



CYNTHIA REGINA ALBRECHT MAHL

**ATUAÇÃO DA QUITOSANA COMO ADSORVENTE DE ÍONS
COBRE EM PRESENÇA DO PEPTÍDEO β -AMILÓIDE OU
HISTIDINA**

CAMPINAS

2013



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENGENHARIA DE PROCESSOS**

CYNTHIA REGINA ALBRECHT MAHL

**ATUAÇÃO DA QUITOSANA COMO ADSORVENTE DE ÍONS
COBRE EM PRESENÇA DO PEPTÍDEO β -AMILÓIDE OU
HISTIDINA**

Orientador: Profa. Dra. Marisa Masumi Beppu

Dissertação de Mestrado apresentada a Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO FINAL DA 1
DEFENDIDA PELA ALUNA CYNTHIA REGINA ALBRECHT
ORIENTADA PELA PROFA. Dra. MARISA MASUMI BEPPU

**Campinas – São Paulo
Maio/2013**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Elizangela Aparecida dos Santos Souza - CRB 8/8098

M278a Mahl, Cynthia Regina Albrecht, 1987-
Atuação da quitosana como adsorvente de ions cobre em presença do peptídeo β -amilóide ou histidina / Cynthia Regina Albrecht Mahl. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

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

1. Quitosana. 2. Cobre. 3. Amilóide. 4. Adsorção. 5. Alzheimer. I. Beppu, Marisa Masumi, 1975-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Effects of chitosan as copper ion adsorbent in presence of amyloid- β peptide or equivalent

Palavras-chave em inglês:

Chitosan

Copper

Amyloid

Adsorption

Alzheimer

Área de concentração: Engenharia de Processos

Titulação: Mestra em Engenharia Química

Banca examinadora:

Marisa Masumi Beppu [Orientador]

Eduardo José de Arruda

Wanda Pereira Almeida

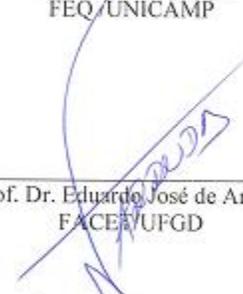
Data de defesa: 29-05-2013

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Cynthia Regina Albrecht Mahl e aprovada em 29 de Maio de 2013 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Profª. Dra. – Marisa Masumi Beppu – Orientadora
FEQ/UNICAMP



Prof. Dr. Eduardo José de Arruda
FACE/UFMG



Profª. Dra. Wanda Pereira Almeida
IQ/UNICAMP

*Para minha família, em especial
Edith, Celio, Vilton e
José Miguel (in
memoriam).*

AGRADECIMENTOS

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

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

Ao meu namorado Felipe Gonzalez Correa, pelo amor, carinho e paciência que sempre teve comigo, mas principalmente pelo companheirismo que me ajudou e que me ajuda a fazer meus dias mais felizes.

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. Se hoje estou aqui, e se hoje pretendo seguir carreira acadêmica você é uma das minhas maiores motivações.

As duas grandes amigas que fiz em Campinas e que levarei para o resto da vida, Kaciane Andreola e Letícia Toledo, obrigada por tudo, por sempre me incentivarem, por sempre estarem ao meu lado, por fazerem meus dias mais felizes e por me mostrarem o significado da palavra lealdade.

À minha grande amiga Juliane Cordeiro Siqueira, pelos mais de 10 anos de amizade, mesmo longe você sempre esteve comigo, me acompanhando em todos os momentos da minha vida, quero você sempre do meu lado minha irmã preta.

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

Ao também colega de LEQUIP Rodrigo Balloni, pela paciência e pelos ensinamentos sobre adsorção durante o início do mestrado, obrigada sem a sua ajuda eu não saberia nem por onde começar.

Aos amigos e agora compadres, Mariana Camargo e Caio Rainieri pelo companheirismo e pelos momentos alegres que me proporcionaram.

À minha prima Noeli Albrecht e sua família, que me receberam de braços abertos em sua casa, obrigada por fazer a minha vinda pra Campinas mais tranquila e amigável.

À Profa. Dr. Wanda P. Almeida e as alunas Paula e Gabriella 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 Laboratório de Saneamento (LABSAN) da Faculdade de Engenharia Civil da Unicamp, pelas análises de absorção atômica. À equipe do Equipe do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) pela realização das análises de SAXS e EXAFS e ao LRAC (FEQ/Unicamp) pelas análises de MEV- EDX, DRX e FTIR.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPQ e FAPESP.

*Não sei... Se a vida é curta
Ou longa demais pra nós,
Mas sei que nada do que vivemos
Tem sentido, se não tocamos o coração das pessoas.*

Muitas vezes basta ser:

*Colo que acolhe,
Braço que envolve,
Palavra que conforta,
Silêncio que respeita,
Alegria que contagia,
Lágrima que corre,
Olhar que acaricia,
Desejo que sacia,
Amor que promove.*

E isso não é coisa de outro mundo,

É o que dá sentido à vida.

É o que faz com que ela

Não seja nem curta,

Nem longa demais,

Mas que seja intensa,

Verdadeira, pura...

Enquanto durar

(Cora Coralina)

RESUMO

A doença de Alzheimer está relacionada à ligação anômala que ocorre entre o peptídeo β -amilóide (β A) e o íon cobre. Segundo a literatura, utilizando-se espectroscopia Raman, observou-se forte evidência de que o cobre se liga ao núcleo da β A através de anéis imidazólicos de histidina. Agentes quelantes, em princípio, podem ser usados farmacologicamente no tratamento da intoxicação com metais pesados. Neste trabalho, verificou-se a ação quelante da quitosana atuando na remoção de íons cobre, na presença de β -amilóide ou de um composto equivalente que contenha histidinas (conhecidos como os responsáveis pela ligação com o íon cobre). Devido a limitações no uso da β A, decidiu-se por usar histidina, para um melhor entendimento da interação que ocorre no sistema. Inicialmente, esferas porosas de quitosana foram preparadas para utilização na adsorção de íons cobre, com e sem a presença de histidina. Estudos de equilíbrio, envolvendo isothermas e cinéticas de adsorção foram realizados, e a partir desses constatou-se, que a histidina compete com a quitosana pelos íons cobre, levando a uma diminuição na capacidade de adsorção. Em contrapartida, observa-se uma diminuição não tão brusca da capacidade de adsorção, mostrando que mesmo com a competição ocorrendo a quitosana continua adsorvendo cobre. Com a aplicação dos modelos isotérmicos, foi possível prever que a adsorção ocorre em monocamadas e também em sítios heterogêneos e que não existe somente um grupamento responsável pela quelação dos íons cobre. Em relação aos modelos cinéticos foi proposto que a etapa limitante no processo é adsorção química. Empregando Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-ATR), observou-se que a histidina atua principalmente nos grupos amino e hidroxil da quitosana, afetando os átomos de nitrogênio e oxigênio do mesmo. Foram também realizadas análises de espalhamento de Raios-X a baixo ângulo (SAXS) revelando que a adição de histidina ou β A no sistema proporciona provavelmente um desenovelamento da quitosana. Através de análises de Estrutura Fina Estendida de Absorção de Raios-X (EXAFS) verificou-se que após adição de histidina ocorre uma mudança qualitativa relacionada a primeira esfera de coordenação referente a ligação de Cu-O, o que pode indicar novas ligações, agora com os átomos de nitrogênio. Para finalizar, uma isoterma de adsorção empregando-se o peptídeo β A foi obtida, os resultados foram semelhantes aos obtidos com a histidina, mantendo-se uma de adsorção de cobre por parte da quitosana.

ABSTRACT

Alzheimer's disease is related to the anomalous binding that occurs between the protein β -amyloid (β A) and copper metal ion. By using Raman spectroscopy, literature has shown strong evidence that copper and zinc bind to A β peptide core through the imidazole ring of histidine. Chelating agents, in principle, can be used pharmacologically in the treatment of heavy metal poisoning. In this study, we verified the chelating action of chitosan acting in the removal of copper ions in the presence of amyloid- β or an equivalent compound structural that presents histidine (known as the responsible for binding with copper ion). Due to limitations in using β A, it was decided to use just histidine, aiming a better understanding of the interaction that occurs in the system. Initially, porous chitosan beads were prepared for the use in the adsorption of copper ions, with and without the presence of histidine. Equilibrium studies involving adsorption isotherms and kinetics were carried out, and from them it was observed that histidine competes with chitosan for the copper ions, leading to a decrease in the adsorption capacity. On the other hand, there is no sharp decrease of the adsorption capacity showing that even with a competition taking place, chitosan remains adsorbing copper. By applying the isothermal models, it was possible to predict that an adsorption monolayer occurs and that there is not only one group responsible for chelation of copper ions. With regard to kinetic models it was proposed that the limiting step in the adsorption process is the chemical adsorption. By using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR-ATR) it was observed that histidine acts mainly in the amino and hydroxyl groups of chitosan, affecting the nitrogen and oxygen atoms of the same. Analyses were performed for Small Angle X-Ray Scattering (SAXS) revealing that the addition of histidine or β A in the system provides probably one unfolding of chitosan. Through the analyses of Extended X-Ray absorption fine structure (EXAFS), it was found that after addition of histidine a qualitative change occurs in the first coordination sphere attributed to Cu-O binding, which may indicate new bindings, now with nitrogen atoms. Finally, the adsorption isotherm employing β A protein was similar to those obtained with histidine, which shows that chitosan kept the ability to adsorb copper.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	ix
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
NOMENCLATURA.....	xxv
LISTA DE FIGURAS	xxix
LISTA DE TABELAS	xxxv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Proteína β A	5
2.2 Estresse oxidativo e produção de espécies reativas de oxigênio	7
2.3 β A e sua relação com o cobre	9
2.4 Adsorção	12
2.5 Bioadsorção de metais pesados.....	13
2.6 Quitosana	15
2.7 Atuação da quitosana na quelação de íons metálicos	18
2.8 Estudo do equilíbrio na adsorção.....	21
2.8.1.....	22
2.8.2.....	23
2.9 Cinética de adsorção	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Reagentes e matérias-primas	25
3.2 Preparação dos bioadsorventes	25
3.2.1 Preparação da solução de quitosana	25

3.2.2	Preparação das esferas porosas de quitosana.....	26
3.3	Ensaio de adsorção	27
3.3.1	Especiação Metálica	27
3.3.2	Influência da agitação na capacidade de adsorção	27
3.3.3	Ensaio de adsorção de íons cobre em esferas de quitosana	27
3.3.4	Ensaio de adsorção de íons cobre na presença de histidina	28
3.3.5	Cinética de adsorção.....	29
3.3.6	Isotermas de adsorção.....	29
3.3.7	Isoterma de adsorção utilizando o peptídeo β A	30
3.4	Métodos de Caracterização	31
3.4.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	31
3.4.2	Diâmetro médio das esferas de quitosana.....	32
3.4.3	Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDX).....	32
3.4.4	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR - ATR)	32
3.4.5	Difração de Raios-X (DRX).....	33
3.4.6	Estrutura Fina Estendida de Absorção de Raios-X (EXAFS)	33
3.4.7	Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo - SAXS	35
4	Resultados e Discussões.....	39
4.1	Resultados dos ensaios de adsorção de íons cobre	39
4.1.1	Especiação metálica.....	39
4.1.2	Influência da agitação na capacidade de adsorção	41
4.1.3	Cinética de adsorção de íons cobre com e sem a presença de histidina	42
4.1.4	Isotermas de adsorção de íons cobre com e sem a presença de histidina.....	49
4.1.5	Isoterma de adsorção utilizando o peptídeo β A	55

4.2	Caracterização das esferas porosas de quitosana antes e após adsorção de íons cobre e na presença de histidina	57
4.2.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e diâmetro médio das esferas.	57
4.2.2	Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDX).....	61
4.2.3	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-ATR) 63	
4.2.4	Difração de Raios – X (DRX)	65
4.2.5	Estrutura Fina Estendida de Absorção de Raios-X (EXAFS)	67
4.2.6	Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo (SAXS)	70
5	DISCUSSÃO GERAL	75
6	CONCLUSÃO	79
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	81
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

NOMENCLATURA

C_0	Concentração inicial do íon metálico	mmol L^{-1}
C_e	Concentração do íon em solução não adsorvido em equilíbrio	mmol L^{-1}
Q_e	Quantidade de íon metálico adsorvido por unidade de massa de adsorvente no equilíbrio	mmol g^{-1}
$Q_{máx}$	quantidade máxima adsorvida de íon por unidade de massa do adsorvente	mmol g^{-1}
k_1	constante da taxa de adsorção pseudo-primeira ordem	h^{-1}
k_2	constante da taxa de adsorção pseudo-segunda ordem	g (mmol min)^{-1}
k_f	Constante de Freundlich	L g^{-1}
k_i	Constante de taxa de adsorção difusão intrapartícula	$\text{mmol (gmol min}^{1/2})^{-1}$
BHE	Barreira hemato - encefálica	-
PPA	Proteína precursora amiloide	-
Rg	Raio de giro	nm^{-1}
β_a	Peptídeo β - amiloide	-
V	Volume da solução de íons cobre	L
b	Constante de Langmuir	L mmol^{-1}
m	Massa de esferas de quitosana em base seca	g
n	Constante de Freundlich	-
Qui	Quitosana	
His	Histidina	
Qui + Cu(II)	Adsorção de cobre através das esferas de quitosana	
(Qui + Cu(II)) + His	Adsorção de cobre através das esferas de quitosana e adição de histidina após o equilíbrio	

- (Cu(II) + His) + Qui Adição de histidina à solução de cobre e após equilíbrio, adição das esferas de quitosana
- (Qui + His) + Cu(II) Adição das esferas de quitosana à solução de histidina e posterior adição de cobre.
- (Cu(II) + β A) + Qui Adição de β -amilóide à solução de cobre e após equilíbrio, adição das esferas de quitosana

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Estrutura da PPA. A caixa destacada em vermelho mostra a região em que se encontra o peptídeo β A (CHECLER; VINCENT, 2002).	5
Figura 2.2 - Processo proteolítico da proteína precursora amilóide (PPA) via secretases, geração do peptídeo β A (WILQUET; STROOPER, 2004).....	6
Figura 2.3 - Sequência dos peptídeos β A (1-42) (DONNELLY <i>et al.</i> , 2007).....	7
Figura 2.4 - Mecanismo da produção de espécies reativas (ROS) pelo complexo Cu(II)- β A. Reações (1),(3) e (5): redução de íons metálicos por vários substratos, reação (6): Reação Fenton e reação (1a): descreve a redução $2e^-/2H^+$ de O_2 (HUREAU ; FALLER, 2009). ...	10
Figura 2.5 - Possíveis modelos de coordenação Cu(II) – β A (STRELTSOV <i>et al.</i> , 2008)..	11
Figura 2.6 - Preparação da quitosana por hidrólise em meio básico a partir da quitina (NO; MEYERS, 1997).....	15
Figura 2.7 - Estrutura linear da quitosana (KUMAR, 2000).	16
Figura 2.8 - Mecanismo de quelação de espécies metálicas em quitosana natural representativo do modelo “ <i>bridge model</i> ” (KAMINSKI ; MODRZEJEWSKA, 1997).	19
Figura 2.9 - Estruturas propostas para o complexo cobre-quitosana , adaptado de Rhazi <i>et al.</i> (2002).	20
Figura 3.1 - Esquema do processo de obtenção de esferas de quitosana.....	26
Figura 4.1 - Diagrama de especiação metálica do sulfato de cobre, Cu(II) = 20 mg/L.	40
Figura 4.2 - Diagrama de especiação metálica do Nitrato de Cobre, Cu(II) = 20 mg/L.	40
Figura 4.3 - Estudo do efeito da agitação na cinética de adsorção de íons de cobre em esferas de quitosana utilizando uma solução de 20 mg/L.	41
Figura 4.4 - Cinética de adsorção para os sistemas Qui + Cu(II), (Cu(II) + His) + Qui e (Qui + His) + Cu(II) com concentração inicial de 20 mg/L.	42
Figura 4.5 - Cinética de adsorção Cinética de adsorção para os sistemas Qui + Cu(II), (Cu(II) + His) + Qui e (Qui + His) + Cu(II) com concentração inicial de 250 mg/L.....	43
Figura 4.6 - Cinética de dessorção para o sistema (Qui + Cu(II)) + His, para a concentração inicial de 20 mg/L e 250 mg/L.	45
Figura 4.7 - Ajuste linear dos sistemas Qui + Cu(II), (Cu(II) + His) + Qui e (Qui + His) + Cu(II) para o modelo cinético de pseudo-primeira ordem.	45

Figura 4.8 - Ajuste linear dos sistemas Qui + Cu(II), (Cu(II) + His) + Qui e (Qui + His) + Cu(II) para o modelo cinético de pseudo-segunda ordem.....	46
Figura 4.9 - Ajuste linear dos sistemas Qui + Cu(II), (Cu(II) + His) + Qui e (Qui + His) + Cu(II) para o modelo cinético de Difusão Intrapartícula.....	48
Figura 4.10 - Isotermas de adsorção referente aos sistemas: Qui + Cu(II), (Cu(II) + His) + Qui, (Qui+Cu(II)) + His e (Qui+His) + Cu(II).....	50
Figura 4.11 - Modelos de Langmuir e Freundlich, ajustados às isotermas dos sistemas, Qui + Cu(II), (Cu(II) + His) + Qui, (Qui+Cu(II)) + His e (Qui+His) + Cu(II).....	51
Figura 4.12 - Isoterma de adsorção do sistema (Cu(II) + β A) + Qui.	56
Figura 4.13 - Aspecto macroscópico das esferas porosas de quitosana.	57
Figura 4.14 - Microscopia eletrônica de varredura das esferas liofilizadas de quitosana. ...	58
Figura 4.15 - Esferas porosas de quitosana após adsorção de cobre e adição de histidina: (A) Qui + Cu(II), (B) (Qui + Cu(II)) + His, , (C) (Cu(II) + His) + Qui e (D) (Qui + His) + Cu(II).	59
Figura 4.16 - Microscopia eletrônica de varredura das esferas porosas de quitosana para os seguintes sistemas: (A) Qui + Cu(II), (B) (Qui + Cu(II)) + His, (C) (Cu(II) + His) + Qui e (D) (Qui + His) + Cu(II).....	60
Figura 4.17 - EDX das esferas porosas de quitosana para os seguintes sistemas: (A) Qui + Cu(II), (B) (Qui + Cu(II)) + His, (C) (Cu(II) + His) + Qui e (D) (Qui + His) + Cu(II).	61
Figura 4.18 - Espectros de EDX obtidos para as esferas de quitosana nos diferentes sistemas estudados: (A) Qui + Cu(II), (B) (Qui + Cu(II)) + His, (C) (Cu(II) + His) + Qui e (D) (Qui + His) + Cu(II).....	62
Figura 4.19 - Espectros de FTIR de esferas de Qui, esferas de Qui + His e esferas de quitosana após adsorção de cobre Qui + Cu(II).	64
Figura 4.20 - Espectros de FTIR para os sistemas: (Qui + Cu(II)) + His, (Cu(II) + His) + Qui e (Qui + His) + Cu(II).....	65
Figura 4.21 - Difractogramas de Raios-X para amostras de Qui, Qui + His , (Qui + Cu(II) + His), (Cu(II) + His) + Qui, Qui + Cu(II) e (Qui + His) + Cu(II).....	66
Figura 4.22 - Espectros de EXAFS.	68
Figura 4.23 - Espectros de EXAFS para os sistemas, Qui + Cu(II) e (Cu(II) + His) + Qui.	69

Figura 4.24 - Espalhamento da função de $I(Q)$ em função do espalhamento do vetor Q , para os sistemas Qui, Qui + Cu(II), (Cu(II) + β A) + Qui e (Cu(II) + His) + Qui.	71
Figura 4.25 - Variação do gráfico de Kratky para uma proteína. (linha vermelha) Gráfico de Kratky para proteína globular compacta, (linha cinza) em estado intermediário ou de crescente desenovelamento e (linha preta) completamente desenovelada (RAMBO, 2011).	72
Figura 4.26 - Gráfico de Kratky. Comparação dos perfis de Kratky para Qui e Qui + Cu(II).	73
Figura 4.27 - Gráfico de Kratky. Comparação dos perfis de Kratky para (Cu(II) + β A) + Qui	74
Figura 4.28 - Gráfico de Kratky. Comparação dos perfis de Kratky para (Cu(II) + His) + Qui.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Propriedades químicas e biológicas da quitosana	17
Tabela 2.2 - Tipos de Isoterma de acordo com o valor de RL	23
Tabela 4.1 - Ajustes dos parâmetros ao modelo de pseudo-primeira ordem.....	46
Tabela 4.2 - Ajustes dos parâmetros ao modelo de pseudo-segunda ordem (20 mg/L).....	47
Tabela 4.3 - Ajustes dos parâmetros ao modelo de Difusão Intrapartícula (20 mg/L).....	49
Tabela 4.4 - Parâmetros obtidos pelo ajuste dos dados de equilíbrio pelo modelo de Langmuir.	52
Tabela 4.5 - Parâmetros obtidos pelo ajuste dos dados de equilíbrio pelo modelo de Freundlich.....	52
Tabela 4.6 - Valores do parâmetro RL , para os sistemas Qui + Cu(II), (Cu(II) + His) + Qui, (Qui + Cu(II)) + His, (Qui + His) + Cu(II).....	55
Tabela 4.7 – Diâmetro médio e desvio - padrão das esferas de quitosana após adsorção de íons cobre e adição de histidina.....	58
Tabela 4.8 - Porcentagem mássica e em mol do elemento cobre na superfície das esferas de quitosana, segundo medidas de EDX.	63
Tabela 4.9 - Raio de Giro calculado a partir dos dados de SAXS.....	71

1 INTRODUÇÃO

Com base nas estatísticas populacionais, estima-se que a ocorrência da doença de Alzheimer (DA) no mundo abrange cerca de 35,6 milhões de pacientes. No Brasil, essa estimativa chega a 1,2 milhões. Em razão do envelhecimento populacional, esses números poderão aumentar significativamente, sendo que no ano de 2030 a estimativa é de 65,7 milhões e em 2050 de 115,4 milhões de portadores no mundo.

A DA é uma doença degenerativa progressiva do cérebro e caracteriza-se pela perturbação de múltiplas funções cognitivas, incluindo memória, atenção e aprendizado, pensamento, orientação, compreensão, cálculo, linguagem e julgamento. O comprometimento das funções cognitivas é comumente acompanhado, e ocasionalmente precedido, por deterioração do controle emocional, comportamento social ou motivação. A demência produz um declínio apreciável no funcionamento intelectual e interfere com as atividades do cotidiano, como higiene pessoal, vestimenta, alimentação, atividades fisiológicas e de toalete. A sobrevida média após o diagnóstico de demência é de 3,3 anos.

A DA, na sua forma mais comum, aparece em geral por volta de 60-70 anos e nem sempre é diagnosticada. Uma forma mais rara da doença, que também é conhecida como forma familiar ou precoce, ocorre antes dos 65 anos e está ligado a um fator hereditário (genético) muito acentuado. Estima-se que, após os 65 anos, entre 1 a 6% da população sofre de Alzheimer.

Com o envelhecimento, temos também o aparecimento de uma redução na capacidade funcional do organismo, o sistema nervoso central é altamente prejudicado com este processo, sofrendo várias alterações fisiológicas, há uma diminuição na produção, liberação e metabolismo dos neurotransmissores. Além disso, ocorrem reduções nas concentrações de enzimas envolvidas nas transduções de sinais. Entre as enzimas que têm sua concentração reduzida com o envelhecimento, estão aquelas responsáveis por seqüestrar os radicais livres e regular a homeostase do cobre.

Radicais livres são espécies químicas instáveis, pelo fato de seus átomos possuírem elétrons desemparelhados. O excesso de radicais livres leva ao chamado estresse oxidativo,

que gera um processo inflamatório no cérebro. Estudos feitos recentemente constataram que este processo inflamatório, causado pelos radicais livres, pode estar associado à iniciação de doenças degenerativas, como Alzheimer e Parkinson.

O cérebro humano é responsável por produzir uma quantidade de radicais livres por dia. Com o envelhecimento, esta quantidade pode ser potencializada por um desequilíbrio na concentração de íons metálicos, neste período, as concentrações extracelulares de metais de transição aumentam consideravelmente. A associação de íons metálicos à proteínas também causa toxicidade, pois leva a formação de agregados insolúveis que podem causar danos a proteína e até mesmo a sua desnaturação (GAGGELLI *et al.*, 2006; PINTO, 2010).

Além da contribuição para a formação de radicais livres, os íons metálicos têm sido associados aos depósitos protéicos característicos de todas as doenças degenerativas, potencializando a formação das placas amilóides (que contribuem ainda mais para o aumento do estresse oxidativo). Na DA, a geração de espécies reativas de oxigênio tem sido apontada como consequência da coordenação do peptídeo β – amilóide (β A) a íons cobre (SESHADRI *et al.*, 2002).

Estudos de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) revelam que o cobre liga-se de maneira anômala à placa β A da DA (HOU; ZAGORSKI, 2006). Metais com atividade redox como cobre, ferro, zinco e manganês são considerados possíveis agentes patogênicos envolvidos não só na DA, mas em várias outras patologias neurais.

Dong *et al.* (2003), através do uso de espectroscopia Raman, observaram que há uma forte evidência de que o cobre e o zinco se ligam ao núcleo dos peptídeos β A através de anéis imidazólicos de histidina.

Atualmente, agentes quelantes como EDTA e clioquinol, são usados farmacologicamente no tratamento de toxicidade com metais pesados. Os quelantes são moléculas que se ligam fortemente numa estrutura em anel aos metais. Um bom quelante clínico deve ter baixa toxicidade, ligar-se preferencialmente aos metais pesados com uma grande estabilidade e ter uma taxa de excreção mais elevada do que os ligantes endógenos, assim favorecendo a rápida eliminação do metal tóxico.

Biopolímeros que possuem ação quelante, como alginato, quitosana e celulose, podem ser de excelente valia para o tratamento de DA, pois são biocompatíveis não causando problemas de rejeição, sendo incorporados naturalmente aos tecidos corporais.

A quitosana provém da desacetilação da quitina, que é considerado o segundo polímero mais abundante na natureza. Além disso, é biodegradável, hidrofílica, atóxica, biocompatível e altamente versátil, o que nos permite mudar facilmente suas propriedades físicas e químicas e possui uma excelente capacidade de remoção de íons metálicos.

Segundo Vieira (2008), a quitosana possui uma grande capacidade de remover metais pesados em diferentes concentrações e pode ser mudada química e/ou fisicamente, provocando um aumento na capacidade de adsorção. Também é capaz de ser condicionada em várias formas tais como membranas, esferas e filmes e ainda apresenta um baixo custo.

O desenvolvimento de opções terapêuticas mais eficazes e seguras é um dos objetivos mais avidamente perseguidos no cenário científico internacional. Drogas capazes de modificar a evolução natural da doença, ao lado da antecipação do diagnóstico, representarão o futuro do tratamento da DA e outras demências.

O objetivo do presente trabalho foi estudar a ação quelante da quitosana, atuando na remoção dos íons cobre, na presença de β -amilóide ou de um composto equivalente que contenha histidina (conhecidos como os responsáveis pela ligação com o íon cobre). Porém devido à limitações em se trabalhar com o peptídeo β A, decidiu-se por usar somente histidina, o que proporcionou um melhor entendimento da interação que ocorre no sistema.

- Preparação das esferas de quitosana utilizadas para adsorção de íons cobre.
- Caracterização das esferas de quitosana.
- Estudo da interação quitosana-cobre em presença de histidina, através da determinação das isotermas e das cinéticas de adsorção.
- Caracterização do complexo quitosana-cobre e quitosana-cobre-histidina, utilizando-se análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de Raios-X (DRX), espectroscopia de infravermelho por transformada de fourier (FTIR-ATR), espectroscopia de energia dispersiva de Raios-X (EDX), estrutura fina estendida de absorção de Raios-X

(EXAFS) e espalhamento de Raios-X a baixo ângulo (SAXS) para obtenção de mais informações em relação a interação que ocorre do complexo quitosana-cobre em presença de histidina.

- Determinação de isoterma empregando o peptídeo β A visando comparação entre os dados obtidos com a histidina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Proteína β A

O peptídeo β A é derivado da clivagem proteolítica de uma proteína grande, denominado proteína precursora amilóide (PPA) (COHEN *et al.*, 2006). A PPA constitui uma família de diferentes isoformas, que são nomeadas de acordo com o comprimento de seus aminoácidos. A estrutura da PPA está esquematizada na Figura 2.1. Pode-se observar que a região destacada em vermelho, é a região que se encontra a β A (CHECLER; VINCENT, 2002).

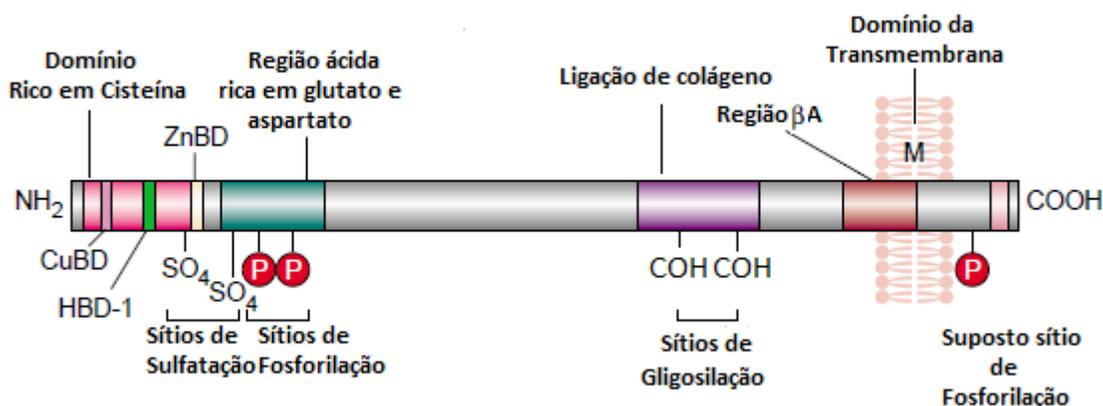


Figura 2.1 - Estrutura da PPA. A caixa destacada em vermelho mostra a região em que se encontra o peptídeo β A (CHECLER; VINCENT, 2002).

Esta clivagem ocorre intracelularmente, por dois caminhos, um deles via amiloidogênica e o outro via não-amiloidogênica. O processo via não-amiloidogênica, ocorre devido a clivagem do peptídeo β A, através da α -secretase, levando a formação de uma secreção chamada PPA α e ao fragmento chamado α - terminal carboxi (α -TC). Em seguida a membrana α -TC é clivada pela γ -secretase, liberando o peptídeo p3 e o domínio intracelular PPA (DIPPA). O processo via amiloidogênica ocorre pela clivagem da PPA através da β -secretase e também da γ -secretase. Esta clivagem ocorre de uma forma anômala, e está propensa a produção de agregados insolúveis. Quando a membrana PPA é clivada via β -secretase produz um fragmento chamado de PPA β , e um outro fragmento

chamado β - terminal carboxi (β -TC). Após isto, ocorre uma outra clivagem via γ -secretase, no fragmento β -TC, levando a formação do peptídeo β A e também do DIPPA (WILQUET; STROOPER, 2004). Para melhor visualizar o processo, a Figura 2.2 ilustra como ocorre o mesmo.

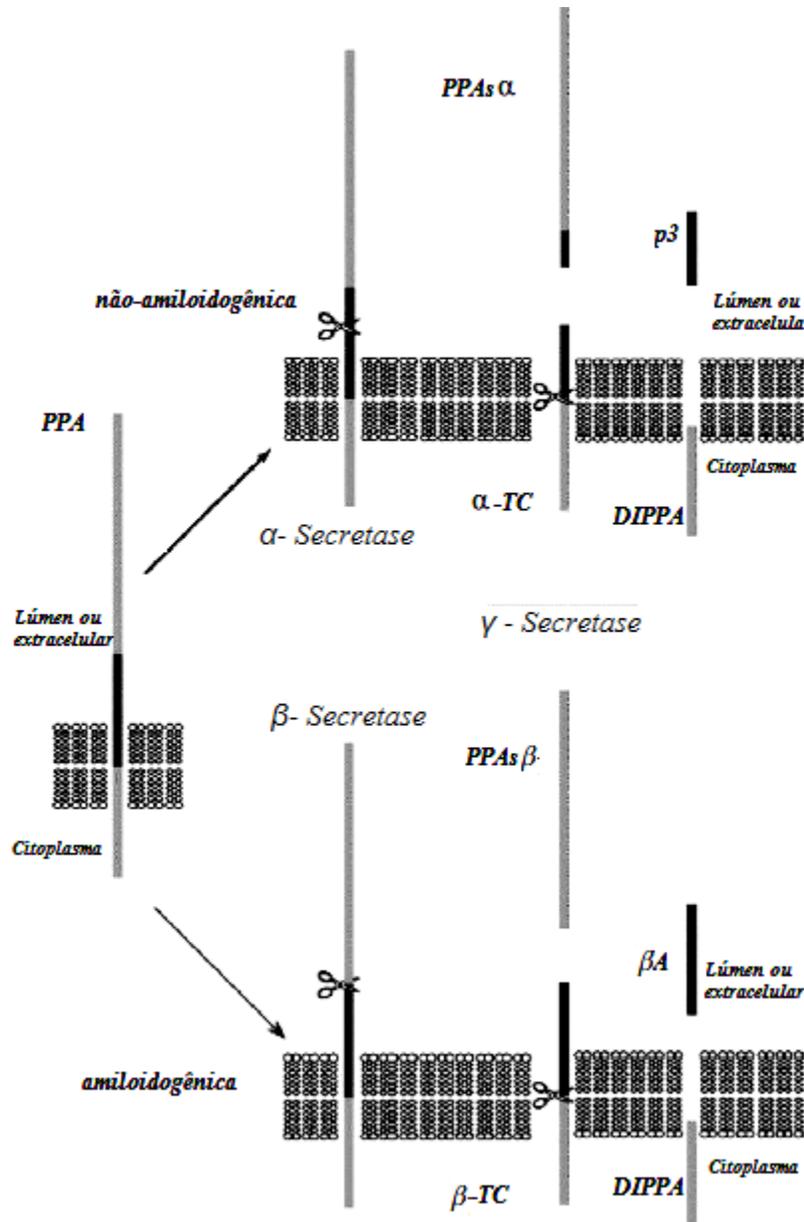


Figura 2.2 - Processo proteolítico da proteína precursora amilóide (PPA) via secretases, geração do peptídeo β A (WILQUET; STROOPER, 2004).

As proteínas amilóide estão presentes em todas as formas de degeneração, normalmente na forma solúvel, mas tendem a se converter em agregados insolúveis que, se depositam sobre as células causando sua morte. Estes agregados estão presentes não só no cérebro, mas também no esqueleto, tecido muscular, coração e fígado (GAGGELLI *et al.*, 2006).

A natureza exata da toxicidade destas placas é incerta, é possível constatar através da literatura, que as proteínas amilóides estão presentes de forma solúvel, quando não há a ocorrência da DA, no entanto a auto agregação destas placas, o que provoca o Alzheimer ainda não está estabelecido. Para cada tipo de doença degenerativa existe um peptídeo específico envolvido na constituição da PPA. A principal alteração fisiológica encontrada no cérebro de pacientes com DA é a presença de placas β A.

Várias formas do peptídeo β A têm sido estudadas, sendo que a mais solúvel e também popular forma *in vitro* estudada é o peptídeo β A (1-40). Outra forma que aparece na literatura é o peptídeo β A(1-42), que tem uma menor solubilidade (DONNELLY *et al.*, 2007). Fibrilas são formadas quando as proteínas se enovelam de forma incorreta, formando agregados insolúveis. Estudos cinéticos, relacionados a formação das fibrilas β A, mostram que o β A(1-42) forma fibrilas significativamente mais rápido que a forma β A(1-40) levando a afirmação de que, “ β A(1-42) é mais amiloidogênica do que a β A(1-40)” (JARRETT *et al.*, 1993). A Figura 2.3 mostra a estrutura primária do peptídeo da β A-42.

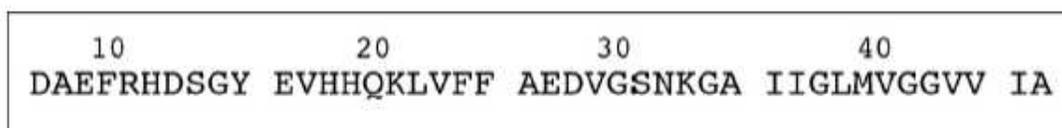


Figura 2.3 - Sequência dos peptídeos β A (1-42) (DONNELLY *et al.*, 2007).

2.2 Estresse oxidativo e produção de espécies reativas de oxigênio

Vários tipos de danos oxidativos têm sido notados em pacientes com DA, incluindo glicação, oxidação de proteínas, peroxidação de lípidios e oxidação de ácidos nucleicos. Estresse oxidativo provém do excesso de radicais livres e também pode ser a principal causa da perda de células neuronais no cérebro. A produção excessiva de radicais livres

leva a formação de espécies reativas de oxigênio como H_2O_2 , O_2^- e OH , que provocam lesões no tecido cerebral (SMITH *et al.*, 1996; CASTELLANI *et al.*, 2004).

No interior das placas amilóides existem agregados de peptídeos βA . Estes agregados têm sido descritos como ‘dissipadores de metal’, devido ao seu alto conteúdo de metais: Cu, 0,44 mmol/L; Zn, 1 mmol/L; Fe, 1mmol/L. Cada um destes metais é capaz de induzir a agregação do peptídeo βA *in vitro*, o qual tem uma grande afinidade pelo íon metálico Cu (II) (CURTAIN *et al.*, 2001; CHERNY *et al.*, 1999).

O cobre (Cu) é um elemento essencial para algumas enzimas que atuam no metabolismo do cérebro. Ex.: CuZn superóxido dismutase (SOD1), ceruloplasmina, citocromo e oxidase, tirosinase e dopamina, β -hidroxilase. Mecanismos sofisticados fazem um balanço da entrada e saída de cobre do organismo para assegurar a homeostase, ou seja, para que o ambiente interno do corpo humano se mantenha estável. Alterações na homeostase do cobre também ajudam de alguma forma, seja direta ou indiretamente para a formação de doenças degenerativas incluindo a DA, pois contribuem com o crescimento do estresse oxidativo, aumentando a toxicidade neuronal (DONNELLY *et al.*, 2007).

Segundo Smith *et al.* (2007), cobre foi encontrado em altas concentrações nas placas amilóides (~ 400 μM) comparado com o cérebro normal que possui uma concentração de 0,2 – 1,7 μM . Também existem muitas evidências de que a ligação do cobre com a βA , produz espécies reativas de oxigênio (HUREAU; FALLER, 2009).

Esta elevada concentração de metais, encontrada nas doenças degenerativas, gera um desequilíbrio na homeostase do cobre. Este desequilíbrio potencializa a produção de radicais livres. No nosso organismo, os radicais livres são produzidos pelas células, durante o processo de combustão por oxigênio, utilizado para converter os nutrientes dos alimentos absorvidos em energia. Porém, existem as chamadas substâncias antioxidantes que são compostas por vitaminas, minerais, pigmentos naturais e outros compostos vegetais e ainda enzimas, que bloqueiam o efeito danoso dos radicais livres. A síntese de antioxidantes no organismo diminui conforme envelhecemos, com isso há um aumento na geração de radicais livres que são altamente reativos. Elétrons que constituem os radicais livres,

tendem a se associar de maneira rápida a outras moléculas de carga positiva com as quais podem reagir ou oxidar. Este processo intensifica o estresse oxidativo.

2.3 β A e sua relação com o cobre

A importância do cobre na Doença de Alzheimer, é ainda mais enfatizada pela interação neurotóxica entre a β A e o cobre. O peptídeo β A se liga ao cobre com uma alta afinidade e reduz de Cu^{2+} para Cu^+ através do recrutamento de redutores biológicos como colesterol, ácido ascórbico ou dopamina. O resultado é a geração catalítica de espécies reativas de oxigênio e também a agregação da β A (OPAZO *et al.*, 2002; HUREAU; FALLER, 2009).

O mecanismo exato da produção de espécies reativas pela ligação entre o cobre e a β A ainda é incerto. A Figura 2.4 mostra um dos mecanismos já estudados na literatura. No ciclo catalítico principal (a), a produção de OH^\cdot resulta de um mecanismo de seis passos envolvendo três reduções de íons Cu(II) (passos 1, 3 e 5), e de reduções sucessivas de O_2 em $\text{O}_2^{\cdot-}$ (passo 2), de $\text{O}_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 (passo 4) e por último de H_2O_2 em OH^\cdot (passo 6) pela redução do complexo $\text{Cu(I)-}\beta\text{A}$. A reação (1b) pula do passo 2 para o passo 4 diretamente, realizando a redução $2\text{e}^-/2\text{H}^+$ de O_2 em H_2O_2 . Esta situação é mais favorável do que a rota 2 para 4, mas requer a presença de dois íons metálicos reduzidos nas proximidades (HUREAU; FALLER, 2009).

A idéia geral é que a ligação de íons metálicos com a β A, ocorre de maneira anômala e predominantemente na DA, sob condições não saudáveis (LOVELL, *et al.* 1998; SMITH, *et al.* 1997). Segundo Gabuzda (1994), a acumulação de íons metálicos e o estresse oxidativo que ocorre no cérebro de pacientes com DA, está associado com a diminuição da solubilidade e deposição da β A.

Apesar de serem grandes as evidências que ligam o Cu^{2+} a DA, a coordenação e os resíduos envolvidos na ligação do cobre com a β A, ainda não estão completamente estabelecidos (CURTAIN *et al.*, 2001).

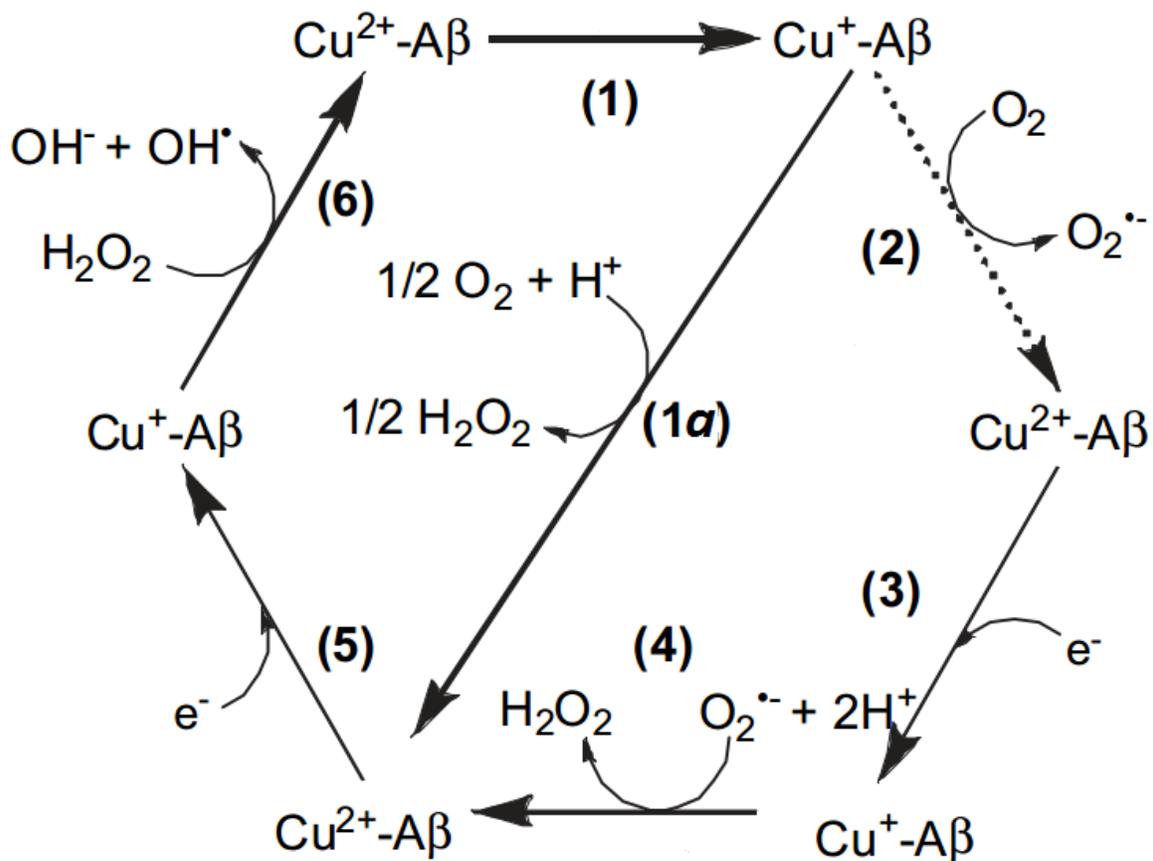


Figura 2.4 - Mecanismo da produção de espécies reativas (ROS) pelo complexo Cu(II)-βA. Reações (1),(3) e (5): redução de íons metálicos por vários substratos, reação (6): Reação Fenton e reação (1a): descreve a redução $2e^-/2H^+$ de O₂ (HUREAU ; FALLER, 2009).

Estudos recentes indicam que resíduos de histidina estão envolvidos na coordenação do Cu²⁺. Estes resíduos são: His-6, His-13 e His-14 presentes na composição da βA. Através de análises de RMN ¹H, pode-se observar que His-13 é fundamental na ligação com o íon cobre, e que His-6 e His-14 também estão implicados nesta ligação (SYME *et al.*, 2004).

Streltsov *et al.* (2008), reportaram que o sítio de ligação preferido do cobre na βA é um “*distorted six-coordinated*” (arranjo piramidal quadrado dissimétrico) com tres 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. Os dois possíveis modelos são apresentados na Figura 2.5.

Desde que o peptídeo β A é encontrado em pacientes com doenças degenerativas, são realizados estudos para se descobrir uma maneira de solubilizá-la (HUREAU; FALLER, 2009). A solubilização da β A no tecido cerebral de pacientes com DA aumentou na presença 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 quelador moderado de $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$, resultando em um decréscimo na deposição de β A (CHERNY *et al.*, 2001).

O tratamento das placas amilóides com o agente quelante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) reverteu a agregação β A-Cu (II), provocando um “afrouxamento” na estrutura da β A. Estes resultados indicam que o “afrouxamento” da estrutura, seguido do tratamento com agentes quelantes, pode ser um possível modo para solubilização dos depósitos de amilóide (BEAUCHEMIN ; KISILEVSKY, 1998).

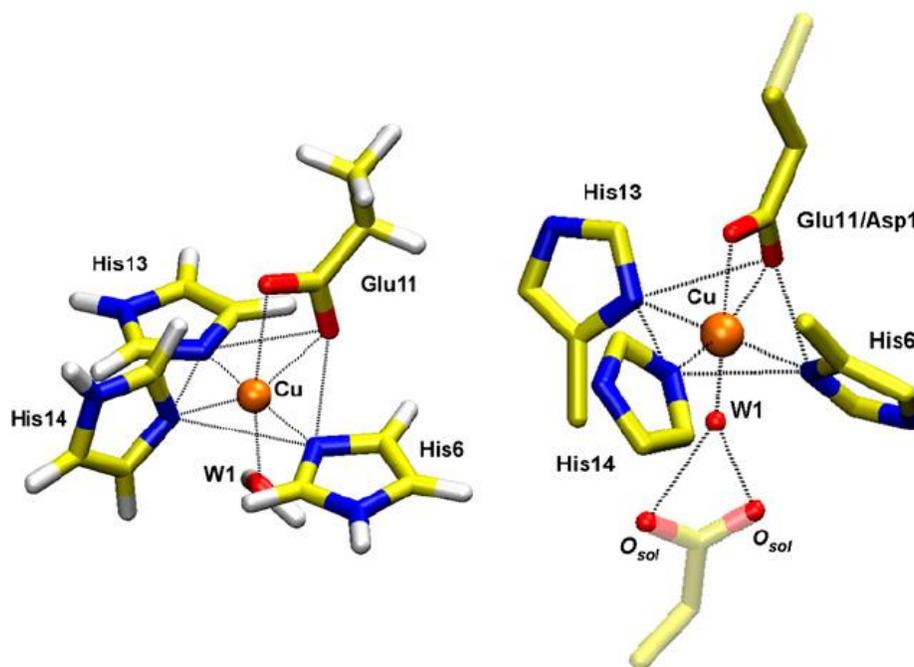


Figura 2.5 - Possíveis modelos de coordenação Cu(II) – β A (STRELTSOV *et al.*, 2008)

2.4 Adsorção

A adsorção pode ser usada quando se deseja remover de uma mistura de líquidos ou gases, um ou mais componentes através do contato direto com um sólido denominado de adsorvente. Ocorre pelo contato entre duas fases, uma fluída e a outra sólida, tendo como fenômeno físico a transferência de massa.

Determinados adsorventes possuem a capacidade de fazer com que substâncias particulares de uma solução se ligue à sua superfície. Portanto, é necessário explorar esta capacidade, para que a separação dos componentes presentes na solução, seja ela gasosa ou líquida, ocorra (TREYBAL, 1981).

Existem dois tipos de adsorção: a adsorção física e a adsorção química. A adsorção física, ou adsorção de “van der Waals”, fenômeno facilmente reversível, é um resultado das forças moleculares de atração entre as moléculas do adsorvente e da substância adsorvida. Quimiossorção, ou adsorção química, é um resultado da interação química entre o adsorvente e a substância adsorvida. A força das ligações moleculares, na adsorção química pode variar consideravelmente, e geralmente sua intensidade é maior do que a observada na adsorção física (TREYBAL, 1981).

Muitos adsorventes têm sido desenvolvidos para uma ampla variedade de separações. Normalmente, os adsorventes são em forma de esferas, pérolas ou pequenos grânulos. A estrutura de uma partícula adsorvente possui vários poros, cujo volume chega a ser metade do volume total da partícula. A adsorção pode ocorrer somente na superfície dos poros, ou também, formando várias camadas até chegar ao interior da partícula adsorvente (GEANKOPLIS, 1993).

São limitadas as operações que removem quantidades baixas de íons metálicos em soluções aquosas, uma das alternativas usadas nestas condições é a bioadsorção (CHU, 2002).

Vários métodos têm sido utilizados para remoção de metais pesados de soluções aquosas (precipitação química, troca iônica, tratamento eletroquímico, tecnologia de

membranas, adsorção em carvão ativado, etc. A bioadsorção é capaz de complexar metais dissolvidos em solução através da atividade química da biomassa microbiana. Desta forma, se apresenta como uma nova tecnologia para remoção e recuperação de íons metálicos (VOLESKY; HOLAN, 1995).

2.5 Bioadsorção de metais pesados

Considerado um processo rápido e reversível para remoção de íons metálicos de águas residuais, a maior vantagem da bioadsorção em comparação com os métodos convencionais de tratamento incluem, baixo custo, alta eficiência, minimização do lodo químico e biológico, regeneração de bioadsorventes e a possibilidade de recuperação de metais (KRATCHOVIL; VOLESKY, 1998).

O processo de bioadsorção envolve uma fase sólida chamada de bioadsorvente e uma fase líquida contendo as espécies que serão adsorvidas chamada de adsorvato. As espécies do adsorvato são removidas através de diferentes mecanismos, isso ocorre devido a alta afinidade do bioadsorvente com as espécies do adsorvato. O processo de remoção continua até que o equilíbrio seja estabelecido entre a quantidade de espécies do adsorvato e a porção remanescente na solução (DAS, 2008).

Devido ao fato de existirem diversos grupos químicos no bioadsorvente que podem atrair e capturar os íons metálicos presentes na fase líquida, ocorre uma interação entre eles. Alguns grupos químicos e seus respectivos bioadsorventes são: grupos acetamido na quitina, polissacarídeos estruturais nos fungos, grupos amino e fosfato nos ácidos nucleicos, amino, amido, sulfidril e grupos carboxil nas proteínas, hidroxil nos polissacarídeos, e principalmente carboxil e sulfato nos polissacarídeos de algas marinhas. Entretanto, deve ser destacado que a presença destes grupos funcionais não garante sua acessibilidade para adsorção, devido a conformação estérica, ou outras barreiras (VOLESKY ; HOLAN, 1995).

Os fatores envolvidos no processo de bioadsorção de metais são considerados complexos. Existem muitos parâmetros que podem influenciar no processo 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).

A bioadsorção de metais pesados engloba 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 podem diferir de acordo com as espécies que estão sendo usadas, com a origem da sua biomassa e seu processamento (VOLESKY; HOLAN, 1995).

A bioadsorção pode ocorrer em duas etapas: em um primeiro momento os íons metálicos são adsorvidos na superfície celular por interação entre o metal e os grupos funcionais existentes. Antes de terem acesso a membrana celular, os íons metálicos atravessam a parede celular que consiste de uma variedade de polissacarídeos e proteínas, que oferecem um número de sítios ativos capazes de adsorver os íons metálicos. Na primeira etapa, chamada de bioadsorção passiva, o processo ocorre rapidamente, por um ou por uma combinação de mecanismos: coordenação, complexação, troca iônica ou adsorção física (eletrostática). Bioadsorção passiva, é um equilíbrio dinâmico de adsorção-dessorção reversível, os íons metálicos que se ligam na superfície do bioadsorvente podem ser desorvidos por outros íons, agentes quelantes ou ácidos. A segunda etapa, é a chamada bioadsorção ativa, onde os íons metálicos penetram na membrana celular e adentram no interior das células (CRIST *et al.*, 1981).

Os principais fatores que podem afetar o processo de bioadsorção são: (i) concentração inicial do íon metálico, (ii) temperatura, (iii) pH, e (iv) concentração da biomassa em solução. Dentre eles, o pH é um dos mais importantes parâmetros, influenciando na solução química do metal, na atividade dos grupos funcionais da biomassa e na competição dos íons metálicos (FRIIS ; MYERS-KEITH, 1986; GALUN *et.al*, 1987). Um aumento no pH causa a desprotonação dos sítios ativos de íons metálicos presentes na superfície celular. Um decréscimo no pH causa competição entre prótons e as cargas positivas dos íons metálicos (NAJA *et.al*, 2009). Os sítios ativos só estão disponíveis para os íons metálicos se estiverem no estado desprotonado (OFOMAJA ; HO, 2007).

Para analisar estes mecanismos é necessário compreender como as espécies metálicas se comportam em solução. Na especiação metálica, os parâmetros mais

importantes a serem considerados são a concentração, o pH, a força iônica e ainda o efeito dos íons competidores (GUIBAL, 2004).

Dentre os vários bioadsorventes existentes (como macro e microalgas, fungos e bactérias) temos os polissacarídeos tal como a quitina e a quitosana, que possuem características particulares, uma boa estabilidade química e também capacidade de sequestrar íons metálicos.

2.6 Quitosana

Dentre os inúmeros polissacarídeos, celulose e quitina são produzidas em larga escala, estima-se que aproximadamente 10 bilhões de toneladas de quitina e celulose são biossintetizadas na natureza a cada ano. A quitina é considerada o segundo biopolímero mais abundante na natureza depois da celulose e se apresenta na natureza, como microfibrilas cristalinas que formam componentes estruturais no exoesqueleto de artrópodes. Sua principal fonte são as carapaças de crustáceos como camarão, caranguejo e lagostas (BABEL; KURNIAWAN, 2003; KURITA, 2006; RINAUDO, 2006).

A quitosana é um copolímero de glucosamina e N-acetilglucosamina. Para sua obtenção, a quitina sofre uma desacetilação, onde os grupos acetil são removidos sob condições básicas, para produzir uma cadeia copolimérica com taxas variáveis de glucosamina e N-acetilglucosamina. As quitosanas geralmente têm de 70 a 90% de suas unidades desacetiladas. Um grande desafio na produção de quitosana é atingir um nível suficientemente baixo de endotoxinas, adequado para aplicações biomédicas e farmacêuticas (MUZZARELLI, 1973; SHALABY *et al.*, 2004). Na Figura 2.5 pode-se observar o processo de formação da quitosana.

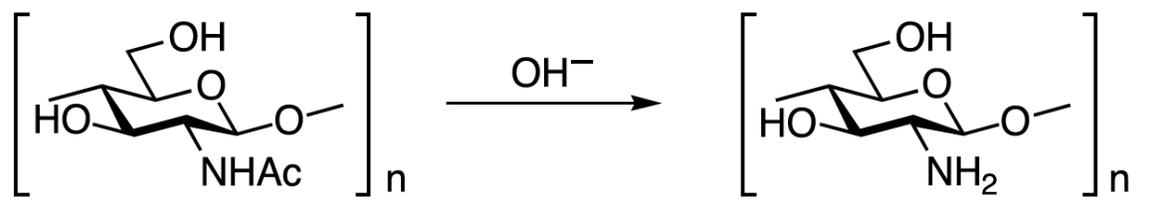


Figura 2.6 - Preparação da quitosana por hidrólise em meio básico a partir da quitina (NO; MEYERS, 1997).

Enquanto a quitina é insolúvel na maioria dos solventes orgânicos, a quitosana se apresenta solúvel em soluções diluídas de ácidos. Ácidos orgânicos como acético, fórmico, láctico, pirúvico e oxálico são frequentemente usados para dissolução da quitosana (RINAUDO *et al.*, 1999; KJM *et al.*, 2006). O melhor solvente encontrado para a sua dissolução é o ácido fórmico, sendo que, o mais usado é o ácido acético (KIENZLE-STERZER *et al.*, 1982). Outra forma de dissolvê-la é usando soluções de ácido clorídrico (HCl) e ácido nítrico (HNO₃) diluído. Em ácidos fortes como o sulfúrico e o fosfórico é insolúvel (KURITA, 2006).

Segundo Furusaki *et al.* (1996), nas posições C-2, C-3 e C-6, respectivamente, a quitosana possui três tipos de grupos funcionais, um grupo amino e dois grupos hidroxilas, dentre o grupo de hidroxilas uma é primária e outra secundária. A Figura 2.7 mostra a estrutura química da quitosana.

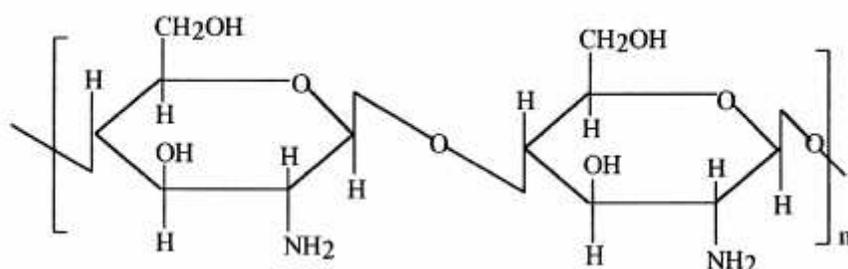


Figura 2.7 - Estrutura linear da quitosana (KUMAR, 2000).

A presença de grupos amino na quitosana indica que o pH altera substancialmente o estado das cargas e as propriedades da quitosana. Em pHs baixos, os grupos amino são protonados e ficam positivamente carregados, isso faz com que a quitosana se torne um polieletrólito catiônico solúvel em água. Por outro lado à medida que o pH aumenta, os grupos amino da quitosana são desprotonados e o polímero perde sua carga tornando-se insolúvel (YI *et al.*, 2006; CHO *et al.*, 2000).

Características como, massa molecular, viscosidade, grau de desacetilação índice de cristalinidade, número de unidades monoméricas, valor de retenção de água, pKa, e energia de hidratação são considerados dentre outros as mais importantes da quitosana. A quitosana é uma poliamina linear em que os grupos amino estão prontamente disponíveis para reações

químicas. Possui uma densidade de carga elevada, aderindo negativamente à superfícies carregadas de íons metálicos. A quitosana é conhecida por quelar íons metálicos através de ligações com os grupos amino (BODEK, 1991).

Sandford (1990), descreveu as propriedades químicas e biológicas da quitosana como se pode ver na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Propriedades químicas e biológicas da quitosana

Propriedades químicas da quitosana	Propriedades biológicas da quitosana
Poliamina catiônica	
Elevada densidade de cargas em pHs < 6.5	Biocompatibilidade
Adere à superfícies carregadas negativamente	Polímero natural
Forma gel com poliânions	Biodegradável
Viscosidade de alto a baixo	Segura e não-tóxica
Alto peso molecular	Hemostática
Agentes quelantes de vários íons metálicos de transição	Bacteriostática
Disponível para modificações químicas	Fungistática
Grupos amino/hidroxil reativos	Espermicida

Devido às propriedades físicas, químicas e biológicas da quitosana, ela é largamente usada em uma vasta gama de diferentes produtos e aplicações. Utilizada principalmente para produtos farmacêuticos, cosméticos, biomédicos, materiais agrícolas e produtos alimentícios a quitosana é usada também em produtos de cuidados pessoais (tratamento de cabelo, cuidados com a pele, hidratante, cicatrização de feridas), para a gestão de resíduos (tratamento de lodo de esgoto e resíduos da indústria da cerveja, da quelação de metais pesados tóxicos radioativo e materiais), na agricultura (revestimento de sementes, aumentando a produtividade da cultura, como um agente de floculação, tal como um agente de liberação controlada de pesticidas e herbicidas), por produtos da biotecnologia (para

separar e purificar os agentes biológicos e para imobilizar enzimas e células) (KAS, 1997). Em cada diferente aplicação, diferentes propriedades da quitosana são exigidas. Estas propriedades podem variar com o grau de desacetilação e sua massa molecular (DUTTA *et al.*, 2004).

Podem-se observar diversas aplicações para quitosana. Uma das mais desenvolvidas é a sua utilização como quelante de íons metálicos, especificamente o íon metálico cobre.

2.7 Atuação da quitosana na quelação de íons metálicos

Para um melhor entendimento de como a quitosana atua na quelação dos íons metálicos, três itens devem ser analisados. Primeiro como ocorre o processo de interação da quitosana com os íons metálicos. Este processo vai depender principalmente do número de grupos amino e hidroxila disponíveis, que irão atuar como sítios de quelação. Segundo, deve-se examinar as propriedades que podem afetar na adsorção da quitosana, como o grau de desacetilação, modificação química, cristalinidade, massa molecular e a forma da quitosana (membranas, filmes, grânulos, esferas, nano-partículas etc). E, finalmente, deve-se analisar as variáveis que podem afetar a capacidade de adsorção. Variáveis essas que estão contidas no adsorbato e incluem, o pH e a composição da solução que podem também afetar a protonação da quitosana e a especiação dos íons metálicos (GUIBAL, 2004).

Os polissacarídeos como a quitosana, possuem uma ótima capacidade adsorvente, pois tem uma alta hidrofiliabilidade devido aos grupos hidroxil, um grande número de grupos funcionais, a alta reatividade destes grupos e a flexibilidade da cadeia polimérica (CRINI, 2005).

Devido ao par de elétrons livres disponíveis no átomo de nitrogênio, os grupos aminos são fortemente reativos com íons metálicos. Porém, em contato com soluções ácidas este grupo pode sofrer protonação, que diminui o poder de adsorção de espécies metálicas, devido à repulsão eletrostática destas com o bioadsorvente (GUIBAL, 2004).

Segundo Rhazi *et al.* (2002), íons de cobre se ligam através de um mecanismo chamado quelação, a adsorção ocorre com ligações covalentes, onde os íons se ligam preferencialmente aos grupos aminos e hidroxilas da quitosana.

Ogawa *et al.* (1993) propuseram um dos modelos que demonstram o mecanismo de coordenação na formação do complexo quitosana-cobre chamado de “*pendant model*”. Com base em um estudo de Raios-X envolvendo complexos de quitosana com Cd (II), Zn (II) e Cu (II), este modelo estabelece que uma espécie metálica liga-se a um grupo amino da quitosana como se fosse um pingente.

Este mesmo modelo “*pendant model*” foi suportado por Domard (1987), onde sugeriu-se que $[Cu NH_2(OH)_2]$ é o único complexo formado pela quitosana e o cobre, seus ligantes são formados por dois grupos OH^- e um grupo NH_2 . Considerando a coordenação esférica do cobre, o quarto sítio pode ser ocupado por uma molécula de água ou um grupo OH na posição C-3. Monteiro e Airoidi (1999), também comprovaram esta hipótese por medidas de calorimetria. No estudo relataram que o cobre liga-se à três átomos de oxigênio e um átomo de nitrogênio, com geometria quadrado-planar tetraédrica.

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). O mecanismo representativo do modelo “*bridge model*” pode ser visto na Figura 2.8.

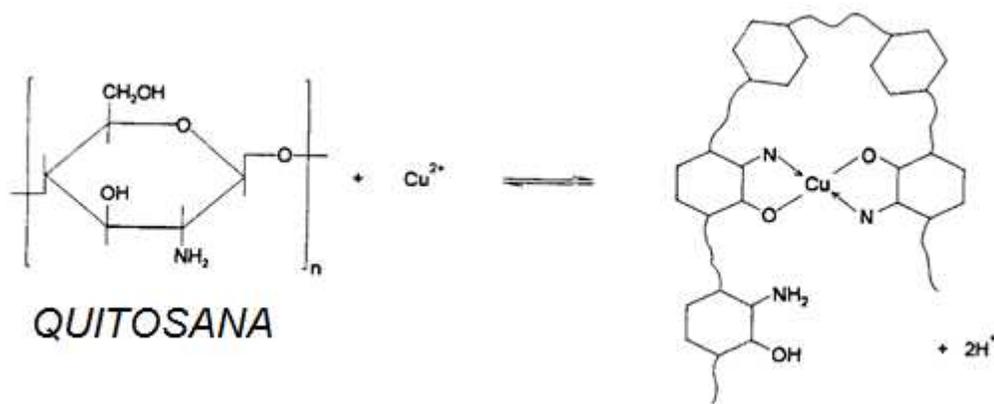


Figura 2.8 - Mecanismo de quelação de espécies metálicas em quitosana natural representativo do modelo “*bridge model*” (KAMINSKI ; MODRZEJEWSKA, 1997).

Por outro lado, Rhazi *et al.*, (2002), apresentaram dois tipos de complexos para o cobre e a quitosana, o qual depende do pH da solução. À um pH entre 5,3 – 5,8 o complexo formado é $[\text{Cu}(-\text{NH}_2)^{2+}, 2\text{OH}^-, \text{H}_2\text{O}]$; enquanto que à um pH > 5,8 sugere-se o seguinte complexo $[\text{Cu}(-\text{NH}_2)_2^{2+}, 2\text{OH}^-]$. Os complexos propostos são apresentados na Figura 2.9.

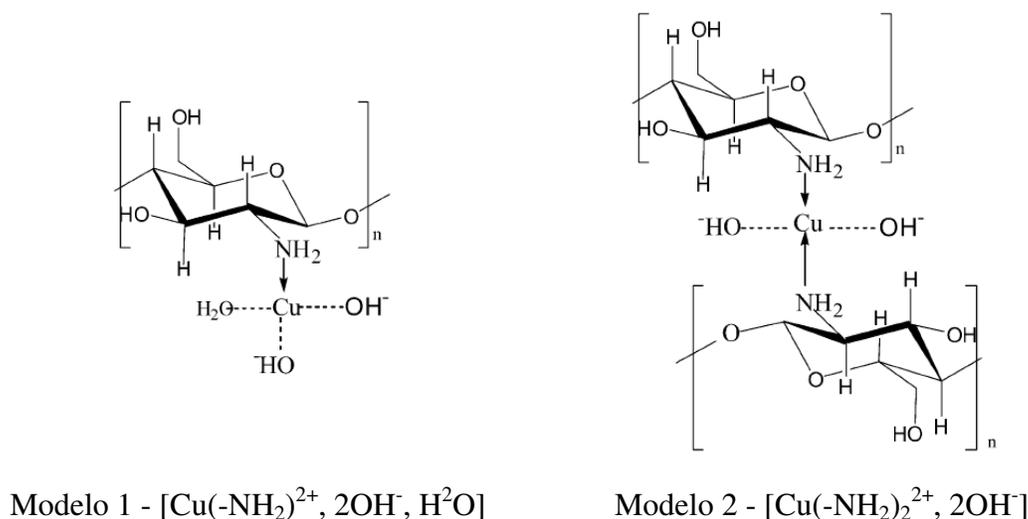


Figura 2.9 - Estruturas propostas para o complexo cobre-quitosana, adaptado de Rhazi *et al.* (2002).

Mckay *et al.*, (1989) avaliou a adsorção de alguns metais utilizando quitosana como adsorvente. Encontrou-se uma capacidade máxima de adsorção para os íons Hg^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} e Zn^{2+} de 815, 222, 164 e 75 mg/g respectivamente. Através de outro estudo realizado por Peniche-Covas *et al.*, (1992), observa-se que a capacidade de adsorção baixou para 430mg/g referente ao íon metálico Hg^{2+} , utilizando quitosana como bioadsorvente também. O que explica esta diferença é que neste último estudo a quitosana foi usada com uma partícula variando de 1.25-2.5 mm (contra 0.21-1 mm do estudo anterior). Uma redução no tamanho da partícula permite que a área superficial aumente, resultando em uma maior eficiência de remoção de íons metálicos. Outro estudo realizado por Ngah e Isa (1998), mostram que 1 g de quitosana pode adsorver 4,7 mg de Cu^{2+} , à um pH de 6,2.

Os resultados mostrados acima indicam que a quitosana pode ser considerada um bom adsorvente para metais pesados. Uma máxima capacidade de adsorção envolvendo metais pesados e tendo como bioadsorvente a quitosana, pode ser atribuído a alguns fatores como: alta hidrofiliabilidade da quitosana devido à presença de um grande número de grupos hidroxil, grande número de grupos amino primários com alta atividade e uma cadeia estrutural flexível tornando a configuração apropriada para adsorção de íons metálicos (BABEL; KURNIAWAN, 2003).

Kurita *et al.*, (1979), observou que a capacidade de adsorção da quitosana varia com a cristalinidade, afinidade por água, grau de desacetilação e quantidade de grupos amino. Polissacarídeos com cerca de 50% de desacetilação se mostraram efetivos para adsorção, para produzir uma quitosana 50% desacetilada e insolúvel, Kurita *et al.*, (1986), sugeriu a reticulação do polímero com glutaraldeído. A reticulação reduz a capacidade de adsorção, mas esta perda é necessária para assegurar a estabilidade do polímero.

Dois importantes parâmetros da quitosana que podem influenciar nas propriedades de adsorção, são o grau de desacetilação e a cristalinidade. O grau de desacetilação controla a fração de grupos amino que podem estar disponíveis para interação com íons metálicos e a cristalinidade do polímero pode controlar a acessibilidade aos sítios de adsorção (OGAWA, *et.al* , 1993; OKUYAMA *et.al*, 1997; MONTEIRO ; AIROLDI, 1999; EROSA *et.al*, 2001).

A quitosana apresenta diversas vantagens, é um material biodegradável, sendo estável quimicamente, com boa biocompatibilidade no campo da medicina, podendo ser usada para o preparo de suturas, vasos sanguíneos artificiais e agentes de liberação controlada e uma das principais características, possui a capacidade de complexar íons metálicos, incluindo o íon cobre.

2.8 Estudo do equilíbrio na adsorção

Isotermas de adsorção, são modelos matemáticos que descrevem a relação de equilíbrio da concentração do adsorvato na fase fluída e a concentração do adsorvato no bioadsorvente, ou seja, descrevem como se comporta a interação entre o soluto e o adsorvente (ALZAYDIEN; MANASREH, 2009). Estes modelos são baseados em um

conjunto de pressupostos que são relacionadas com a heterogeneidade/homogeneidade do adsorvente, o tipo de superfície e a possibilidade de interação entre as espécies de adsorvatos. Os modelos de isoterma frequentemente usados na literatura são o de Langmuir e Freundlich.

2.8.1 Isoterma de Langmuir

A isoterma de Langmuir, é uma isoterma teórica desenvolvida em 1916 e seu modelo baseia-se em poucas suposições: primeiro, todos os sítios são idênticos e energeticamente equivalentes. Termodinamicamente isso implica que cada sítio pode segurar uma molécula de adsorvato e a adsorção não pode acontecer além da monocamada. Segundo, a habilidade 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. Para adsorção do soluto de um líquido. A isoterma de Langmuir é expressa pela seguinte equação :

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

Onde C_e é a concentração dos íons metálicos na fase líquida no equilíbrio; Q_e é a quantidade de íons metálicos 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).

A fim de se prever se o sistema é “favorável” ou “desfavorável” para adsorção Hall *et al.*, (1966) propuseram um fator de separação dimensional, R_L , ou também chamado de parâmetro de equilíbrio, sendo uma característica essencial da isoterma de Langmuir, o qual é definido como:

$$R_L = \frac{1}{1 + bC_{ref}} \quad (2)$$

Onde, C_{ref} é a concentração de referência na fase-fluída do adsorvato e b é a constante de Langmuir. Para um sistema único de adsorção, C_{ref} é geralmente a maior

concentração encontrada na fase fluída. Valores de R_L indicam um modelo de isoterma em conformidade com o que é mostrado na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Tipos de Isotherma de acordo com o valor de R_L .

Valores de R_L	Tipos de Isotherma
$0 < R_L < 1$	Favorável
$R_L > 1$	Desfavorável
$R_L = 1$	Linear
$R_L = 0$	Irreversível

A isoterma de Langmuir é válida para adsorções em monocamada em uma superfície contendo um número finito de sítios identificados. O modelo assume adsorção uniforme na superfície e nenhuma migração no plano da superfície (HALL *et al.*, 1966).

2.8.2 Isotherma de Freundlich

A isoterma de Freundlich é comumente usada para descrever a adsorção característica para uma superfície heterogênea. Derivada empiricamente em 1912 a isoterma de Freundlich pode ser expressa pela Equação 3 (KUMAR; KIRTHIKA, 2009).

$$Q_e = K_F C_e^{1/n} \quad (3)$$

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 dos íons metálicos na fase líquido no equilíbrio e a quantidade de íons metálicos adsorvida pela massa de adsorvente no equilíbrio respectivamente. A isoterma de Freundlich também assume que a adsorção de solutos de

um líquido através de uma superfície sólida ocorre através diferentes sítios com diferentes energias de adsorção (KUMAR; KIRTHIKA, 2009).

2.9 Cinética de adsorção

A fim de investigar o mecanismo que controla o processo de adsorção como a transferência de massa e as reações químicas, os modelos de pseudo- primeira ordem, pseudo- segunda ordem e difusão intrapartícula são utilizados neste trabalho.

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

$$\log(Q_e - Q_t) = \log Q_e - \frac{k_1}{2.3} t \quad (4)$$

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 ordem proposto por Ho e McKay (2000) pode ser usado para explicar a cinética de adsorção. Este modelo é baseado na suposição de que a adsorção segue uma químiissorção de segunda ordem. O modelo de pseudo-segunda ordem pode ser expresso como:

$$\frac{t}{Q_t} = \frac{1}{k_2 Q_e^2} + \frac{1}{Q_e} \quad (5)$$

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

O modelo de difusão intrapartícula proposto por Weber e Morris (1962) é descrito pela Equação 6.

$$Q_t = k_i \cdot t^{0,5} \quad (6)$$

Onde k_i é a constante deste modelo sendo este parâmetro característico da taxa do processo de adsorção no início.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes e matérias-primas

- Quitosana (Sigma, 85% de desacetilação, E.U.A.)
- Ácido acético glacial (Chemco, 99,7%, Brasil)

Os reagentes apresentados a seguir são de grau analítico:

- NaOH (Synth, Brasil)
- HCl (Synth, 36,5-38,0%, Brasil)
- Nitrato de cobre trihidratado, $\text{CuNO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Vetec, Brasil)
- L-histidina monoclорidrato (Synth, Brasil)
- Beta-Amyloid Peptide (1-42) (American Peptide Company, E.U.A) – βA42
- Beta-Amyloid Peptide (1-40) (American Peptide Company, E.U.A) – βA40
- 1,1,1,3,3,3 - hexafluoro -2 - propanol (Aldrich Chemistry, 99%, E.U.A)

3.2 Preparação dos bioadsorventes

3.2.1 Preparação da solução 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, 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).

3.2.2 Preparação das esferas porosas de quitosana

A obtenção das esferas de quitosana, ocorreu através do gotejamento da solução de quitosana 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 3.1 ilustra o processo de obtenção das esferas.

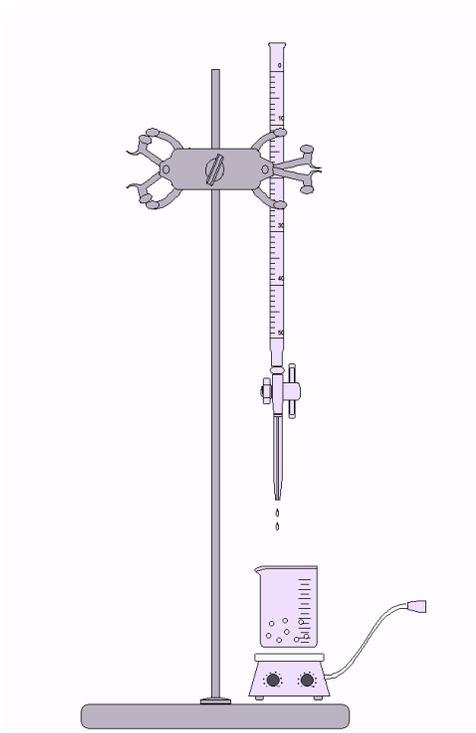


Figura 3.1 - Esquema do processo de obtenção de esferas de quitosana.

3.3 Ensaios de adsorção

O Nitrato de cobre foi o sal escolhido para realização dos ensaios de adsorção, sua escolha foi baseada no diagrama de especiação metálica que se encontra nos Resultados e Discussões deste trabalho.

3.3.1 Especiação Metálica

Diagramas de especiação de cobre em função do pH foram simulados utilizando o software HYDRA (Hydrochemical Equilibrium-Constant Database, Suécia) de modo a se conhecer o comportamento das diferentes espécies em meio aquoso. Sendo possível determinar a melhor faixa de pH para se realizar os ensaios de adsorção. O Sulfato e o Nitrato de cobre foram utilizados na simulação.

3.3.2 Influência da agitação na capacidade de adsorção

Objetivando analisar a influência da agitação na capacidade de adsorção das esferas de quitosana, ensaios utilizando diferentes condições de agitação foram analisados.

Para a realização deste ensaio, foi utilizada uma solução de cobre com concentração inicial de 20 mg/L e pH = 5,0. A cada intervalo de tempo específico uma alíquota era retirada e sua concentração medida através do espectrômetro de absorção atômica Perkin Elmer Analyst 300 com chama oxidante de ar-acetileno, instalado no Laboratório de Saneamento (LABSAN) localizado na Faculdade de Engenharia Civil (FEC), UNICAMP. Este procedimento foi realizado, utilizando três diferentes agitações: 0 rpm, 150 rpm e 250 rpm, empregando um banho termostático (Dubnoff, NT 232, Brasil) à uma temperatura de 25°C.

3.3.3 Ensaios de adsorção de íons cobre em esferas de quitosana

Inicialmente, foram estudados os fenômenos de adsorção envolvendo somente o sistema Quitosana + Cobre (Qui + Cu(II)), ou seja, esferas de quitosana previamente preparadas foram utilizadas para atuar na adsorção de íons cobre.

O método utilizado para obtenção dos dados foi o estático. Os experimentos foram realizados a temperatura de 25°C empregando um banho termostático (Dubnoff, NT 232,

Brasil) com agitação de 150 rpm. O pH foi fixado em 5,0, valor escolhido, com base na especificação metálica do íon cobre, realizada antes dos ensaios de adsorção.

3.3.4 Ensaios de adsorção de íons cobre na presença de histidina

Conhecido o comportamento do sistema quitosana-cobre, foram então iniciados os experimentos empregando 100 μ mol/L de histidina.

Foram estabelecidos três diferentes procedimentos para se investigar a atuação da histidina no sistema quitosana-cobre, descritos a seguir:

1º procedimento: (Quitosana + Cobre) + Histidina (após o equilíbrio) / (Qui + Cu(II) + His

Neste sistema, quitosana e íons de cobre eram colocados em contato, até atingirem o tempo de equilíbrio já encontrado previamente. Após este período uma alíquota de histidina, era adicionada à solução e sua capacidade de adsorção e tempo de equilíbrio eram medidos.

2º procedimento: (Quitosana + Cobre) + Histidina (antes do equilíbrio) / (Cu(II) + His) + Qui

Neste segundo sistema, a solução de cobre era colocada em contato primeiramente com histidina. Após um tempo pré-estabelecido de 2h, as esferas de quitosana eram adicionadas ao meio, e novamente sua capacidade de adsorção e tempo de equilíbrio eram medidos.

3º procedimento: (Quitosana + Histidina) + (Posterior adição de cobre) / (Qui + His) + Cu(II)

Finalmente, neste terceiro sistema, esferas de quitosana eram colocadas em uma solução de histidina (100 μ mol/L) por 24horas. Após isso, as esferas de quitosana foram filtradas e colocadas em uma solução contendo o íon cobre. O tempo de equilíbrio e a capacidade de adsorção foram determinados.

As condições empregadas para cada sistema são as mesmas descritas no Item 3.2.3.

3.3.5 Cinética de adsorção

Para a cinética de adsorção dos sistemas foram utilizadas duas concentrações de cobre:

- solução de 500 mL com concentração de 20 mg/L
- solução de 50 mL com concentração de 250 mg/L.

A massa de esferas porosas de quitosana utilizada foi de aproximadamente 0,6 g e 6 g respectivamente para cada solução.

Em intervalos de tempo específicos, alíquotas destas soluções eram retiradas, e sua concentração era medida utilizando um espectrômetro de absorção atômica Perkin Elmer AA Analyst 100 com chama oxidante de ar-acetileno (LABSAN/FEC/UNICAMP).

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

$$Q(\text{capacidade de adsorção}) = \frac{(C_0 - C_e)V}{m} \quad (7)$$

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.

3.3.6 Isotermas de adsorção

Para obtenção dos dados de equilíbrio dos sistemas descritos acima, colocou-se uma massa de 0,3 g de esferas de quitosana em uma série de tubos falcon contendo 25 ml de solução de cobre em diferentes concentrações.

O pH da solução foi ajustado com soluções de NaOH (0,1 mol/L) e HCl (0,1 mol/L), durante o ensaio o pH não era ajustado.

O sal utilizado para realização dos experimentos foi o $\text{CuNO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, e a concentração das soluções variaram de 5 mg/L a 300 mg/L.

Após o sistema atingir o tempo de equilíbrio obtido através da cinética, eram retiradas alíquotas de cada solução para determinação de sua concentração através de um espectrômetro de absorção atômica Perkin Elmer AA Analyst 100 com chama oxidante de ar-acetileno, instalado no Laboratório de Saneamento (LABSAN) localizado na Faculdade de Engenharia Civil (FEC), UNICAMP.

Para o cálculo da capacidade de adsorção fez-se uso da Equação 7.

3.3.7 Isoterma de adsorção utilizando o peptídeo β A

3.3.7.1 Preparação do filme peptídico

O peptídeo utilizado na realização deste experimento foi o β A42, e a obtenção dele se deu pela preparação de um filme peptídico. Este filme foi obtido através da dissolução do mesmo em 1,1,1,3,3,3 – hexafluoro -2 – propanol (HFIP) para obter-se uma solução de 1mM de β A42, peptídeo utilizado neste experimento. A solução contendo o peptídeo e o HFIP foi então dividida igualmente em seis alíquotas de 35 μ L e para evaporação do HFIP foi deixada em uma capela por 90 min e centrifugada sob vácuo para total evaporação do HFIP, após este procedimento o filme foi estocado a -80°C (STINE *et al.*, 2003).

Este procedimento foi realizado no Laboratório de Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos (LAFAME) da Profa. Dr. Wanda P. Almeida do Instituto de Química da Unicamp, portanto venho através deste agradecer a disponibilidade para viabilização deste experimento.

3.3.7.2 Isoterma de adsorção

Soluções de cobre contendo diferentes concentrações foram colocadas nos eppendorfs contendo o peptídeo β A42, e foram deixados por 2 horas até que alcançassem o equilíbrio. Após isso, uma massa de 0,01 g de esferas de quitosana foi colocada em contato com as soluções contendo o peptídeo e a solução Cobre. O pH da solução foi fixado em 5,0 e durante o ensaio não foi ajustado. A concentração das soluções variaram de 5 mg/L a 300

mg/L. O experimento foi realizado a uma temperatura de 25°C, controlado por uma estufa, sem agitação.

Após o sistema atingir o tempo de equilíbrio de 100 h, eram retiradas alíquotas de cada solução para determinação de sua concentração através de um espectrômetro de absorção atômica Perkin Elmer Analyst 300 com chama oxidante de ar-acetileno, instalado no Laboratório de Saneamento (LABSAN) localizado na Faculdade de Engenharia Civil (FEC), UNICAMP. Para o cálculo da capacidade de adsorção fez-se uso da Equação 7.

3.4 Métodos de Caracterização

Depois de concluídos os ensaios de adsorção de íons cobre pela quitosana, com e sem a presença de β A/histidina, foram realizadas caracterizações com o objetivo de compreender melhor as interações que ocorreram nos ensaios. As caracterizações foram realizadas com as esferas de quitosana, antes e após a adsorção de íons cobre, e após a adição de histidina, com exceção da técnica de espectroscopia de energia dispersiva de Raios-X (EDX) utilizada somente para caracterizar as esferas após adsorção de íons cobre e adição de histidina, e das técnicas de espalhamento de Raios-X a baixo ângulo (SAXS) e estrutura fina estendida de absorção de Raios-X (EXAFS) realizadas com algumas particularidades expostas nos itens 3.3.6 e 3.3.7 .

3.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura foi usada para verificar a morfologia da superfície. As análises foram realizadas nos microscópios do Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC- 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 35×10^{-3} bar e uma temperatura de -45°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) (LRAC - FEQ/UNICAMP).

3.4.2 Diâmetro médio das esferas de quitosana

Foram analisadas 30 esferas através do *software* ImageJ[®], resultando em um diâmetro médio das esferas porosas de quitosana utilizadas neste trabalho.

3.4.3 Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDX)

Foi utilizada a técnica EDX acoplada a MEV para análise das esferas de quitosana depois da adsorção de íons cobre e na presença de histidina. Esta análise possibilitou, observar qual a distribuição dos íons metálicos cobre presentes na amostra. Esta análise foi realizada no LRAC da FEQ/UNICAMP, utilizando-se um equipamento de microscópio eletrônico de varredura *LEO Electron Microscopy/Oxford* (Leo440i, Inglaterra). Os parâmetros empregados para análise foram 15 kV de tensão e tempo para mapeamento de 10 min. As amostras foram analisadas no LRAC da FEQ/UNICAMP.

3.4.4 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR - ATR)

A espectroscopia de infravermelho 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 feitas nas esferas de quitosana antes e depois da adsorção de

íons cobre e na presença da histidina. A análise das amostras foi realizada no LRAC na FEQ/UNICAMP.

3.4.5 Difração de Raios-X (DRX)

Esta técnica possibilitou analisar vários parâmetros dos cristais 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 θ : 5-90°, passo: 0,02°, velocidade 0,033 graus/segundo. As análises foram feitas no LRAC da FEQ/UNICAMP.

3.4.6 Estrutura Fina Estendida de Absorção de Raios-X (EXAFS)

A estrutura fina estendida de absorção de Raios-X (EXAFS) está associada à medida do coeficiente linear de absorção de Raios-X (μ) de um material em função da energia do feixe incidente, fornecendo informações estruturais sobre as duas ou três primeiras camadas atômicas em torno do átomo central. Esta análise permite determinar precisamente a vizinhança do átomo principal do complexo de adsorção, seu número de coordenação e as distâncias interatômicas do adsorvato (FAY *et al.*, 1988). As determinações estruturais por EXAFS dependem da viabilidade do tratamento dos dados. Isto pode ser feito através do ajuste da curva ou utilizando-se a técnica da transformada de Fourier que fornece a função distribuição radial de vizinhos e relaciona as posições dos picos com a distância destes ao átomo absorvedor, bem como suas amplitudes com o número de vizinhos (ASHLEY; DONIACH, 1975).

O EXAFS basicamente aparece do processo físico que envolve a interferência. A função de onda do elétron excitado se propaga para além do átomo e é parcialmente refletida pelos átomos vizinhos. A interferência entre a onda que se propaga e a que é

refletida pelos átomos vizinhos causa as ondulações no espectro de absorção. A interferência é construtiva ou destrutiva dependendo do comprimento de onda associado ao elétron e da distância interatômica. Assim, através do tratamento dos dados de EXAFS podem-se determinar as distâncias interatômicas entre o átomo que sofreu a excitação e os seus vizinhos próximos (LEE *et al.*, 1981; PARSONS *et al.*, 2002).

Cada elemento químico possui uma borda de absorção característica, esta borda é identificada quando ocorre um salto no espectro de absorção, referente à energia de Raios-X incidente ser maior ou igual à ligação de um elétron nas camadas mais próximas do núcleo do átomo (K ou L) (NEVVILLE, 2004).

As medidas foram de EXAFS foram realizadas na linha de luz D04B - XAS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil), com as seguintes especificações técnicas: *Fonte de luz*: imã defletor D04B (15°), $\alpha_y = 0,222\text{mm}$; *Feixes na amostra (dimensões e fluxo)*: vertical : 0,5 - 1,5 mm e horizontal : 1,0 - 10,0 mm, Fluxo na amostra: 3×10^9 fótons/(s.mrad.100mA) 6 keV; *Monocromador*: cristal sulcado de silício Si(111) ($2d = 6,271 \text{ \AA}$): 3 000 - 12 000 eV, Si(220) ($2d = 3,840 \text{ \AA}$): 5 000 - 24 000 eV; *Resolução em energia (E/ E)*: 5.000 - 10.000; *Detectores*: câmaras de ionização, detector de elétrons em atmosfera de He, cintilador para altas contagens, detector de estado sólido Si(Li), detector de estado sólido Ge (15 elementos); *Facilidades experimentais*: criostato com circuito fechado de He : 8K - 300 K, criostato/forno : 80K - 700 K, Potenciostato para eletroquímica *in-situ*.

Nesta análise foram testados somente dois sistemas, Cu(II) + Qui e (Cu(II) + His) + Qui. Os dados de EXAFS foram analisados pelo software ATHENA®, que permitiu através do espectro bruto a extração das oscilações de EXAFS, $\chi(k)$, também chamada de função de EXAFS. Após a obtenção de $\chi(k)$, aplica-se a transformada de Fourier, resultando em uma função radial, esta função radial se aproxima da distribuição dos átomos vizinhos em torno do átomo central, e cada pico do gráfico obtido a partir da transformada de Fourier pode corresponder a uma esfera de coordenação, de um determinado átomo ou diferentes átomos ligados aos grupos funcionais da quitosana.

3.4.7 Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo - SAXS

O espalhamento de Raios-X a baixo ângulo representa uma das técnicas mais adequadas para estudos estruturais no nível atômico e molecular, pois permite caracterizar a conformação geral de proteínas e outras macromoléculas ordenadas ou desordenadas de diferentes conformações e tamanhos em solução a uma resolução entre 50 e 10 Å (BERNADÓ; SVERGUN, 2012; PUTNAM *et al.*, 2007). Através dos dados de SAXS podem-se obter informações, sobre o raio de giro, volume, massa molecular, conformação geral, organização espacial e mudanças estruturais, além de uma análise quantitativa do grau de compacidade (que pode ser correlacionado com o grau de enovelamento) de uma proteína flexível e/ou com grandes regiões desestruturadas (TREWHELLA, 1997).

SAXS é uma técnica que permite estudar características estruturais de tamanho coloidal (de 10 Å a 1000 Å) de moléculas em solução e suas organizações dentro de um material. O mais surpreendente da técnica de SAXS é a possibilidade de realizar uma modelagem de baixa resolução, usando cálculos *ab initio*, para se obter um modelo tridimensional para o envelope molecular de uma proteína. Essa reconstituição tridimensional fornece um modelo de baixa resolução, já que os dados de SAXS fornecem informações de dimensões coloidais sobre a forma da partícula. Porém, um dos mais importantes aspectos da técnica de SAXS é que ela permite o estudo de proteínas em soluções muito próximas das condições fisiológicas, além de permitir a análise de mudanças estruturais em resposta a variações das condições externas (SILVA, 2010).

A técnica de SAXS consiste num processo de espalhamento elástico que ocorre quando os Raios-X de alta energia (da ordem de 1,5 Å) atingem um material e interagem com os elétrons do mesmo. A radiação espalhada pelos elétrons nesse caso é isotrópica e as ondas espalhadas interferem entre si de forma construtiva ou destrutiva, dependendo da fase relativa das diferentes ondas. As interferências produzidas dependem das relativas posições atômicas e por consequência, a amplitude e intensidade da onda difratada em uma determinada direção estarão relacionadas com a distribuição espacial dos átomos do material (PUTNAM *et al.*, 2007).

O experimento consiste na exposição da solução de proteínas, acomodadas em um capilar ou cubeta, a um feixe colimado de Raios-X e cuja intensidade espalhada é registrada em função do ângulo de espalhamento 2θ por detectores bidimensionais. A mesma medida é realizada apenas para o tampão na qual se encontra a proteína. A subtração do espalhamento observado para a solução de proteínas em relação ao tampão resulta na informação de espalhamento apenas da macromolécula (BERNADÓ & SVERGUN, 2012).

O SAXS mede a intensidade de espalhamento versus o vetor de espalhamento, q , que é definido pela Equação 1:

$$q = 4\pi/\lambda \text{ sen}\theta \quad (8)$$

Onde θ é a metade do ângulo em que a radiação é espalhada e λ é o comprimento de onda da radiação incidente.

A curva de espalhamento pode fornecer várias informações, uma delas é o raio de giro (R_g), que representa a raiz quadrada do quadrado das distâncias médias de cada átomo em relação ao centro da partícula. A informação sobre o R_g é encontrada através do plot de Guinier ($\ln(I)$ vs. q^2), que mostra uma função linear próxima ao ângulo zero e cuja inclinação é usada para calcular o R_g . Este parâmetro permite avaliar a forma, o tamanho e a compactação da partícula em estudo (GUINIER; FOURNET, 1955).

Outra informação que podemos deduzir com a curva de espalhamento é o plot de Kratky ($q^2 \times I(q)$ vs. q). Este plot possui padrões específicos que permitem avaliar se a proteína está estruturada, parcialmente desordenada e desnaturada (PUTNAM *et al.*, 2007). A informação global contida na curva de espalhamento pode ser submetida à operação de transformada de Fourier para gerar a função de distribuição de pares $P(r)$. Esta função descreve todas as distâncias entre os elétrons em uma proteína e permite a reconstrução tridimensional através de modelos de envelope molecular denominados *ab initio* (SVERGUN *et al.*, 2001).

Nesta análise o peptídeo $\beta A40$ foi utilizado, e a preparação dos filmes peptídicos foi a mesma utilizada no item 3.4.7.1. Os sistemas analisados foram Qui, Cu(II) + βA , (Cu(II) + βA) + Qui e (Cu(II) + His) + Qui. A preparação dos sistemas Cu(II) + βA , (Cu(II) + βA)

+ Qui e (Cu(II) + His) + Qui, se deu pela adição de soluções de Nitrato de Cobre, ao peptídeo β A40 e histidina respectivamente, onde foram deixados por 2 horas para atingir o equilíbrio, e posterior adição de quitosana foi efetuada. Para viabilização da análise, foram utilizadas nanoesferas de quitosana previamente preparadas pelo método de gelificação ionotrópica, onde ocorre a reticulação iônica da quitosana com contra-íons multivalentes, as partículas resultantes possuem tamanhos da ordem de nanômetros (SILVA, 2006). Outro fato observado, foi que para diluição do peptídeo β A foi utilizado tampão TRIS 20 mM e a concentração da solução de nitrato cobre utilizado nos sistemas foi de 30 mg/L.

Os dados de SAXS foram coletados utilizando a linha de luz SAXS2, localizada, no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil) utilizando um detector 2D (Pilatus-Dectris). Foi utilizado um comprimento de onda de $\lambda=1,51\text{\AA}$, detector bidimensiona (MarCCD). O experimento foi realizado a 25 °C com uma distância amostra-detector de 1674,5 mm que permitiu registrar os dados em um intervalo de $0,01 < q < 0,32 \text{ \AA}^{-1}$. Os dados eram normalizados pela intensidade do feixe incidente e multiplicando-os pela absorção da amostra. O espalhamento da solução tampão foi subtraído da curva de espalhamento da solução dos sistemas analisados, a solução tampão utilizada foi o TRIS 20 mM. A análise dos dados bem como a obtenção do R_g e do gráfico de Kratky foi feito utilizando-se o programa PRIMUS® do pacote ATSAS®.

4 Resultados e Discussões

4.1 Resultados dos ensaios de adsorção de íons cobre

4.1.1 Especificação metálica

Os diagramas de especificação mostram a distribuição das espécies metálicas de cobre em função do pH em uma solução aquosa. Através destes diagramas, decidimos qual o sal, e qual o pH que seria utilizado nos estudos de adsorção. Os sais analisados pelo diagrama de especificação metálica foram o nitrato de cobre e o sulfato de cobre com uma concentração de 20 mg/L para ambos. Decidiu-se pela utilização do nitrato de cobre, pois observando os diagramas constatamos que para a solução de sulfato de cobre existem sais não dissociados nos valores de pH abaixo de 5, onde o cobre tem a sua forma dissociada Cu^{2+} . Ao utilizar este sal no processo de adsorção poderia levar a erros na quantificação de cobre adsorvido, visto que parte do cobre estaria precipitado em solução.

Após a escolha do sal que seria utilizado, foi escolhido em qual pH os experimentos seriam realizados. Analisando o diagrama de especificação para o Nitrato de Cobre, observa-se que a forma dissociada do cobre, Cu^{2+} , encontra-se em pHs menores que 5. Em pHs maiores que 5, o metal Cu^{2+} precipita na forma de Cu(O) . Sabemos que em soluções ácidas a quitosana pode sofrer protonação, isso causaria uma diminuição na capacidade de adsorção dos íons metálicos, desta forma, o pH escolhido para a realização dos experimentos foi 5.

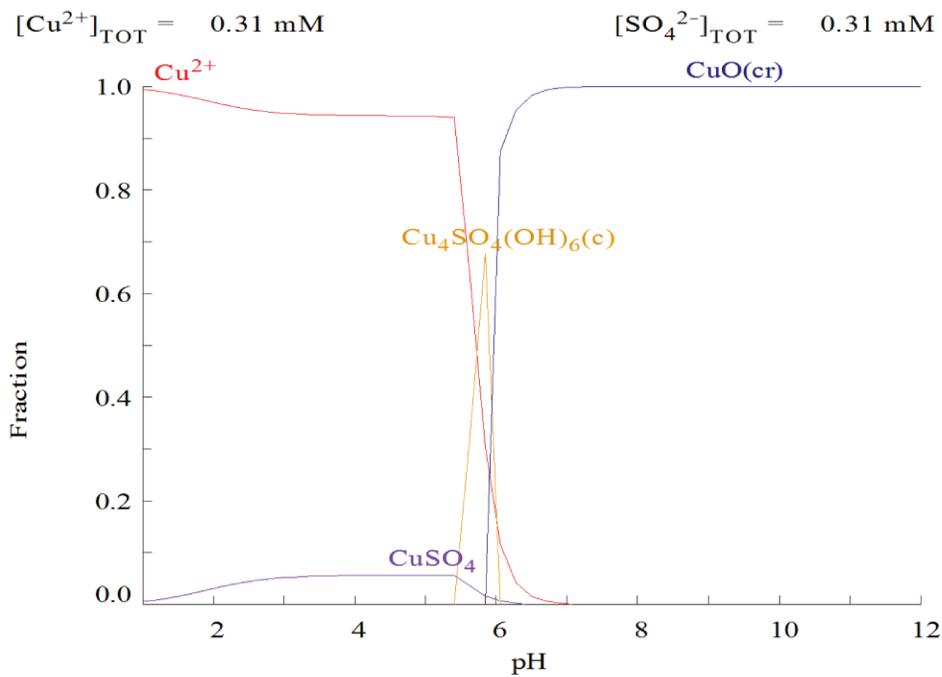


Figura 4.1 - Diagrama de especiação metálica do sulfato de cobre, $Cu(II) = 20 \text{ mg/L}$.

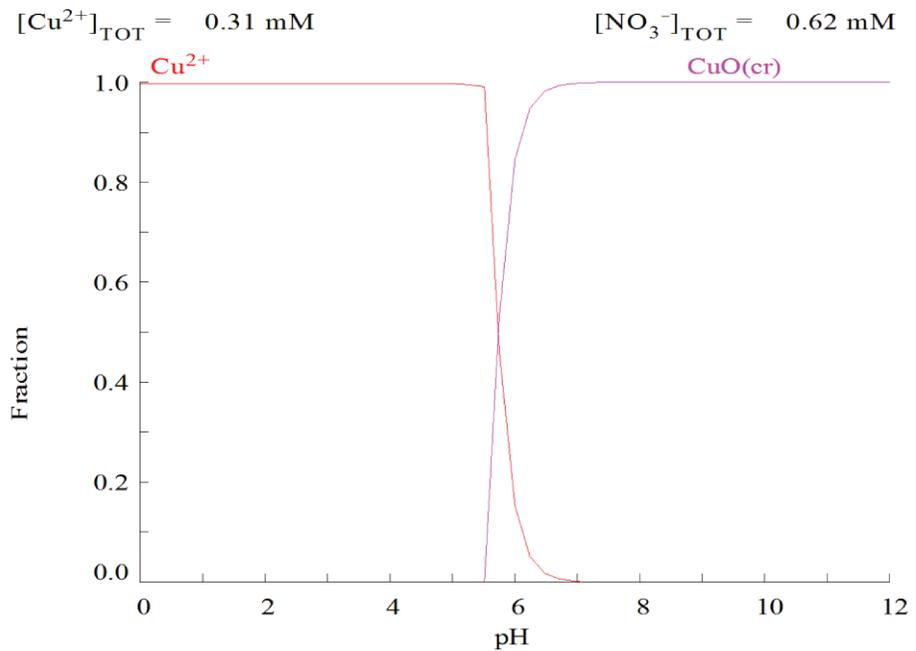


Figura 4.2 - Diagrama de especiação metálica do Nitrato de Cobre, $Cu(II) = 20 \text{ mg/L}$.

4.1.2 Influência da agitação na capacidade de adsorção

Na Figura 4.3, temos ensaios de adsorção envolvendo 3 diferentes agitações. Estes ensaios foram feitos de forma a se avaliar qual a melhor agitação para se utilizar nos experimentos. As agitações utilizadas foram, 250 rpm, 150 rpm e 0 rpm empregando um banho termostático (Dubnoff, NT 232, Brasil). De acordo com os resultados encontrados não é possível afirmar que a agitação esteja influenciando na capacidade de adsorção de íons cobre, mostrando que a agitação não é uma limitação a transferência de massa externa no processo de adsorção. Também se deve ponderar que o “set up” de rpm usado varia conforme o equipamento usado, mas um estudo realizado por Nghah *et al.* (2004), onde são utilizadas esferas de quitosana e quitosana-álcool polivinílico, ocorre um aumento na capacidade de adsorção, devido ao aumento na agitação. A agitação ótima encontrada por Nghah *et al.* (2004), foi de 500 rpm, resultando em uma capacidade máxima de adsorção de 0,7109 mmol de Cu(II)/g de adsorvente, resultado este, superior ao encontrado por este trabalho. Como não foi possível testar agitações superiores a 250 rpm, não podemos afirmar que com uma máxima agitação a capacidade de adsorção aumente, o que pode-se afirmar através deste estudo é que as agitações testadas não estão influenciando o processo de adsorção, desta forma, escolheu-se a agitação de 150 rpm para realizar os experimentos.

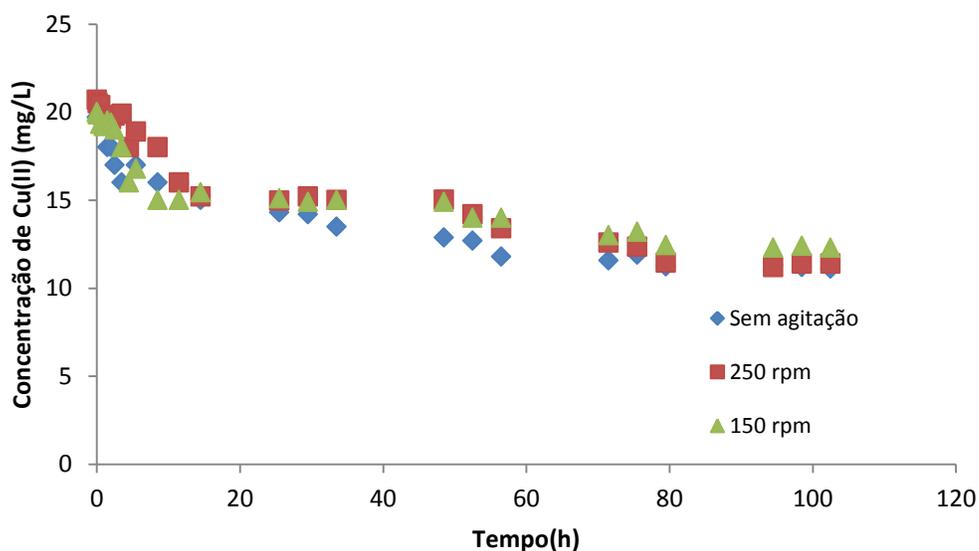


Figura 4.3 - Estudo do efeito da agitação na cinética de adsorção de íons de cobre em esferas de quitosana utilizando uma solução de 20 mg/L.

4.1.3 Cinética de adsorção de íons cobre com e sem a presença de histidina

A taxa pela qual os íons metálicos são transferidos do soluto para superfície do adsorvente, determina a cinética de adsorção e também a eficiência do processo. O estudo da cinética promove uma idéia do possível mecanismo de adsorção juntamente com os caminhos da reação até que ocorra o equilíbrio. O tempo de residência do soluto na superfície do adsorvente é importante para determinar se o processo chegou ao fim e também para estimar a adsorção total que ocorreu no processo.

O estudo da cinética foi realizado em banho finito para duas concentrações iniciais de cobre: 20 mg/L e 250 mg/L. Os resultados encontrados para os sistemas: Qui + Cu(II), (Cu(II) + His) + Qui e (Qui + His) + Cu(II) podem ser vistos nas Figuras 4.4 e 4.5.

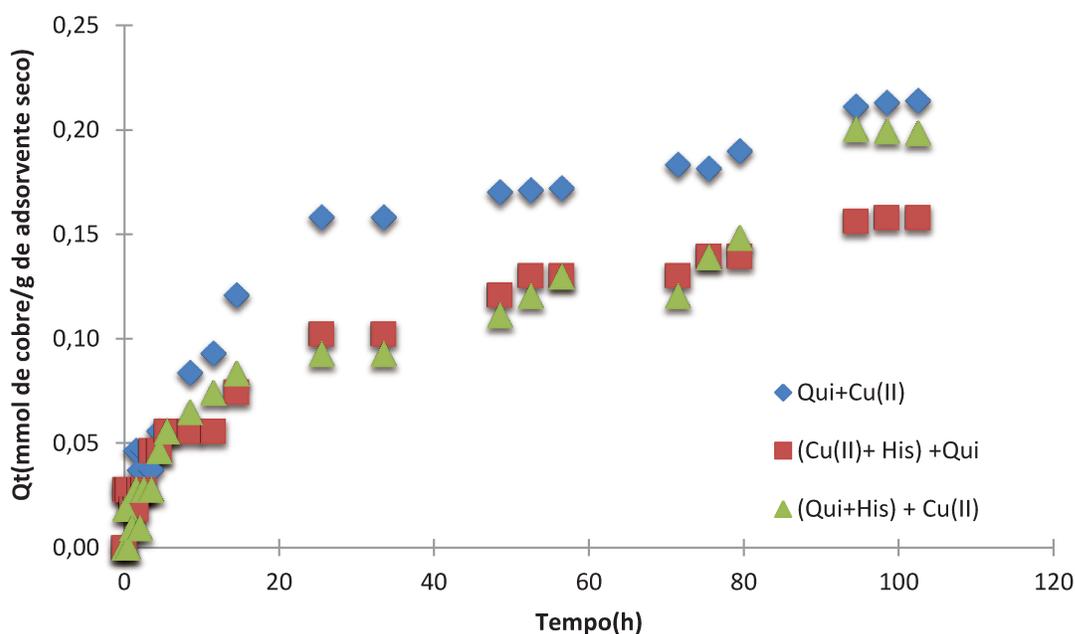


Figura 4.4 - Cinética de adsorção para os sistemas Qui + Cu(II), (Cu(II) + His) + Qui e (Qui + His) + Cu(II) com concentração inicial de 20 mg/L.

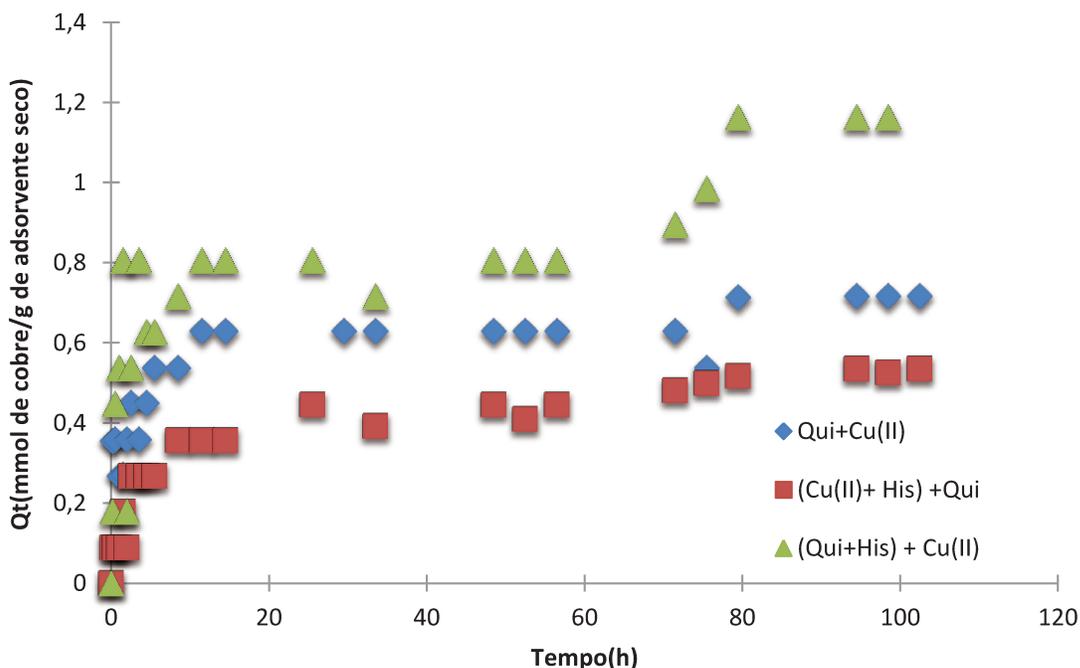


Figura 4.5 - Cinética de adsorção para os sistemas Qui + Cu(II), (Cu(II) + His) + Qui e (Qui + His) + Cu(II) com concentração inicial de 250 mg/L.

Através das curvas cinéticas podemos observar que o tempo de equilíbrio para os sistemas foi de $\cong 100$ h, este resultado assemelha-se a um estudo realizado por Wu *et al.* (2013), onde são utilizadas esferas porosas de quitosana-tripolifosfato para adsorção de íons cobre, encontrando um tempo de equilíbrio de 120 h. Em relação às cinéticas realizadas com concentração inicial de 250 mg/L observou-se uma interação entre quitosana e histidina, pois no sistema (Qui + His) + Cu(II) a capacidade de adsorção aumenta em relação ao sistema Qui + Cu(II). Este fato indica que a altas concentrações, a ordem de adição da histidina é importante e que a quitosana teria dificuldade de adsorver o cobre já coordenado pela histidina. Em suma, a ordem de adição da histidina muda o equilíbrio químico final.

De acordo com Deschamps (2005), o pK_a da histidina possui um valor de 6,0. Dependendo do pH em que a solução se encontra, a carga da histidina pode variar. Quando se tem uma faixa de pH de 2 a 6, os grupos amino e imidazol da histidina encontram-se protonados. A protonação destes grupos impede que exista uma coordenação entre o íon

cobre a histidina, ou seja, a histidina pode estar interagindo com a quitosana, em vez de atuar como quelante de íons cobre.

Na Figura 4.4, nota-se que somente a curva cinética Qui+Cu se distancia das demais, evidenciando que o equilíbrio deve ocorrer da mesma maneira nos 2 casos variando-se a ordem de adição da histidina.

A capacidade de adsorção aumenta com a concentração inicial de 250 mg/L, o que era esperado. Uma concentração inicial alta significa um aumento na força motriz causado pelo gradiente de concentração e efeitos da transferência de massa, resultando em um aumento da capacidade de adsorção (WAN *et al.*, 2010).

Para o sistema (Qui + Cu(II)) + His, onde adiciona-se histidina após Cu(II) + Qui entrarem em equilíbrio observa-se através da Figura 4.6 que ocorre uma dessorção de íons cobre na solução, provando novamente que a histidina pode estar competindo com a quitosana. Pode-se constatar que a porcentagem de íons dessorvidos de cobre é mais evidente para uma concentração inicial de 250 mg/L, reafirmando a teoria de Wan *et al.* 2010.

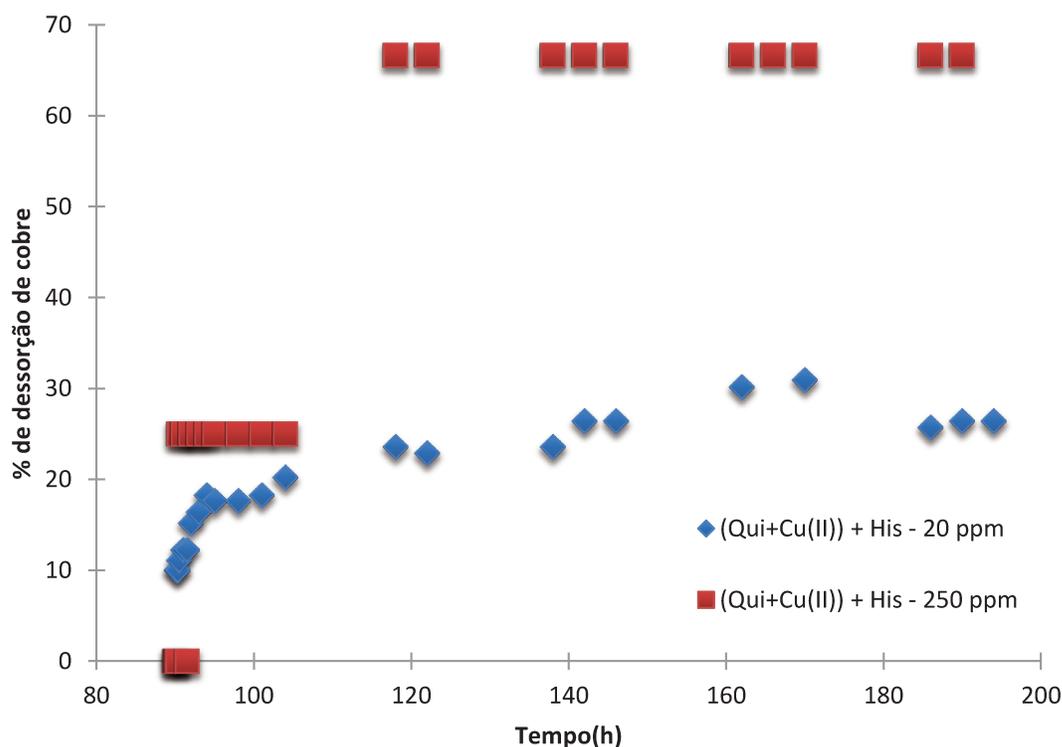


Figura 4.6 - Cinética de dessorção para o sistema (Qui + Cu(II)) + His, para a concentração inicial de 20 mg/L e 250 mg/L.

As curvas cinéticas referentes ao sistema Qui + Cu(II), (Cu(II) + His) + Qui e (Qui + His) + Cu(II) com concentração inicial de 20 mg/L foram avaliadas através dos modelos cinéticos de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem e Difusão intrapartícula, os resultados para cada sistema se encontram nas tabelas e gráficos abaixo, o *software* usado para tal análise foi Microsoft Excel.

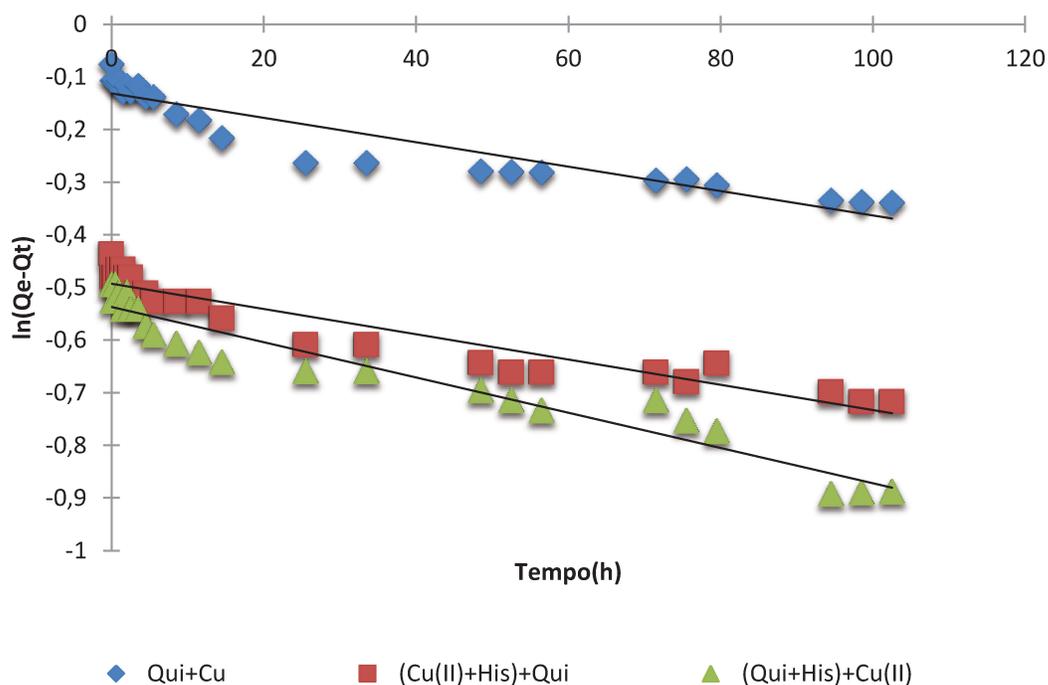


Figura 4.7 - Ajuste linear dos sistemas Qui + Cu(II), (Cu(II) + His) + Qui e (Qui + His) + Cu(II) para o modelo cinético de pseudo-primeira ordem.

Tabela 4.1 - Ajustes dos parâmetros ao modelo de pseudo-primeira ordem

Sistema	Q_e (mmol/ g de quitosana seca)	k_1 (h^{-1})	R^2
Qui + Cu(II)	0,877	0,0023	0,94
(Cu(II) + His) + Qui	0,611	0,0024	0,95
(Qui + His) + Cu(II)	0,584	0,0033	0,97

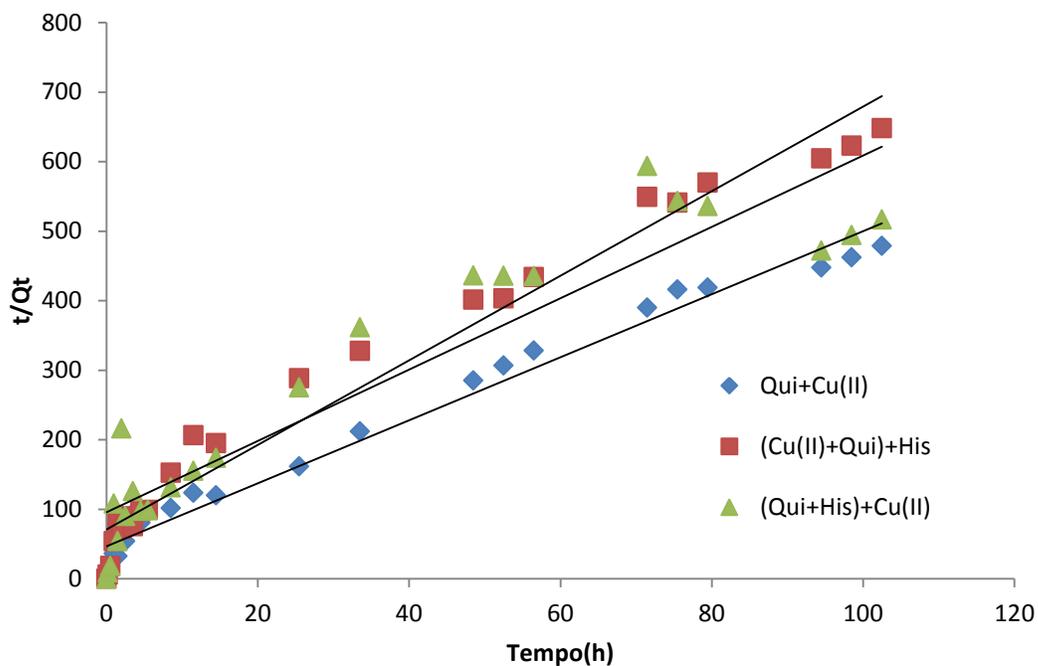


Figura 4.8 - Ajuste linear dos sistemas Qui + Cu(II), (Cu(II) + His) + Qui e (Qui + His) + Cu(II) para o modelo cinético de pseudo-segunda ordem.

Tabela 4.2 - Ajustes dos parâmetros ao modelo de pseudo-segunda ordem (20 mg/L)

Sistema	Q_e (mmol/g de quitosana seca)	k_2 (g/mmol min)	R^2
Qui + Cu(II)	0,221	0,00103	0,99
(Cu(II) + His) + Qui	0,164	0,00038	0,98
(Qui + His) + Cu(II)	0,195	0,00039	0,93

As Tabelas 4.1 e 4.2 apresentam os parâmetros encontrados para os modelos cinéticos de adsorção de pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem. Observa-se que para os sistemas Qui + Cu(II) e (Cu(II) + His) + Qui os valores teóricos de Q_e estimados pelo modelo cinético de pseudo-primeira ordem se mostram significativamente diferentes dos valores determinados experimentalmente, além disso, o coeficiente de correlação R^2 é muito menor que 1, enquanto que os coeficientes de correlação se mostram melhores para o modelo cinético de pseudo-segunda ordem. Este resultado para o coeficiente de correlação sugere que a adsorção de íons cobre nestes dois sistemas ocorra pela cinética de pseudo-segunda ordem. Outro fator observado é que os valores calculados para capacidade de adsorção no equilíbrio Q_e estão muito próximos dos valores experimentais encontrados. Com isso, podemos concluir que a etapa limitante no processo de adsorção dos íons cobre nos sistemas Qui+Cu(II) e (Cu(II)+His) + Qui é a adsorção química envolvendo compartilhamento ou troca de elétrons entre Cu(II) e a quitosana. Isto significa que 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 analisando-se o sistema (Qui + His) + Cu(II) o modelo de pseudo-primeira ordem se ajusta melhor aos dados, este modelo sugere que a adsorção ocorra através de ligações reversíveis que acontecem na superfície do adsorvente e que portanto a etapa limitante neste caso é difusão externa e não mais a adsorção química (LOW *et al.*, 2000). Isso pode indicar uma possível interação entre quitosana e histidina que pode estar ocorrendo na superfície das esferas de quitosana, diferentemente do outro sistema (Cu(II) + His) + Qui, onde ocorre uma competição entre quitosana e histidina pelos íons cobre.

Outro ponto que podemos observar para o modelo de pseudo-segunda ordem, é que com a adição de histidina no sistema tem-se uma diminuição na taxa de adsorção representada pelo parâmetro k_2 , isso pode ser explicado pelo fato de que quando histidina é adicionada ao sistema existe uma competição pelos íons cobre, tornando mais difícil a ligação entre íons cobre e a quitosana, levando a uma taxa de adsorção mais lenta.

Os modelos de adsorção sempre são construídos com base em três fases consecutivas, primeiro temos a difusão através do filme líquido que envolve as partículas do adsorvente, também chamada de difusão externa ou difusão no filme. Segundo temos a difusão no líquido contido nos poros e/ou na parede dos poros, chamada de difusão interna ou difusão intrapartícula e finalmente ocorre a adsorção e dessorção entre o adsorbato e os sítios ativos (LAZARIDIS; ASOUHIDOU, 2003).

As equações de pseudo-primeira e pseudo-segunda ordem predizem somente o comportamento ao longo de toda adsorção, mas não confirmam um mecanismo de adsorção particular e não conseguem representar o mecanismo de difusão. Com o objetivo de propor um processo razoável de difusão para a adsorção de íons cobre, o modelo de difusão intrapartícula foi analisado.

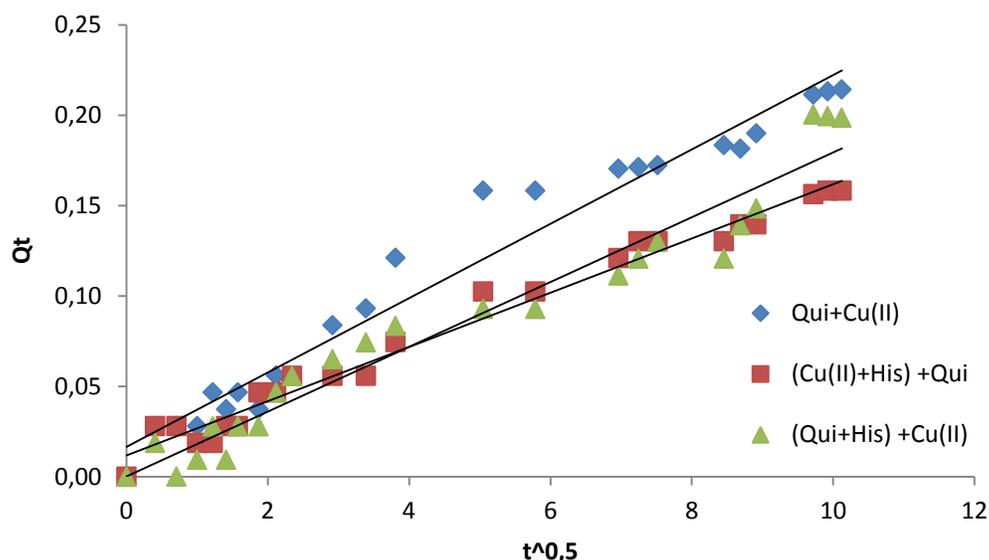


Figura 4.9 - Ajuste linear dos sistemas Qui + Cu(II), (Cu(II) + His) + Qui e (Qui + His) + Cu(II) para o modelo cinético de Difusão Intrapartícula.

Tabela 4.3 - Ajustes dos parâmetros ao modelo de Difusão Intrapartícula (20 mg/L)

Sistema	k_i	R^2
Qui + Cu(II)	0,021	0,98
(Cu(II) + His) + Qui	0,015	0,99
(Qui + His) + Cu(II)	0,018	0,97

Pode-se observar através da Figura 4.9 que existe uma multilinearidade dos pontos para os três sistemas observados, esta multilinearidade sugere que existem dois ou mais passos envolvidos no processo de adsorção (SUN; YANG, 2003). Se a linha do modelo não passar pela origem, isso indica que o transporte intrapartícula não é o limitante no processo de adsorção, desta forma pode-se observar na Figura 4.9 que os pontos experimentais não passam pela origem, mostrando que a existem duas ou mais etapas envolvidas no processo de adsorção (OZCAN *et al.*, 2006).

4.1.4 Isotermas de adsorção de íons cobre com e sem a presença de histidina

Através dos dados de equilíbrio podemos descrever como os adsorvatos interagem com os adsorventes, sendo de grande valia também para aperfeiçoar o uso dos adsorventes. Os dados experimentais de adsorção dos sistemas estudados: Qui + Cu(II), (Cu(II) + His) + Qui, (Qui+Cu(II)) + His e (Qui+His) + Cu(II) são mostrados na Figura 4.10. Os resultados claramente indicam que com adição de histidina, a capacidade de adsorção das esferas de quitosana decresce. Pode-se observar também que a ordem em que a histidina é adicionada ao sistema não interfere no equilíbrio do mesmo.

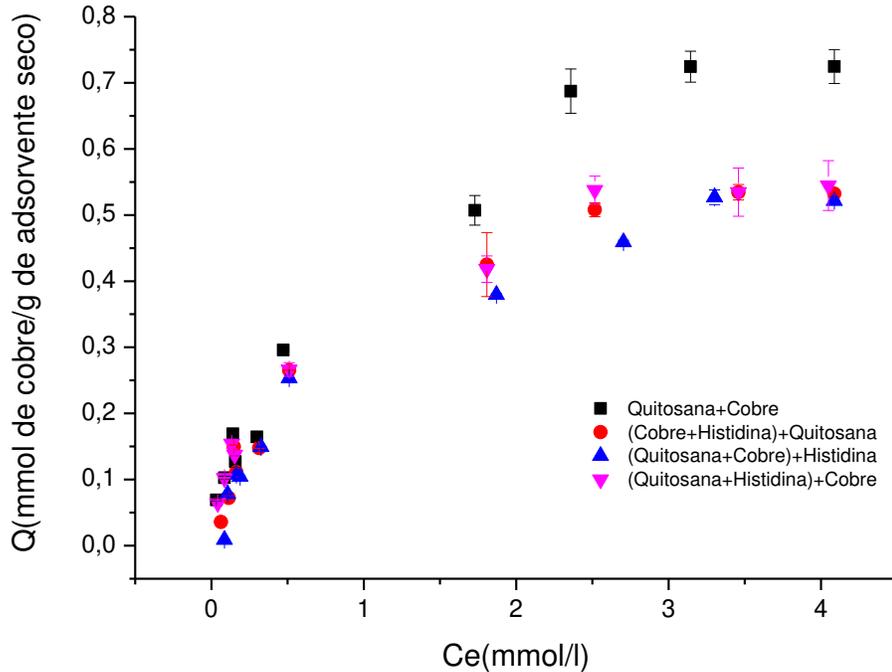


Figura 4.10 - Isothermas de adsorção referente aos sistemas: Qui + Cu(II), (Cu(II) + His) + Qui, (Qui+Cu(II)) + His e (Qui+His) + Cu(II)

No presente estudo, foram utilizados os modelos de Langmuir e Freundlich a fim de se conhecer o comportamento de cada sistema. Os ajustes foram realizados pelo *software* Origin[®] e utilizou-se o método de regressão não linear. A Figura 4.11, mostra os modelos ajustados para cada sistema e os resultados desta análise podem ser vistos nas Tabelas 4.4 e 4.5

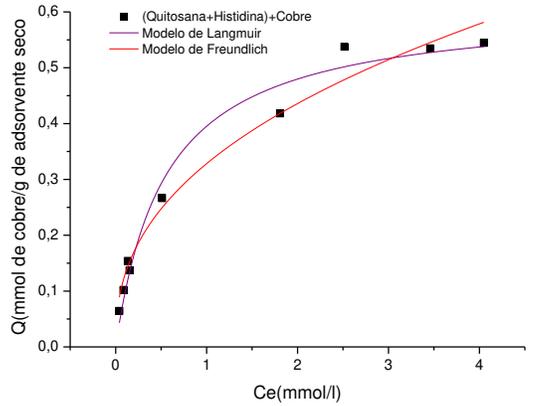
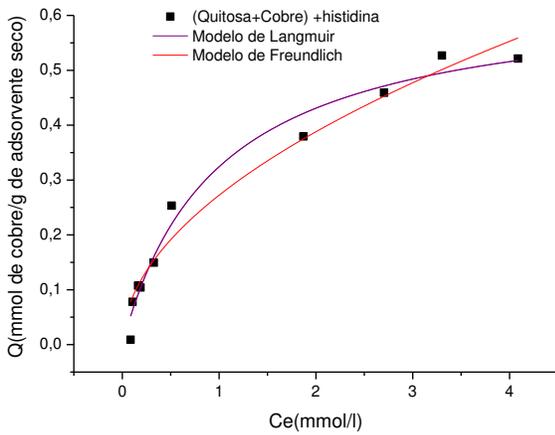
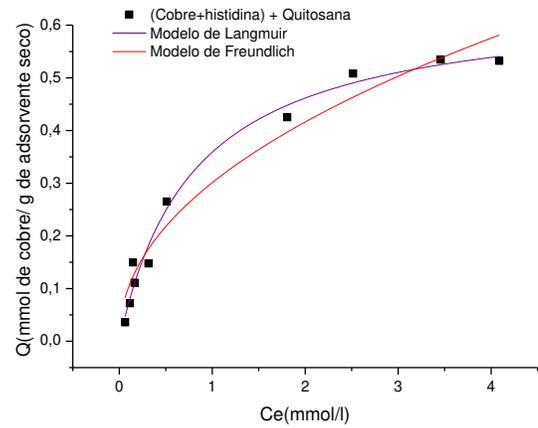
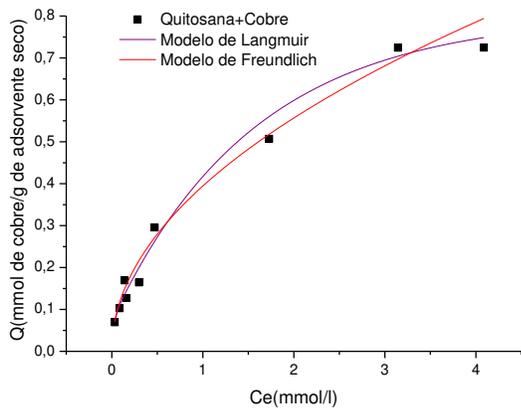


Figura 4.11 - Modelos de Langmuir e Freundlich, ajustados às isothermas dos sistemas, Qui + Cu(II), (Cu(II) + His) + Qui, (Qui+Cu(II)) + His e (Qui+His) + Cu(II).

Tabela 4.4 - Parâmetros obtidos pelo ajuste dos dados de equilíbrio pelo modelo de Langmuir.

Sistema	$Q_{m\acute{a}x}$ (mmol/ g de quitosana seca)	b	R^2
Qui + Cu(II)	0,927	0,960	0,97
(Cu(II) + His) + Qui	0,647	1,246	0,99
(Qui + Cu(II)) + His	0,642	1,019	0,98
(Qui + His) + Cu(II)	0,610	1,837	0,98

Tabela 4.5 - Parâmetros obtidos pelo ajuste dos dados de equilíbrio pelo modelo de Freundlich.

Sistema	k_f (mmol/ g de quitosana seca)	n	R_2
Qui + Cu(II)	0,154	0,497	0,97
(Cu(II) + His) + Qui	0,077	0,467	0,96
(Qui + Cu(II)) + His	0,078	0,511	0,97
(Qui + His) + Cu(II)	0,066	0,409	0,98

Pode-se concluir que os dois modelos tanto de Langmuir quanto o de Freundlich, forneceram boas correlações com os dados experimentais, e se mostraram adequados aos dados de equilíbrio. 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). O modelo de Freundlich é baseado em uma equação empírica e a adsorção do soluto geralmente ocorre em sítios

ativos com níveis de energia heterógenos em uma superfície heterogênea (SEN GUPTA; BHATTACHARYYA, 2011).

Isso indica que talvez a adsorção não esteja ocorrendo só na monocamada, e que além dos grupos amino que geralmente são responsáveis pela quelação dos íons metálicos cobre, podem existir outros grupos fazendo parte da adsorção.

A capacidade máxima de adsorção da quitosana em relação aos íons cobre, pode ser comparada com um estudo realizado por Ngah e Fatinathan (2008) onde ele também utiliza esferas de quitosana para adsorção de cobre. A capacidade máxima encontrada por Ngah e Fatinathan (2008) foi superior a encontrada neste estudo. Isso se deve ao fato de que no estudo realizado por Ngah e Fatinathan (2008) as esferas possuíam um diâmetro menor do que as esferas que foram utilizadas neste trabalho. A redução do tamanho da esfera proporciona um aumento na área superficial, permitindo uma maior eficiência na remoção dos íons cobre.

A constante , n , do modelo de Freundlich indica o favorecimento da adsorção. Se o valor de n for menor que 1, a intensidade de adsorção é favorável em todo o intervalo de concentração usado, porém, um valor de n maior que 1, significa que a adsorção é favorável somente em altas concentrações. A intensidade de adsorção n para todos os sistema estudados foi menos que 1, indicando que a adsorção é favorável no intervalo de concentração usado neste experimento (NGAH; FATINATHAN, 2008).

O parâmetro da isoterma de Langmuir, $Q_{m\acute{a}x}$ (mmol/ g de quitosana seca) representa a capacidade máxima de adsorção do adsorvente. A adição de histidina no sistema ocasiona um decréscimo no $Q_{m\acute{a}x}$, isso nos leva a hipótese de que a histidina esteja competindo com a quitosana pelos íons metálicos cobre, diminuindo dessa forma a capacidade de adsorção das esferas de quitosana. A constante de equilíbrio b representa 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 com o adsorvato. Pode-se observar que o valor de b aumenta com a adição de histidina, o que significa que a histidina remanescente na matriz promove um aumento na força de interação do cobre com a quitosana. Um acréscimo no parâmetro de interação b deveria

aumentar a capacidade máxima de adsorção, mas o que se observa é o contrário, ocorre uma diminuição na capacidade de adsorção.

O parâmetro R_L indica se o sistema é ou não favorável a adsorção. Foram calculados os valores de R_L , para os quatro sistemas estudados, seus respectivos resultados são mostrados na Tabela 4.6. A equação usada para o cálculo foi a Equação 2. Através da Tabela 4.6 observa-se que todos os valores encontrados se mantiveram entre 0 e 1 mostrando que todos os sistemas são favoráveis a adsorção. Outro ponto observado é que quando a concentração inicial de íons cobre é de 0,09 mmol/L os valores de R_L se aproximam de 1 denotando que para concentrações abaixo deste valor os sistemas estudados tendem a ser desfavoráveis para adsorção. Enquanto que em concentrações mais altas os valores de R_L tendem a se aproximar de 0 apontando sistemas irreversíveis. Portanto pode-se concluir que o sistema (Qui + His) + Cu(II) com concentração de 4,56 mmol/L se mostrou o melhor sistema estudado.

Segundo um estudo realizado por Marti *et al.*, (2004), sobre as interações da histidina com o íon metálico cobre, aponta-se que o cobre realiza ligações covalentes, com átomos de nitrogênio do grupo NH_2 e/ou átomos de oxigênio do grupo COO^- , presentes na estrutura da histidina. Outro estudo também revela que dentre os aminoácidos existentes, a histidina é um dos ligantes mais fortes que se coordenam com metais, e exerce um papel importante na ligação de íons metálicos com proteínas. A histidina possui três ligantes com potencial para capturar íons metálicos, sendo eles, oxigênio carboxilato ($\text{O}_{\text{carboxil}}$), nitrogênio do grupo imida do imidazol (N_{im}) e o nitrogênio do amino (N_{am}) (DESCHAMPS, 2005). Com esta informação, pode-se concluir que a histidina possa estar competindo com a quitosana pelos íons cobre, pois em sua estrutura se encontram grupos funcionais com grande potencial para captura de cobre. Ainda assim, a capacidade máxima de adsorção da quitosana não mostrou um drástico decréscimo, mostrando que mesmo na presença de histidina, a quitosana se mostra como um poderoso quelante de metais e a adsorção continua a ocorrer neste biopolímero.

Tabela 4.6 - Valores do parâmetro R_L , para os sistemas Qui + Cu(II), (Cu(II) + His) + Qui, (Qui + Cu(II)) + His, (Qui + His) + Cu(II).

Concentração Inicial de Cu(II) (mmol/l)	Valores de R_L			
	Qui + Cu(II)	(Cu(II) + His) + Qui	(Qui + Cu(II)) + His	(Qui + His) + Cu(II)
0,09	0,92	0,89	0,91	0,85
0,18	0,85	0,82	0,84	0,75
0,27	0,80	0,75	0,79	0,67
0,28	0,79	0,74	0,78	0,66
0,45	0,70	0,64	0,69	0,55
0,75	0,58	0,52	0,57	0,42
2,20	0,32	0,27	0,31	0,20
2,99	0,26	0,21	0,25	0,15
3,93	0,21	0,17	0,20	0,12
4,56	0,19	0,15	0,18	0,11

4.1.5 Isoterma de adsorção utilizando o peptídeo β A

Depois de concluídos e analisados os experimentos relacionados com a histidina, decidiu-se por fazer uma isoterma com o peptídeo β A visando observar o comportamento da adsorção. Através das análises feitas, observou-se que o equilíbrio do sistema independe da ordem que a histidina é adicionada ao sistema. Logo, optou-se por realizar a isoterma adicionando-se o peptídeo antes do sistema Qui+Cu(II) entrar em equilíbrio, ou seja, o sistema analisado foi (Cu(II) + β A) + Qui, e a quantidade de β A

adicionada ao sistema foi a mesma dos experimentos realizados com histidina, 100 μ M. A isoterma pode ser vista na Figura 4.12.

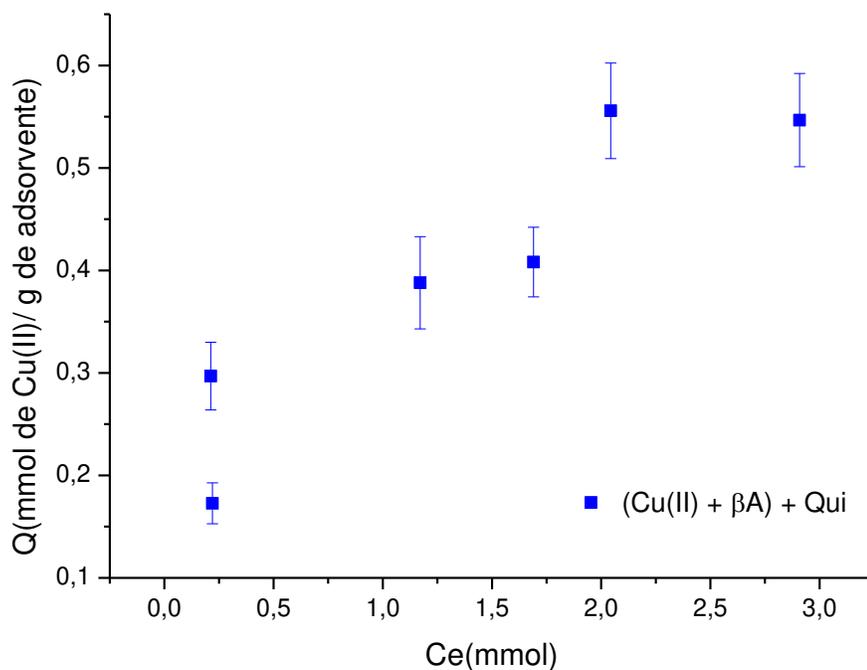


Figura 4.12 - Isoterma de adsorção do sistema (Cu(II) + β A) + Qui.

Confrontando-se a isoterma do sistema (Cu(II) + β A) + Qui com a isoterma do sistema Qui+Cu(II) obtida neste trabalho, observa-se que a capacidade de adsorção diminuiu, mas as esferas de quitosana continuam com capacidade de adsorver íons cobre, mesmo na presença do peptídeo β A.

Comparando-se os resultados obtidos da isoterma envolvendo a histidina com a isoterma envolvendo o peptídeo β A, também pode-se dizer que não existe muita diferença em relação à capacidade de adsorção das esferas de quitosana. Os resultados se assemelharam bastante, sendo a capacidade máxima de adsorção para o sistema (Cu(II)+His) + Qui de 0,54 mmol de Cu(II)/ g de adsorvente, enquanto que para o sistema (Cu(II) + β A) + Qui foi de 0,55 mmol de Cu(II)/ g de adsorvente. Através de um levantamento da porcentagem de histidina que existe no peptídeo β A empregada neste experimento, concluiu-se que somente 5% dos 100 μ M de β A adicionados são efetivamente

histidina. Entretanto, a metodologia utilizada nos experimentos não nos permite separar o cobre livre em solução, daquele ligado com His ou β A. O que pode-se concluir com este resultado, é que a quitosana tem a mesma tendência em adsorver cobre tanto em presença de His ou β A, nas condições estudadas neste trabalho.

Vale ressaltar que existe a possibilidade da formação de dímeros e oligômeros nas condições empregadas neste experimento, ou seja, o peptídeo β A pode ter desenvolvido sua forma agregada.

4.2 Caracterização das esferas porosas de quitosana antes e após adsorção de íons cobre e na presença de histidina

4.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e diâmetro médio das esferas

Com a finalidade de caracterizar o bioadsorvente usado neste trabalho, foram feitas medições para obtenção do diâmetro médio das esferas de quitosana. O *software* ImageJ[®] foi usado para tal análise, e o resultado encontrado foi $3,78 \pm 0,014$ mm.



Figura 4.13 - Aspecto macroscópico das esferas porosas de quitosana.

A morfologia da superfície das esferas porosas de quitosana também foi analisada, usando-se microscopia eletrônica de varredura, que pode ser vista na Figura 4.14.

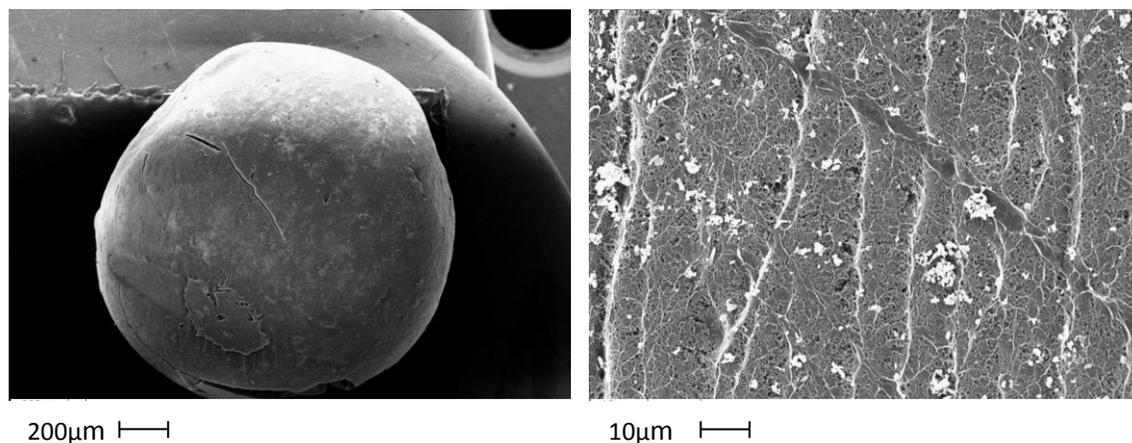


Figura 4.14 - Microscopia eletrônica de varredura das esferas liofilizadas de quitosana.

Pode-se observar através da Figura 4.14, que a superfície das esferas de quitosana apresenta irregularidades e rugosidade com a existência de poros. Há a presença de alguns pontos brancos, que se devem a resquícios de sais de NaOH que não foram removidos após a lavagem com água destilada.

O diâmetro médio das esferas de quitosana após a adsorção de íons cobre e adição de histidina também foi calculado pelo *software* ImageJ. Os diâmetros encontrados para cada sistema seguem na Tabela 4.7.

Tabela 4.7 – Diâmetro médio e desvio - padrão das esferas de quitosana após adsorção de íons cobre e adição de histidina.

	Qui+Cu(II)	(Qui + Cu(II)) +His	(Cu(II) + His) + Qui	(Qui + His) + Cu(II)
Diâmetro Médio (mm)	4,62±0,19	4,10 ± 0,10	5,07 ±0,03	4,79± 0,02

Na Figura 4.15, encontram-se as esferas de quitosana após a adsorção dos íons cobre, e após adição de histidina ao sistema. As esferas exibem uma coloração azul, devido à ligação do íon cobre com os grupos amino da quitosana (RHAZI *et al.*, 2002). Observa-se ainda que as esferas referentes ao sistema (Cu(II) + His) + Qui, apresentou uma coloração menos intensa em relação aos outros sistemas, mostrando uma possível interferência da histidina no meio. Neste caso as esferas de quitosana são adicionadas após o sistema cobre+histidina entrar em equilíbrio, ou seja, as ligações entre cobre e histidina já estão formadas, dificultando a adsorção de íons cobre pela quitosana.

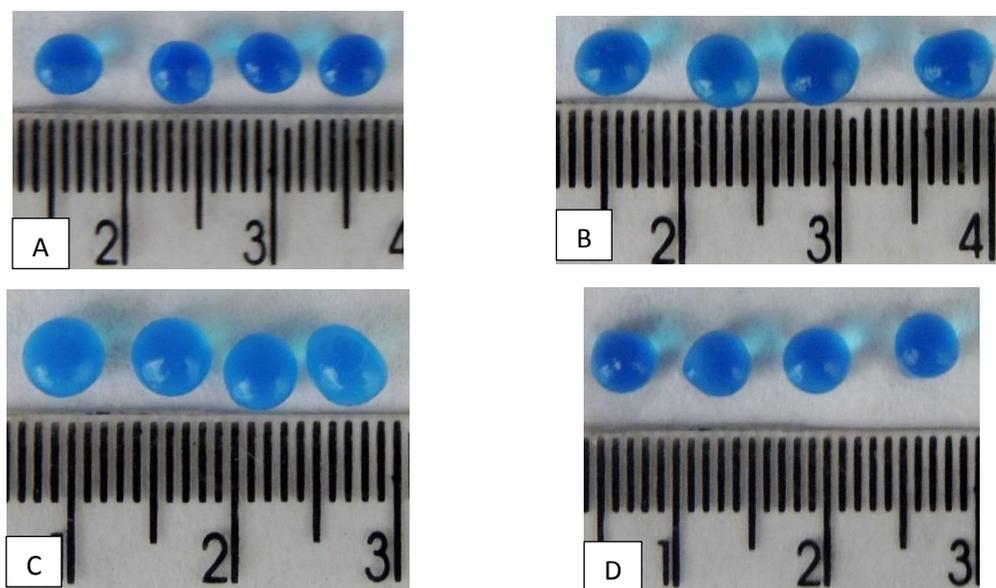


Figura 4.15 - Esferas porosas de quitosana após adsorção de cobre e adição de histidina: (A) Qui + Cu(II), (B) (Qui + Cu(II)) + His, (C) (Cu(II) + His) + Qui e (D) (Qui + His) + Cu(II).

A Figura 4.16 apresenta imagens de microscopia eletrônica de varredura para os sistemas estudados neste trabalho, Qui + Cu(II), (Qui + Cu(II)) + His, (Cu(II) + His) + Qui, (Qui + His) + Cu(II). Após a adsorção de íons cobre a superfície da esfera continua irregular e rugosa, mas com poros de morfologia diferente. Com a adição de histidina no sistema, a superfície se torna mais lisa e não podemos detectar poros. 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.

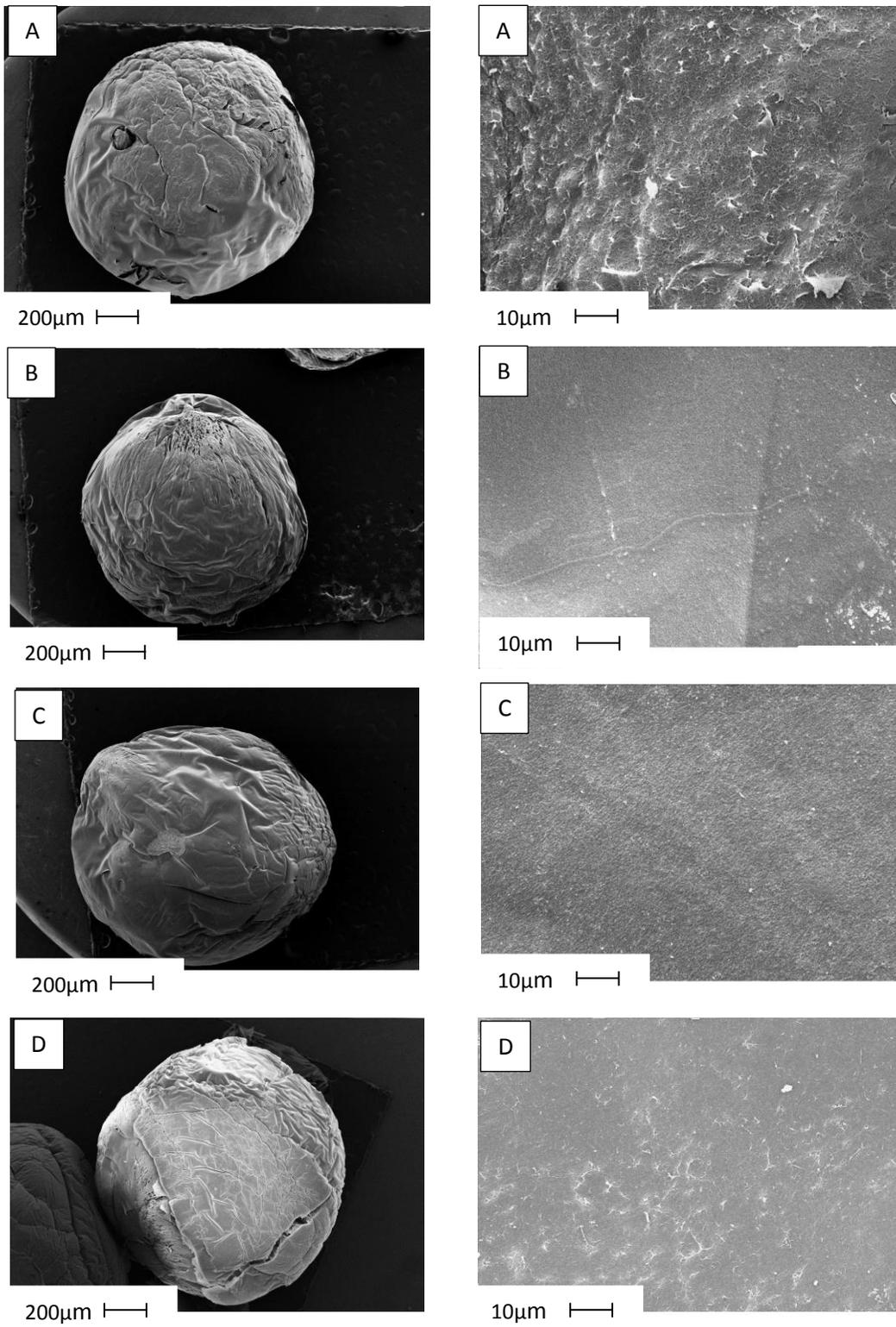


Figura 4.16 - Microscopia eletrônica de varredura das esferas porosas de quitosana para os seguintes sistemas: (A) Qui + Cu(II), (B) (Qui + Cu(II)) + His, (C) (Cu(II) + His) + Qui e (D) (Qui + His) + Cu(II).

4.2.2 Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDX)

Através da Figura 4.17, observa-se o mapeamento do elemento cobre, realizado pela técnica de EDX, mostrando uma distribuição uniforme na superfície das esferas de quitosana para todos as rotas estudadas.



Figura 4.17 - EDX das esferas porosas de quitosana para os seguintes sistemas: (A) Qui + Cu(II), (B) (Qui + Cu(II)) + His, (C) (Cu(II) + His) + Qui e (D) (Qui + His) + Cu(II).

Espectros de EDX também foram analisados de forma a se confirmar a presença de cobre na superfície das esferas de quitosana. Na Figura 4.18, temos os espectros de EDX para as amostras de quitosana referentes aos sistemas : Qui + Cu(II), (Qui + Cu(II)) + His, (Cu(II) + His) + Qui e (Qui + His) + Cu(II). Com estes espectros constatamos a presença de cobre em todas as amostras analisadas, confirmando que a adsorção de cobre na superfície das amostras ocorreu. Uma quantidade menor de cobre foi localizada nas

amostras em que histidina é adicionada ao sistema. Na Tabela 4.8, temos as porcentagens mássicas e em mol encontradas nas esferas de quitosana pelo espectro de EDX referentes ao elemento cobre, onde pode-se observar com mais clareza, uma diminuição da porcentagem de cobre, quando temos a adição de histidina no meio.

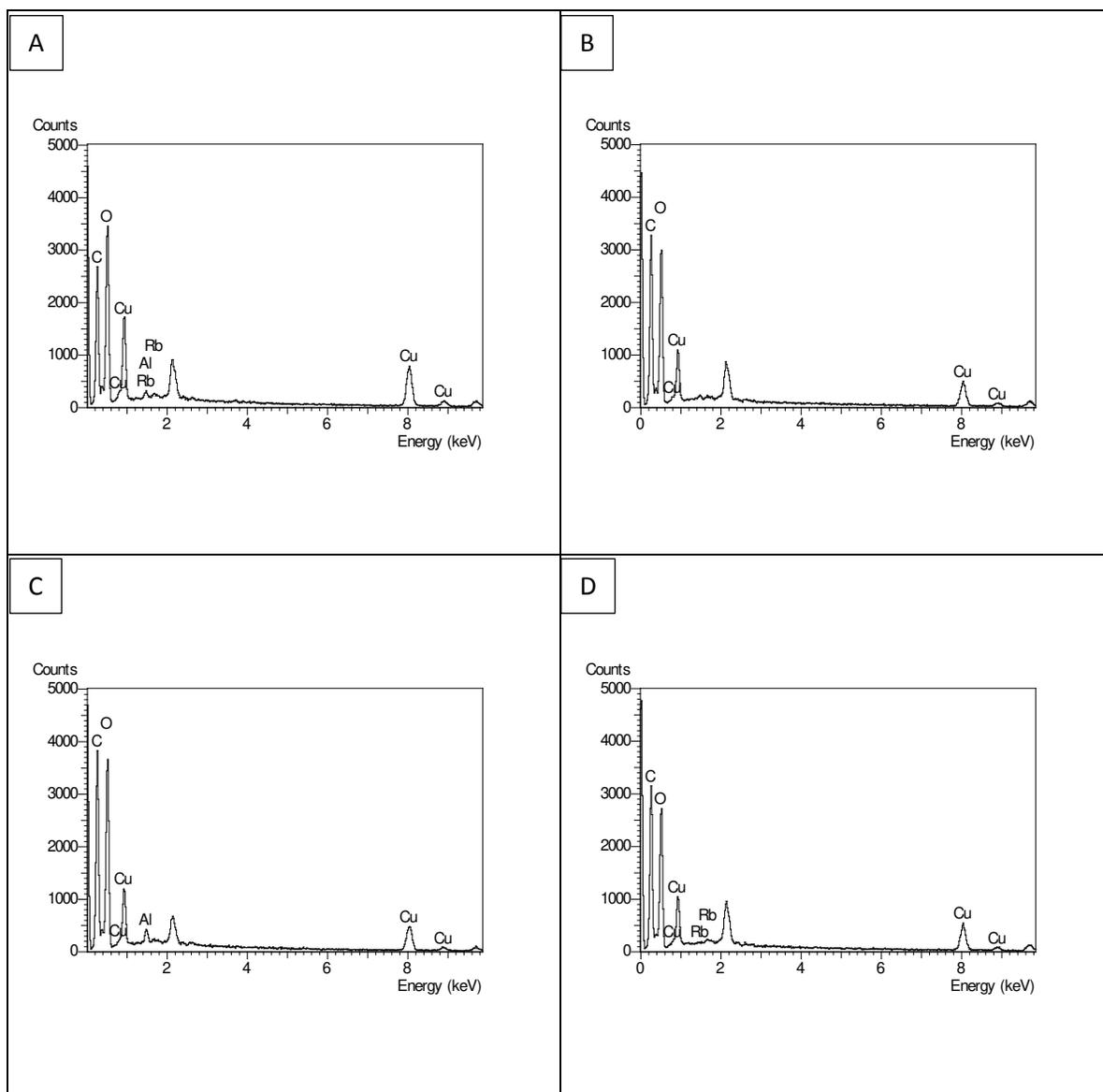


Figura 4.18 - Espectros de EDX obtidos para as esferas de quitosana nos diferentes sistemas estudados: (A) Qui + Cu(II), (B) (Qui + Cu(II)) + His, (C) (Cu(II) + His) + Qui e (D) (Qui + His) + Cu(II).

Tabela 4.8 - Porcentagem mássica e em mol do elemento cobre na superfície das esferas de quitosana, segundo medidas de EDX.

Sistemas	% em massa de Cu(II)	% em mol de Cu(II)
Quit + Cu(II)	16,32	4,15
(Quit + Cu(II)) + His	10,78	2,58
(Cu(II) + His) + Cu(II)	9,75	2,33
(Quit + His) + Cu(II)	11,74	2,73

4.2.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-ATR)

Para identificar as possíveis ligações que ocorrem entre quitosana e cobre, com e sem a presença de histidina, espectros de FTIR-ATR foram obtidos para Qui, Qui + His, Qui + Cu(II), (Qui + Cu(II)) + His, (Cu(II) + His) + Qui e (Qui + His) + Cu(II). Os respectivos espectros podem ser vistos nas Figuras 4.19 e 4.20.

Na Figura 4.19, observam-se as seguintes bandas de absorção de IR para a quitosana natural: 3330 cm^{-1} (referente aos estiramentos $-\text{OH}$ e $-\text{NH}$); 2854 cm^{-1} (referente ao estiramento $-\text{CH}$); 1633 cm^{-1} (referentes a grupos $-\text{NH}$); 1365 cm^{-1} (referente a deformação vibracional de $-\text{NH}$ a $-\text{NH}_2$); 1060 cm^{-1} (estiramento vibracional C-O do álcool primário) e 1025 cm^{-1} (referente aos grupos $-\text{C-O-C-}$) (GOULART, 2006; POPURI *et al.*, 2008).

Após a adsorção de cobre, os estiramentos referentes aos grupos amino e hidroxil da quitosana apresentaram um decréscimo em sua intensidade, evidenciando que durante a adsorção, os íons cobre se ligam preferencialmente a estes grupos. 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.

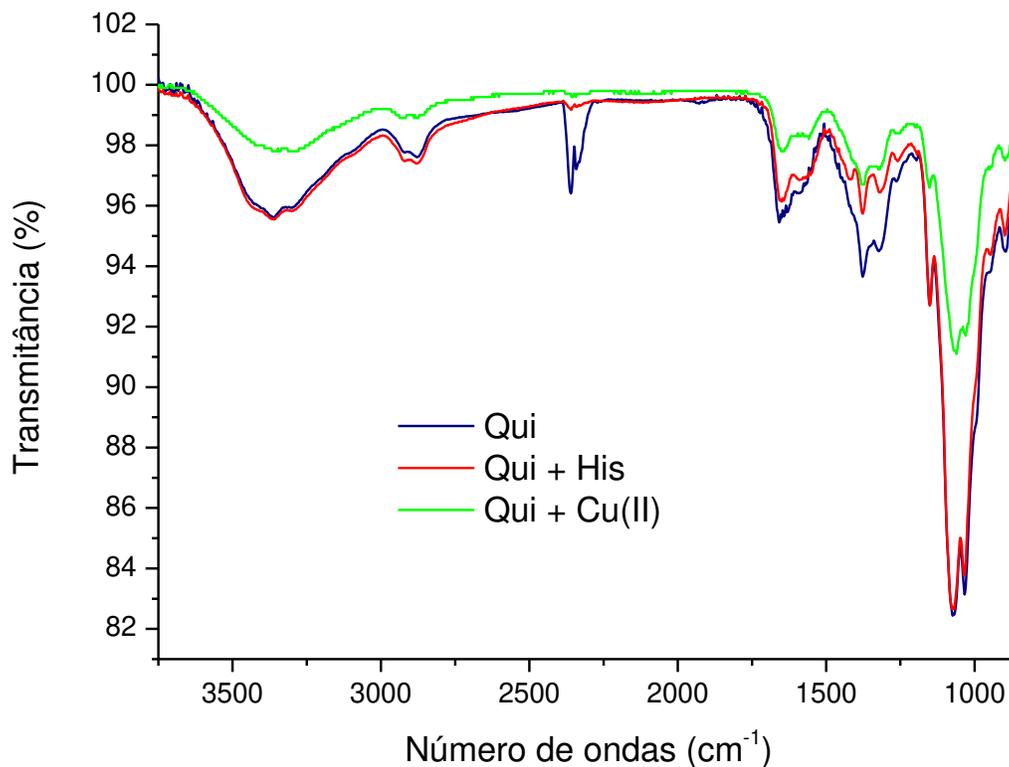


Figura 4.19 - Espectros de FTIR de esferas de Qui, esferas de Qui + His e esferas de quitosana após adsorção de cobre Qui + Cu(II).

Com a adição de histidina, observa-se um aumento na intensidade de vibração do estiramento referentes aos grupos C-O e -C-O-C-. Isso sugere que a histidina possa estar afetando as ligações com os átomos de oxigênio envolvidos na adsorção dos íons cobre.

Outro fato notado ocorre com o estiramento em 1365 cm^{-1} , correspondente aos grupos amino da quitosana: quando temos a adição de histidina, este estiramento também aumenta sua intensidade, mostrando que o grupo amino antes ligado ao cobre agora deve estar livre, indicando uma competição entre a quitosana e a histidina pelos íons cobre. Este fato se evidencia quanto temos o sistema (Qui + His) + Cu (II), onde a intensidade referente ao grupo -NH da quitosana se encontra mais elevada se comparada aos outros sistemas, indicando que a histidina está inserindo grupos nitrogenados na quitosana. 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 cm^{-1} aumenta, como se a histidina estivesse adicionando grupos amino na quitosana.

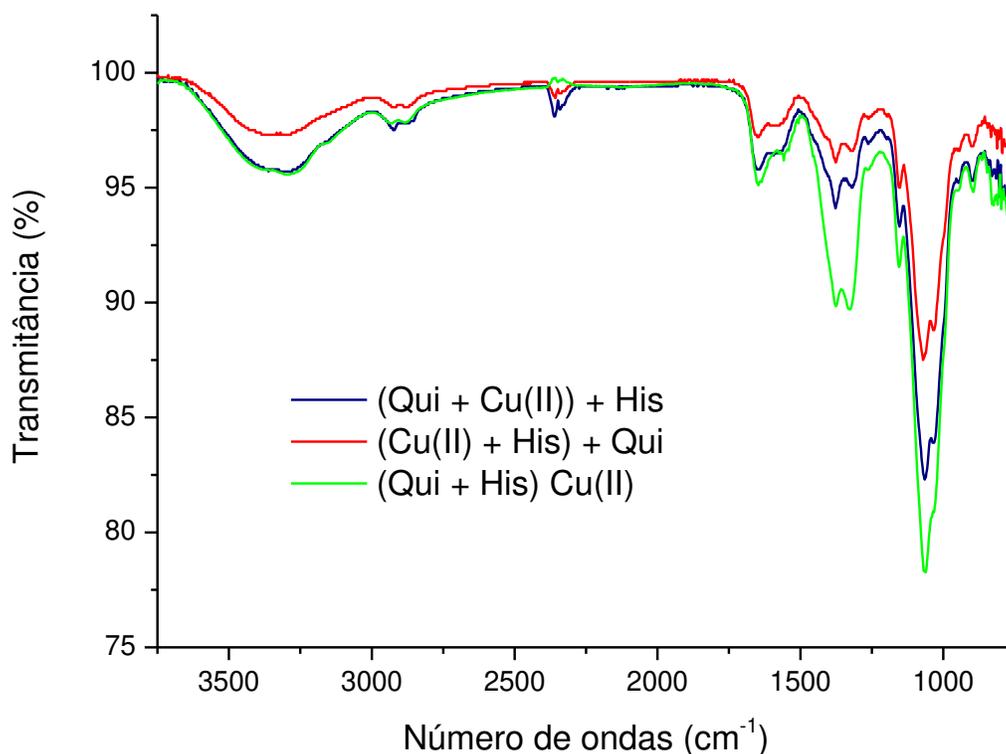


Figura 4.20 - Espectros de FTIR para os sistemas: (Qui + Cu(II)) + His, (Cu(II) + His) + Qui e (Qui + His) + Cu(II).

4.2.4 Difração de Raios – X (DRX)

A Figura 4.21, apresenta os difratogramas de Raios-x para as esferas de quitosana antes e após adsorção de cobre e adição de histidina. Pode-se observar que em todos os difratogramas existe um pico característico em $2\Theta = 19,2^\circ$.

De acordo com Saito *et al.*, (1987), a quitosana apresenta um arranjo atômico similar ao da quitina, sendo que os picos característicos são $2\Theta = 10,4^\circ$, $19,6^\circ$ e $21,4^\circ$ correspondendo aos equatoriais (200), (020) e (220) e (202) de reflexão. Este pico de $2\Theta =$

19,2° apresentado pela quitosana, indica uma região de cristalinidade. Entretanto, após adsorção de cobre à superfície das esferas quitosana, a intensidade deste pico decresce revelando uma estrutura mais amorfa após a adsorção.

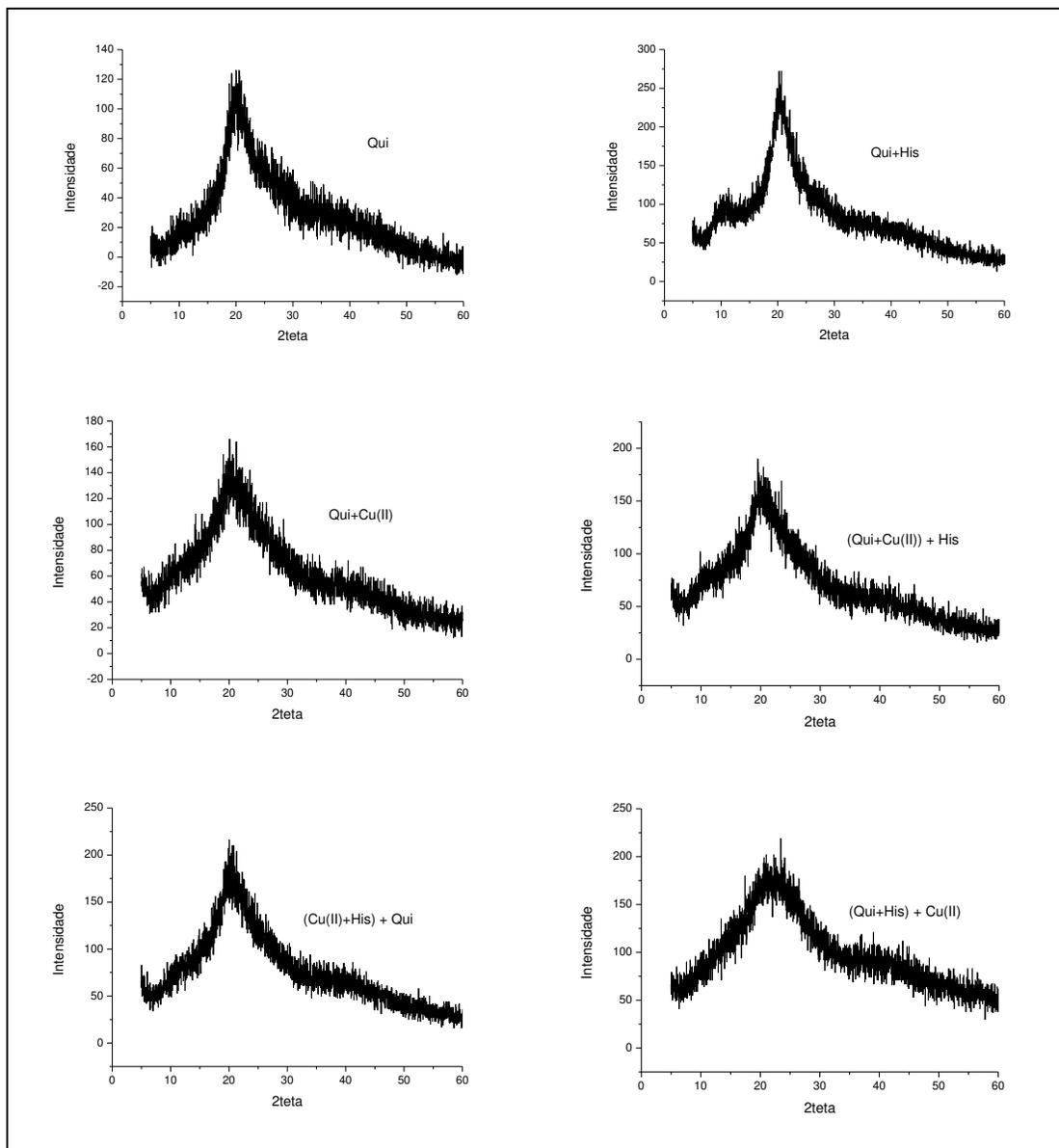


Figura 4.21 - Difractogramas de Raios-X para amostras de Qui, Qui + His , (Qui + Cu(II) + His), (Cu(II) + His) + Qui, Qui + Cu(II) e (Qui + His) + Cu(II).

O aparecimento de uma estrutura mais amorfa após a adsorção se deve a presença dos íons metálicos cobre entre as cadeias de quitosana. Segundo Vieira (2008), o

empacotamento das cadeias decresce com a adição dos íons cobre, levando a um aumento na natureza amorfa, ou seja, o metal tende a deixar a matriz das esferas de quitosana mais amorfas. Estes resultados estão de acordo com os difratogramas encontrados por Vieira (2008) e Albarelli (2009). Este comportamento também pode ser observado para os sistemas estudados (Qui + Cu(II) + His) e (Cu(II) + His) + Qui. Com o difratograma da amostra de Qui+His, observa-se que a histidina proporciona um aumento na cristalinidade das esferas de quitosana, e após a etapa de adsorção o sistema (Qui + His) + Cu(II), também se torna mais amorfo se comparado com o sistema Qui + Cu(II).

4.2.5 Estrutura Fina Estendida de Absorção de Raios-X (EXAFS)

As análises de EXAFS foram feitas em duplicatas para as amostras padrões, e em quadruplicatas para as amostras testadas. Após a realização das isotermas pode-se perceber a existência de uma única forma de equilíbrio que independe da ordem de adição da histidina no sistema. Portanto, nesta análise foram testados somente dois sistemas, Cu(II) + Qui e (Cu(II) + His) + Qui. O tratamento dos dados foi feito através do software Athena® e os gráficos dos espectros brutos $\mu(E)$, e os espectros transformados em espaço real (transformada de Fourier), para as esferas de quitosana complexadas com cobre com e sem histidina são mostradas na Figura 4.22.

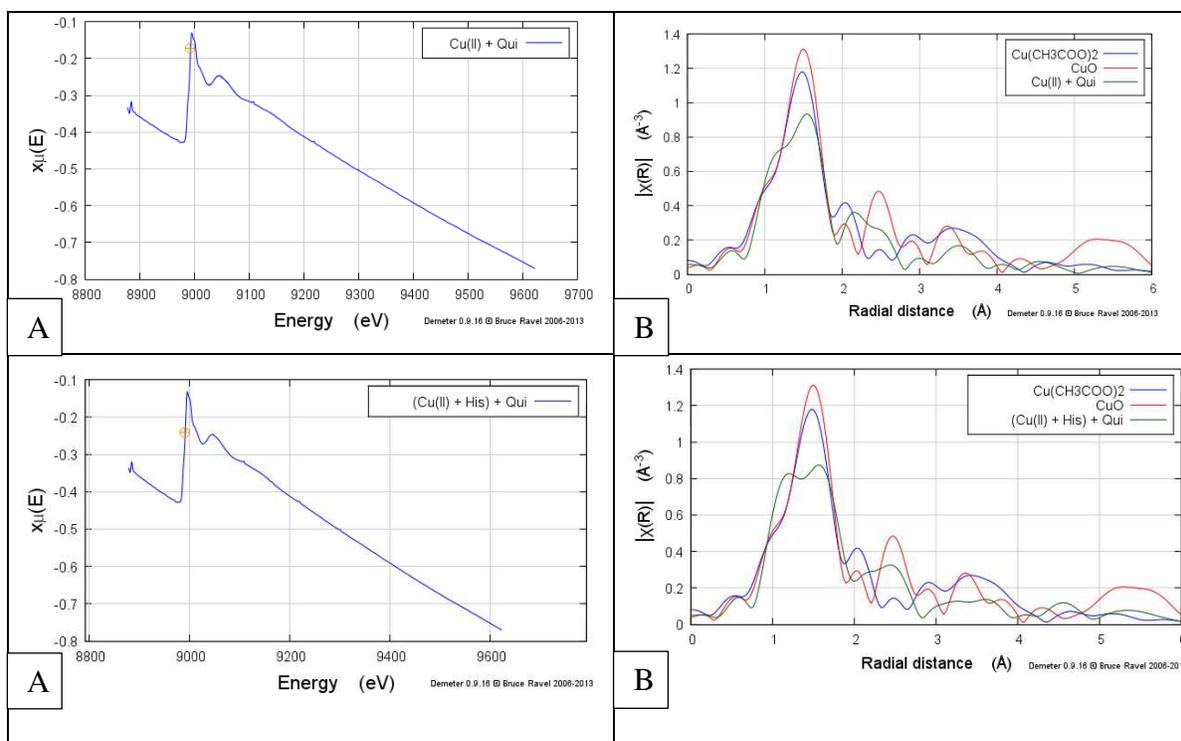


Figura 4.22 - Espectros de EXAFS.

Através da literatura sabemos que a absorção da borda K do metal Cu, ocorre á energia de 8987 eV. Os valores experimentais encontrados para as bordas de absorção, que são representados por picos ou saltos, foram de 8995.32 e 8995.61 eV, respectivamente para os sistemas Cu(II) + Qui e (Cu(II) + His) + Qui, correspondente a parte A da Figura 4.22. Este salto ou pico já era esperado, confirmando a presença de cobre nas amostras analisadas. Os espectros mostrados na parte A das amostras estudadas nesta técnica são essencialmente idênticos. Na parte A temos um pico próximo a 9000 eV correspondente a borda de absorção K do metal Cu já comentado anteriormente. Após este pico, observamos outro, localizado entre as 9000 e 9100 eV que esta relacionado, principalmente, ao espalhamento múltiplo dos átomos de oxigênio sobre seus vizinhos mais próximos. Observando-se os sistemas analisados, não existe nenhuma diferença em relação a posição e/ou intensidade sugerindo que estas apresentam o mesmo arranjo nos poliedros de coordenação (NETTO, 2001).

O sinal de EXAFS extraído corresponde à soma das contribuições de diferentes camadas atômicas. A separação do sinal proveniente de cada camada é feita através da

transformada de Fourier que pode ser vista na parte B da Figura 4.22. A transformada de Fourier fornece uma representação da distribuição dos átomos em função das distâncias r . Na transformada de Fourier, cada pico está centrado em uma distância r_i correspondente à i ésima esfera de coordenação (NETTO, 2001). Foram utilizados dois compostos padrões, óxido de cobre e acetato de cobre. Para o óxido e o acetato de cobre observam-se três picos principais em 1,5, 2,5 e 3,3Å, onde o primeiro é referente à primeira esfera de coordenação relacionada com a ligação do cobre com o oxigênio (Cu-O), a segunda se refere a ligação tipo metal-metal (Cu-Cu) e a terceira tem o tipo de ligação (Cu-O-Cu) (PARSONS *et al.*, 2002).

O pico que aparece em 1,5 Å, além de estar relacionado com ligações do cobre com o oxigênio, também pode estar relacionado com as interações de cobre com nitrogênio e este pico aparece para a amostra Cu(II) + Qui, e (Cu(II) + His) + Qui, com isso pode-se dizer que a adsorção esteja ocorrendo através dos grupos amino e grupos hidroxila da quitosana. (BRIGATTI *et al.*, 2004; PARSONS *et al.*, 2002). Através da Figura 4.23, observa-se que após a adição de histidina no sistema há uma mudança qualitativa do sinal emitido na região de 1,5 Å, que se intensifica mais na direção da primeira esfera de coordenação relacionada com a ligação Cu-O. Indicando uma tendência à redução da distância de coordenação média, que poderia ser induzida, por exemplo, através das novas interações do cobre com grupos contendo nitrogênio.

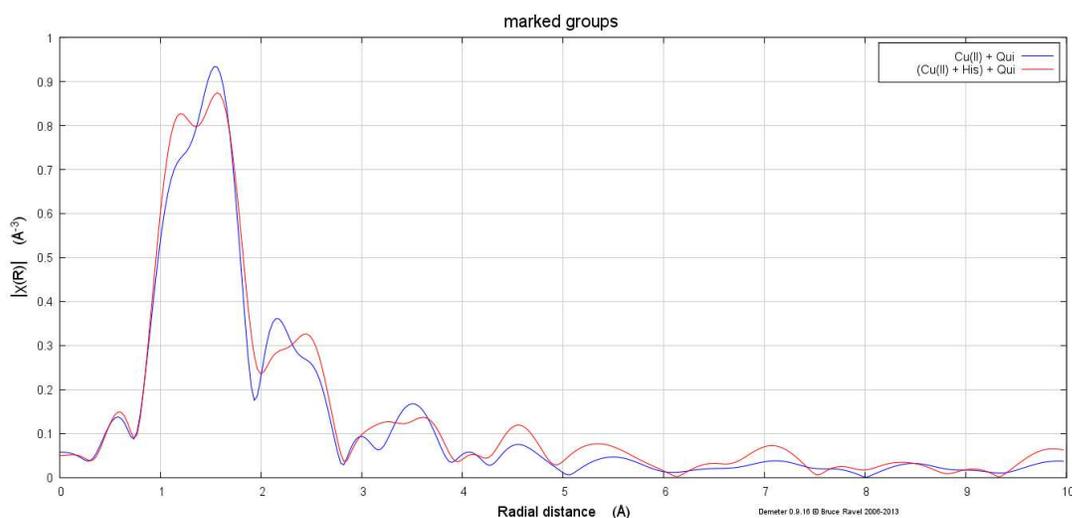


Figura 4.23 - Espectros de EXAFS para os sistemas, Qui + Cu(II) e (Cu(II) + His) + Qui.

4.2.6 Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo (SAXS)

Além do sistema envolvendo histidina, nesta análise fez-se uso do peptídeo β A. Desta forma, foram analisados os seguintes sistemas: Qui, Qui + Cu(II), (Cu(II) + β A) + Qui e (Cu(II) + His) + Qui. Para permitir o uso da análise foram utilizadas nanopartículas de quitosana ao invés das esferas de quitosana, pois o porta-amostra não suportava as esferas de quitosana. Outro sistema que também foi analisada foi o sistema envolvendo somente Cu(II) e β A, infelizmente não foi possível a obtenção destes dados pois a concentração de β A exigida para um bom sinal era muito alta, o que inviabilizou o experimento. Os dados do espalhamento de luz das amostras se encontram na Figura 4.24 que mostra a relação entre a intensidade de espalhamento $I(q)$ e o módulo do vetor de espalhamento Q . O tratamento dos dados foi feito pelo software Sasfit®. Observa-se que a intensidade de espalhamento diminui com a adsorção de cobre nas nanopartículas de quitosana e posterior adição de β A, já em relação a adição de His esse espalhamento aumenta. A concentração de His utilizada nestes experimentos foi muito maior que a concentração de β A, o que pode levar a um aumento no espalhamento.

Para encontrarmos o raio de giro, plota-se um gráfico de $\ln(Q) \times Q^2$, quando tem-se um sistema monodisperso e diluído, o gráfico apresenta uma reta na região de Q tendendo a zero, cuja inclinação fornece o valor do raio de giro. Um afastamento deste comportamento linear indica que o sistema estudado é do tipo polidisperso, isto é, não existe homogeneidade no tamanho das partículas. Em nenhuma das amostras analisadas neste trabalho foi observada a linearidade dos dados, indicando que trata-se de um sistema polidisperso (JUNIOR, 1999).

Os valores do raio de giro, apresentados na Tabela 4.9, foram encontrados extrapolando-se a região que apresenta maior linearidade. Observando-se os valores encontrados para o R_g , conclui-se que a diferença entre eles não é significativa, ou seja, a mudança que houve no tamanho das unidades espalhadoras não foi expressiva, levando a acreditar que o R_g das nanopartículas de quitosana não muda com a adsorção de cobre, e posterior adição de His ou β A. Tavares (2011), encontrou um raio de giro próximo de 10 nm^{-1} , utilizando nanopartículas de quitosana, valor muito próximo ao encontrado por este trabalho.

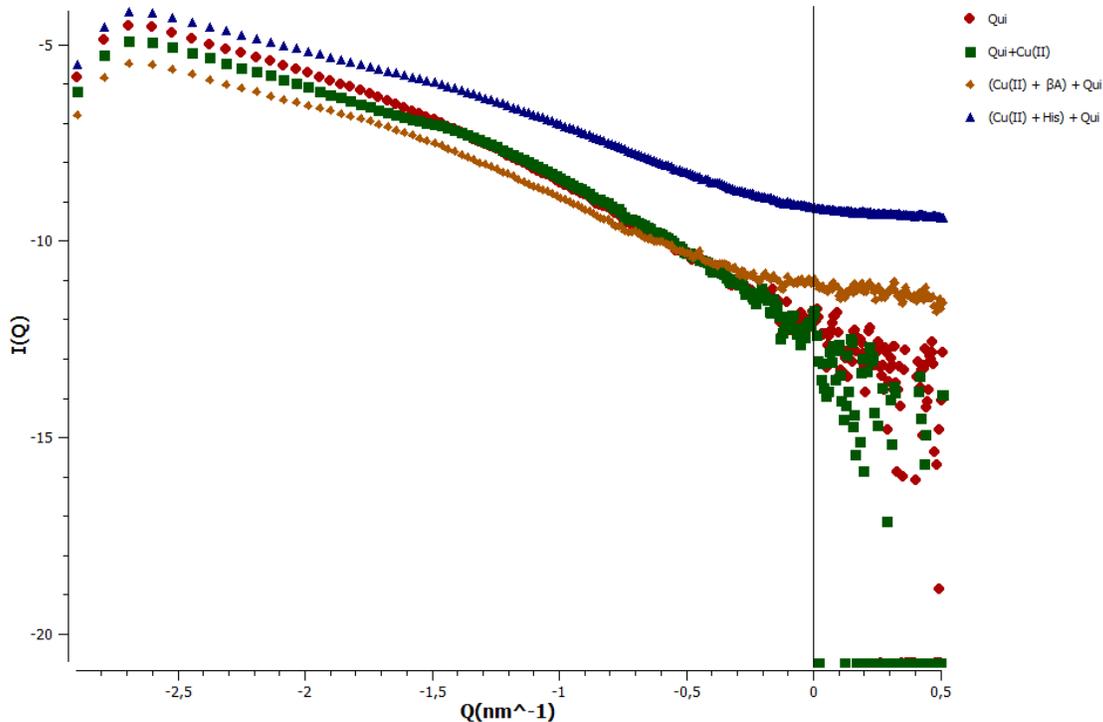


Figura 4.24 - Espalhamento da função de $I(Q)$ em função do espalhamento do vetor Q , para os sistemas Qui, Qui + Cu(II), (Cu(II) + β A) + Qui e (Cu(II) + His) + Qui.

Tabela 4.9 - Raio de Giro calculado a partir dos dados de SAXS

	Rg (nm⁻¹)
Qui	13,037 ± 1,349
Qui + Cu(II)	12,891 ± 1,356
(Cu(II) + βA) + Qui	11,914 ± 1,495
(Cu(II) + His) + Qui	11,393 ± 1,597

Outra característica que pode ser obtida a partir dos dados de espalhamento é o grau de enovelamento da partícula espalhadora. Para esta análise utilizam-se os gráficos de Kratky ($I \cdot Q^2 \times Q$). Essa representação vem da teoria de espalhamento por polímeros lineares, onde, cada tipo de conformação (cadeia Gaussiana ideal, cadeia enovelada compacta, cadeias flexíveis com comprimento de persistência etc.) pode ser identificado

pelo perfil característico do gráfico de Kratky associado (GLATTER; KRATKY, 1982). O gráfico de Kratky é apresentado na Figura 4.25, onde para uma partícula esférica, como uma proteína de domínio globular, a curva é descrita por um pico inicial bem definido seguido por uma linha de base próxima de zero mostrada pela curva em preto. Proteínas formadas por um domínio parcialmente desenovelado, ou adicionada de uma região flexível, apresenta um curva com um pico definido, mas com uma elevada linha de base, representado pela curva em cinza. Em partículas totalmente desenoveladas, a curva perde a forma gaussiana e a linha de base é extremamente elevada, como é mostrada pela curva em vermelho (GLATTER; KRATKY, 1982).

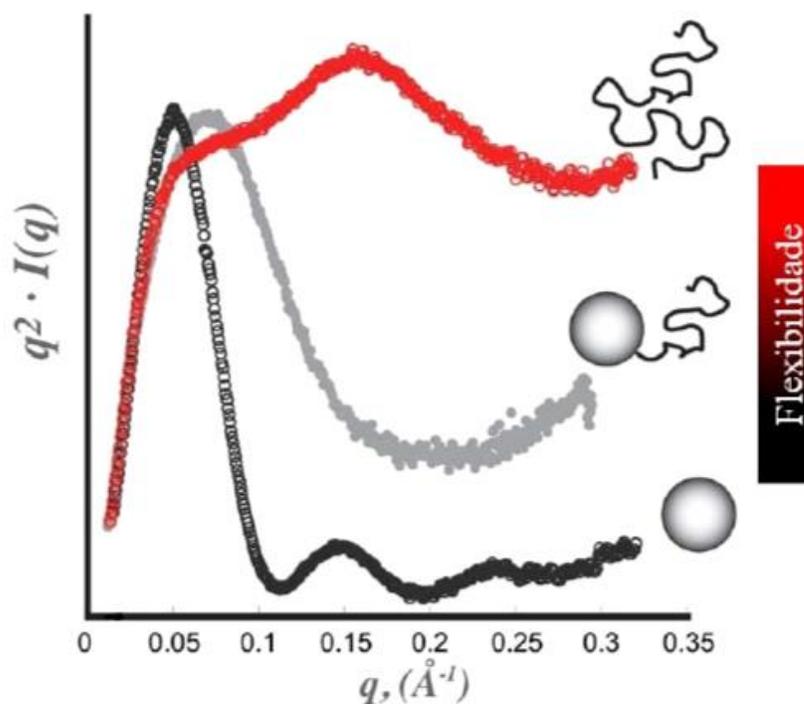


Figura 4.25 - Variação do gráfico de Kratky para uma proteína. (linha vermelha) Gráfico de Kratky para proteína globular compacta, (linha cinza) em estado intermediário ou de crescente desenovelamento e (linha preta) completamente desenovelada (RAMBO, 2011).

A Figura 4.26 e 4.27 e 4.28, apresenta o gráfico de Kratky para as amostras de Qui, Qui + Cu(II), (Cu(II) + β A) + Qui e (Cu(II) + His) + Qui respectivamente. O que podemos

observar é que inicialmente a nanopartícula de quitosana encontra-se compacta, mantendo sua conformação após a adsorção de íons cobre. Adicionando a β A no sistema percebemos que a curva de Kratky sofre uma pequena alteração tendendo a aumentar sua flexibilidade, ou seja, a β A provoca um desenovelamento parcial da quitosana. Ao adicionar a His no sistema temos o mesmo comportamento observado para a β A só que desta vez mais intensificado, indicando que as nanopartículas possivelmente se desenovelaram. Esta mudança de comportamento em relação a His e a β A, mais uma vez, deve estar acontecendo devido a concentração de His ser maior que a de β A, portanto, o sistema envolvendo His provavelmente esta interagindo mais com as nanopartículas de quitosana devido a sua alta concentração.

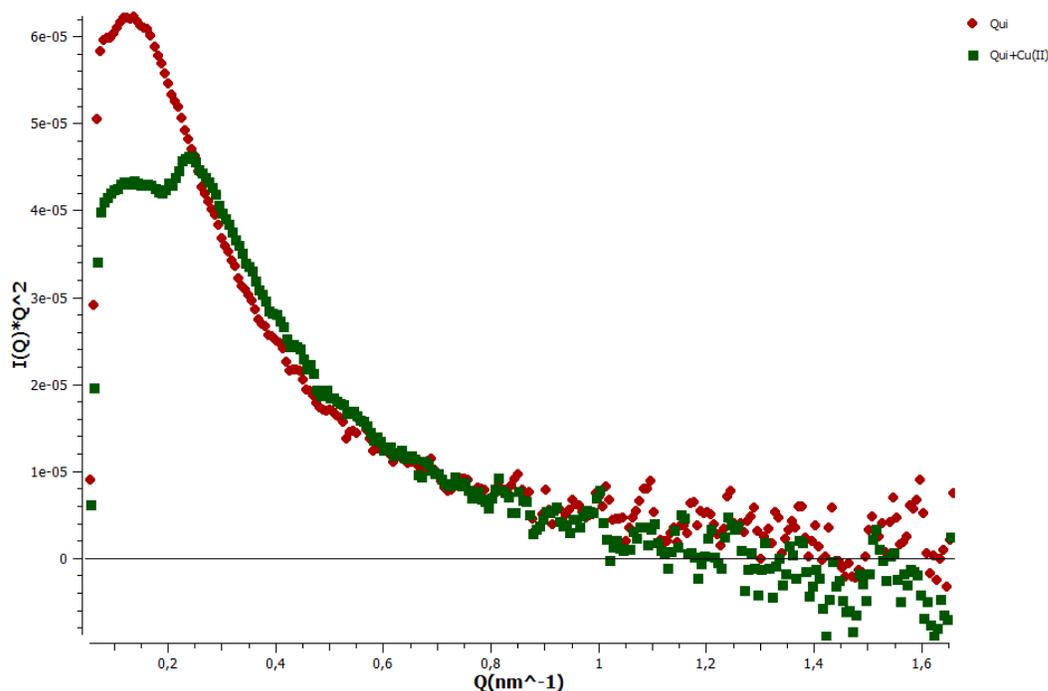


Figura 4.26 - Gráfico de Kratky. Comparação dos perfis de Kratky para Qui e Qui + Cu(II).

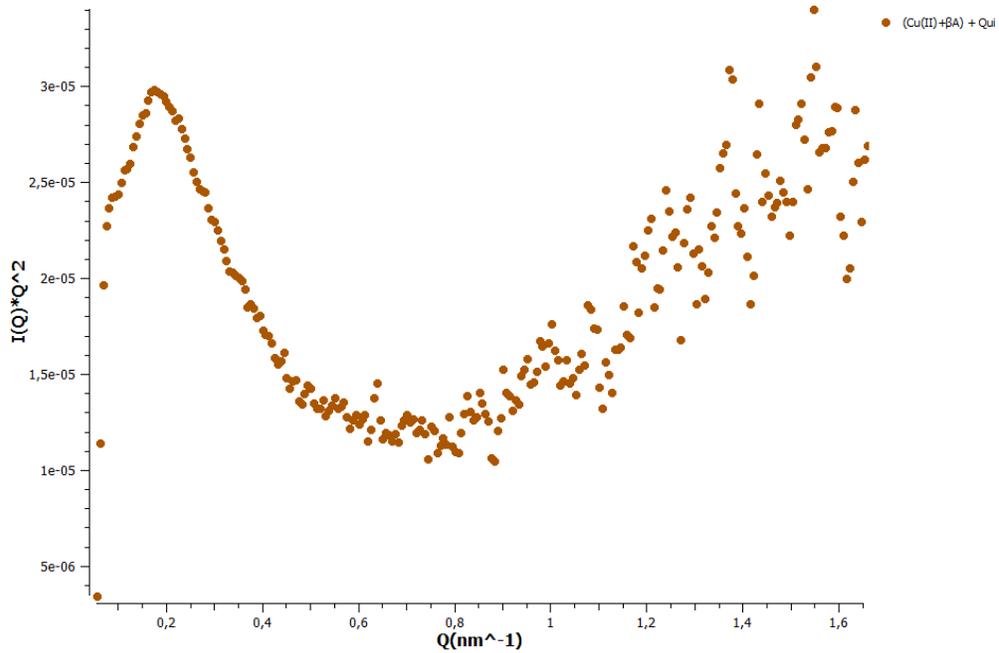


Figura 4.27 - Gráfico de Kratky. Comparação dos perfis de Kratky para (Cu(II) + βA) + Qui

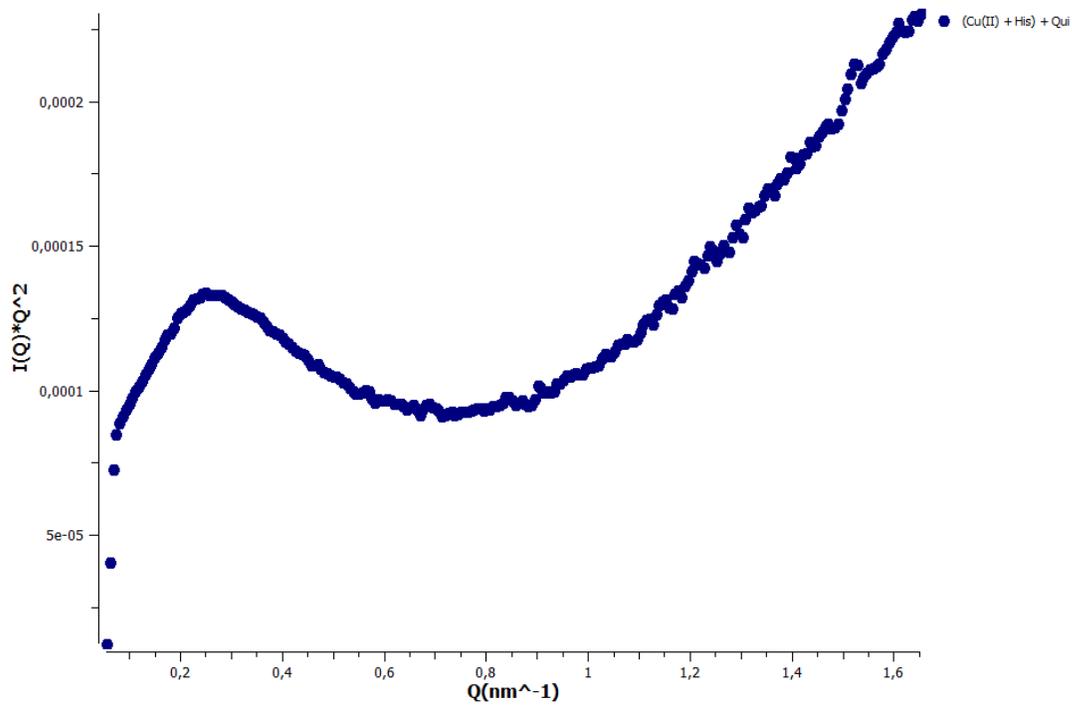


Figura 4.28 - Gráfico de Kratky. Comparação dos perfis de Kratky para (Cu(II) + His) + Qui

5 DISCUSSÃO GERAL

Pode-se observar através dos dados obtidos neste trabalho com as isotermas dos sistemas Cu(II) + Qui, (Cu(II) + His) + Qui, (Qui + His) + Cu(II) e (Cu(II) + Qui) + His que com a adição de histidina a capacidade de adsorção das esferas de quitosana sofre uma redução. Ngah *et al*, 2002 utilizando esferas de quitosana reticuladas, também constatou uma diminuição na capacidade de adsorção se comparada com a quitosana natural, ele relacionou isso com uma possível diminuição nos grupos amino livres, uma diminuição na acessibilidade aos sítios internos ou um possível impedimento nos sítios de adsorção.

Nesta pesquisa constatou-se através dos espectros de FTIR que a histidina interfere nas ligações com os átomos de oxigênio envolvidos na adsorção de íons cobre, e também nas ligações envolvendo os grupamentos amino, o que nos leva a acreditar que exista uma competição entre quitosana e histidina, deixando estes grupos que antes estavam ligados ao cobre, livres. Desta forma, diferentemente de Ngah *et al*, 2002 que atribui a diminuição da capacidade de adsorção das esferas de quitosana a uma diminuição nos grupos amino da quitosana; com este trabalho, observou-se que com a adição de histidina os grupos amino que anteriormente estavam ligados aos íons cobre, agora estão livres, diminuindo a capacidade de adsorção da quitosana.

Ainda em relação a análise de FTIR, observou-se que para o sistema (Qui + His) + Cu(II) a banda referente ao grupamento amino tem sua intensidade claramente elevada, comparando-se com o espectro de quitosana, isso indica que neste caso a histidina pode estar inserindo grupos amino na quitosana, isto deveria levar a um aumento na capacidade de adsorção de íons cobre, o que não é constatado pelas isotermas de adsorção. Isso deve ter ocorrido devido ao fato de que a adsorção para este sistema esteja ocorrendo através de outro mecanismo de adsorção.

Os dados de equilíbrio também mostraram através dos modelos, que a adsorção esteja ocorrendo não somente em monocamadas mas também em sítios heterogêneos e que não exista somente um grupamento responsável pela quelação dos íons cobre. De acordo com Guibal (2004), a presença de acetilglucosamina e glucosamina na estrutura da quitosana, contribui para existência de heterogeneidade no polímero. Outro parâmetro

encontrado pelos dados de equilíbrio foi que a ordem em que histidina é adicionada ao sistema não interfere no equilíbrio do mesmo.

Os dados cinéticos de adsorção indicaram que a etapa limitante em todos os sistemas estudados é a adsorção química revelando um tempo de equilíbrio de 100 horas, e mostrando que apesar do resultado das isotermas apontarem que a ordem de histidina não interfere no equilíbrio, a altas concentrações a ordem se torna importante, pois quando temos o sistema (Qui + His) + Cu(II) a capacidade de adsorção aumenta em relação aos demais sistemas estudados. Outro fator observado agora através dos modelos cinéticos, é que a taxa de adsorção se torna mais lenta com adição de histidina, com a competição de quitosana e histidina pelos íons cobre, ocorre um retardamento na adsorção.

Comprovou-se, pelas análises de EDX, que na presença de histidina as esferas de quitosana tendem a adsorver menos cobre, de acordo com os resultados, a quantidade de cobre presente nas esferas de quitosana, provenientes dos sistemas em que histidina era adicionada foi menor. As análises de DRX mostraram que após a adsorção de íons cobre e adsorção de histidina na solução, ocorre um decréscimo em sua cristalinidade tornando-a mais amorfa. Em contrapartida, a amostra Qui + His, apresentou uma estrutura mais cristalina. De acordo com Kurita *et al.* (1979), uma diminuição na cristalinidade acarreta em melhorias nas propriedades de adsorção, devido a um aumento na acessibilidade aos sítios locais internos, tanto para moléculas de água como para os íons metálicos, portanto o que ocorre quando a histidina é adicionada ao sistema é o contrário, a matriz das esferas de quitosana se torna mais cristalina e mais empacotada, dificultando a permissividade dos íons metálicos aos sítios adsorptivos das esferas de quitosana, acarretando em uma diminuição da capacidade de adsorção.

As análises de EXAFS mostraram que após adição de histidina ocorreu uma mudança qualitativa relacionada a primeira esfera de coordenação referente a ligação de Cu-O, o que pode indicar novas ligações, mas agora com os átomos de nitrogênio. Com as análises de SAXS, observa-se que o R_g das nanopartículas de quitosana, se mantém praticamente o mesmo para os sistemas analisados. Um fator interessante que ocorre é que após adição de histidina e/ou βA no sistema as nanopartículas de quitosana tendem a se

desenovelar e tornarem-se mais flexíveis, este fator é evidenciado para o sistema em que histidina é adicionada.

Por fim, a isoterma realizada com o peptídeo β A, revelou um comportamento muito parecido com as curvas encontradas para as isotermas envolvendo histidina, e com isso verificou-se que a quitosana tem a tendência de adsorver cobre tanto em presença de His quanto β A, denotando ainda mais a capacidade da quitosana na quelação de íons metálicos.

O aumento do estresse oxidativo é amplamente aceito na literatura como um dos fatores no desenvolvimento e progressão da DA. Em um trabalho realizado por Khodagholi *et al.* (2010), utilizou a quitosana como um agente antioxidante, atuando na proteção contra espécies reativas de oxigênio $H_2O_2/FeSO^{4-}$ que induzem a morte de células neuronais, como resultado a quitosana não só protegeu os neurônios contra as espécies reativas de oxigênio como provocou um decréscimo na deposição do peptídeo β A. O uso da quitosana foi considerado como uma estratégia terapêutica auxiliar no combate as mortes de células neuronais na DA e em outras doenças relacionadas ao estresse oxidativo.

Como já citado neste trabalho, a histidina possui um anel imidazólico que se comporta de maneira eficaz na captura de Cu(II), os resíduos de histidina (His 6, His 13 e His 14) contidos no peptídeo β A são cruciais na ligação do íon metálico e agregação da β A. Estes resíduos contidos em peptídeos, podem se ligar a íons metálicos como cobre e ativar o H_2O_2 para formar as espécies reativas de oxigênio responsáveis pela morte celular (GAGGELLI, 2003). Em vista disto, e através dos resultados apresentados por este trabalho pode-se perceber que a quitosana atua como um bom quelante de íons metálicos especificamente o cobre, mesmo em presença de histidina quitosana teve um decréscimo de apenas 20% em sua capacidade de adsorção.

A permeabilidade da barreira hemato - encefálica (BHE) tem limitado vários estudos *in vivo*. Zhang e Wu (2009), exploraram o mecanismo de permeação de nanopartículas de quitosana conjugadas com β A através da BHE e avaliaram a imunogeneidade destas partículas. As nanopartículas demonstraram permeabilidade eficiente e imunogenicidade significativa foi observada. Jaruszewski *et al.* (2012) também estudaram a permeabilidade de nanopartículas de quitosana atravessarem a BHE,

desenvolvendo “*immuno-nanovehicles*” de quitosana revestidos por poli (ácido láctico-co-glicólico) e conjugado com um novo anticorpo anti- β A. Os “*immuno-nanovehicles*” mostraram ter uma grande aceitação pela BHE, além disso, a quitosana aumentou a estabilidade dos “*immuno-nanovehicles*”, assim transformando-os em veículos ideais para liberação de agentes terapêuticos para o tratamento de danos vasculares provocados pela β A.

Alguns agentes quelantes têm sido propostos pela literatura, para auxiliarem no combate a DA, um exemplo é o clioquinol, agente responsável pela quelação de Cu(II), que ainda se encontra em fase piloto, mostrando a sua habilidade de diminuir os níveis de β A (1 – 42) e melhorar a cognição em alguns pacientes (CHERNY *et al.*, 2001). Como já estudado por Khodagholi *et al.* (2010), a quitosana se mostrou um bom agente antioxidante diminuindo a deposição de β A e além do mais, é capaz de atravessar a BHE, o que torna possível seu uso. Neste trabalho observou-se através dos estudos com histidina e da isoterma envolvendo o peptídeo β A, a quitosana atuou como um efetivo agente quelante interferindo na ligação Cu(II) – β A, ainda que, os estudos não tenham sido realizados em condições fisiológicas, a quitosana pode vir a se tornar um ótimo auxiliar na diminuição de espécies reativas de oxigênio e deposição do peptídeo β A.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos por este trabalho pode-se entender melhor como ocorre a interação quitosana+cobre+histidina e concluir que na presença de histidina, ocorre uma competição pelos íons cobre entre quitosana e histidina, comprovado pelos resultados de equilíbrio e caracterizações realizados. Essa competição leva a uma diminuição na capacidade de adsorção da quitosana, apesar disso, ainda pode-se considera-lá um efetivo adsorvente. O mesmo foi observado quando empregado o peptídeo β A, em relação a capacidade de adsorção, mostrando que a quitosana pode exercer uma possível contribuição no controle e atenuação da doença de Alzheimer, pois se mostrou um poderoso agente quelante de íons cobre, mesmo na presença de β A e histidina.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestão para trabalhos futuros pode-se ressaltar:

- Realizar todos os experimentos, isotermas e cinéticas anteriormente realizados agora em condições fisiológicas (ph = 7,4 e T = 37°C).
- Estudar o efeito de outros íons metálicos na capacidade de adsorção da quitosana em presença de histidina, como zinco e ferro também envolvido nos fatores da DA.
- Estudar os fatores termodinâmicos que envolvem a adsorção de íons cobre pela quitosana, em presença de histidina.
- Diminuir o tamanho das esferas de quitosana, visando aumento da adsorção e diminuição do tempo de equilíbrio
- Estudar o efeito da reticulação das esferas de quitosana, na adsorção de íons cobre em presença de histidina.
- Através de mais caracterizações do complexo quitosana+cobre+histidina, propor um mecanismo para os sistemas estudados.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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 (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1985.

ALZAYDIEN, A.S.; MANASREH, W. Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies on the adsorption of phenol onto activated phosphate rock. **International Journal of Physical Sciences**, v.4, n.4, p.172-181, Apr 2009.

ASHLEY, C.A.; DONIACH, S. Theory of extended x-ray absorption edge fine structure (EXAFS) in crystalline solids. **Physical Review B**, v.11, n.4, p.1279-1288, 1975.

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, n.1, p.45-52, Mar 2011.

BABEL, S.; KURNIAWAN, T.A. Low-cost adsorbents for heavy metals uptake from contaminated water: a review. **J Hazard Mater**, v.97, n.1-3, p.219-43, Feb 28 2003.

BEAUCHEMIN, D.; KISILEVSKY, R. A method based on ICP-MS for the analysis of Alzheimer's amyloid plaques. **Anal Chem**, v.70, n.5, p.1026-9, Mar 1 1998.

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, Sep 1 2004.

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

BERNADÓ, 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.

BODEK, K. H. Potentiometric method for determination of the degree of acetylation of chitosan. In: Karnicki, Z.S. *et al.* **Chitin World**. Bremerhaven, Germany: Wirtschaftsverlag, p. 456-461, 1991.

BRIGATTI, M.F. *et al.* Characterization of Cu-complexes in smectite with different layer charge location: Chemical, thermal and EXAFS studies. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, 68, 781-788, 2004.

CASTELLANI, R. J. *et al.* Contribution of redox-active iron and copper to oxidative damage in Alzheimer disease. **Ageing Res Rev**, v. 3, n. 3, p. 319-26, Jul 2004.

CHECLER, F.; VINCENT, B. Alzheimer's and prion diseases: distinct pathologies, common proteolytic denominators. **Trends in Neurosciences**, v. 25, n. 12, p. 616-620, Dec 2002.

CHERNY, R. A. *et al.* Aqueous dissolution of Alzheimer's disease A β amyloid deposits by biometal depletion. **J Biol Chem**, v. 274, n. 33, p. 23223-8, Aug 13 1999.

CHERNY, R. A. *et al.* Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits β -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, Mar 2003.

CHO, Y. W. *et al.* Preparation and solubility in acid and water of partially deacetylated chitins. **Biomacromolecules**, v. 1, n. 4, p. 609-14, 2000.

CHU, K. H. Removal of copper from aqueous solution by chitosan in prawn shell: adsorption equilibrium and kinetics. **J Hazard Mater**, v. 90, n. 1, p. 77-95, Feb 14 2002.

COHEN, E. *et al.* Opposing activities protect against age-onset proteotoxicity. **Science**, v. 313, n. 5793, p. 1604-1610, Sep 2006.

- 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, Jan 2005.
- CRIST, R. H. *et al.* Nature of bonding between metallic-ions and algal cell-walls. **Environ Sci Technol**, v. 15, n. 10, p. 1212-1217, 1981.
- CURTAIN, C. C. *et al.* Alzheimer's disease amyloid- β binds copper and zinc to generate an allosterically ordered membrane-penetrating structure containing superoxide dismutase-like subunits. **J Biol Chem**, v. 276, n. 23, p. 20466-73, Jun 8 2001.
- DAS, N.; VIMALA, R.; KARTHIKA, P. Biosorption of heavy metals - An overview. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 159-169, Apr 2008.
- DESCHAMPS, P. *et al.* The saga of copper(II)-L-histidine. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 249, n. 9-10, p. 895-909, May 2005.
- DOMARD, A. pH and c.d. measurements on a fully deacetylated chitosan: application to CuII—polymer interactions. **Int J Biol Macromol**, v. 9, n. 2, p. 98-104, 1987.
- DONG, J. *et al.* Metal binding and oxidation of amyloid- β within isolated senile plaque cores: Raman microscopic evidence. **Biochemistry**, v.42, n.10, p.2768-2773, jan.2003.
- DONNELLY, P. S.; XIAO, Z.; WEDD, A. G. Copper and Alzheimer's disease. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, n. 2, p. 128-133, Apr 2007.
- DUTTA, P. K. *et al.* Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 63, n. 1, p. 20-31, Jan 2004.
- EROSA, M. S. D. *et al.* Cadmium sorption on chitosan sorbents: kinetic and equilibrium studies. **Hydrometallurgy**, v. 61, n. 3, p. 157-167, Aug 2001.
- FAY, M. J. *et al.* UNRAVELING EXAFS SPECTROSCOPY. **Anal Chem**, v. 60, n. 21, p. A1225-&, Nov 1 1988.
- FRIIS, N.; MYERS-KEITH, P. Biosorption of uranium and lead by *Streptomyces longwoodensis*. **Biotechnol Bioeng**, v. 28, n. 1, p. 21-28, 1986.

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

GABUZDA, D. *et al.* Inhibition of energy metabolism alters the processing of amyloid precursor protein and induces a potentially amyloidogenic derivative. **J Biol Chem**, v. 269, n. 18, p. 13623-8, May 6 1994.

GAGGELLI, E. *et al.* H-1 NMR studies of copper binding by histidine-containing peptides. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 41, n. 10, p. 877-883, Oct 2003.

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, Jun 2006.

GALUN, M. *et al.* Removal of metal-ions from aqueous-solutions by penicillium biomass - kinetic and uptake parameters. **Water Air and Soil Pollution**, v. 33, n. 3-4, p. 359-371, Apr 1987.

GEANKOPLIS, C.J. **Transport processes and unit operations**. 3rd Ed. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1993.

GLATTER, O.; KRATKY, O. **Small-angle X-ray Scattering**. Academic Press, London. 1982. 515 p.

GOULART, G.A.S. **Obtenção e caracterização de micropartículas de quitosana contendo papaína**. 2006. 126f.. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

GUIBAL, E. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review. **Separation and Purification Technology**, v. 38, n. 1, p. 43-74, Jul 15 2004.

GUINIER, A.; FOURNET, G. **Small Angle Scattering of X-Rays**. New York, Wiley, 1955. 268p.

HALL, K. R. *et al.* Pore and solid-diffusion kinetics in fixed-bed adsorption under constant-pattern conditions. **Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals**, v. 5, n. 2, p. 212-&, 1966.

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, Feb 2000.

HOU, L.; ZAGORSKI, M.G. NMR reveals anomalous copper (II) binding to the amyloid A β peptide of Alzheimer's disease. **Journal american chemical society**, v. 128, n.29, p. 9620-9621, jul. 2006.

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

JARRETT, J. T. *et al.* The carboxy terminus of the β amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Biochemistry**, v. 32, n. 18, p. 4693-7, May 11 1993.

JARUSZEWSKI, K. M. *et al.* Chitosan enhances the stability and targeting of immunonanovehicles to cerebro-vascular deposits of Alzheimer's disease amyloid protein. **Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine**, v. 8, n. 2, p. 250-260, Feb 2012.

JUNIOR, D.C. **Desenvolvimento de célula fotovoltaica utilizando polianilina e eletrólito polimérico**. 1999. 101 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

KAMINSKI, W.; MODRZEJEWSKA, Z. Application of chitosan membranes in separation of heavy metal ions. **Separation Science and Technology**, v. 32, n. 16, p. 2659-2668, 1997.

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

KHODAGHOLI, F. *et al.* Chitosan prevents oxidative stress-induced amyloid beta formation and cytotoxicity in NT2 neurons: involvement of transcription factors Nrf2 and NF-kappa B. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 337, n. 1-2, p. 39-51, Apr 2010.

KIENZLE-STERZER, C. *et al.* Dilute solution behavior of a cationic polyelectrolyte. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 27, n. 11, p. 4467-4470, 1982.

KJM, K. M. *et al.* Properties of chitosan films as a function of pH and solvent type. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 3, p. E119-E124, Apr 2006.

KRATOCHVIL, D.; VOLESKY, B. Advances in the biosorption of heavy metals. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 7, p. 291-300, Jul 1998.

KUMAR, M. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers**, v. 46, n. 1, p. 1-27, Nov 2000.

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.

KURITA, K. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. **Mar Biotechnol (NY)**, v. 8, n. 3, p. 203-26, May-Jun 2006.

KURITA, K. *et al.* Studies on chitin .6. Binding of metal-cations. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 23, n. 2, p. 511-515, 1979.

KURITA, K. *et al.* Studies on chitin. IX. Crosslinking of water-soluble chitin and evaluation of the products as adsorbents for cupric ion. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 31, n. 5, p. 1169-1176, 1986.

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

LAZARIDIS, N. K.; ASOUHIDOU, D. D. Kinetics of sorptive removal of chromium(VI) from aqueous solutions by calcined Mg-Al-CO₃ hydrotalcite. **Water Res**, v. 37, n. 12, p. 2875-2882, Jul 2003.

LEE, P. A. *et al.* EXTENDED X-RAY ABSORPTION FINE-STRUCTURE - ITS STRENGTHS AND LIMITATIONS AS A STRUCTURAL TOOL. **Reviews of Modern Physics**, v. 53, n. 4, p. 769-806, 1981.

LOVELL, M. A. *et al.* Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. **J Neurol Sci**, v. 158, n. 1, p. 47-52, Jun 1998.

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, Sep 2000.

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, Nov 2004.

MCKAY, G. *et al.* 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, May 1989.

MONTEIRO, O.A., JR.; AIROLDI, C. Some Thermodynamic Data on Copper-Chitin and Copper-Chitosan Biopolymer Interactions. **J Colloid Interface Sci**, v. 212, n. 2, p. 212-219, Apr 1999.

MUZZARELLI, R. A. A. Natural chelating polymers: alginic acid, chitin and chitosan. **Oxford: Pergamon**, p.170-254, 1973.

NAJA, G. M. *et al.* Biosorption, Metals. In: (Ed.). **Encyclopedia of Industrial Biotechnology**: John Wiley & Sons, Inc., 2009.

NETTO, S.M. **Caracterização cristaloquímica da incorporação de íons cobre(II) em goethita (α - FeOOH) sintética**. 2001. 103 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

NEWVILLE, M. **Fundamentals of EXAFS**. Consortium for Advanced Radiation Sources, University of Chicago, Chicago, 2004.

NGAH, W. S. W. *et al.* 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, Jan 2002.

NGAH, W.S.W. *et al.* Equilibrium and kinetics studies of adsorption of copper (II) on chitosan and chitosan/PVA beads. **Int J Biol Macromol**, v. 34, n. 3, p. 155-161, 2004.

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 1998.

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, n. 1-3, p. 62-72, Sep 2008.

NO, H.K.; MEYERS, S.P. Preparation of chitin and chitosan. In: **Chitin Handbook**, MUZZARELLI, R.A.A.; PETER, M.G. 1997 (Grottamare: Atec Edizioni), p. 475-489.

OFOMAJA, A. E.; HO, Y. S. Effect of pH on cadmium biosorption by coconut copra meal. **J Hazard Mater**, v. 139, n. 2, p. 356-62, Jan 2007.

OGAWA, K. *et al.* X-ray study of chitosan transition-metal complexes. **Chemistry of Materials**, v. 5, n. 5, p. 726-728, May 1993.

OKUYAMA, K. *et al.* Molecular and crystal structure of hydrated chitosan. **Macromolecules**, v. 30, n. 19, p. 5849-5855, Sep 1997.

OPAZO, C. *et al.* Metalloenzyme-like activity of Alzheimer's disease β -amyloid. Cu-dependent catalytic conversion of dopamine, cholesterol, and biological reducing agents to neurotoxic H_2O_2 . **J Biol Chem**, v. 277, n. 43, p. 40302-8, Oct 2002.

OZCAN, A. *et al.* Kinetics, isotherm and thermodynamic studies of adsorption of Acid Blue 193 from aqueous solutions onto natural sepiolite. **Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 277, n. 1-3, p. 90-97, Apr 2006.

PARSONS, J. G. *et al.* Environmental and biological applications of extended X-ray absorption fine structure (EXAFS) and X-ray absorption near edge structure (XANES) spectroscopies. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 37, n. 2, p. 187-222, 2002.

PENICHE-COVAS, C. *et al.* The adsorption of mercuric ions by chitosan. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 46, n. 7, p. 1147-1150, 1992.

PINTO, L. D. **Estudo de complexos de cobre (II) com aminoácidos de interesse para a química do cérebro**. 2010. 149 f. Tese (Pós-graduação em Química) – Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro, 2010.

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, Jan 2008.

PUTNAM, C. D. *et al.* X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 40, n. 03, p. 191-285, 2007.

RAMBO, R.P.; TAINER, J.A. Characterizing flexible and intrinsically unstructured biological macromolecules by SAS using the Porod-Debye law. **Biopolymers**, v.95, n.8, p.559-71, Aug 2011.

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, Feb 2002.

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

RINAUDO, M. *et al.* Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. **Polymer**, v. 40, n. 25, p. 7029-7032, Dec 1999.

SAITO, H. *et al.* High-resolution solid-state carbon-13 NMR study of chitosan and its salts with acids: conformational characterization of polymorphs and helical structures as viewed from the conformation-dependent carbon-13 chemical shifts. **Macromolecules**, v. 20, n. 10, p. 2424-2430, 1987.

SANDFORD, P.A. Chitosan and Alginate: New Forms of Commercial Interest. **Polymer Preprints -- Papers Presented At The Boston, Massachusetts Meeting**, v. 31, n.1, p.628, 1990.

SCHLICK, S. Binding-sites of Cu^{2+} in chitin and chitosan - an electron-spin-resonance study. **Macromolecules**, v. 19, n. 1, p. 192-195, Jan 1986.

SEN GUPTA, S.; BHATTACHARYYA, K. G. Kinetics of adsorption of metal ions on inorganic materials: A review. **Adv Colloid Interface Sci**, v. 162, n. 1-2, p. 39-58, Feb 2011.

SESHADRI, S. *et al.* Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. **New England Journal Medicine**, v.346, n.7, p. 476 – 483, Feb. 2002.

SHALABY, W. S., *et al.* Chitosan-Based Systems. In: SHALABY, W. S.; BURG, J.L.K. **Handbook of Absorbable and biodegradable polymers. Boca Raton: CRC Press, 2004, cap.6.**

SILVA, J.C. **Estudos de macromoléculas biológicas parcialmente desestruradas usando espalhamento de Raios-X.** 2010. 161 f. Tese (Doutorado em Física) – Universidade Estadual de Campinas. 2010.

SILVA, C.F. **Micropartículas de quitosana com didanosina e sua formulação em grânulos mucoadesivos.** 2006. 238 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas. 2006.

SMITH, D. P. *et al.* Concentration Dependent Cu^{2+} Induced Aggregation and Dityrosine Formation of the Alzheimer's Disease Amyloid- β Peptide. **Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 2881-2891, 2007.

SMITH, M. A. *et al.* Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 18, p. 9866-8, Sep 1997.

SMITH, M. A. *et al.* Oxidative damage in Alzheimer's. **Nature**, v. 382, n. 6587, p. 120-121, Jul 1996.

STINE, W. B. *et al.* In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 13, p. 11612-11622, Mar 28, 2003.

STRELTSOV, V. A. *et al.* The Structure of the Amyloid- β Peptide High-Affinity Copper II Binding Site in Alzheimer Disease. **Biophys J**, v. 95, n. 7, p. 10-10, 2008.

SUN, Q. Y.; YANG, L. Z. The adsorption of basic dyes from aqueous solution on modified peat-resin particle. **Water Res**, v. 37, n. 7, p. 1535-1544, Apr 2003.

SVERGUN, D. I. *et al.* Determination of Domain Structure of Proteins from X-Ray Solution Scattering. **Biophys J**, v. 80, n. 6, p. 2946-2953, 2001.

SYME, C. D. *et al.* Copper binding to the amyloid- β (A β) peptide associated with Alzheimer's disease: folding, coordination geometry, pH dependence, stoichiometry, and affinity of A β -(1-28): insights from a range of complementary spectroscopic techniques. **J Biol Chem**, v. 279, n. 18, p. 18169-77, Apr 30 2004.

TAVARES, I.C. **Obtenção e caracterização de nanopartículas de quitosana**. 2011. 56 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2011.

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

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

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. **Biotechnol Prog**, v. 11, n. 3, p. 235-50, May-Jun 1995.

WAN, M.W. *et al.* Adsorption of copper (II) and lead (II) ions from aqueous solution on chitosan-coated sand. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 3, p. 891-899, May 5 2010.

WEBER JR., W.J.; MORRIS, J.C. *Advances in Water Pollution Research*, **Pergamon Press**, NY, p. 231–266, 1962.

WILQUET, V.; DE STROOPER, B. Amyloid- β precursor protein processing in neurodegeneration. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 14, n. 5, p. 582-588, Oct 2004.

WU, S.-J. *et al.* Preparation and characterization of porous chitosan-tripolyphosphate beads for copper(II) ion adsorption. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 127, n. 6, p. 4573-4580, Mar 2013.

YI, H. *et al.* Biofabrication with chitosan. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 6, p. 2881-94, Nov-Dec 2005.

ZHANG, S.; WU, L. Amyloid-Beta Associated with Chitosan Nano-Carrier has Favorable Immunogenicity and Permeates the BBB. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 3, p. 900-905, Sep 2009.