsorventes. Em relação a QuiHIS, essa coloração deve-se a ligação do íon cobre com os grupos amino da quitosana (RHAZI *et al.*, 2002). A adição de histidina não proporcionou nenhum efeito nas esferas de QuiHIS, AlgGEL e AlgCOL.

Tabela 3- Diâmetro médio dos adsorventes utilizados QuiHIS, AlgGEL e AlgCOL. Os resultados foram obtidos a partir do *software* ImageJ<sup>®</sup>.

	<b>Diâmetro Médio (cm)</b>
<b>Qui</b>	0,347 ± 0,013
<b>QuiHIS</b>	0,227 ± 0,022
<b>QuiHIS+Cu(II)</b>	0,277 ± 0,035
<b>(Cu(II)+His)+Qui</b>	0,281 ± 0,040
<b>AlgGEL</b>	0,288 ± 0,025
<b>AlgGEL+Cu(II)</b>	0,295 ± 0,036
<b>(Cu(II)+His)+ AlgGEL</b>	0,296 ± 0,018
<b>AlgCOL</b>	0,301 ± 0,011
<b>AlgCOL+Cu(II)</b>	0,287 ± 0,033
<b>(Cu(II)+His)+ AlgGEL</b>	0,290 ± 0,032

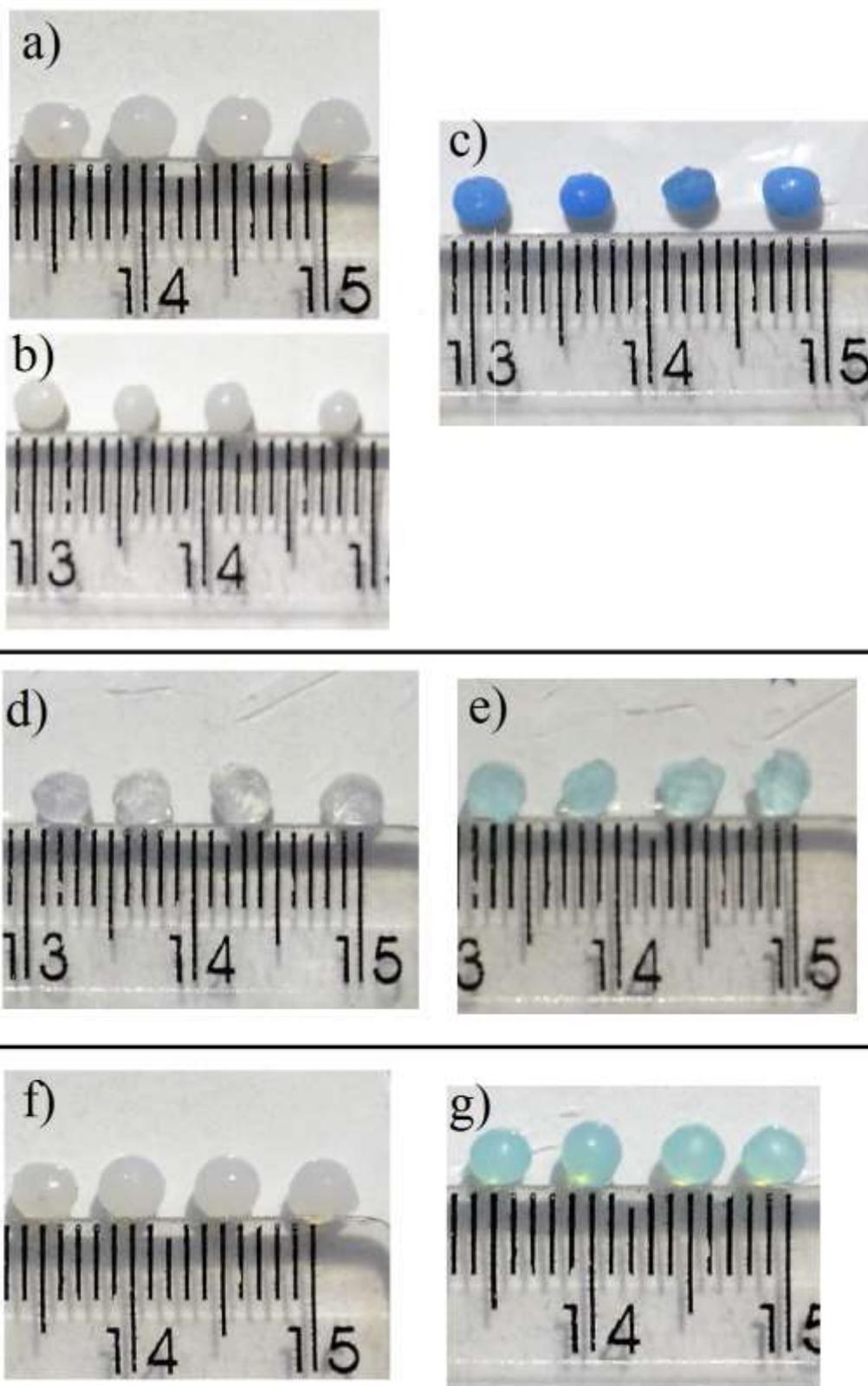


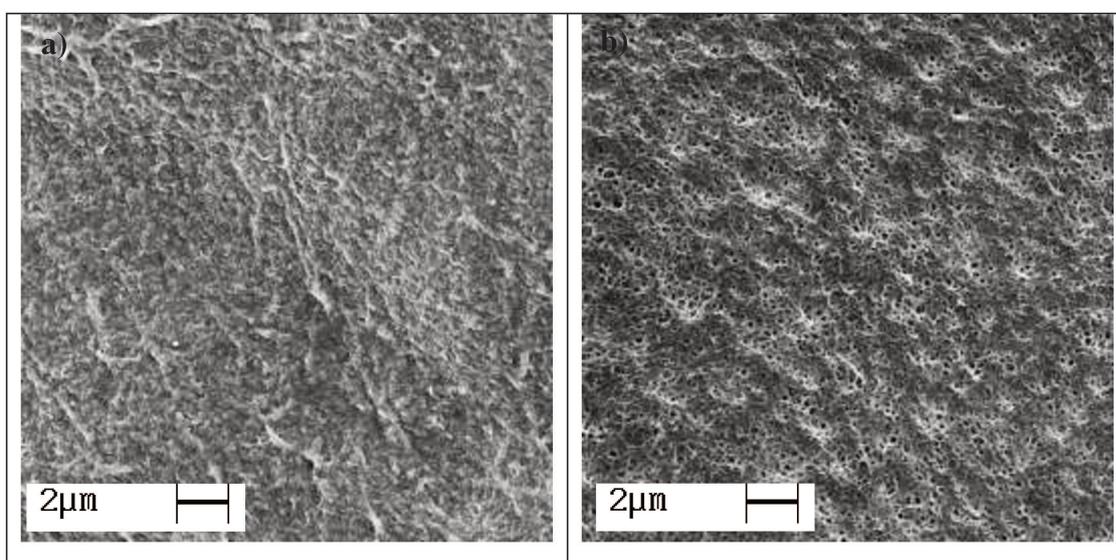
Figura 11 – Esferas dos adsorventes utilizados, antes e após adsorção de íons cobre, a) Qui, b) QuiHIS, c) QuiHIS+Cu (II), d) AlgGEL, e) AlgGEL+Cu (II), f) AlgCOL e g) AlgCOL+Cu (II). Régua com escala em mm.

### 5.1.2 Morfologia dos adsorventes

Através do MEV pôde-se observar a morfologia da superfície das esferas Qui, QuiHIS, AlgCOL e AlgGEL. Nota-se com a Figura 12 a formação de pequenos poros na superfície da esfera após a funcionalização da histidina. Após a etapa de adsorção esses poros desaparecem ou se tornam muito pequenos ficando invisíveis nesta aproximação. A superfície das esferas de quitosana se apresenta irregular e rugosa assim como foi relatado por Mahl (2013).

Observam-se diferenças significativas em relação a morfologia da superfície das esferas dos dois tipos de alginato. O AlgGEL exibiu uma superfície irregular, coberta por estrias e sem a presença de poros (Figura 13). O AlgCOL apresentou uma superfície homogênea com a formação de camadas e também não apresentou poros (Figura 14). Se observarmos a Figura 10, as características globais das esferas de AlgGEL e AlgCOL refletem as micrografias analisadas, com uma superfície irregular para o AlgGEL e homogênea para o AlgCOL. A complexação do cobre e posterior adição de histidina ao AlgGEL promoveu um aumento da sua rugosidade, isto pode ser devido à influência da histidina atuar de fato na morfologia da esfera ou ainda, atuar no processo de liofilização usado para preparo das amostras na microscopia.

A formação das esferas de alginato pode ser atribuída a ligação simultânea de cátions divalentes, neste caso o  $\text{Ca}^{2+}$ , com diferentes cadeias de blocos gulurônicos. Como resultado da sua configuração, essas cadeias formam cavidades eletronegativas, capazes de prender os cátions via interação iônica resultando na reticulação das cadeias e assim formando a estrutura chamada de “caixa de ovos” (PAPAGEORGIU, 2006).



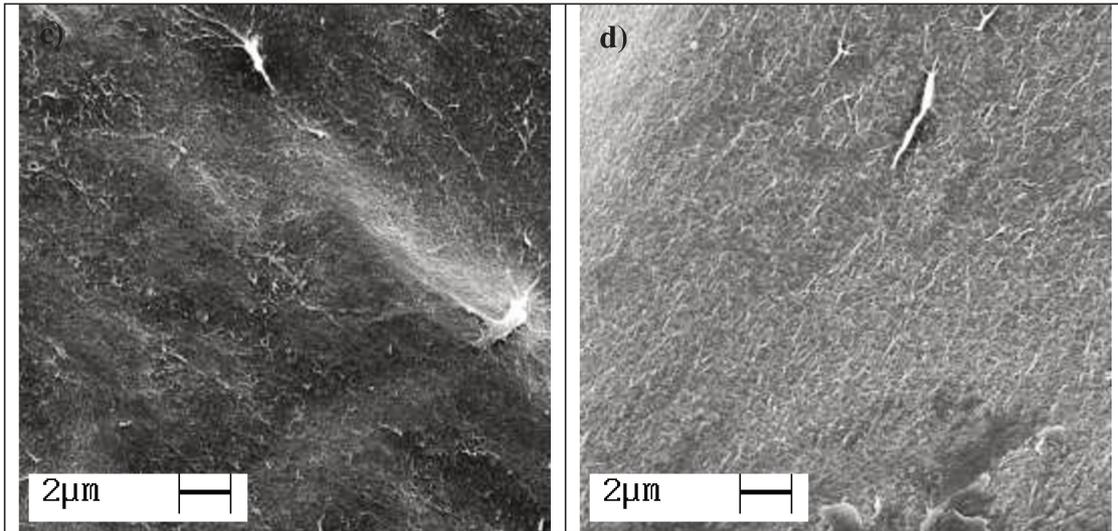


Figura 12 - Microscopia eletrônica de varredura das esferas liofilizadas de a) Qui, b) QuiHIS, c) QuiHIS+Cu(II) e d) (Cu(II)+His)+QuiHIS

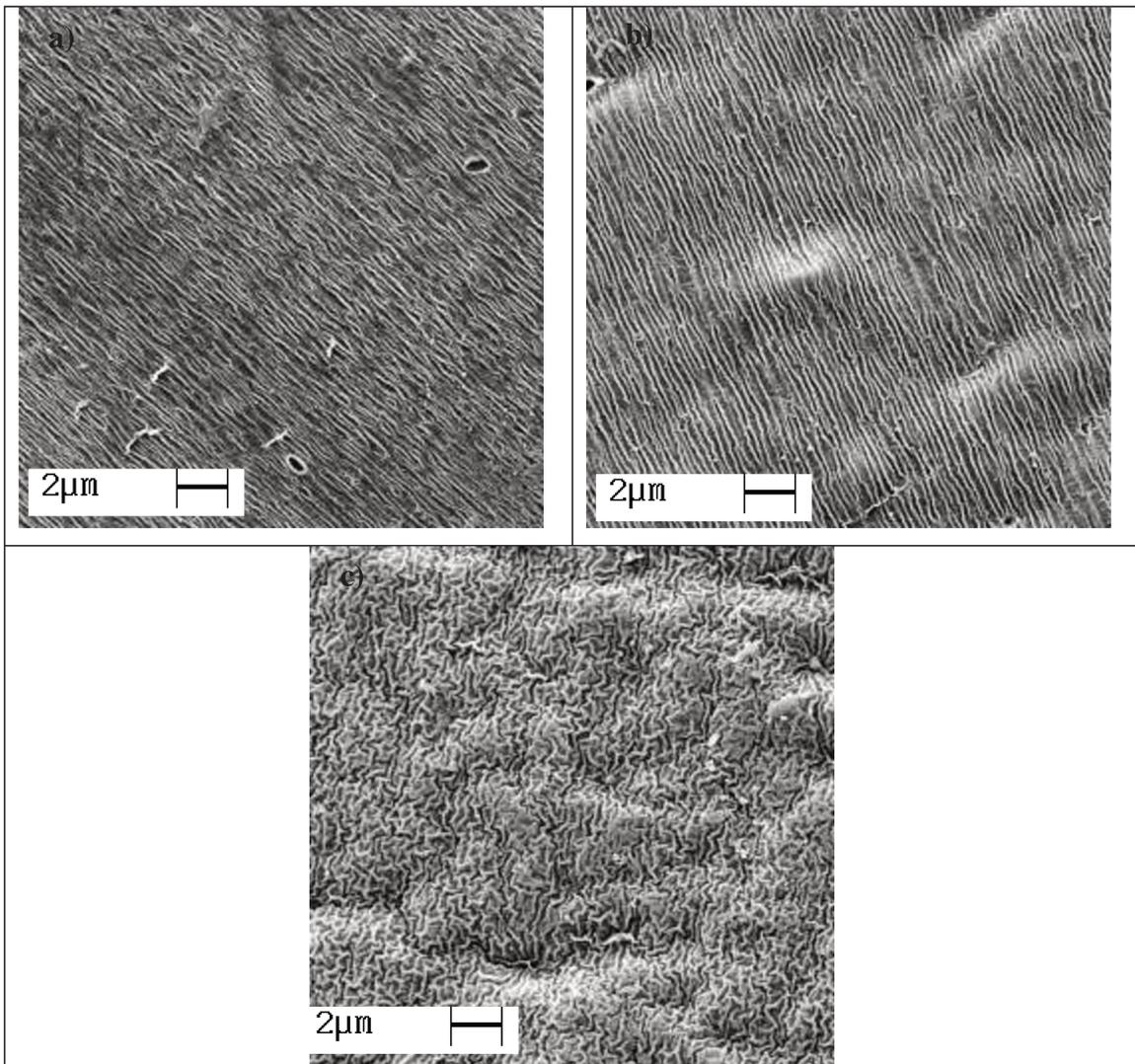


Figura 13 - Microscopia eletrônica de varredura das esferas liofilizadas de a) AlgGEL, b) AlgGEL+Cu(II) e c) (Cu(II)+His) + AlgGEL.

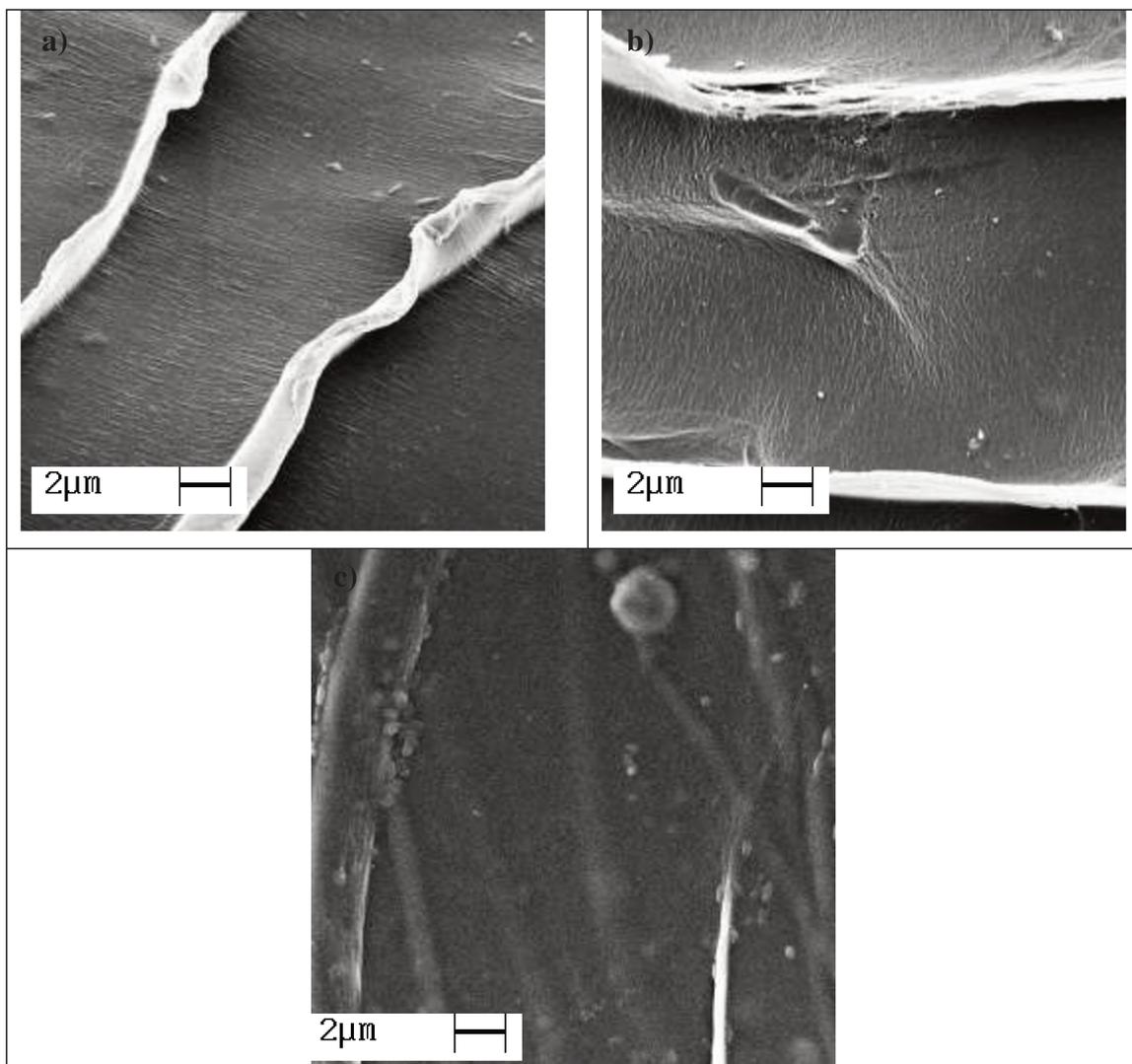


Figura 14 - Microscopia eletrônica de varredura das esferas liofilizadas de a) AlgCOL, b) AlgCOL+Cu(II) e c) (Cu(II)+His) + AlgCOL.

### 5.1.3 Determinação da cristalinidade dos adsorventes

A Figura 15 apresenta os difratogramas para quitosana e quitosana funcionalizada com histidina antes e após os experimentos de adsorção. A quitosana apresenta um padrão de difração pouco cristalino, com dois largos halos característicos em  $2\theta$  próximo de  $10^\circ$  e de  $20^\circ$  que corresponde a região não-cristalina e cristalina respectivamente da quitosana. Após a funcionalização observa-se um aumento na cristalinidade da quitosana. Após a adsorção de íons cobre, ocorreu uma diminuição na cristalinidade da quitosana. A complexação de íons metálicos pode ser compreendida como um fenômeno que promove a desorganização estrutural e subsequente decréscimo da cristalinidade. Na literatura, os difratogramas encontrados para íons cobre exibem quatro principais halos de cristalinidade  $2\theta = 21,2; 25; 34,2$  e  $37$  (GU

*et al.*, 2007). Observa-se que o halo próximo de  $2\theta = 20^\circ$  fica mais largo após a adsorção, o que pode indicar uma combinação dos halos característicos da estrutura do polímero com os halos do íons metálico (ANAN *et al.*, 2011; GU *et al.*, 2007).

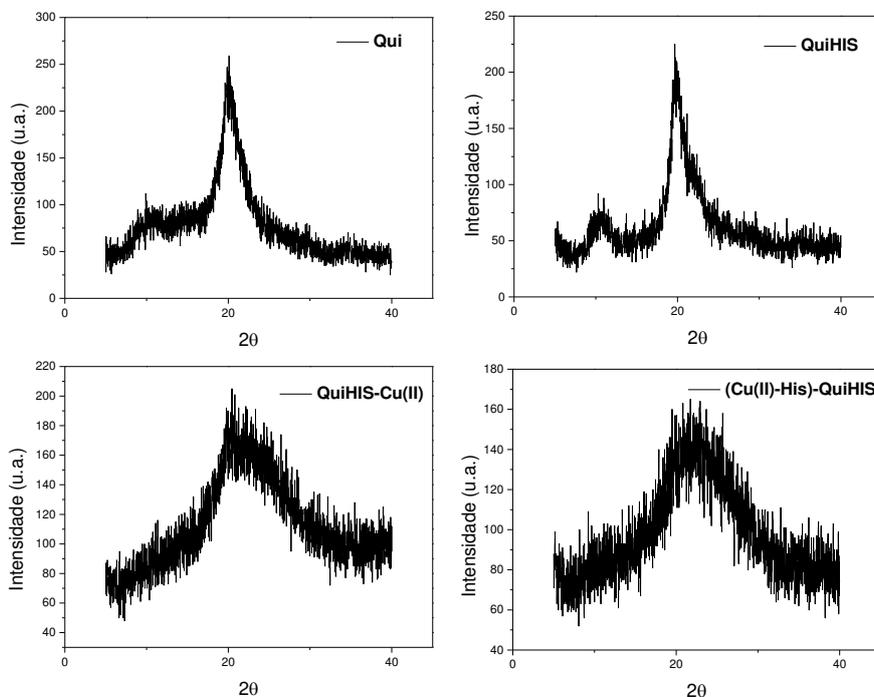


Figura 15 - Difratogramas de Raios-X para amostras de quitosana natural e funcionalizada com histidina, antes e após adsorção de íons cobre e adição de histidina.

Verifica-se nas Figuras 16 e 17 que os dois tipos de alginato apresentaram halos de cristalinidade típicos. Os alginatos exibem halos característicos de sua estrutura em  $2\theta = 13,7^\circ$ , e  $21^\circ$  (XIAO *et al.*, 2001). Para o AlgCOL, a visualização do halo em  $2\theta = 13,7^\circ$  não é tão nítida. Após a adsorção de cobre, o halo em  $2\theta = 21^\circ$  continua presente, porém, não houve alteração em sua cristalinidade, enquanto que, para o AlgGEL ocorre uma diminuição significativa na intensidade dos halos, especialmente em  $2\theta = 13,7^\circ$  que praticamente não aparece. Isto mostra que a incorporação de cobre diminuiu o caráter cristalino do AlgGEL, provavelmente o metal está entre as cadeias poliméricas, ligando-se aos grupos funcionais do alginato, e assim provocando maior desordem entre as cadeias dos polímeros. Também não houveram modificações após adição de histidina ao sistema, mostrando que o aminoácido não influencia a cristalinidade do biopolímero.

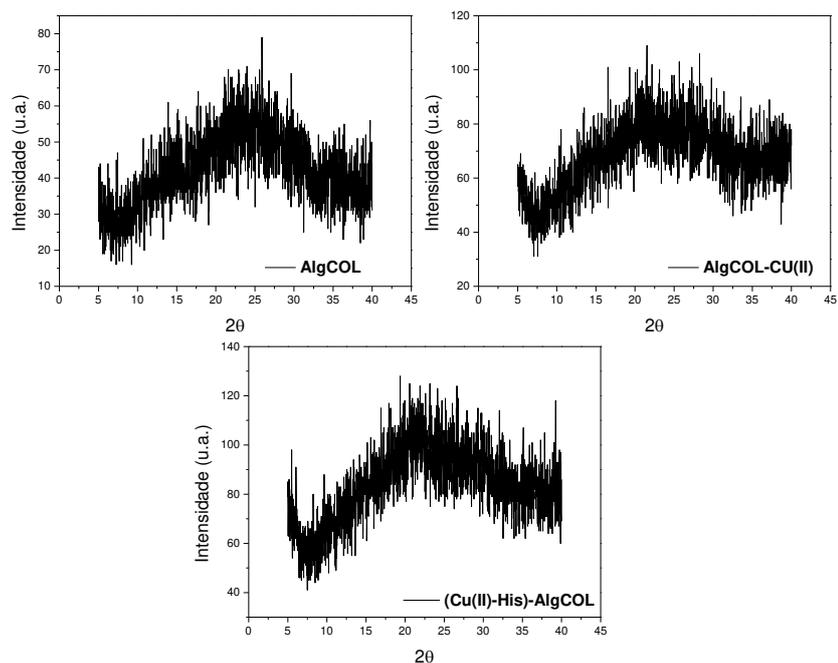


Figura 16 - Difratomogramas de Raios-X para amostras de AlgCOL, antes e após adsorção de íons cobre.

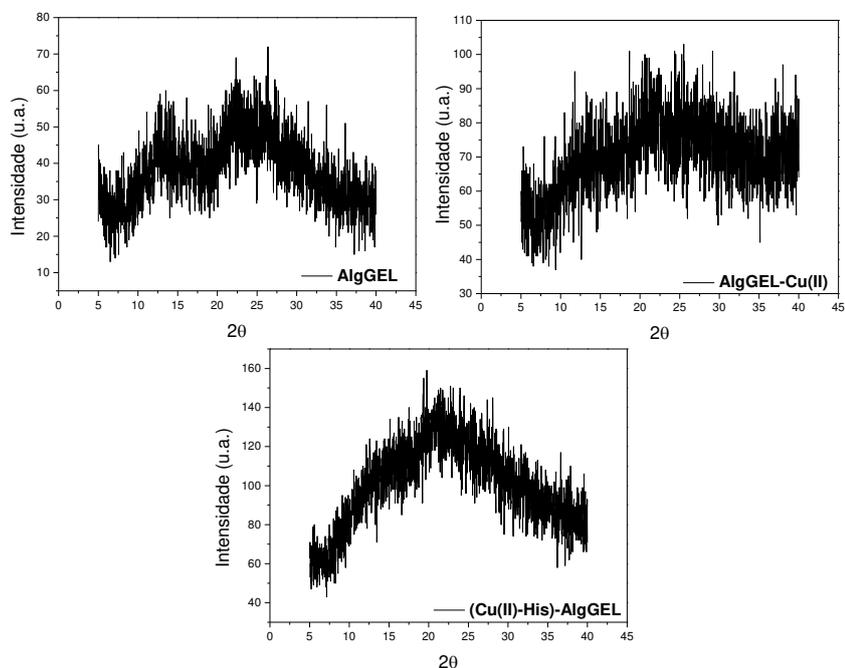


Figura 17 - Difratomogramas de Raios-X para amostras de AlgGEL, antes e após adsorção de íons cobre.

O alginato com maior quantidade de grupos gulurônicos, AlgGEL, parece apresentar uma estrutura levemente mais cristalina que o AlgCOL. Desde que, blocos manurônicos não formam a ‘caixa de ovos’, sua estrutura será menos rígida e menos organizada e, portanto, menos cristalina (CHAPMAN, 1980).

#### 5.1.4 Determinação do Grau Médio de Desacetilação (GD) das esferas de quitosana

Uma propriedade importante na caracterização da quitosana é a determinação do seu grau médio de desacetilação, ou percentual de grupos amino protonados quando em meio ácido. Esta característica interfere diretamente nas propriedades de adsorção dos íons metálicos, pela modificação da cristalinidade do polímero e propriedades de difusão. Para medição do GD diferentes técnicas são utilizadas. Heux *et al.* (2000) usaram a técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para medir o GD de diferentes amostras de quitosana. Enquanto que, Gupta e Jabrail (2006) utilizaram técnicas como titulação potenciométrica, espectroscopia de FTIR e análise elementar e observaram resultados bastante similares para a mesma amostra de quitosana.

A Figura 18 apresenta as curvas de titulação potenciométrica e a derivada primeira para quitosana natural e quitosana funcionalizada com histidina. Utilizando-se a equação 7, é possível através das inflexões destas curvas, determinar  $V_1$  e  $V_2$  e a partir disso, obter a porcentagem de grupos amino presentes na quitosana. Os resultados obtidos apontaram um valor para o GD da Qui e QuiHIS de 60% e 87,5% respectivamente. As esferas de quitosana natural apresentaram um valor próximo ao valor fornecido pela Sigma de  $\geq 75\%$ . Este resultado indica um aumento dos grupos aminos livres na quitosana devido a sua conjugação com a histidina.

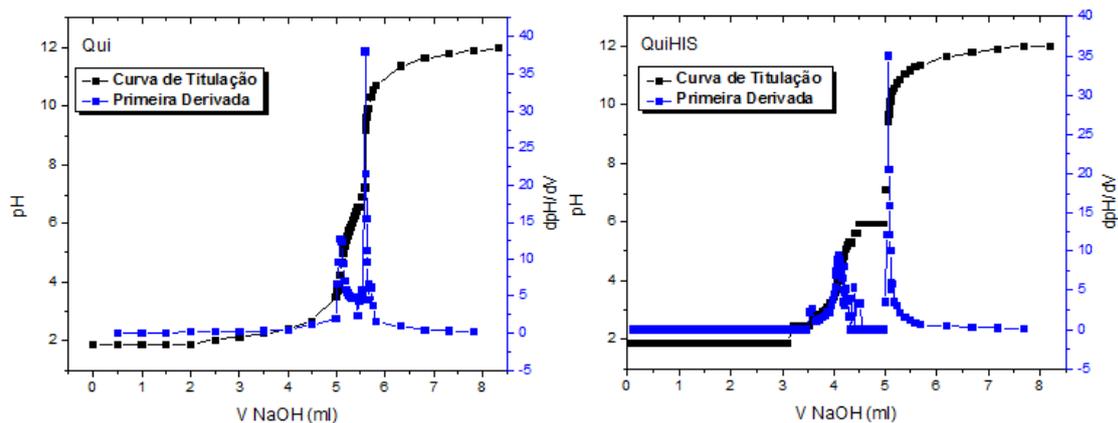


Figura 18 - Curva de titulação potenciométrica e sua derivada primeira para esferas de quitosana natural (Qui) e quitosana funcionalizada com histidina (QuiHIS).

Piron e Domard (1997) estudaram a influência de três tipos de quitosana com graus de desacetilação diferentes, atuando na adsorção de íons de urânio. Foi verificado que a capacidade de adsorção aumenta com o aumento do GD. O mesmo foi verificado neste trabalho, com o aumento do GD notou-se um aumento na capacidade de adsorção de íons cobre, indicando a participação dos grupos amino no processo de complexação do metal na matriz da quitosana.

#### 5.1.5 Determinação da estrutura química dos adsorventes

Os espectros de FTIR da quitosana natural e quitosana funcionalizada com histidina antes e após a adsorção são mostrados na Figura 19. Os espectros apresentam os picos característicos da quitosana em  $3400\text{ cm}^{-1}$  (estiramento de O-H e N-H),  $2900\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-H),  $1650\text{ cm}^{-1}$  (atribuído a ligação C=O no grupo amida),  $1560\text{ cm}^{-1}$  (ligação N-H no grupo amida). As bandas que aparecem em  $1418$  e  $1375\text{ cm}^{-1}$  são responsáveis pelas ligações CH e  $\text{CH}_2$  respectivamente, enquanto que, em  $1070$  e  $1030\text{ cm}^{-1}$  temos a ligação C-O-C.

As principais mudanças observadas no espectro de FTIR após a funcionalização das esferas de quitosana estão no estiramento em  $1560\text{ cm}^{-1}$  relacionado a amida II da quitosana que se desloca para  $1590\text{ cm}^{-1}$ . A banda em  $1590\text{ cm}^{-1}$  está atribuído a ligações  $\text{NH}_2$  e pode ser um indício de novas ligações que ocorreram após a funcionalização da histidina ou até mesmo a inserção de novos grupamento amino na estrutura da quitosana (PAWLAK; MUCHA, 2003; RITTHIDEJ; PHAECHAMUD; KOIZUMI, 2002). O pico em  $1650\text{ cm}^{-1}$  praticamente

desaparece após a funcionalização mostrando uma possível interação com as ligações C=O do grupo amida remanescentes da estrutura da quitina. Alterações encontradas nos picos em 1418 e 1375  $\text{cm}^{-1}$  sugerem mudanças devido ao aumento do número de ligações CH e  $\text{CH}_2$  após a funcionalização.

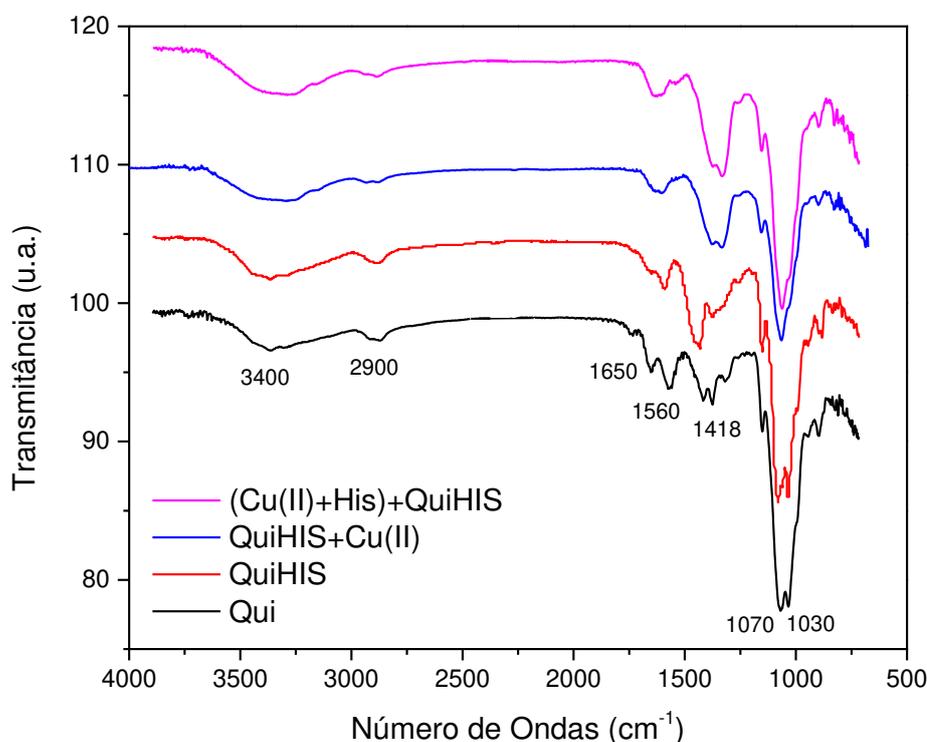


Figura 19– Espectros de FTIR das esferas de Qui, QuiHIS, QuiHIS+Cu(II) e (Cu(II)+HIS)+QuiHIS .

Em um estudo realizado por Beppu *et al.*, (2004), onde histidina é funcionalizada em membranas de quitosana reticuladas com glutaraldeído, é relatado que no espectro de histidina tratada com quitosana o estiramento perto de 1100  $\text{cm}^{-1}$  aumenta, como se a histidina estivesse adicionando grupos amino na quitosana.

Após a adsorção, podem-se verificar alterações ocorrendo principalmente em 1590  $\text{cm}^{-1}$  ( $-\text{NH}_2$ ), este pico desaparece após o contato com íons cobre. Em 1080 e 1030  $\text{cm}^{-1}$  referente a ligações C-O-C, também ocorreram modificações mostrando que a interação com o metal ocorre majoritariamente com os grupos amino e algumas ligações envolvendo átomos de oxigênio. Vieira (2008) e Albarelli (2009) encontraram os mesmos resultados referentes aos espectros de FTIR, para membranas de quitosana e esferas de vidro recobertas com quitosana respectivamente, reafirmando que a adsorção de íons cobre na quitosana altera principalmente as ligações junto aos átomos de nitrogênio e oxigênio da quitosana.

Além destes espectros, foi realizado um teste para analisar a interação entre QuiHIS e HIS, não observada na Figura 20. A quitosana funcionalizada foi colocada em contato com uma solução de histidina 100  $\mu\text{M}$  durante 24h e após isso a análise de FTIR foi efetuada e algumas modificações foram observadas na região de  $3400\text{ cm}^{-1}$  e também em  $1418\text{ cm}^{-1}$ , mostrando que há interação entre QuiHIS e HIS e que ela pode estar ocorrendo entre os grupos funcionais  $-\text{OH}$  e  $-\text{NH}_2$  das esferas de quitosana funcionalizada. Portanto, a histidina pode estar interagindo não somente com o cobre, mas, também com as esferas de QuiHIS durante o processo de adsorção.

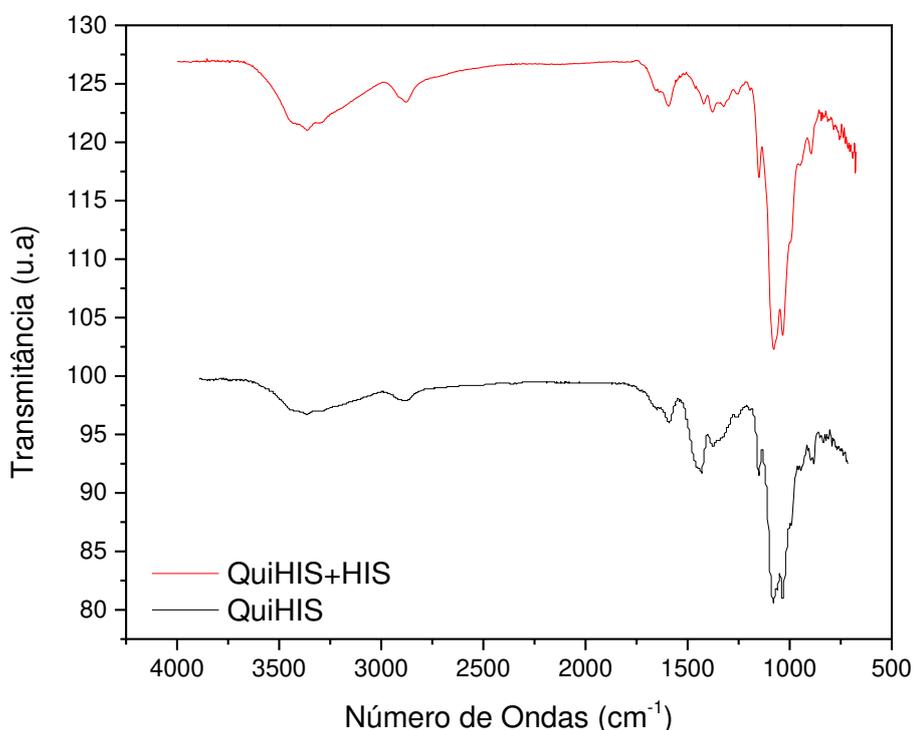


Figura 20 – Espectros de FTIR realizados a partir de um teste onde as esferas de quitosana funcionalizada foram colocadas em contato com uma solução de histidina 100  $\mu\text{M}$  durante 24h e após isso a análise foi efetuada.

Nos espectros dos alginatos (Figuras 21-23) as seguintes bandas características são observadas tanto no AlgCOL quanto no AlgGEL:  $3340\text{ cm}^{-1}$  atribuído as ligações de hidrogênio O-H; um sinal fraco em  $2930\text{ cm}^{-1}$  devido as vibrações de C-H;  $1600\text{ cm}^{-1}$  que corresponde ao ânion carboxilato  $\text{COO}^-$  assimétrico;  $1410\text{ cm}^{-1}$  atribuída a deformação vibracional da ligação C-OH com contribuição simétrica do grupo carboxila O-C-O; as bandas em  $1295\text{ cm}^{-1}$ ,  $1080\text{ cm}^{-1}$ ,  $1030\text{ cm}^{-1}$  e  $940\text{ cm}^{-1}$  podem ser

atribuídas ao estiramento das ligações C-O e C-C de resíduos de ácido urônicos. Todas as bandas encontradas condizem com resultados anteriormente relatados pela literatura (GÓMEZ-ORDÓÑEZ; RUPÉREZ, 2011; LAWRIE *et al.*, 2007; PAPAGEORGIOU *et al.*, 2010; SAKUGAWA *et al.*, 2004).

Filipov e Kohn (1974) mostraram que a quantidade de blocos gulurônicos e manurônicos no alginato pode ser calculado por espectros de infravermelho. Eles relataram a posição dos picos para alginatos de cálcio ricos em blocos M e ricos em blocos G. Os espectros e picos encontrados pelos autores se assemelharam muitos aos espectros dos dois alginatos estudados neste trabalho. As principais mudanças de um alginato para outro são encontradas em 1320; 1100 e 1080  $\text{cm}^{-1}$  (bandas características do ácido gulurônico), e em 1290  $\text{cm}^{-1}$  e 880  $\text{cm}^{-1}$  atribuídas a resíduos de ácido manurônico (Figura 21).

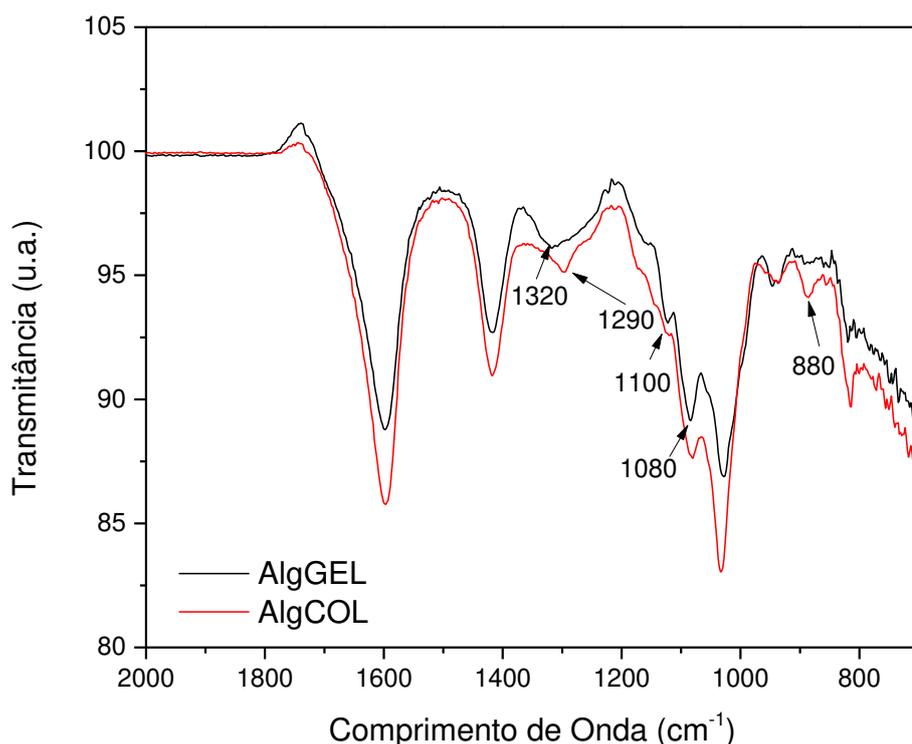


Figura 21 - Espectros de infravermelho para os alginatos AlgCOL rico em blocos manurônicos e AlGEL rico em blocos gulurônicos.

Após a adsorção, como consequência da difusão de íons cobre na matriz dos alginatos, algumas mudanças podem ser notadas principalmente nos picos em 3340

$\text{cm}^{-1}$  referente a ligações O-H, e em 1600 e 1410  $\text{cm}^{-1}$  responsáveis pela região do grupo  $\text{COO}^-$  simétrico e assimétrico. Percebe-se a diminuição na intensidade destas bandas e também um deslocamento do pico em 1410  $\text{cm}^{-1}$  para posições menores. Sartori *et al.* (1997) realizaram uma pesquisa onde foi determinado a porcentagem de íons cálcio retidos em filmes finos de alginato utilizando a técnica de FTIR. Eles relataram que este pico, em específico, é responsável pelas ligações iônicas. Quando o sódio é substituído por íons cálcio na formação dos filmes finos, a densidade de cargas, o raio e o peso atômico do cátion são mudados criando um novo ambiente ao redor do grupo carbonila, desta forma, a mudança do pico em 1410  $\text{cm}^{-1}$  é esperada. No caso deste trabalho, esse deslocamento pode estar associado a retirada dos íons cálcio e inserção de íons cobre na matriz do biopolímero (HOOGMOED, VAN; BUSSCHER; VOS, DE, 2003; SARTORI *et al.*, 1997).

Observa-se também o desaparecimento do pico em 940  $\text{cm}^{-1}$  após a adsorção de íons cobre, indicando a interação do metal com os ácidos urônicos do biopolímero. Bertagnolli (2013) também observou o desaparecimento deste pico após a adsorção de cromo em esferas de alginato comercial.

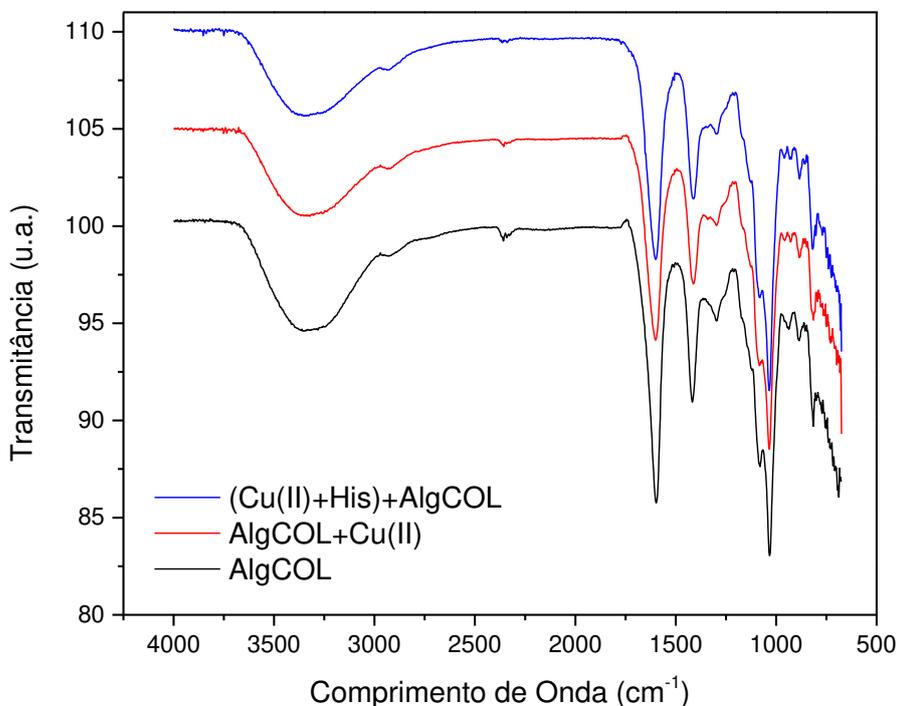


Figura 22 - Espectros de infravermelho antes e após adsorção de íons cobre e adição de histidina em AlgCOL.

Nenhuma diferença significativa foi encontrada nos espectros após adição de histidina ao sistema, tanto para AlgGEL quanto para AlgCOL. Os dois alginatos também foram colocados em contato com HIS por 24h e os espectros não apresentaram diferença, mostrando que provavelmente não existe interação entre os alginatos e a histidina. Ao contrário do que sugere um estudo realizado por Di Cocco *et al.* (2003) sobre a interação entre o alginato e quatro tipos de aminoácidos, dentre eles a histidina, utilizando a técnica de RMN como suporte. Foi constatado que existia interação entre alginato e os amino ácidos, e que os responsáveis por essa interação são os prótons do ácido manurônico do alginato. Deve-se levar em consideração que a técnica de RMN é extremamente sensível e, portanto, pode ser que haja a interação entre alginato e histidina, mas não foi possível verificar com os espectros de FTIR.

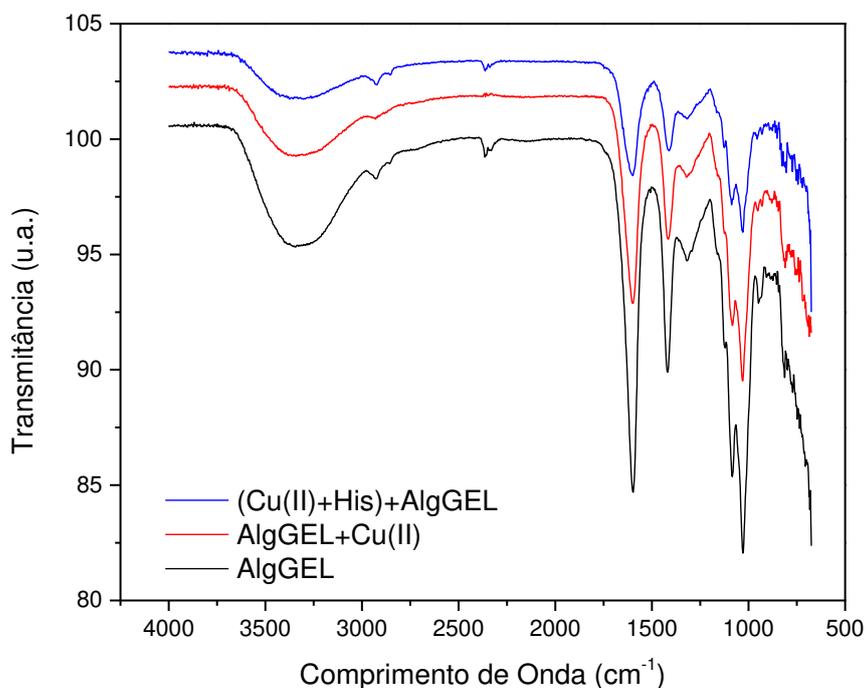


Figura 23 - Espectros de infravermelho antes e após adsorção de íons cobre e adição de histidina em AlgGEL.

Mehrotra e Bohra (1983) sugeriram que o complexo metal-carboxilato pode ter diferentes tipos de coordenação como pode ser visto na Figura 24: I – iônica ou sem coordenação, II- coordenação unidentada, III- coordenação bidentada via quelatação e IV- coordenação bidentada em ponte. Estudos realizados por Alcock, Tracy e Waddington (1976) e Tackett (1989) descreveram a relação entre bandas COO<sup>-</sup>

assimétrica ( $1600\text{ cm}^{-1}$ ) e  $\text{COO}^-$  simétrica ( $1410\text{ cm}^{-1}$ ) e o tipo de coordenação do complexo metálico. A frequência destas bandas é extremamente sensível a estrutura do grupo carboxila, a natureza do solvente, do ligante e a identidade do metal. Deste modo, a separação destas bandas, ou seja,  $\Delta\nu = \text{COO}^-_{\text{assimétrico}} - \text{COO}^-_{\text{simétrico}}$ , pode ser considerado um indicativo da estrutura do carboxilato. De acordo com Nakamoto (1978) e Deacon e Phillips (1980), valores de  $\Delta\nu_{\text{complexo}} < \Delta\nu_{\text{Na}}$ , sugerem uma coordenação bidentada via quelação, se  $\Delta\nu_{\text{complexo}} \cong \Delta\nu_{\text{Na}}$ , ocorre uma coordenação bidentada em ponte e se  $\Delta\nu_{\text{complexo}} > \Delta\nu_{\text{Na}}$  a coordenação é unidentada.

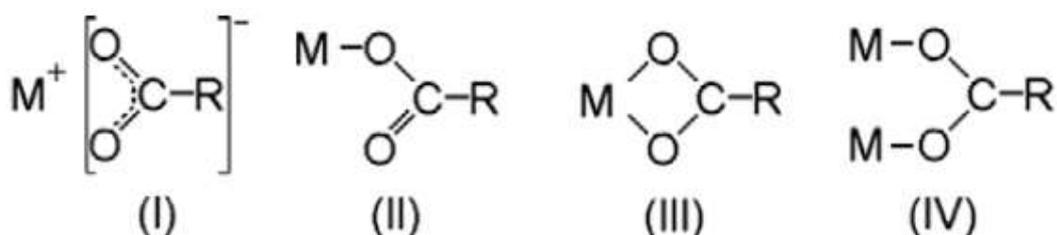


Figura 24– Diferentes tipos de coordenação para o complexo metal-carboxilato (PAPAGEORGIU *et al.*, 2010).

Com isso, calculou-se a separação das bandas para os dois tipos de alginato (Tabela 4). Os espectros obtidos para o Alginato de sódio (AlgCOL e AlgGEL) estão apresentados no Apêndice. Observa-se que em todos os casos temos que o  $\Delta\nu_{\text{complexo}} < \Delta\nu_{\text{Na}}$  o que pode indicar segundo a literatura uma coordenação bidentada dos íons cobre via quelação metálica.

Tabela 4 - Valor da separação das bandas assimétrica e simétrica para os espectros de FTIR dos alginatos e sistemas estudados.

	$\text{COO}^-_{\text{assimétrico}} (\text{cm}^{-1})$	$\text{COO}^-_{\text{simétrico}} (\text{cm}^{-1})$	$\Delta\nu$
<b>AlgGEL sódio</b>	1615	1419	196
<b>AlgGEL cálcio</b>	1600	1418	182
<b>AlgGEL+Cu(II)</b>	1600	1415	185
<b>(Cu(II)+His)+AlgGEL</b>	1600	1411	189
<b>AlgCOL sódio</b>	1613	1415	198
<b>AlgCOL cálcio</b>	1600	1412	188
<b>AlgCOL+Cu(II)</b>	1600	1414	186
<b>(Cu(II)+His)+AlgCOL</b>	1597	1417	180

Os grupos carboxílicos do alginato têm sido apontados como os maiores sítios ligantes para íons metálicos e outras moléculas (CHEN *et al.*, 2002; DAVIS *et al.*, 2008). Sartori *et al.* (1997) estudaram alginatos com proporções de blocos M/G variando de 0.43-1.08 e encontraram que a banda simétrica em  $1413\text{ cm}^{-1}$  se deslocou para  $1431\text{ cm}^{-1}$  após adsorção de íons cálcio na matriz. Tam *et al.* (2005) por sua vez, estudaram alginatos com proporção de blocos M/G igual a 0,67 e também observaram deslocamentos após adsorção de cálcio, porém, para valores menores de comprimento de onda. Os alginatos AlgCOL e AlgGEL tem proporção de blocos M/G de 1,94 e 0,61 respectivamente, e apresentaram deslocamentos de suas bandas simétricas e assimétricas para valores menores de comprimento de onda (VAZ, 2012). Esses deslocamentos são semelhantes aos encontrados por Tam *et al.* (2005), mas, contraditórios ao estudo de Sartori *et al.* (1997) . Logo, ainda não está claro se a relação da proporção dos blocos M/G ou diferenças mais sutis na estrutura do alginato (como o comprimento dos blocos G) causem as diferenças nas características espectrais do FTIR.

#### 5.1.6 Determinação da composição química das esferas de AlgGEL

Para aperfeiçoar e controlar a adsorção visando uma aplicação final é necessário entender melhor o processo de captura do metal. Neste caso, a técnica de XPS aparece como uma ferramenta interessante no sentido de fornecer novas ideias voltadas a entender o mecanismo de adsorção em nível molecular.

Para realização desta análise foi escolhido o adsorvente AlgGEL devido ao desempenho deste nos experimentos de adsorção que serão mostrados posteriormente. De acordo com estes experimentos, o adsorvente AlgGEL mostrou melhores resultados em se tratando de capacidade de adsorção de íons cobre e estabilidade se comparado a AlgCOL e QuiHIS. Na Tabela 5 estão mostrados os elementos que compõe o adsorvente. Verificou-se a presença de nitrogênio na composição química do AlgGEL o que pode ser explicado pela ineficiência no seu processo de extração, o que proporcionou resquícios de proteínas da alga em que o alginato foi extraído. Estes resquícios de nitrogênio em alginatos são comuns e já foram encontrados por alguns autores (BERTAGNOLLI *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2014). A presença de Cálcio se deve ao processo de obtenção das esferas de alginato onde cloreto de cálcio é utilizado como reticulante. Após a adsorção nota-se a presença de cobre na amostra, confirmando sua adsorção e corroborando com os resultados de isoterma e cinética

que mostraram que a adição de histidina provoca um leve decréscimo na capacidade de adsorção.

Ainda na Tabela 5, a concentração atômica de cálcio na superfície do alginato tem um decréscimo enquanto que, a de cobre aumenta. Isso pode indicar um mecanismo de troca iônica entre  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  ocorrendo na adsorção. Vários autores investigaram a remoção de cátions divalentes como Cu, Zn, Ni, Pb e Cd pelo alginato e propuseram como mecanismo a troca do  $\text{Ca}^{2+}$  por estes íons (DAVIS; VOLESKY; MUCCI, 2003; PAPAGEORGIOU *et al.*, 2006; KHOTIMCHENKO; KOVALEV, 2008; KLEINÜBING, 2009). Além disso, Grant *et al.* (1973) sugeriram que os ácidos galurônicos dos alginatos aprisionam cátions por meio de interações iônicas com a cavidade eletronegativa formada pela estrutura de “caixa de ovos”.

Tabela 5 - Composição química dos adsorventes antes e após adsorção de cobre e adição de histidina determinada por XPS.

	Concentração Atômica Total				
	C 1s	O 1s	Cu 2p	N 1s	Ca 2p
<b>AlgGEL pH 7</b>	60,34	32,95	-	3,03	3,68
<b>AlgGEL pH 5</b>	60,42	36,98	-	-	2,6
<b>AlgGEL+Cu(II)</b>	57,47	39,02	1,52	1,07	0,92
<b>(Cu(II)+His)+AlgGEL</b>	58,38	40,22	0,92	0,32	0,15

A adição de histidina exerce um efeito somente na concentração atômica do cobre, levando a uma diminuição do mesmo. Em relação aos outros elementos há mudanças pouco significativas, mostrando que a histidina não está interferindo quimicamente nas esferas de AlgGEL durante o processo de adsorção.

Além dos sistemas estudados, as esferas de alginato foram colocadas em dois pH's diferentes, pH 5 e pH 7 em meio aquoso. São os pH's em que a adsorção ocorre, e em que a esfera fica armazenada respectivamente. Os resultados mostraram que no pH 5 ocorre um aumento na concentração de oxigênio devido uma diminuição na concentração de cálcio e ausência de nitrogênio. O alginato é considerado extremamente hidrofílico, portanto, a esfera pode ter liberado os íons cálcio para o meio ( $\text{H}_2\text{O}$ ) por não ter nenhum íon metálico para realizar troca iônica.

As características de ligação do carbono foram investigadas pela análise dos espectros XPS de alta resolução do C 1s. A Figura 25 mostra este espectro e suas respectivas deconvoluções. O pico com energia de ligação (BE) de 285 eV é atribuído à ligação C-C/C-H, estes grupos são geralmente utilizados para a calibração da energia

do instrumento (MOULDER *et al.*, 1992). Os demais picos podem ser atribuídos a álcoois e éteres com ligação C-O e grupos carboxila com ligação C=O com BE de 286 e 288 eV respectivamente (CHEN *et al.*, 2002; MOULDER *et al.*, 1992). Estas funções orgânicas são típicas de polissacarídeos de algas e as variações na BE do átomo de carbono se devem as diferentes densidades eletrônicas dos grupos. A Figura 26 identifica os picos que sofreram deconvolução, com base nas energias de ligação do C1s e apresenta a concentração atômica de cada pico.

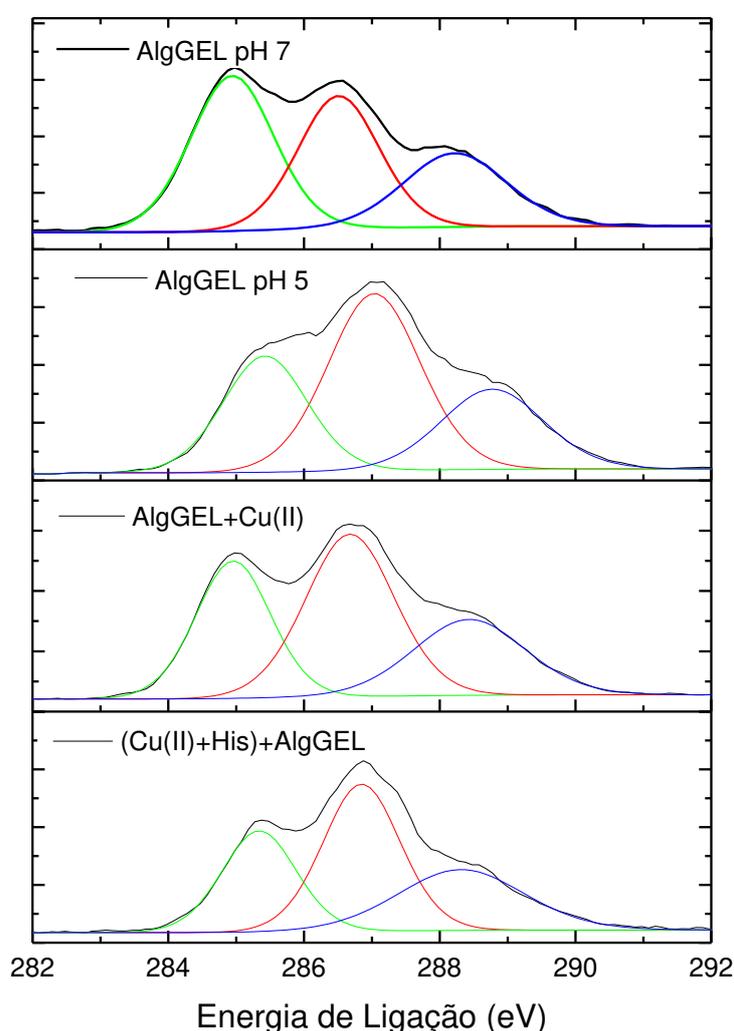


Figura 25 - Espectros de fotoelétrons de alta resolução do C1s e suas respectivas deconvoluções para o AlgGEL antes e após adsorção e adição de histidina.

A mudança de pH proporcionou uma exposição maior dos grupos funcionais. Em uma solução mais ácida os grupos funcionais ficam mais expostos pois não existe o íon metálico presente para complexá-los. Como há um aumento na concentração

atômica dos grupos funcionais, a concentração de carbono diminui. Outra explicação para diminuição das ligações C-C, dada por Chen e Yang (2006), seria a perda de conteúdo orgânico com a mudança de pH. Os autores utilizaram a alga *Sargassum sp.* na adsorção de íons cobre, antes da adsorção a alga passava por um processo para alcançar um pH de 4.5, os resultados antes e depois da mudança de pH mostram a diminuição de ligações C-C e a consequente perda de conteúdo orgânico (CHEN; YANG, 2006). Porém, na Tabela 5 verifica-se que não existe uma diminuição dos elementos carbono e oxigênio, o que nos leva a acreditar que esta teoria não se encaixa nos resultados deste trabalho.

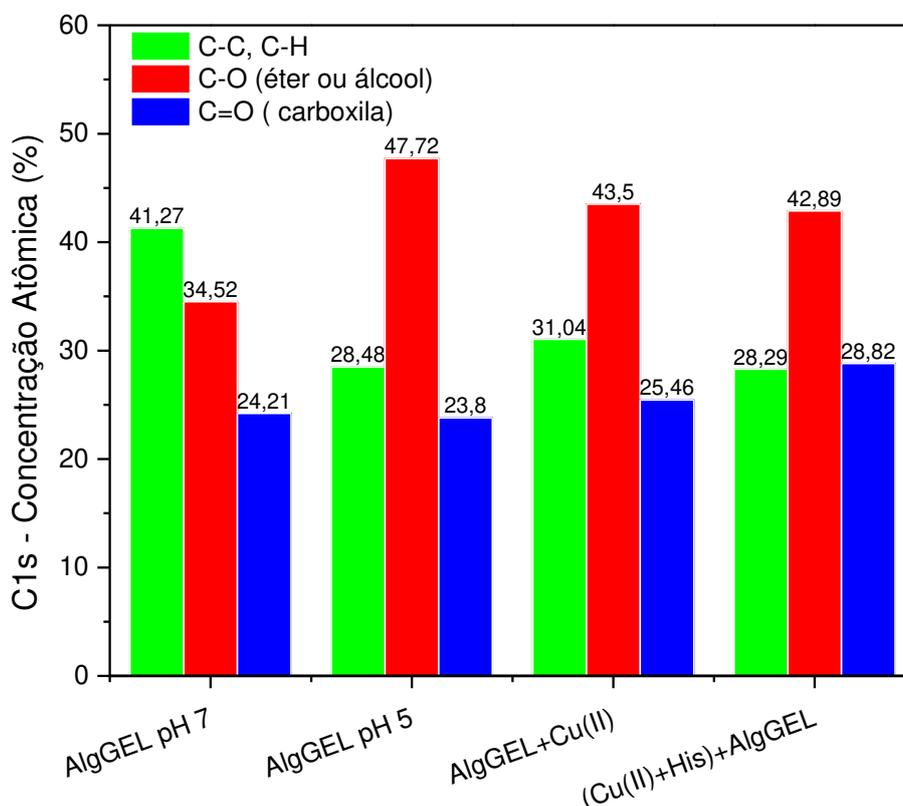


Figura 26 - Identificação dos picos que sofreram deconvolução com base nas energias de ligação para o C1s com suas respectivas concentrações atômicas para cada sistema estudado.

O pH inicial da solução do metal proporcionou um efeito significativo na capacidade de adsorção das esferas de alginato, devido aos grupos carboxílicos serem ionizados em pH's abaixo de 4. O pH da solução pode afetar tanto o estado de

ionização dos grupos funcionais dos adsorventes quanto a solubilização dos íons metálicos. Em valores baixos de pH, a competição entre os íons  $H^+$  e as espécies metálicas ( $M^{2+}$ ) resulta em um decréscimo na adsorção do metal, enquanto que valores altos de solução podem causar a precipitação dos sais de hidróxido do metal.

Os valores de pKa para os grupos carboxílicos  $\alpha$ -L-ácido gulurônico e  $\beta$ -D-ácido manurônico do alginato variam entre 3,4-3,9 (SMIDSROD; HAUG; LARSEN, 1966). Papageorgiou *et al.* (2008) encontraram um pH ótimo para adsorção de íons cobre de 4,5, valor muito próximo do utilizado neste trabalho. Com o aumento do pH, mais sítios negativos ficam disponíveis para a adsorção do cobre, desta forma, a remoção do metal aumenta (JIAPING CHEN; FANY TENDEYONG; YIACOUMI, 1997).

Com a Figura 25 observou-se que após adsorção de íons cobre a ligação C=O do grupo funcional carboxila tem sua concentração atômica elevada, implicando a participação destes grupos na captura dos íons metálicos cobre. Com a adição de histidina no sistema pode-se observar o mesmo. Isso indica a formação de um complexo carboxila-metal, em que os átomos de oxigênio doam elétrons para os íons metálicos. Desta forma, a densidade eletrônica do átomo de carbono diminui, fazendo com que a BE também diminua, de 288,77 para 288,43 eV.

Os espectros de alta resolução do O1s são apresentados na Figura 27 juntamente com as deconvoluções. A identificação dos picos e suas concentrações atômicas podem ser visualizadas na Figura 28. No caso do oxigênio o pico com BE de 531 eV é atribuído a ligação Metal-OH, em 533 eV a ligação C=O proveniente dos grupos carboxílicos e em 534 eV a ligação C-O dos álcoois e éteres.

Observa-se que após a adsorção ocorre um aumento no pico em 531 eV correspondente a ligação Metal-OH, o que indica a formação da ligação Cu-O, evidenciando a ligação entre os grupos hidroxila e o cobre. Observa-se novamente uma maior exposição dos grupos funcionais após mudança de pH e conseqüentemente diminuição da ligação metal-OH, o que leva a uma concordância com os espectros de C1s e a teoria de que em solução mais ácida e meio aquoso o alginato libera os íons cálcio.

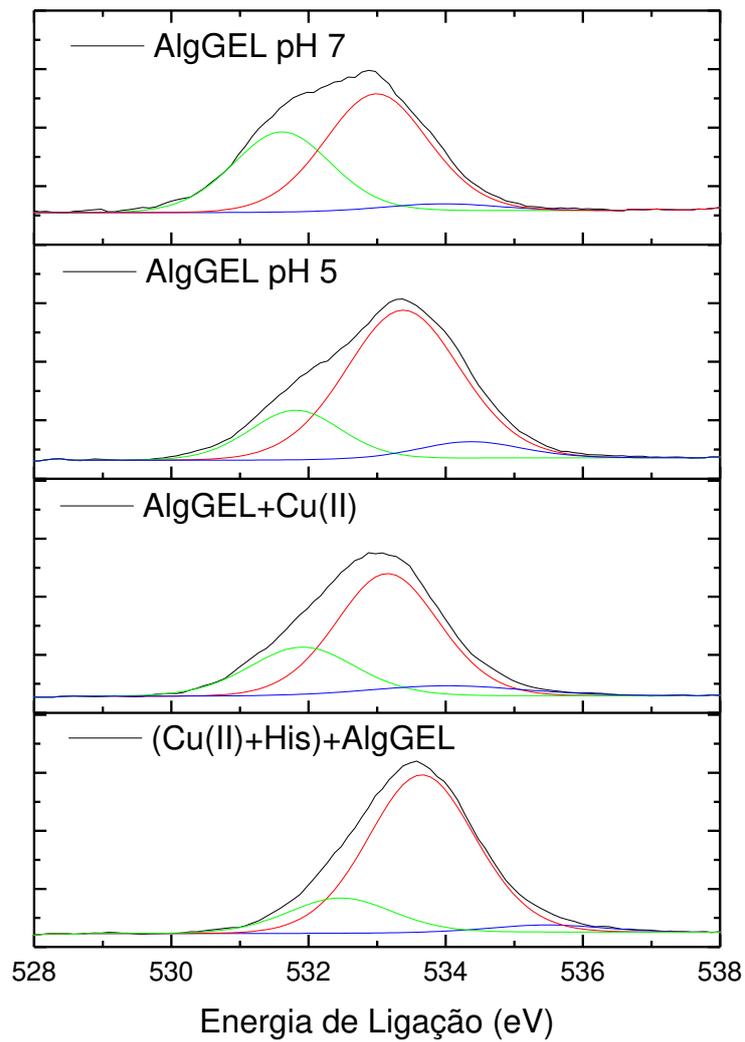


Figura 27 - Espectros de fotoelétrons de alta resolução do O1s e suas respectivas deconvoluções para o AlgGEL antes e após adsorção e adição de histidina.

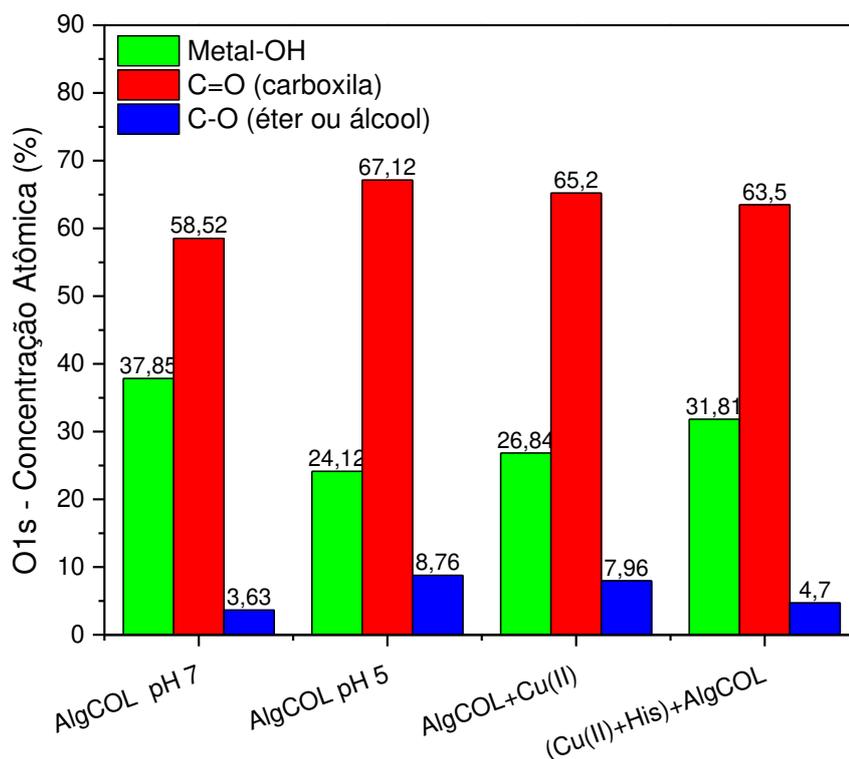


Figura 28 - Identificação dos picos deconvolucionados com base nas energias de ligação para o O1s com suas respectivas concentrações atômicas para cada sistema estudado.

A Figura 29 apresenta os espectros de XPS do átomo de cobre Cu 2p. Observa-se um grande sinal de ruído devido ao curto tempo de exposição da amostra à radiação. Esse curto tempo de exposição foi aplicado a fim de evitar a foto-redução do cobre pela ação dos Raios-x durante a aquisição do espectro. Os picos situados em  $2p_{3/2} = 933,0$  e  $2p_{1/2} = 952,6$  são atribuídos à presença de Cu(0) ou Cu(I). Os picos em  $2p_{3/2} = 935,2$  e  $2p_{1/2} = 955,2$  eV indicam uma provável existência de Cu(II).

Outro fato que confirma a presença de Cu(II) na superfície das amostras é a presença de linhas de *shake-up* em 945 e 965 eV para Cu  $2p_{3/2}$  e  $2p_{1/2}$ . Isso ocorre quando elétrons mais internos de um átomo são arrancados. Com isso, seus elétrons de valência sofrem uma reorganização, levando a uma elevação do elétron para um nível de mais alta energia (nível *shake-up*). O pico secundário é formado devido à perda de energia neste processo. Esses picos, são normalmente observados em transições de alguns compostos metálicos que possuem elétrons das camadas 3d ou 4f desemparelhados como o íons cobre (WATTS, J.F.; WOLSTENHOLME, 2005). As linhas de *shake-up* são um indício de uma esfera aberta  $3d^9$  de Cu(II) indicando a

presença de CuO na superfície das esferas. O mesmo é observado quando histidina é adicionada ao sistema.

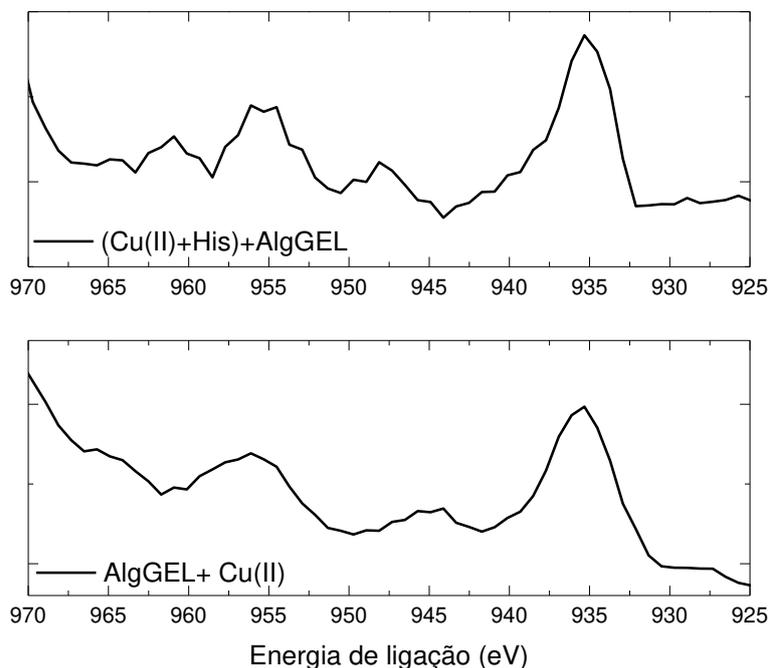


Figura 29 – Espectro de alta resolução do Cu2p para o AlgGEL após adsorção de cobre e adição de histidina.

## 5.2 Ensaios de adsorção dos íons cobre na presença de histidina

### 5.2.1 Cinética de adsorção

O estudo da cinética de adsorção entre metal-biopolímero em uma solução aquosa é essencial para entender os mecanismos de transporte que controlam a taxa de adsorção como a transferência de massa e a adsorção química.

As Figuras 30, 31 e 32 apresentam as curvas cinéticas de adsorção para o íon cobre na presença de histidina utilizando os adsorventes QuiHIS, AlgGEL e AlgCOL respectivamente. Observa-se uma cinética mais rápida para os dois tipos de alginato estudados. Se compararmos as curvas, os alginatos apresentam equilíbrio cinético próximo à 25h enquanto a quitosana modificada entra em equilíbrio com aproximadamente 45h. Alguns estudos já realizados sobre a cinética de adsorção de íons metálicos utilizando alginatos mostraram que a adsorção começa com uma fase rápida seguida de uma fase relativamente lenta. A fase rápida ocorre no período de alguns minutos a horas enquanto a fase lenta pode continuar durante várias horas até um dia (JIAPING CHEN; FANY TENDEYONG; YIACOUMI, 1997).

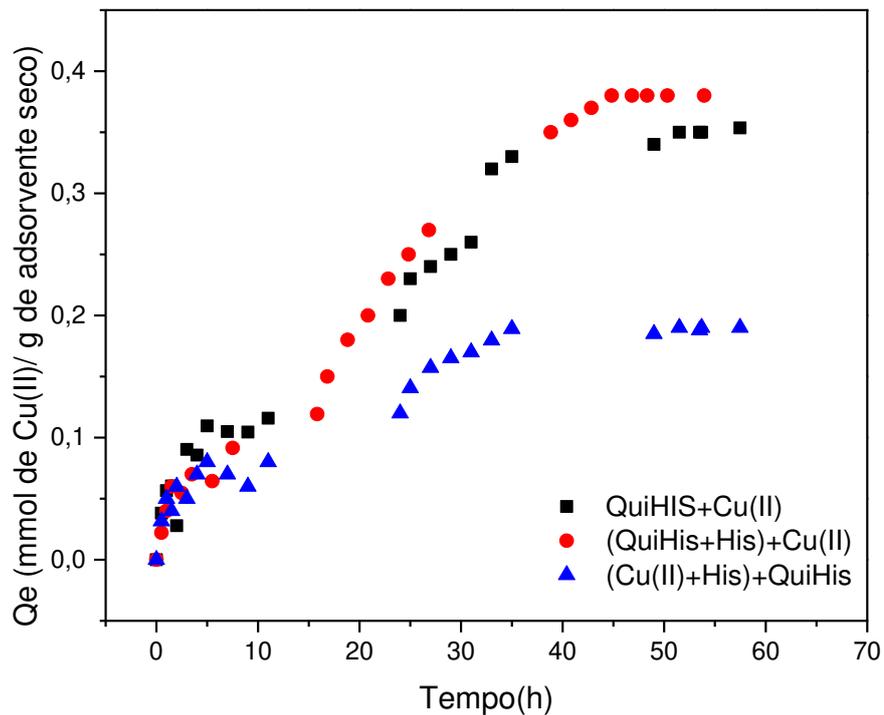


Figura 30– Cinética de adsorção das esferas de quitosana funcionalizada com histidina, utilizando, temperatura de 25°C, pH 5 e concentração inicial de 0,47 mmol/L de nitrato de cobre.

Kleinübing (2009) estudou a adsorção de íons cobre utilizando dois tipos de alginato comercial e obteve resultados semelhantes ao deste trabalho, porém, o equilíbrio cinético foi menor, provavelmente devido ao diâmetro da partícula utilizado neste trabalho ser maior, o que diminui a área superficial do adsorvente, aumentando assim sua cinética.

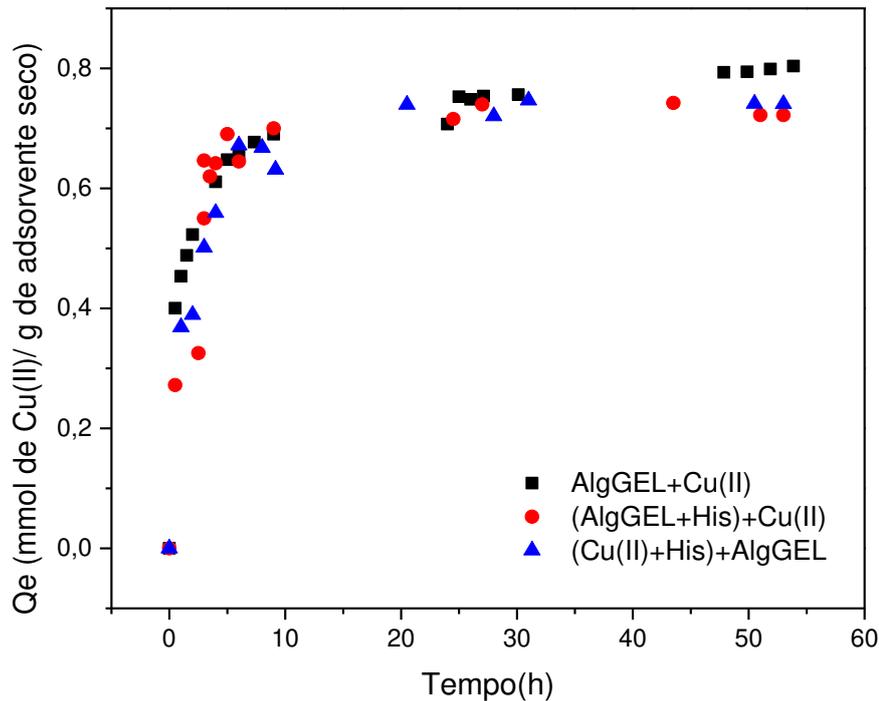


Figura 31 - Cinética de adsorção das esferas do alginato AlgGEL, utilizando temperatura de 25°C, pH 5 e concentração inicial de 0,47 mmol/L de nitrato de cobre.

A taxa de adsorção do metal é influenciada por fatores que afetam a transferência de massa do seio da fase fluida para os sítios ativos. Assim, o experimento de cinética pode ser considerado uma combinação de várias etapas. Estas etapas incluem o transporte de íons metálicos pela solução, o transporte de íons metálicos através da fina camada hidrodinâmica que se encontra ao redor do adsorvente e a difusão dos íons metálicos dentro da partícula. O tempo de equilíbrio do sistema adsorvato-adsorvente depende principalmente da temperatura, coeficiente de difusão e tamanho da partícula adsorvente (PAPAGEORGIOU *et al.*, 2006).

No presente estudo, as condições experimentais promoveram uma boa mistura dos solutos e dos adsorventes no sistema o que pode ter eliminado as limitações referentes ao transporte do íon na solução e pela camada hidrodinâmica. Com isso, a probabilidade de a difusão do metal ser a etapa que controla o processo de adsorção é elevada.

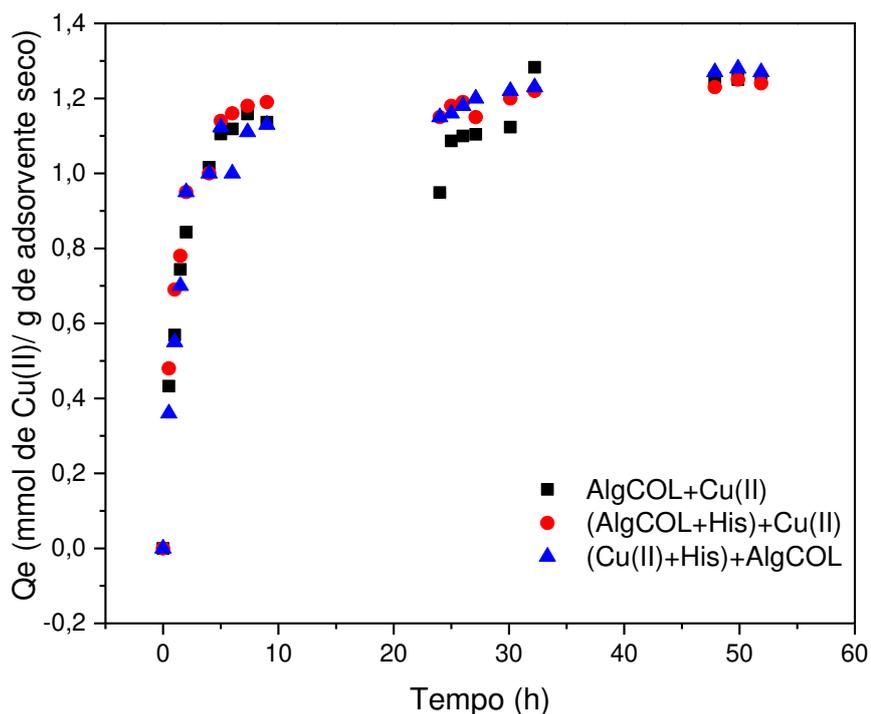


Figura 32 - Cinética de adsorção das esferas do alginato AlgCOL, utilizando temperatura de 25°C, pH 5 e concentração inicial de 0,47 mmol/L de nitrato de cobre

A Figura 33 mostra o caso específico do sistema em que o adsorvente é primeiramente incubado com a solução de cobre e após o equilíbrio, histidina é adicionada. Nesse caso espera-se que ocorra uma dessorção de íons cobre, devido a histidina apresentar elevada interação com íons metálicos. Observa-se que para quitosana modificada isso não ocorre, não apresentando nenhum efeito dessorativo. Isso pode ser explicado pelo fato de existir uma interação entre QuiHIS e histidina maior do que a interação entre histidina e cobre. Com isso, não existe uma competição entre QuiHIS e histidina pelos íons cobre, mas sim, uma sinergia entre as duas para que ocorra a adsorção do metal. Essa interação pode ocorrer devido a presença da própria histidina na matriz da quitosana, e também pela interação entre quitosana e histidina confirmada por Mahl (2013). Outra explicação pode ser o fato de que todo o cobre está quelatado fortemente por QuiHIS não havendo desprendimento e assim mantendo sua capacidade de adsorção.

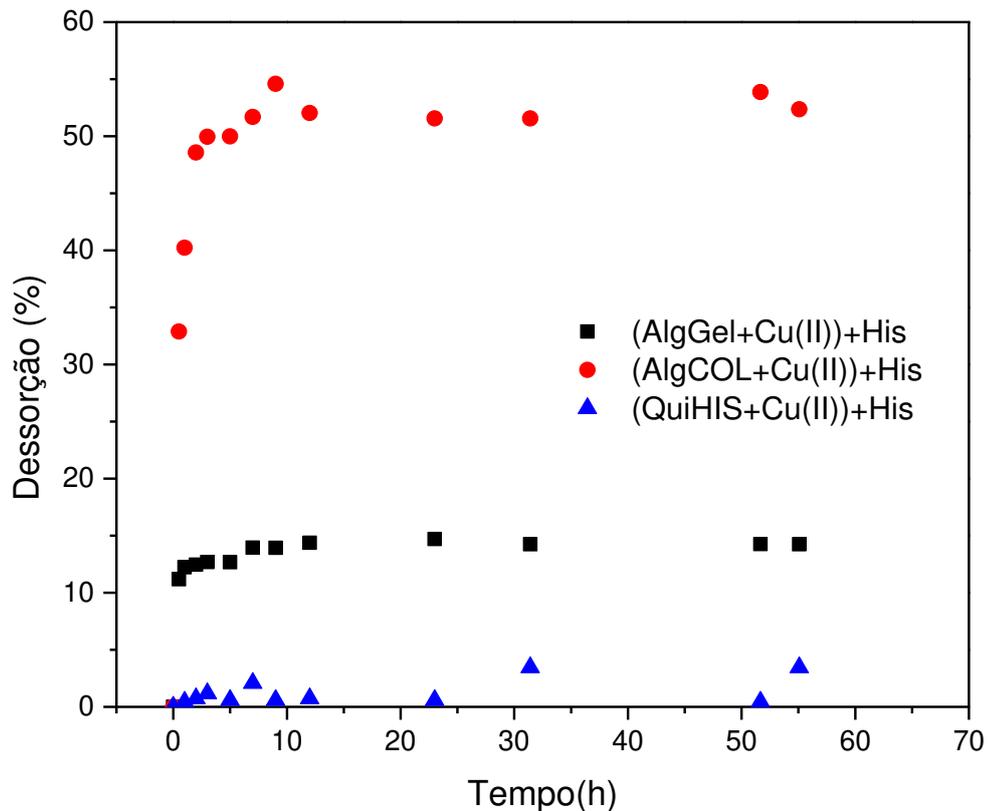


Figura 33 – Cinética de dessorção de íons cobre após adição de histidina para QuiHIS, AlgGEL e AlgCOL utilizando banho finito com T:25°C e pH:5.

O contrário observa-se para os alginatos, onde a dessorção é evidenciada pelo AlgCOL que apresenta quase 60% de liberação de íons cobre na solução após adição de histidina no meio. O AlgCOL apresenta maior quantidade de grupos manurônicos, e portanto, a complexação com o cobre será predominantemente monodentada e mais fraca como já relatado nesse trabalho (DAVIS; VOLESKY; MUCCI, 2003). Isso pode caracterizar uma maior dessorção por parte do AlgCOL.

As curvas cinéticas de adsorção foram avaliadas usando modelos cinéticos de pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem. Os resultados para cada sistema se encontram na Tabela 6. Foram utilizadas regressões não lineares para aquisição dos parâmetros e o *software* utilizado para tal análise foi o *Origin*.

Observa-se que o formato das curvas obtidas para QuiHIS são diferentes das obtidas para os dois tipos de alginatos que apresentam uma interação mais rápida entre

o adsorvato e o adsorvente. Isto pode ser confirmado pelas constantes cinéticas obtidas pelos modelos que apresentam valores maiores para os alginatos. Foi aplicado o teste do Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ) para cada modelo devido ambos apresentarem respostas significativas. O cálculo do  $\chi^2$ , auxiliou na decisão de qual modelo se adequou melhor aos dados.

Pode-se perceber que o modelo de pseudo-segunda ordem apresenta melhores resultados se comparado ao modelo de pseudo-primeira ordem, para a maioria dos sistemas estudados. Este resultado indica que a etapa limitante nestes sistemas é decorrente de uma adsorção química onde existe o compartilhamento ou troca de elétrons entre os íons cobre e os adsorventes, ou seja, a taxa global do processo de adsorção de cobre parece ser controlada pela adsorção química e não pelo transporte de massa (CHIOU; LI, 2003). Porém, o sistema (Cu(II)+His)+QuiHIS se adequou melhor ao modelo de pseudo-primeira ordem, este modelo descreve a adsorção ocorrendo através de ligações reversíveis na região superficial do adsorvente, sendo a difusão externa a etapa limitante (LOW *et al.*, 2000). Neste sistema, ocorre uma diminuição da adsorção de íons cobre devido a presença de histidina. Um estudo realizado por Marti *et al.* (2004), apontou que a histidina faz ligações covalentes com os átomos de cobre. Neste caso, a esfera de QuiHIS não foi capaz de capturar os íons metálicos já ligados a histidina, e o que restou em solução está se ligando superficialmente a matriz da QuiHIS.

Como já comentado, as taxas de adsorção foram maiores para os dois tipos de alginato, além disso, a capacidade de adsorção também foi maior. Isso mostra uma elevada interação dos alginatos com o íon cobre se compararmos com os resultados obtidos para QuiHIS. Dentre os adsorventes estudados o AlgGEL se mostrou o mais adequado por não apresentar maiores vulnerabilidades frente a histidina, mesmo no sistema (AlgGEL+Cu(II))+His a taxa de dessorção é de aproximadamente 10%. Portanto, mantém sua adsorção elevada independente da ordem em que histidina é adicionada ao sistema, o que torna este adsorvente extremamente interessante. Outro resultado interessante foi o aumento da capacidade de adsorção para o sistema (QuiHIS+His)+Cu(II). Isso mostra novamente uma possível interação entre QuiHIS e histidina levando a uma maior capacidade de adsorção.

Tabela 6– Parâmetros cinéticos obtidos para os modelos de pseudo-primeira e pseudo-segunda ordem para QuiHIS, AlgGEL e AlgCOL antes e após adição de histidina. Adsorção em banho estático com T: 25°C e pH 5.

	QuiHIS-Cu(II)	(Cu(II)-His)-QuiHIS	(QuiHIS-His)-Cu(II)
<b>Pseudo - primeira ordem</b>			
$Q_e$ (mmol g <sup>-1</sup> )	0,40±0,03	0,19 ± 0,01	0,63 ± 0,09
$k_1$ (h <sup>-1</sup> )	0,06±0,02	0,30± 0,09	0,01± 0,005
$R^2$	0,96	0,92	0,98
$\chi^2$	0,34	1,97	0,36
<b>Pseudo - segunda ordem</b>			
$Q_e$ (mmol g <sup>-1</sup> )	0,56±0,06	0,24±0,02	1,03±0,18
$k_2$ (g mmol h <sup>-1</sup> )	0,04±0,01	0,07±0,01	0,02±0,004
$R^2$	0,95	0,98	0,90
$\chi^2$	0,26	0,91	0,78
	AlgGEL-Cu(II)	(Cu(II)-His)-AlgGEL	(AlgGEL-His)-Cu(II)
<b>Pseudo - primeira ordem</b>			
$Q_e$ (mmol g <sup>-1</sup> )	0,73±0,02	0,72 ± 0,03	0,72 ± 0,02
$k_1$ (h <sup>-1</sup> )	0,85±0,12	0,43± 0,05	0,48± 0,07
$R^2$	0,88	0,95	0,90
$\chi^2$	0,17	0,18	0,07
<b>Pseudo - segunda ordem</b>			
$Q_e$ (mmol g <sup>-1</sup> )	0,78±0,01	0,76±0,03	0,77±0,02
$k_2$ (g mmol h <sup>-1</sup> )	1,71±0,21	0,91±0,12	1,24±0,36
$R^2$	0,97	0,98	0,90
$\chi^2$	0,04	0,16	0,02
	AlgCOL-Cu(II)	(Cu(II)-His)-AlgCOL	(AlgCOL-His)-Cu(II)
<b>Pseudo - primeira ordem</b>			
$Q_e$ (mmol g <sup>-1</sup> )	1,15±0,02	1,19 ± 0,02	1,18 ± 0,01
$k_1$ (h <sup>-1</sup> )	0,70±0,14	0,63± 0,05	0,80± 0,06
$R^2$	0,94	0,96	0,98
$\chi^2$	0,12	0,08	0,20
<b>Pseudo - segunda ordem</b>			
$Q_e$ (mmol g <sup>-1</sup> )	1,21±0,03	1,26±0,02	1,25±0,01
$k_2$ (g mmol h <sup>-1</sup> )	0,92±0,16	0,73±0,08	1,06±0,09
$R^2$	0,94	0,98	0,98
$\chi^2$	0,11	0,05	0,05

### 5.2.2 Isotermas de Adsorção

Através dos dados de equilíbrio podemos descrever como os adsorvatos interagem com os adsorventes, sendo de grande valia também para aperfeiçoar o processo de adsorção. Os dados experimentais de adsorção são mostrados nas Figuras 34, 35 e 36. Observa-se em todos os casos elevada adsorção de íons cobre. A adição de histidina em todos os sistemas provocou mudanças, tanto pela sua interação com os adsorventes quanto pela competição por íons cobre.

No caso da quitosana funcionalizada, o primeiro fato que se observa é o aumento da adsorção de íons cobre após sua funcionalização, vide dados obtidos por Mahl (2013). A autora testou a adsorção de íons cobre em esferas de quitosana naturais e obteve uma capacidade de adsorção inferior.

O trabalho de Beppu *et al.* (2004) investigou a adsorção de Cu(II) em soluções aquosas na faixa de pH 4 – 6 com membranas porosas de quitosana funcionalizadas com histidina. O estudo mostrou que a porosidade foi o fator que influenciou na capacidade máxima de adsorção de Cu(II). Membranas com alta porosidade apresentaram um aumento na capacidade de remoção do metal, enquanto que o oposto também foi verificado. Os valores das capacidades máxima de adsorção variaram de 2-3 mmol Cu(II)/g de quitosana.

Observa-se na Figura 34 que a adição de histidina influenciou o sistema (Cu(II)-His)-QuiHIS de forma a diminuir a capacidade de adsorção, mostrando que a interação Cu(II)-His continua forte, mesmo após a modificação da quitosana. Porém, nos outros casos a histidina interferiu de forma positiva, promovendo um aumento na capacidade de adsorção. Isso mostra novamente, uma possível interação entre QuiHIS e histidina que se intensifica na presença do íons cobre.

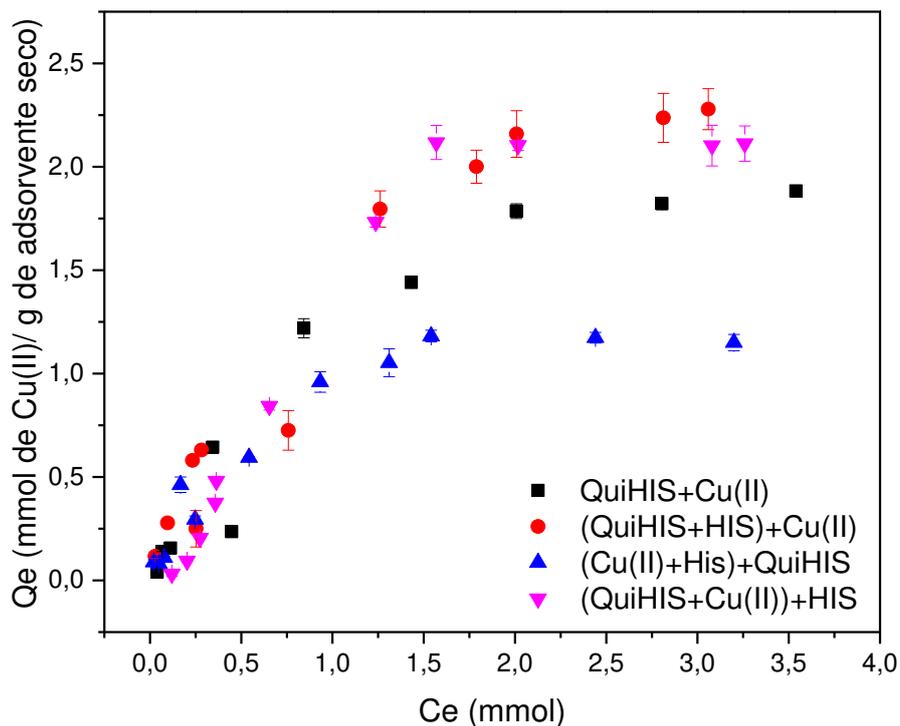


Figura 34 – Isotermas de adsorção das esferas de quitosana funcionalizada com histidina, utilizando temperatura de 25°C e pH 5.

Os dois alginatos também apresentaram elevada capacidade de adsorção. Mesmo provendo de fontes diferentes e, por isso, apresentam estruturas moleculares diferentes, as capacidades de adsorção foram semelhantes. Contudo, analisando-se os sistemas na presença de histidina, o AlgCOL manteve sua capacidade de adsorção, com exceção do sistema (AlgCOL+Cu(II))+His onde ocorre uma diminuição na capacidade de adsorção. Como já citado anteriormente, este tipo de alginato possui uma ligação mais fraca com íons metálicos, devido à presença maior de grupos manurônicos em sua estrutura. Esse fator pode facilitar a dessorção de íons cobre pois torna a histidina um quelante com elevada força de interação com o metal. Em relação ao AlgGEL ocorre uma leve diminuição na capacidade de adsorção que pode indicar a competição do adsorvente com a histidina pelos íons cobre, pois a mesma apresenta grupos funcionais em sua estrutura capazes de interagir fortemente com metais (DESCHAMPS, 2005). Por possuir a capacidade de se ligar fortemente aos metais, devido à ligações tridentadas e formando a “caixa de ovos” o AlgGEL é possivelmente uma interessante opção para atuar na ligação  $\beta$ A-Cu(II).

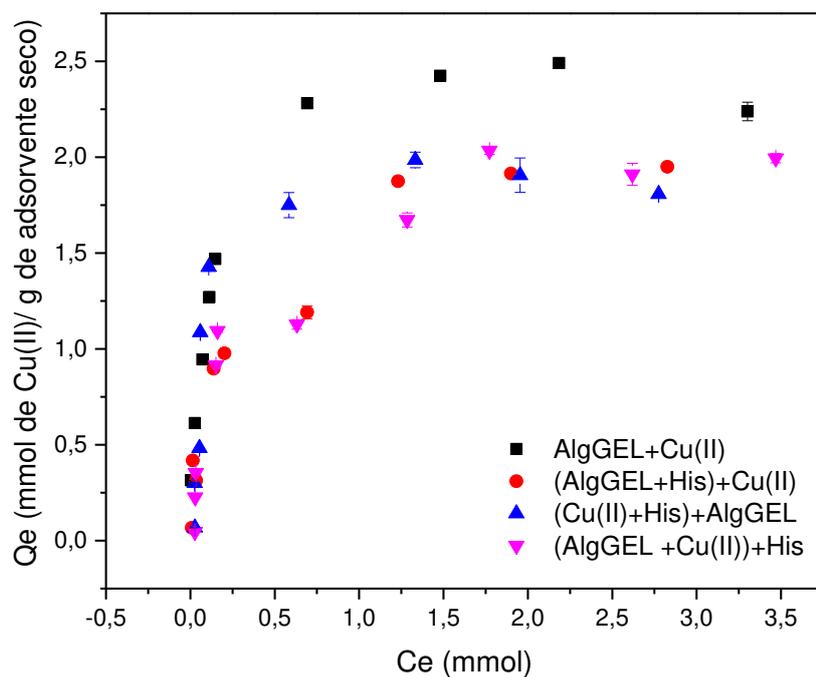


Figura 35– Isotermas de adsorção das esferas do alginato AlgGEL, utilizando temperatura de 25°C e pH 5.

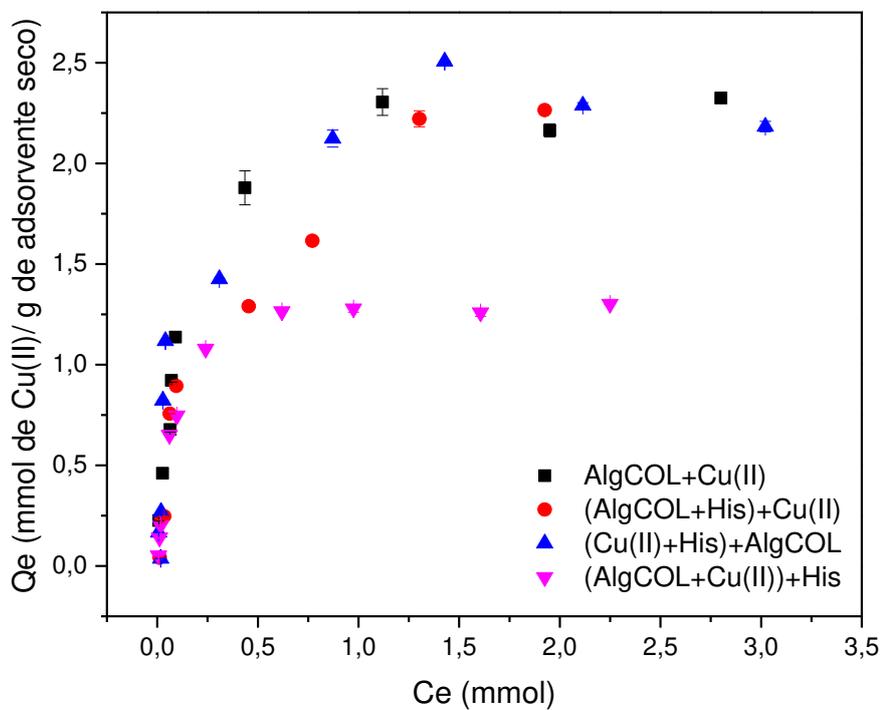


Figura 36 – Isotermas de adsorção das esferas do alginato AlgCOL, utilizando temperatura de 25°C e pH 5.

A capacidade máxima de adsorção dos dois tipos de alginato pode ser comparada com um estudo realizado por Kleinübing (2009) e Ngah Fatinathan (2008). Os autores utilizam esferas de alginato e esferas complexadas de quitosana-alginato respectivamente, na adsorção de íons cobre. Nos dois casos citados acima, as capacidades máximas de adsorção são inferiores às encontradas neste trabalho.

Em relação aos modelos utilizados, pode-se concluir com os dados mostrados na Tabela 7 que o modelo de Langmuir foi o que apresentou melhores ajustes em todos os sistemas estudados neste trabalho, com uma única exceção do sistema (QuiHis+His) +Cu(II). Neste sistema, não foi possível a aplicação do modelo de Langmuir e com o modelo de Freundlich não foi obtido bons resultados. O modelo de Langmuir assume que o soluto é adsorvido em um número finito de sítios e que a adsorção ocorre em monocamadas onde não existe interação entre as moléculas adsorvidas (NGAH; FATINATHAN, 2008). Portanto, no caso de QuiHIS a ligação com o cobre deve estar ocorrendo através dos grupamentos amino da quitosana e imidazol da histidina, e no caso dos alginatos através das carboxilas.

A constante de equilíbrio  $b$  representa um coeficiente de partição, ou seja, a afinidade entre o soluto e o adsorvente. Seu valor aumenta com a força de interação e depende da temperatura. Deste modo, um baixo valor de  $b$  indica uma menor força de interação do adsorvente. Observa-se um alto valor de  $b$  para os dois tipos de alginato. A quantidade de grupos manurônicos e gularônicos presentes na cadeia polimérica do alginato está diretamente relacionada à sua interação com íons metálicos. Alginatos com maior proporção de grupos gularônicos possuem maior afinidade por estes íons, originando um maior número de ligações de conteúdo energético superior às formadas pelos alginatos com maior proporção de grupos manurônicos que apresentam ligações mais brandas com íons metálicos (SMIDSRØD, 1974). Se compararmos os alginatos com a quitosana modificada, o parâmetro  $b$  exibiu valores menos expressivos para QuiHIS, mostrando que a força de interação entre os AlgGEL/AlgCOL e o íon cobre é mais elevada.

Em alguns casos, para QuiHIS, AlgCOL e AlgGEL ocorre um aumento no parâmetro  $b$ . O modelo de Langmuir aplicado considera o sistema como monocomponente. Se pensarmos na histidina como um segundo componente no sistema, isso explicaria o aumento do parâmetro  $b$ . A contribuição da histidina no sistema poderia estar embutida neste parâmetro e como consideramos um sistema

monocomponente e não binário, isso refletiu neste aumento. Vieira (2008) observou o mesmo comportamento para quitosana reticulada com glutaraldeído na adsorção de cobre.

Tabela 7 – Parâmetros de equilíbrio obtidos para os modelos de Langmuir e Freundlich para QuiHIS, AlgGEL e AlgCOL antes e após adição de histidina. Adsorção em banho estático com T: 25°C e pH 5.

	QuiHIS+Cu(II)	(Cu(II)+His)+QuiHIS	(QuiHIS+His)+Cu(II)	(QuiHIS+Cu(II))+His
<b>Langmuir</b>				
$Q_{m\acute{a}x}$ ( $mmol\ g^{-1}$ )	2,47±0,29	1,69 ± 0,16	2,50 ± 0,49	--
$b$ ( $L\ mmol^{-1}$ )	0,89±0,12	0,99 ± 0,15	1,29± 0,33	--
$R^2$	0,93	0,99	0,97	--
$\chi^2$	0,42	0,38	0,62	--
<b>Freundlich</b>				
$k_f$ ( $mmol\ g^{-1}$ )	0,88 ±0,05	0,82 ±0,04	1,47±0,1	1,39±0,33
$n$	1,48±0,05	1,73 ±0,17	1,56±0,11	0,79±0,13
$R^2$	0,94	0,95	0,96	0,62
$\chi^2$	0,82	0,45	1,08	--
	AlgGEL+Cu(II)	(Cu(II)+His)+AlgGEL	(AlgGEL+His)+Cu(II)	(Cu(II)+AlgGEL)+His
<b>Langmuir</b>				
$Q_{m\acute{a}x}$ ( $mmol\ g^{-1}$ )	2,51±0,08	2,02 ± 0,16	2,04 ± 0,16	2,05 ± 0,14
$b$ ( $L\ mmol^{-1}$ )	9,74±1,34	10,83 ± 3,49	4,67 ± 1,52	4,61 ± 1,35
$R^2$	0,98	0,87	0,93	0,93
$\chi^2$	0,36	0,70	0,77	0,36
<b>Freundlich</b>				
$k_f$ ( $mmol\ g^{-1}$ )	2,02±0,11	1,64±0,16	1,50±0,07	1,44±0,09
$n$	4,24±0,72	3,80±1,04	2,97±0,39	2,93±0,46
$R^2$	0,87	0,71	0,93	0,9
$\chi^2$	0,57	5,65	1,05	3,37
	AlgCOL+Cu(II)	(Cu(II)+His)+AlgCOL	(AlgCOL+His)+Cu(II)	(Cu(II)+AlgCOL)+His
<b>Langmuir</b>				
$Q_{m\acute{a}x}$ ( $mmol\ g^{-1}$ )	2,41±0,07	2,34 ± 0,16	2,38 ± 0,21	1,37 ± 0,03
$b$ ( $L\ mmol^{-1}$ )	8,40±0,95	11,56 ± 4,01	4,44± 1,49	13,05 ± 1,26
$R^2$	0,99	0,92	0,94	0,99
$\chi^2$	0,09	0,79	0,35	0,06
<b>Freundlich</b>				
$k_f$ ( $mmol\ g^{-1}$ )	1,91±0,11	1,89±0,14	1,83±0,09	1,19±0,08
$n$	3,53±0,53	3,39±0,67	2,36±0,28	3,66±0,72
$R^2$	0,89	0,85	0,95	0,83
$\chi^2$	0,65	8,88	1,71	1,89

A Tabela 8 mostra os valores das capacidades de adsorção de íon cobre para diferentes adsorventes. Uma comparação rigorosa é difícil, uma vez que as capacidades máximas de adsorção não foram obtidas em condições semelhantes. No entanto, estes dados são suficientes para mostrar que os adsorventes utilizados neste trabalho exibem elevada capacidade de adsorção.

Tabela 8 – Valores de capacidade de adsorção de íons cobre para diferentes adsorventes (LI; BAI, 2005; NGAH *et al.*, 2010; NGAH; FATINATHAN, 2008; NGAH; KAMARI; KOAY, 2004; POPURI *et al.*, 2009; WAN NGAH; ENDUD; MAYANAR, 2002).

<b>Adsorvente</b>	<b>Capacidade de Adsorção (mmol/g)</b>	<b>Referência</b>
Esferas de Qui-Celulose	0,8	Li e Bai (2005)
Esferas de Qui-PVC	1,4	Popuri <i>et al.</i> (2009)
Esferas de Qui-PVA	0,7	Ngah <i>et.al.</i> (2004)
Esferas de Qui-EPI	1,0	Ngah <i>et.al.</i> (2010)
Esferas de Qui-Alginato	1,1	Ngah and Fatinathan (2008)
Esferas de Qui	1,3	Mahl (2013)
Esferas de QuiHIS	2,5	Este trabalho
Esferas de AlgGEL	2,5	Este trabalho
Esferas de AlgCOL	2,4	Este trabalho

### 5.3 Isoterma de adsorção de íons cobre na presença do peptídeo $\beta$ A

Após as realizações dos experimentos de adsorção com a histidina, decidiu-se utilizar o peptídeo  $\beta$ A visando uma comparação. O adsorvente escolhido foi o AlgGEL, por demonstrar a partir dos resultados um melhor desempenho nos experimentos de adsorção. Esse experimento foi realizado em temperatura média corporal de 36,7°C. Experimentos mudando o pH para 7,4 também foram realizados, entretanto, não foram obtidos resultados satisfatórios devido ao fato de que o aumento do pH da solução de Nitrato de Cobre produz precipitados, o que poderia mascarar a concentração final de íons cobre na solução.

Os resultados obtidos podem ser verificados na Figura 37. O aumento da temperatura de 25°C para 36,7°C não provocou nenhuma mudança significativa na capacidade de adsorção de íons cobre. A adição do  $\beta$ A no sistema, provocou um leve decréscimo na capacidade de adsorção, o que mostra mais uma vez que o AlgGEL pode ser considerado um excelente agente quelante.

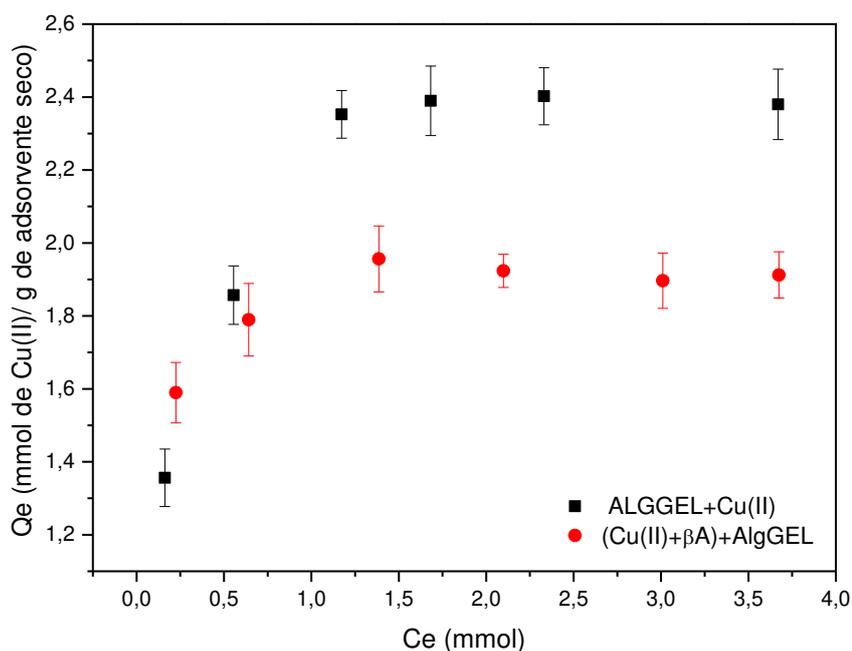


Figura 37 - Isoterma de adsorção do sistema AlgGEL+Cu(II) e (Cu(II)+βA)+AlgGEL em pH 5 e T=36,5°C.

Mahl (2013), também realizou uma isoterma utilizando o peptídeo βA, utilizando esferas de quitosana natural como adsorvente. Os resultados obtidos com o peptídeo foram similares aos experimentos utilizando a histidina, confirmando mais uma vez a validade do uso da histidina nos ensaios de adsorção. Além disso, os modelos de Langmuir e Freundlich foram aplicados aos dados experimentais e reproduziram os resultados obtidos com histidina (Tabela 9). Observa-se também um aumento do parâmetro b na presença do peptídeo βA. Como já explicado anteriormente, a presença do peptídeo reflete neste aumento, pelo modelo de Langmuir considerar um sistema monocomponente e não binário. O fato de o peptídeo possuir 42 aminoácidos que podem interagir no processo de adsorção também pode refletir no aumento do parâmetro b.

Tabela 9 - Parâmetros de equilíbrio obtidos para os modelos de Langmuir e Freundlich para os sistemas AlgGEL-Cu(II) e (Cu(II)-βA)-AlgGel. Adsorção em banho estático com T: 25°C e pH 5.

	AlgGEL-Cu(II)	(Cu(II)-βA)-AlgGEL
<b>Langmuir</b>		
$Q_{m\acute{a}x}$ ( $mmol\ g^{-1}$ )	2,56±0,08	1,96 ± 0,02
$b$ ( $L\ mmol^{-1}$ )	6,48±1,15	19,30 ± 2,97
$R^2$	0,95	0,92
<b>Freundlich</b>		
$k_f$ ( $mmol\ g^{-1}$ )	2,09±0,08	1,81±0,03
$n$	5,62±1,31	16,30±4,65
$R^2$	0,81	0,72

Pode-se concluir que, o AlgGEL tem a mesma tendência em adsorver íons metálicos tanto na presença de histidina, quanto na presença de βA. Desta forma, observa-se que o uso da histidina nos experimentos se mostrou eficiente, podendo então atuar na substituição do peptídeo para experimentos de adsorção que exigem uma demanda maior de reagente para que se consiga resultados satisfatórios, o que com o peptídeo não seria possível.

## 6 DISCUSSÃO FINAL

A partir dos resultados deste trabalho foi possível explorar três tipos de adsorventes que atuaram na adsorção de íons cobre na presença de histidina. É interessante notar que todos tiveram resultados consideráveis com capacidades de adsorção próximas a 2 mmol de Cu(II)/ g de adsorvente seco, QuiHIS, AlgGEL e AlgCOL superaram vários adsorventes já estudados como mostra a Tabela 8. Com isso, é notável o potencial de cada um deles que pode ser explorado visando outras finalidades, como por exemplo, o tratamento de águas contaminadas por metais.

Com os estudos cinéticos e de equilíbrio, foi possível concluir que os dois tipos de alginatos estudados AlgCOL e AlgGEL apesar de terem composições diferentes e serem obtidos de fontes diferente, apresentaram capacidades de adsorção semelhantes. Outro estudo realizado por Kleinübing (2009), com diferentes tipos de alginato, obteve resultados similares, em que as capacidades de adsorção de cada um dos alginatos não demonstraram diferenças significativas entre si. Assim, este trabalho mostrou que a quantidade de grupos gulurônicos x grupos manurônicos não exerce influência na capacidade de adsorção de íons cobre. Isso pode ser corroborado com um estudo realizado por Papageorgiou (2006) onde foi apresentado que quando estamos trabalhando com íons metálicos com pouca afinidade, por exemplo, o  $Cd^{2+}$ , os íons metálicos conseguem “distinguir” os diferentes tipos de sítios ligantes (blocos carboxila gulurônicos e manurônicos e hidroxilas) mostrando diferentes capacidades de adsorção. Contudo, conforme a afinidade entre o alginato e o metal cresce, como exemplos,  $Cu^{2+}$  e  $Pb^{2+}$ , os íons metálicos são facilmente adsorvidos por todos os sítios disponíveis nas esferas de alginato.

Ainda assim, a estrutura química diferente de cada alginato pôde ser percebida na interação com o íon cobre. O grande diferencial ocorreu na adição de histidina ao sistema após o equilíbrio. Se analisarmos este sistema, primeiramente ocorre a adsorção de íons cobre na matriz dos alginatos e após o equilíbrio, histidina é adicionada. Neste momento conseguimos perceber a diferença entre os dois tipos de alginato estudados. O AlgGEL com quantidade superior de grupos gulurônicos teve uma leve decaída na sua capacidade de adsorção, mas, o AlgCOL com quantidade superior de grupos manurônicos teve uma queda brusca, comprovando o que a literatura apresenta sobre grupos gulurônicos e grupos manurônicos. Alginatos com grande quantidade de blocos gulurônicos tendem a formar a “caixa de ovos” com

ligações bidentadas extremamente fortes, enquanto que, alginatos com quantidade maiores de blocos manurônicos formam ligações monodentadas e, portanto, mais fracas. Observou-se que apesar da adição de histidina ter provocado um leve decréscimo na capacidade de adsorção, o AlgGEL se apresentou mais estável se comparado aos outros adsorventes devido a ordem em que a histidina é adicionada ao sistema não interferir no equilíbrio do mesmo.

Por ter uma matriz flexível, disponibilizar grupos funcionais capazes de interagir e reagir com diversas substâncias e apresentar interação com metais pesados a modificação química da quitosana se torna atraente. Neste caso, sua funcionalização promoveu um aumento considerável na capacidade de adsorção de íons cobre. Dependendo da ordem de adição de histidina ao sistema, as esferas de QuiHIS reagiram de formas diferentes. As cinéticas mostraram que, uma vez que a ligação Cu(II)-His se estabelece, QuiHIS não é capaz de capturar o metal já ligado, o que promove a diminuição na capacidade de adsorção. Nos outros sistemas, nota-se que possivelmente ocorreu uma interação entre QuiHIS e HIS não havendo decréscimos na capacidade de adsorção.

Um fato observado através dos resultados de Isotermas foi o parâmetro  $b$  de Langmuir ter apresentado um valor mais elevado para os alginatos, mostrando assim uma menor força de interação entre quitosana e o íon cobre. A maior afinidade do cobre pelo alginato pode ser explicada, principalmente, devido ao efeito “egg-box”, presente neste polímero. Como já comentado, é causado pela alta afinidade do alginato por íons metálicos divalentes, onde as cadeias do polímero mudam a sua conformação, passando de cadeias lineares para um arranjo tridimensional, após a interação com o íon divalente, formando estruturas cada vez mais complexas e ampliando a possibilidade de mais íons metálicos interagirem com o polímero (PHILLIPS, 2000). Sabe-se que, a interação entre alginato e íons metálicos ocorre através de ligações iônicas e no caso da quitosana funcionalizada, ocorrem através dos elétrons livres presentes no grupamento amina propiciando uma ligação covalente com o metal e também pelo grupo carboxila livre da histidina. A ligação iônica tende a ser mais forte que a covalente, pois a diferença de eletronegatividade entre os átomos é maior, o que torna a substância mais estável. Já na ligação covalente os átomos apenas compartilham os elétrons, e por isso podem ser quebradas facilmente se fornecermos energia. Isso pode ser provavelmente um dos fatores que resultaram em um resultado menor do valor do parâmetro  $b$  para quitosana.

Além da troca iônica, percebeu-se que, o mecanismo de adsorção do AlgGEL envolve principalmente os grupos carboxílicos do alginato e ligações hidroxilícas. Esses grupos foram observados através das análises de FTIR e XPS. O FTIR apontou que possivelmente ocorre uma ligação bidentada via quelação metálica entre o alginato e o íon metálico. Para o AlgGEL isso pode estar relacionado com a quantidade de grupos gulurônicos presentes em sua estrutura capazes de realizar ligações bidentadas com íons metálicos. Com o FTIR e o XPS, também foi possível analisar a interação entre AlgGEL e HIS. A análise não detectou nenhuma interação, portanto, a diminuição da capacidade de adsorção ocorre provavelmente pela competição entre AlgGEL e HIS pelos íons cobre.

Os três adsorventes mostraram potencial para serem utilizados na quebra da ligação  $\beta$ A - Cu(II). Porém, o AlgGEL foi escolhido para fazer um último teste de adsorção utilizando o peptídeo. Resultados semelhantes ao dos experimentos utilizando histidina foram encontrados. Houve um leve decréscimo da capacidade de adsorção de cobre em esferas de AlgGEL após adição do  $\beta$ A. Ao realizar uma busca pela literatura, é possível encontrar somente dois artigos que utilizam o alginato para minimizar os efeitos do peptídeo  $\beta$ A. Eftekharzadeh *et al.* (2009) e Zhou *et al.* (2015) utilizaram oligômeros de alginato visando a neutralização dos efeitos oxidantes e inflamatórios da  $\beta$ A e obtiveram resultados positivos. Entretanto, não existem estudos utilizando o alginato como agente quelante objetivando a quebra da ligação  $\beta$ A-Cu(II).

A DA pode ser desencadeada por diferentes fatores, presença elevada de metais pesados, espécies reativas de oxigênio, peptídeo  $\beta$ A dentre outros. O AlgGEL neste caso apresenta potencial para contribuir tanto na atenuação da inflamação da  $\beta$ A como já mostrado pelos autores acima, como também poderá atuar na quelação dos íons metálicos, em especial o cobre, promovendo assim uma possível quebra da ligação  $\beta$ A-Cu(II) o que poderá gerar um equilíbrio na produção de radicais livres e na homeostase do cobre.

## 7 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos neste trabalho pode-se explorar e analisar a ação quelante de três adsorventes: QuiHIS, AlgGEL e AlgCOL. Os adsorventes apresentaram elevada capacidade adsorção mesmo na presença de histidina considerado um forte agente quelante de íons cobre. O AlgGEL por sua vez apresentou maior estabilidade se comparado aos outros adsorventes, diminuindo levemente sua adsorção na presença do peptídeo  $\beta$ A e da histidina. Essa diminuição ocorre provavelmente pela competição entre AlgGEL e HIS pelos íons cobre, pois não foi detectado interação entre His e AlgGEL. Além da troca iônica, percebeu-se que, o mecanismo de adsorção do AlgGEL envolve principalmente os grupos carboxílicos do alginato e ligações hidroxílicas. O AlgGEL então, se mostra um excelente candidato a ser utilizado como modelo para obter-se um melhor entendimento das interação biopolímero-cobre que ocorrem na DA, assim como, um possível agente quelante que pode interferir nas ligações entre  $\beta$ A e o íons cobre

## 8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLARD, P. A. *et al.* Rapid restoration of cognition in Alzheimer's transgenic mice with 8-hydroxy quinoline analogs is associated with decreased interstitial Abeta. **Neuron**, v. 59, n. 1, p. 43-55, 2008.

AL'HANATI, Y. Índice de demência vai triplicar até 2050, diz estudo, <http://www.institutoalzheimerbrasil.org.br/>, 2013. Acesso em: 05 de maio de 2013.

ALBARELLI, J.Q. **Produção e caracterização de quitosana imobilizada em substratos visando adsorção de íons metálicos.** 2009. 111 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

ALBUQUERQUE, L. L. **Projeto, construção e ensaio de um gerador de Raios-X de laboratório.** 1985. 102 f. (Dissertação de Mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

ALCOCK, N. W.; TRACY, V. M.; WADDINGTON, T. C. Acetates and acetatocomplexes. Part 2. Spectroscopic studies. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**, n. 21, p. 2243, 1976.

ANAN, N. A. *et al.* Preparation, characterization and pH-metric measurements of 4-hydroxysalicylidenechitosan Schiff-base complexes of Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Ru(III), Rh(III), Pd(II) and Au(III). **Carbohydrate Research**, v. 346, n. 6, p. 775–793, 2011.

ASSOCIATION, A. S. Alzheimer's Disease Facts and Figures. **Alzheimer's & Dementia**, v. 9, n. 2, p. 71, 2013.

ATWOOD, C. S. *et al.* Amyloid-beta: a chameleon walking in two worlds: a review of the trophic and toxic properties of amyloid-beta. **Brain Research Reviews**, v. 43, n. 1, p. 1-16, 2003.

AWALA, H. A.; EL JAMAL, M. M. Equilibrium and kinetics study of adsorption of some dyes onto feldspar. **Journal of the University of Chemical Technology & Metallurgy**, v. 46, 2011.

BECKER, T.; SCHLAAK, M.; STRASDEIT, H. Adsorption of nickel(II), zinc(II) and cadmium(II) by new chitosan derivatives. **Reactive and Functional Polymers**, v. 44, n. 3, p. 289-298, 2000.

BELL, C. F. **Principles and applications of metal chelation.** Oxford: Clarendon Press., 1977.

BEPPU, M. M. *et al.* Adsorption of Cu(II) on porous chitosan membranes functionalized with histidine. **Journal of Membrane Science**, v. 240, n. 1-2, p. 227-235, 2004.

BEPPU, M. M. **Estudo da calcificação “in vitro” da quitosana**. 1999. 137 f. (Tese de Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

BERNADO, P.; SVERGUN, D. I. Structural analysis of intrinsically disordered proteins by small-angle X-ray scattering. **Molecular BioSystems**, v. 8, n. 1, p. 151-167, 2012.

BERTAGNOLLI, C. **Bioadsorção de cromo na alga Sargassum filipendula e em seus derivados**. 2013. 152 f. (Tese de Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

BERTAGNOLLI, C. *et al.* Biosorption of chromium by alginate extraction products from Sargassum filipendula: Investigation of adsorption mechanisms using X-ray photoelectron spectroscopy analysis. **Bioresource Technology**, v. 164, p. 264–269, 2014.

BRACCINI, I.; PEREZ, S. Molecular basis of Cu<sup>2+</sup>-induced gelation in alginates and pectins: the egg-box model revisited. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 4, p. 1089-96, 2001.

CARLSON, R. H.; BROWN, T. L. Infrared and Proton Magnetic Resonance Spectra of Imidazole Alpha-Alanine and L-Histidine Complexes in Deuterium Oxide Solution. **Inorganic Chemistry**, v. 5, n. 2, p. 268-275, 1966.

CARRILLO-MORA, P.; LUNA, R.; COLIN-BARENQUE, L. Amyloid beta: multiple mechanisms of toxicity and only some protective effects. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, v. 2014, p. 1-15, 2014.

CHAPMAN, V.J.; CHAPMAN, D.J. **Seaweeds and Their Uses**. New York: Chapman and Hall, 1980.

CHAUHAN, V.; CHAUHAN, A. Oxidative stress in Alzheimer's disease. **Pathophysiology**, v. 13, n. 3, p. 195-208, 2006.

CHEN, J. P. *et al.* Elucidation of Interactions between Metal Ions and Ca Alginate-Based Ion-Exchange Resin by Spectroscopic Analysis and Modeling Simulation. **Langmuir**, v.18, p. 9413-942, 2002.

CHEN, J. P.; YANG, L. Study of a Heavy Metal Biosorption onto Raw and Chemically Modified Sargassum sp. via Spectroscopic and Modeling Analysis. **Langmuir**, v.22, p. 8906-8914, 2006.

CHERNY, R. A. *et al.* Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits beta-amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. **Neuron**, v. 30, n. 3, p. 665-76, Jun 2001.

CHIOU, M. S.; LI, H. Y. Adsorption behavior of reactive dye in aqueous solution on chemical cross-linked chitosan beads. **Chemosphere**, v. 50, n. 8, p. 1095-1105, 2003.

- CHU, K. H. Removal of copper from aqueous solution by chitosan in prawn shell: adsorption equilibrium and kinetics. **Journal of Hazardous Materials**, v. 90, n. 1, p. 77-95, 2002.
- CRINI, G. Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. **Progress in Polymer Science**, v. 30, n. 1, p. 38-70, 2005.
- CRIST, R. H. *et al.* Nature of Bonding between Metallic-Ions and Algal Cell-Walls. **Environmental Science & Technology**, v. 15, n. 10, p. 1212-1217, 1981.
- CURTAIN, C. C. *et al.* Alzheimer's disease amyloid-beta binds copper and zinc to generate an allosterically ordered membrane-penetrating structure containing superoxide dismutase-like subunits. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 23, p. 20466-73, 2001.
- DAVIS, T. A. *et al.* Stability of Lead(II) Complexes of Alginate Oligomers. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 5, p. 1673–1679, 2008.
- DAVIS, T. A.; VOLESKY, B.; MUCCI, A. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. **Water Research**, v. 37, n. 18, p. 4311-4330, 2003.
- DEACON, G. B.; PHILLIPS, R. J. Relationships between the carbon-oxygen stretching frequencies of carboxylato complexes and the type of carboxylate coordination. **Coordination Chemistry Reviews**, v.33, n.3, p.227–250, 1980.
- DESCHAMPS, P. *et al.* The saga of copper(II)-L-histidine. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 249, n. 9-10, p. 895-909, 2005.
- DI COCCO, M. E.; BIANCHETTI, C.; CHIPELLINI, F. <sup>1</sup>H NMR Studies of Alginate Interactions with Amino Acids. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 18, n. 4, p. 283–296, 2003.
- DONG, J. *et al.* Engineering metal ion coordination to regulate amyloid fibril assembly and toxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 104, n. 33, p. 13313-8, 2007.
- DRAGET, K. I.; SKJAK-BRAEK, G.; SMIDSROD, O. Alginate based new materials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 21, n. 1-2, p. 47-55, 1997.
- DUTTA, P. K. E. A. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 63, n. 1, p. 20-31, 2004.
- EFTEKHARZADEH, B. *et al.* Alginate protects NT2 neurons against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - induced neurotoxicity. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 1063–1072, 2009.
- EIDEN, C. A.; JEWELL, C. A.; WIGHTMAN, J. P. Interaction of lead and chromium with chitin and chitosan. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 25, n. 8, p. 1587–1599, 1980.

ERTESVÅG, H.; VALLA, S. Biosynthesis and applications of alginates. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 85-91, 1998

GAGGELLI, E. *et al.* Copper Homeostasis and Neurodegenerative Disorders (Alzheimer's, Prion, and Parkinson's Diseases and Amyotrophic Lateral Sclerosis). **Chemical Reviews**, v.106, n.6, p. 1995-2044, 2006.

FERREIRA., M. C. M., M.R.; DUARTE,M. L.; DOMARD,A.; NUNES, T.; FEIO, G. **Chitosan degree of acetylation: comparison of two spectroscopic methods (13C CP/MAS, NMR and dispersive IR)**. S. Karnicki, A. Wojtasc-Pajak, M. M. Breziski and P. J. Bylowsky. **WORLD**, C. 1994.

FILIPPOV, M. P.; KOHN, B. Determination of composition of alginates by infrared spectroscopic method. **Chemical Papers**, v. 28, n.6, p. 817–819, 1974.

FURUSAKI, E. *et al.* Facile preparation and inclusion ability of a chitosan derivative bearing carboxymethyl- $\beta$ -cyclodextrin. **Carbohydrate Polymers**, v. 29, n. 1, p. 29-34, 1996.

GAGGELLI, E. *et al.* Copper homeostasis and neurodegenerative disorders (Alzheimer's, prion, and Parkinson's diseases and amyotrophic lateral sclerosis). **Chemical Reviews**, v. 106, n. 6, p. 1995-2044, 2006.

GEORGE, M.; ABRAHAM, T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. **Journal of Controlled Release**, v. 114, n. 1, p. 1-14, 2006.

GÓMEZ-ORDÓÑEZ, E.; RUPÉREZ, P. FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds. **Food hydrocolloids**, v. 25, p. 1514–1520, 2011.

GRANT, G. T. *et al.* Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. **FEBS Letters**, v. 32, n. 1, p. 195–198, 1973.

GU, C. *et al.* Synthesis, Characterization of Copper-Loaded Carboxymethyl-Chitosan Nanoparticles with Effective Antibacterial Activity. **Macromolecular Symposia**, v. 254, n. 1, p. 160–166, 2007.

GUIBAL, E. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review. **Separation and Purification Technology**, v. 38, n. 1, p. 43–74, 2004.

GUPTA, K. C.; JABRAIL, F. H. Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, n.1, p. 43–54 2006.

HARDY, J. A.; HIGGINS, G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science**, v. 256, n. 5054, p. 184-5, 1992.

HASSAN, R. M. *et al.* Kinetics and Mechanism of Sol-Gel Transformation on Poly-Electrolytes of Some Transition-Metal Ions, Especially Cobalt Alginate Iontropic Membranes. **European Polymer Journal**, v. 25, n. 12, p. 1209-1212, 1989.

HAUG, A.; LARSEN, B.; SMIDSRØD, O. Uronic Acid Sequence in Alginate from Different Sources. **Carbohydrate Research**, v. 32, n. 2, p. 217-225, 1974.

HEUX, L. *et al.* Solid state NMR for determination of degree of acetylation of chitin and chitosan. **Biomacromolecules**, v. 1, n. 4, p. 746–51, 2000.

HO, Y. S.; MCKAY, G. The kinetics of sorption of divalent metal ions onto sphagnum moss peat. **Water Research**, v. 34, n. 3, p. 735-742, 2000.

HUANG, X. *et al.* Cu(II) potentiation of Alzheimer's  $\beta$  neurotoxicity. Correlation with cell-free hydrogen peroxide production and metal reduction. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 52, p. 37111-6, 1999.

HUREAU, C.; FALLER, P.  $\beta$ -mediated ROS production by Cu ions: structural insights, mechanisms and relevance to Alzheimer's disease. **Biochimie**, v. 91, n. 10, p. 1212-7, 2009.

IKEDA, A.; TAKEMURA, A.; ONO, H. Preparation of low-molecular weight alginic acid by acid hydrolysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, n. 4, p. 421-425, 2000.

INOUE, K.; YOSHIZUKA, K.; OHTO, K. Adsorptive separation of some metal ions by complexing agent types of chemically modified chitosan. **Analytica Chimica Acta**, v. 388, n. 1-2, p. 209-218, 1999.

JIANG, D. *et al.* Redox reactions of copper complexes formed with different  $\beta$ -amyloid peptides and their neuropathological relevance. **Biochemistry**, v. 46, n. 32, p. 9270-82, 2007.

JIAPING CHEN; FANY TENDEYONG, AND; YIACOUMI\*, S. Equilibrium and Kinetic Studies of Copper Ion Uptake by Calcium Alginate. **Environmental Science & Technology**, v.31, p.1433-1439, 1997.

KAS, H. S. Chitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems. **Journal of Microencapsulation**, v. 14, n. 6, p. 689-711, Nov-Dec 1997.

KHOTIMCHENKO, M.; KOVALEV, V.; KHOTIMCHENKO, Y. Comparative equilibrium studies of sorption of Pb(II) ions by sodium and calcium alginate. **Journal of Environmental Sciences**, v. 20, n. 7, p. 827–831, 2008.

KLEINÜBING, S.J. **Bioadsorção competitiva dos íons níquel e cobre em alginato e alga marinha Sargassum filipedula**. 2009. 149 f. (Tese de Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

KUMAR, S. P.; KIRTHIKA, K. Equilibrium and kinetic study of adsorption of nickel from aqueous solution onto bael tree leaf powder. **Journal of Engineering Science and Technology**, v. 4, n. 4, p. 351-363, 2009.

LAGERGREN, S. Zur theorie der sogenannten adsorption gelöster stoffe. Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens. **Handlingar**, v. 24, n. 4, p. 1-39, 1898.

LAWRIE, G. *et al.* Interactions between Alginate and Chitosan Biopolymers Characterized Using FTIR and XPS. **Biomacromolecules**, v.8, p.2533-2541.

LI, N.; BAI, R. Copper adsorption on chitosan–cellulose hydrogel beads: behaviors and mechanisms. **Separation and Purification Technology**, v. 42, p. 237–247, 2005.

LINDER, M. C.; HAZEGH-AZAM, M. Copper biochemistry and molecular biology. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, n. 5, p. 797S-811S, 1996.

LOW, K. S. *et al.* Sorption of cadmium and lead from aqueous solutions by spent grain. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 1-2, p. 59-64, 2000.

MAHL, C. R. A. **Atuação da quitosana como adsorvente de íons cobre na presença de b-amilóide ou histidina**. 2013. 94 f. (Dissertação de Mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

MANCINI, M.; MORESI, M.; SAPPINO, F. Rheological behavior of aqueous dispersions of algal sodium alginates. **Journal of Food Engineering**, v. 28, p. 283-295, 1996.

MARK, D. *et al.* Manufacture of chitosan microbeads using centrifugally driven flow of gel-forming solutions through a polymeric micronozzle. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 336, p. 634–641, 2009.

MARTI, E. M. *et al.* Interaction of S-histidine, an amino acid, with copper and gold surfaces, a comparison based on RAIRS analyses. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 249, n. 1–3, p. 85-89, 2004.

MCHUGH, D. J. Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds. Campbell, Australia: FAO Fish.Tech.Pap. 288: 189, p. 1987.

MCKAY, G. **Use of adsorbents for the removal of pollutants from wastewater**. Florida: CRC Press, 1996.

MCKAY, G.; BLAIR, H. S.; FINDON, A. Equilibrium Studies for the Sorption of Metal-Ions onto Chitosan. **Indian Journal of Chemistry Section a-Inorganic Bio-Inorganic Physical Theoretical & Analytical Chemistry**, v. 28, n. 5, p. 356-360, 1989.

MEHROTRA, R. C.; BOHRA, R. **Metal Carboxylates**, London: Academic Press, 1983.

MIURA, T. *et al.* Metal Binding Modes of Alzheimer's Amyloid -Peptide in Insoluble Aggregates and Soluble Complexes. **Biochemistry**, v.39, n.23, p. 7024-7031, 2000.

MOULDER, J. F.; STICKLE, W. F.; SOBOL, P. E.; BOMBEN, K. D. **Handbook of X-ray photoelectron spectroscopy: a reference book of standard spectra for identification and interpretation of XPS data**, Perkin Elmer Corporation, 1992.

NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds**, 3 ed., New York: Wiley Interscience, 1978; p. 233.

NASCENTE, P.A.P. Materials characterization by X-ray photoelectron spectroscopy. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 228, pp. 145-150, 2005.

NGAH, W. S. W. *et al.* Adsorption of dyes and heavy metal ions by chitosan composites: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 4, p. 1446–1456, 2010.

NGAH, W. S. W.; ENDUD, C. S.; MAYANAR, R. Removal of copper(II) ions from aqueous solution onto chitosan and cross-linked chitosan beads. **Reactive & Functional Polymers**, v. 50, n. 2, p. 181-190, 2002.

NGAH, W. S. W.; FATINATHAN, S. Adsorption of Cu(II) ions in aqueous solution using chitosan beads, chitosan–GLA beads and chitosan–alginate beads. **Chemical Engineering Journal**, v. 143, p. 62–72, 2008.

NGAH, W. S. W.; ISA, I. M. Comparison study of copper ion adsorption on chitosan, Dowex A-1, and Zerolit 225. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 67, n. 6, p. 1067-1070, Feb 7 1998.

NGAH, W. S. W.; KAMARI, A.; KOAY, Y. J. Equilibrium and kinetics studies of adsorption of copper (II) on chitosan and chitosan/PVA beads. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 34, p. 155–161, 2004.

OGAWA, K.; OKA, K.; YUI, T. X-Ray Study of Chitosan Transition-Metal Complexes. **Chemistry of Materials**, v. 5, n. 5, p. 726-728, 1993.

OLIVEIRA, R. C. *et al.* Characterization of metal–biomass interactions in the lanthanum(III) biosorption on Sargassum sp. using SEM/EDX, FTIR, and XPS: Preliminary studies. **Chemical Engineering Journal**, v. 239, p. 381–391, 2014.

ONSØYEN, E. **Alginates. Thickening and gelling agents for food**. IMENSON, E. London: Blackie Academic & Professional. 2 ed.: p. 230-260. 1997.

OPAZO, C. *et al.* Copper reduction by copper binding proteins and its relation to neurodegenerative diseases. **Biometals**, v. 16, n. 1, p. 91-8, 2003.

OPAZO, C. *et al.* Metalloenzyme-like activity of Alzheimer's disease beta-amyloid. Cu-dependent catalytic conversion of dopamine, cholesterol, and biological reducing agents to neurotoxic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 43, p. 40302-8, 2002.

- PAPAGEORGIU, S. K. *et al.* Heavy metal sorption by calcium alginate beads from *Laminaria digitata*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 137, n. 3, p. 1765-1772, 2006.
- PAPAGEORGIU, S. K. *et al.* Metal–carboxylate interactions in metal–alginate complexes studied with FTIR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 345, n. 4, p. 469–473, 2010.
- PAPAGEORGIU, S. K.; KOUVELOU, E. P.; KATSAROS, F. K. Calcium alginate beads from *Laminaria digitata* for the removal of Cu<sup>+2</sup> and Cd<sup>+2</sup> from dilute aqueous metal solutions. **Desalination**, v. 224, n. 1, p. 293–306, 2008.
- PAWLAK, A.; MUCHA, M. Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends. **Thermochimica Acta**, v. 396, p. 153–166, 2003.
- PICKUP, M. E. *et al.* Serum Histidine in Rheumatoid-Arthritis - Changes Induced by Anti-Rheumatic Drug-Therapy. **Journal of Rheumatology**, v. 7, n. 1, p. 71-76, 1980.
- PIRON, E.; DOMARD, A. Interaction between chitosan and uranyl ions: Part 1. Role of physicochemical parameters. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 21, n. 4, p. 327–335, 1997.
- POPURI, S. R. *et al.* Adsorptive removal of copper and nickel ions from water using chitosan coated PVC beads. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 194–199, 2009.
- PROX, J.; RITTGER, A.; SAFTIG, P. Physiological functions of the amyloid precursor protein secretases ADAM10, BACE1, and presenilin. **Experimental Brain Research**, v. 217, n. 3-4, p. 331-41, 2012.
- RAFFA, D. F.; RICKARD, G. A.; RAUK, A. Ab initio modelling of the structure and redox behaviour of copper(I) bound to a His-His model peptide: relevance to the beta-amyloid peptide of Alzheimer's disease. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 12, n. 2, p. 147-64, 2007.
- RAJ ADHIKARI, C. *et al.* Pre-concentration and separation of heavy metal ions by chemically modified waste paper gel. **Chemosphere**, v.72, p.182–188, 2008.
- RAVI KUMAR, M. N. V. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.
- RAYMOND, L.; MORIN, F. G.; MARCHESSAULT, R. H. Degree of deacetylation of chitosan using conductometric titration and solid-state NMR. **Carbohydrate Research**, v.246, n.1, p.331-336, 1993.
- RHAZI, M. *et al.* Contribution to the study of the complexation of copper by chitosan and oligomers. **Polymer**, v. 43, n. 4, p. 1267-1276, 2002.

RIBEIRO, M. B. **Cromatografia em membranas com íons Cu(II) e Ni(II) imobilizados: Efeito dos agentes quelantes IDA, TREN, CM-ASP.** 2006. 174 f. (Tese de Doutorado). Universidade Estadual de Campinas

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, v. 31, n. 7, p. 603–632, 2006.

RITTHIDEJ, G. C.; PHAECHAMUD, T.; KOIZUMI, T. Moist heat treatment on physicochemical change of chitosan salt films. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 232, n. 1, p. 11–22, 2002.

RIVERA-MANCIA, S. *et al.* The transition metals copper and iron in neurodegenerative diseases. *Chemico-Biological Interactions*, v. 186, n. 2, p. 184-99, 2010.

SAKUGAWA, K. *et al.* Simplified method for estimation of composition of alginates by FTIR. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 93, n. 3, p. 1372–1377, 5 2004.

SARTORI, C. *et al.* Determination of the cation content of alginate thin films by FTIR spectroscopy. *Polymer*, v. 38, n. 1, p. 43–51, 1997.

SCHLICK, S. Binding-Sites of Cu-2+ in Chitin and Chitosan - an Electron-Spin-Resonance Study. *Macromolecules*, v. 19, n. 1, p. 192-195, 1986.

SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W. **Química Inorgânica.** Bookman, 2008. 848 p.

SKJÅK-BRAEK, G.; ANTHONSEN, T.; SANDFORD, P. A. **Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties, and applications.** London; New York: Elsevier Applied Science, 1989. xxii, 835 p. ISBN 1851663959.

SMIDSRØD, O. Molecular basis for some physical properties of alginates in the gel state. *Faraday Discussions of the Chemical Society*, v. 57, n. 0, p. 263–274, 1974.

SMIDSRØD, O.; HAUG, A.; LARSEN, B. The influence of pH on the rate of hydrolysis of acidic polysaccharides. *Acta Chemica Scandinavica*, v. 20, n. 4, p. 1026–34, 1966.

SMITH, D. P. *et al.* Concentration dependent Cu<sup>2+</sup> induced aggregation and dityrosine formation of the Alzheimer's disease amyloid-beta peptide. *Biochemistry*, v. 46, n. 10, p. 2881-91, 2007.

STEEN, K. H.; STEEN, A. E.; REEH, P. W. A Dominant Role of Acid Ph in Inflammatory Excitation and Sensitization of Nociceptors in Rat Skin, in-Vitro. *Journal of Neuroscience*, v. 15, n. 5, p. 3982-3989, 1995.

STRELTSOV, V. A. *et al.* The structure of the amyloid-beta peptide high-affinity copper II binding site in Alzheimer disease. *Biophysical Journal*, v. 95, n. 7, p. 3447-56, 2008.

T. SANO; I. MURASE (SUMITOMA CHEMICAL COMPANY). **Cellulosic ion exchange fibers and method for preparing same**, 1979.

TACKETT, J. E. FT-IR Characterization of metal acetates in aqueous solution. **Applied Spectroscopy**, v. 43, n. 3, p. 483-489, 1989.

TAM, S. K. *et al.* Physicochemical model of alginate–poly-L-lysine microcapsules defined at the micrometric/nanometric scale using ATR-FTIR, XPS, and ToF-SIMS. **Biomaterials**, v. 26, p. 6950–6961, 2005.

TISCHER, E.; CORDELL, B. Beta-amyloid precursor protein. Location of transmembrane domain and specificity of gamma-secretase cleavage. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 36, p. 21914-9, 1996.

TREWHELLA, J. Insights into biomolecular function from small-angle scattering. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 7, n. 5, p. 702-708, 1997.

TREYBAL, R. E. **Mass transfer operations**. 3 ed. Ed. Auckland: McGraw-Hill, 1981.

TRUNG, T. S. *et al.* Functional characteristics of shrimp chitosan and its membranes as affected by the degree of deacetylation. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 4, p. 659–663, 2006.

VAN HOOGMOED, C. G.; BUSSCHER, H. J.; DE VOS, P. Fourier transform infrared spectroscopy studies of alginate-PLL capsules with varying compositions. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 67A, n. 1, p. 172–178, 2003.

VASSAR, R. *et al.* Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. **Science**, v. 286, n. 5440, p. 735-41, 1999.

VAZ, J.M. **Preparação e caracterização de biofilmes ativos à base de alginato de diferentes estruturas poliméricas reticulados com cálcio**. 2012. 154 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

VETRIVEL, K. S.; THINAKARAN, G. Amyloidogenic processing of beta-amyloid precursor protein in intracellular compartments. **Neurology**, v. 66, n. 2, p. S69-73, 2006.

VIEIRA, S.V. **Adsorção competitiva dos íons cobre e mercúrio em membranas de quitosana natural e reticulada**. 2008. 162 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

VOLESKY, B.; HOLAN, Z. R. Biosorption of Heavy-Metals. **Biotechnology Progress**, v. 11, n. 3, p. 235-250, 1995.

WAN NGAH, W.; ENDUD, C.; MAYANAR, R. Removal of copper(II) ions from aqueous solution onto chitosan and cross-linked chitosan beads. **Reactive and Functional Polymers**, v. 50, n. 2, p. 181–190, 2002.

WATTS, J.F.; WOLSTENHOLME, J. **The Electron Spectrum: Qualitative and Quantitative Interpretation**. In: An Introduction to Surface Analysis by XPS and AES. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2005. p. 59–77.

WENLING, C. *et al.* Effects of the degree of deacetylation on the physicochemical properties and Schwann cell affinity of chitosan films. **Journal of biomaterials applications**, v. 20, n. 2, p. 157–77, 2005.

XIAO, C. B. *et al.* Blend films from sodium alginate and gelatin solutions. **Journal of Macromolecular Science-Pure and Applied Chemistry**, v. 38, n. 3, p. 317-328, 2001.

YUGAY, D. *et al.* Copper Ion Binding Site in  $\beta$ -Amyloid Peptide. **Nano Letters**, v.16, n.10, p. 6282–6289, 2016

ZATTA, P. *et al.* Alzheimer's disease, metal ions and metal homeostatic therapy. **Trends in Pharmacological Sciences** v. 30, n. 7, p. 346-55, Jul 2009.

ZHENG, H.; FRIDKIN, M.; YODIM, M. B. Site-activated chelators derived from anti-Parkinson drug rasagiline as a potential safer and more effective approach to the treatment of Alzheimer's disease. **Neurochemical Research**, v. 35, n. 12, p. 2117-23, 2010.

ZHOU, R. *et al.* Alginate-Derived Oligosaccharide Inhibits Neuroinflammation and Promotes Microglial Phagocytosis of  $\beta$ -Amyloid. **Marine Drugs**, v. 13, n. 9, p. 5828–5846, 2015.

## 9 APÊNDICE A

Espectros de FTIR referentes a interação entre QuiHIS, AlgGEL e AlgCOL com histidina, assim como, os outros sistemas que não apresentaram alterações após adição de histidina ao sistema. Também é apresentado o espectro de FTIR do pó dos alginatos de sódio AlgGEL e AlgCOL.

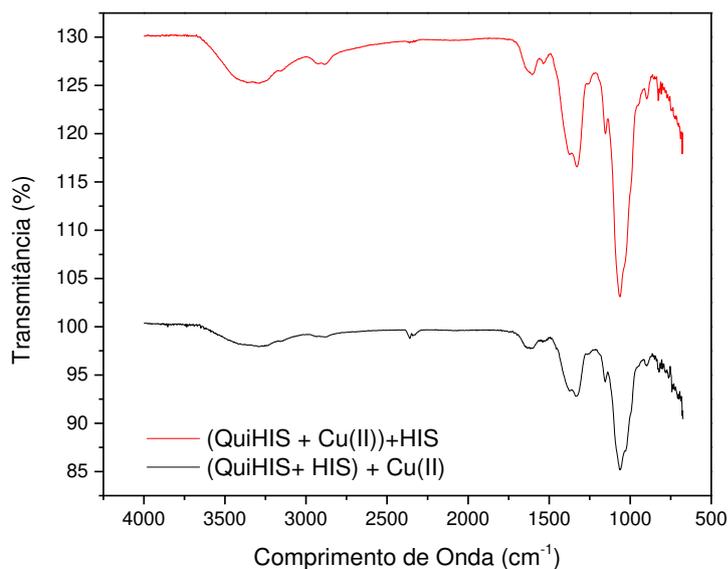


Figura A1 – Espectros de FTIR das esferas de (QuiHIS+Cu(II))+HIS e (QuiHIS+HIS)+Cu(II).

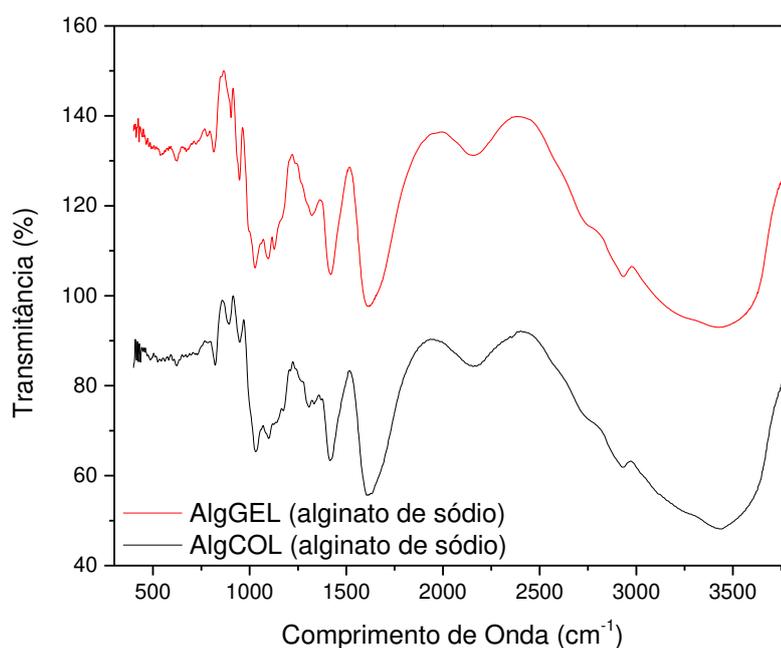


Figura A2 – Espectros de FTIR dos reagentes em pó AlgGEL e AlgCOL.

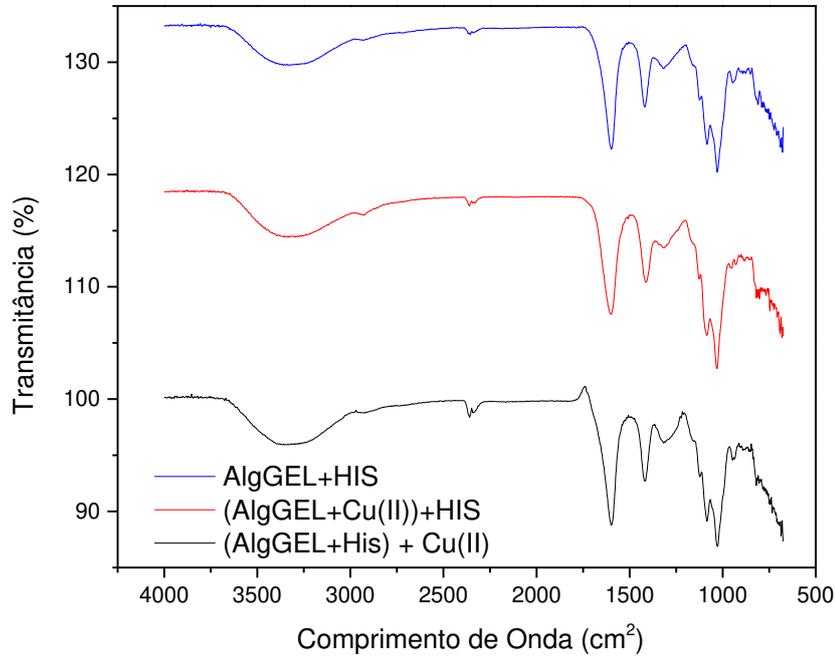


Figura A3 – Espectros de FTIR das esferas de AlgGEL+HIS, (AlgGEL+Cu(II))+HIS e (AlgGEL+HIS)+Cu(II).

## 10 APÊNDICE B

Aplicação dos modelos de Isoterma, Langmuir e Freundlich aos dados experimentais de equilíbrio e aplicação dos modelos de Pseudo-primeira ordem e Pseudo segunda-ordem aos dados cinéticos.

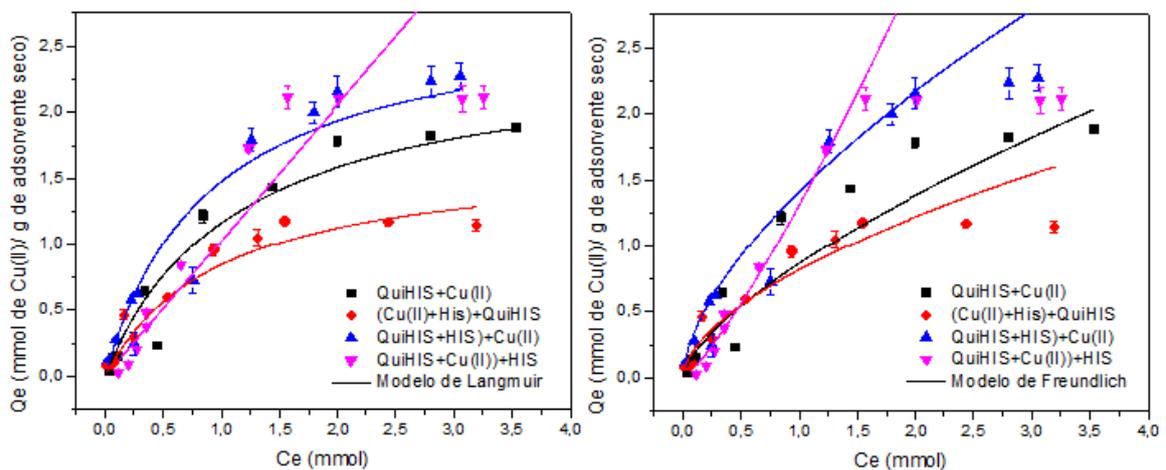


Figura B1 - Modelos de Langmuir e Freundlich, ajustados às isotermas dos sistemas, QuiHIS+ Cu(II), (Cu(II) + His) + QuiHIS, (QuiHIS+Cu(II)) + His e (QuiHIS+HIS) + Cu(II).

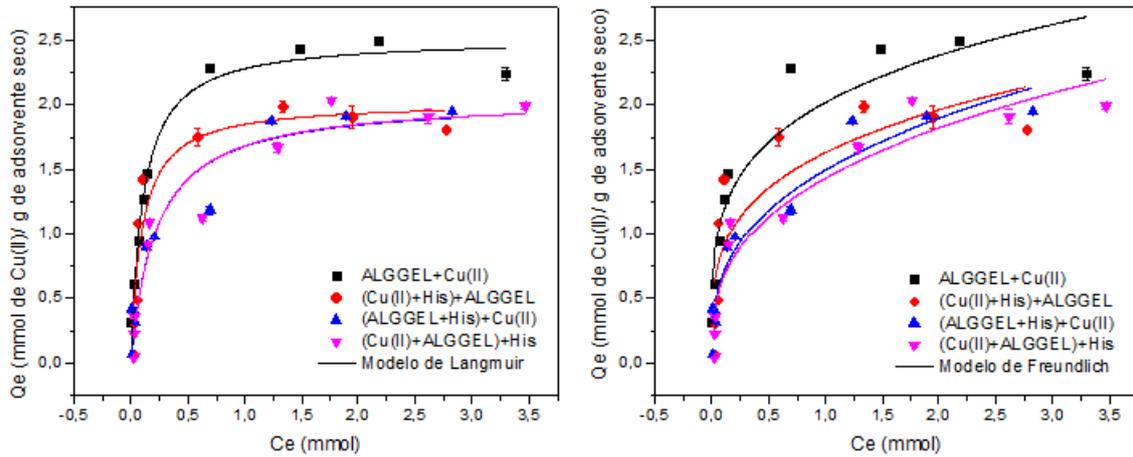


Figura B2 - Modelos de Langmuir e Freundlich, ajustados às isotermas dos sistemas, AlgGEL+ Cu(II), (Cu(II) + His) + AlgGEL, (AlgGEL+Cu(II)) + His e (AlgGEL+HIS) + Cu(II).

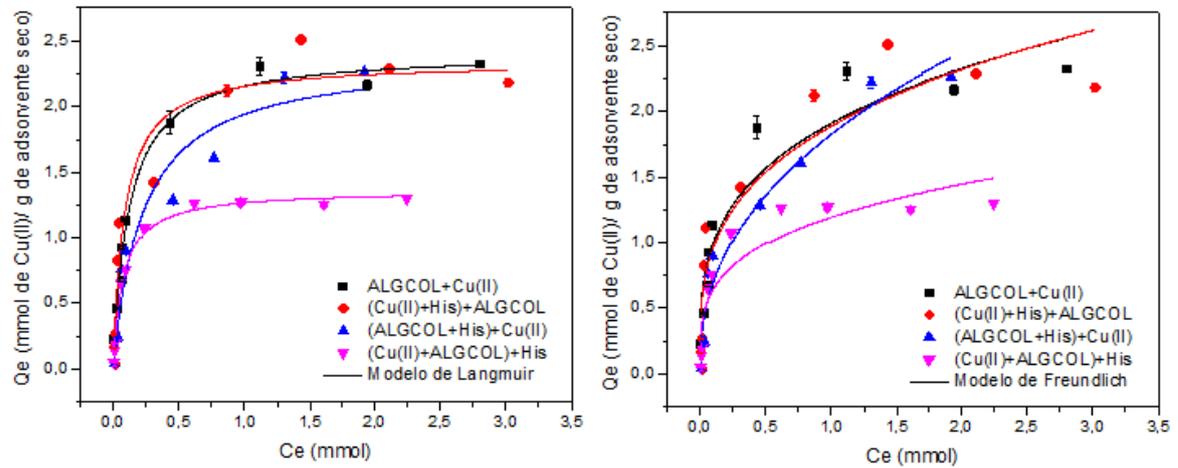


Figura B3 – Modelos de Langmuir e Freundlich, ajustados às isotermas dos sistemas, AlgCOL+ Cu(II), (Cu(II) + His) + AlgCOL, (AlgCOL+Cu(II)) + His e (AlgCOL+HIS) + Cu(II).

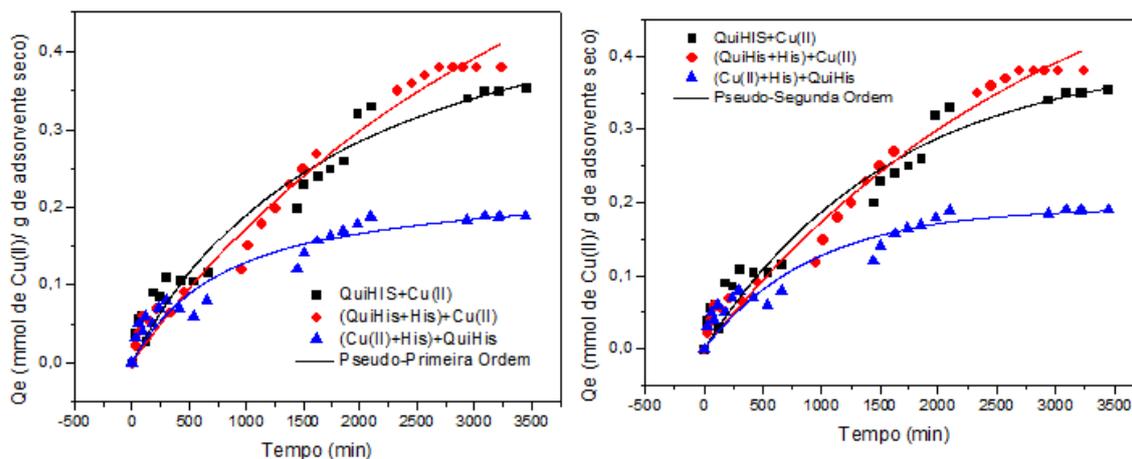


Figura B4 – Modelos cinéticos de Pseudo-primeira ordem e Pseudo-segunda ordem ajustados aos sistemas, QuiHIS+ Cu(II), (Cu(II) + His) + QuiHIS, e (QuiHIS+HIS) + Cu(II).

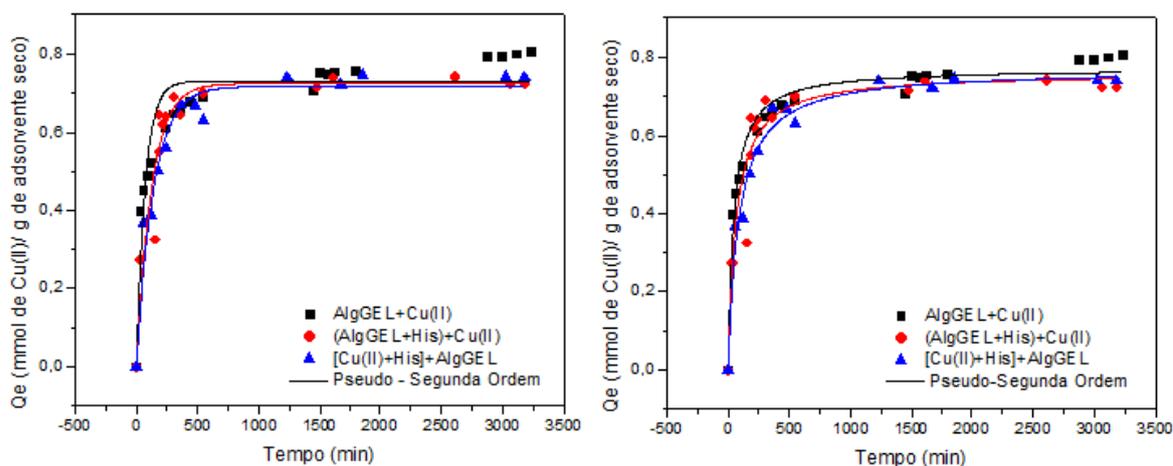


Figura B5– Modelos cinéticos de Pseudo-primeira ordem e Pseudo-segunda ordem ajustados aos sistemas, AlgGEL+ Cu(II), (Cu(II) + His) + AlgGEL, e (AlgGEL+HIS) + Cu(II).

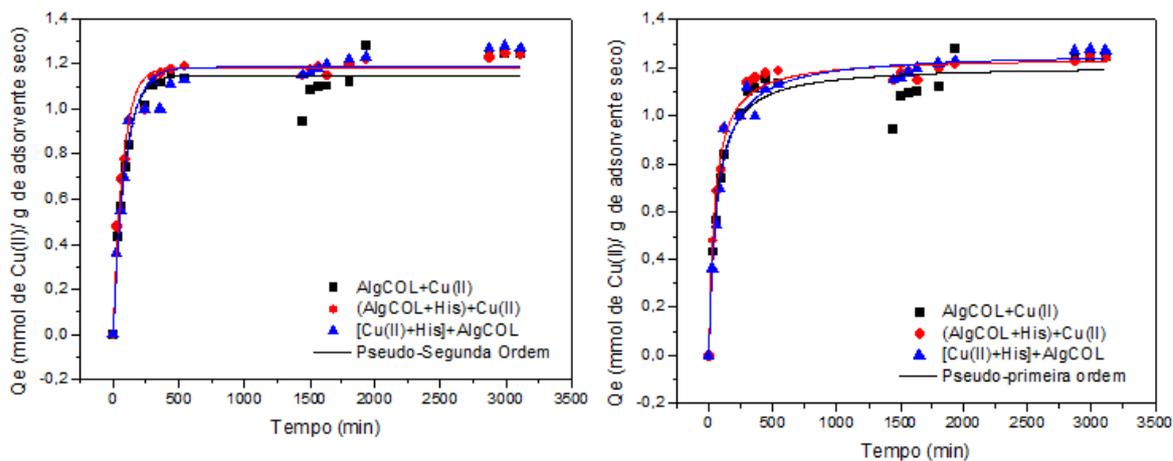


Figura B6– Modelos cinéticos de Pseudo-primeira ordem e Pseudo-segunda ordem ajustados aos sistemas, AlgCOL+ Cu(II), (Cu(II) + His) + AlgCOL, e (AlgCOL+HIS) + Cu(II).

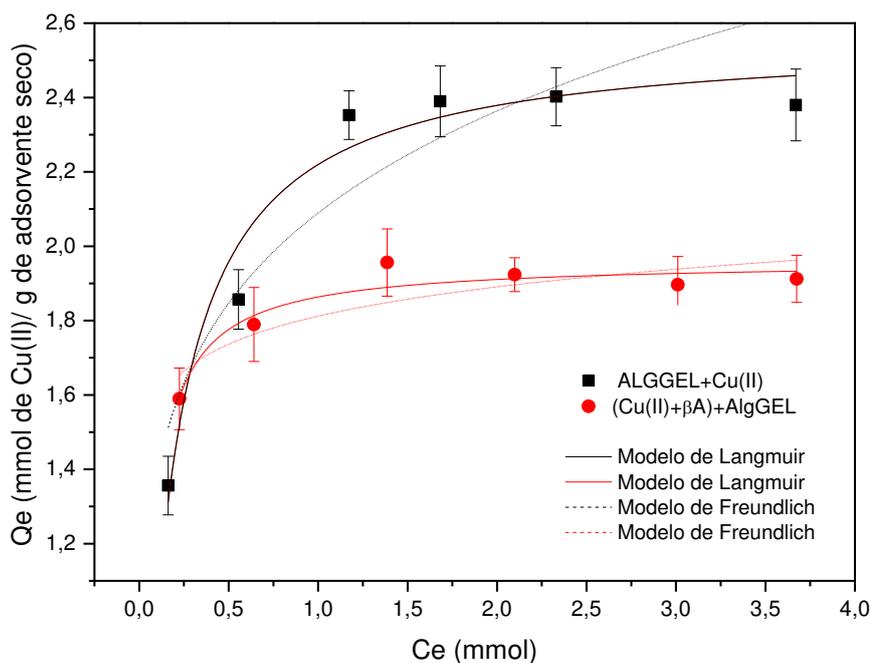


Figura B7 – Modelos de Langmuir e Freundlich, ajustados às isotermas dos sistemas, AlgGEL+ Cu(II) e (Cu(II)+βA)+AlgGEL.