

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“ESTUDOS DE ADSORÇÃO DE COBRE (II) EM
MICROESFERAS DE QUITOSANA RETICULADAS
COM EPICLORIDRINA E IMPREGNADAS COM
HEPARINA”**

THALIA CAMILA COELHO

FLORIANÓPOLIS - SC

FEVEREIRO DE 2006

THALIA CAMILA COELHO

**“ESTUDOS DE ADSORÇÃO DE COBRE (II) EM
MICROESFERAS DE QUITOSANA RETICULADAS
COM EPICLORIDRINA E IMPREGNADAS COM
HEPARINA”**

**DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
“MESTRE EM QUÍMICA”**

Orientador: Prof. Dr. Mauro Cesar Marghetti Laranjeira

FLORIANÓPOLIS - SC

FEVEREIRO DE 2006

THALIA CAMILA COELHO

**ESTUDOS DE ADSORÇÃO DE COBRE (II) EM MICROESFERAS DE QUITOSANA
RETICULADAS COM EPICLORIDRINA E IMPREGNADAS COM HEPARINA**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do título de
Mestre em Química no **Programa de Pós-Graduação em Química** da
Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 24 de fevereiro de 2006.

Prof. Dr. Faruk José Nome Aguilera
Coordenador do Curso de Pós-Graduação
QMC – UFSC

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mauro C. M. Laranjeira
Orientador
QMC – UFSC

Prof. Dr. Norberto S. Gonçalves
QMC - UFSC

Prof^a. Dra. Iolanda da C. Vieira
QMC – UFSC

AGRADECIMENTOS

A Deus que esteve junto comigo nos momentos mais difíceis deste percurso.

Aos meus pais Ivo e Tânia, ao meu irmão Thiago, as minhas irmãs Tháren e Ivea que sempre me apoiaram e me auxiliaram em todos os momentos de minha vida, especialmente durante o período de desenvolvimento deste curso.

Ao meu namorado Carlos Eduardo pelo amor, incentivo e paciência durante estes anos.

Ao professor Dr. Mauro Cesar Marghetti Laranjeira pela amizade, dedicação e orientação no trabalho.

Ao professor Dr. Valfredo Tadeu de Fávère pela colaboração, sugestões, críticas favoráveis e construtivas.

Aos professores, Dr. Norberto Sanches Gonçalves e Dra. Iolanda da Cruz Vieira por aceitarem o convite para participar da banca examinadora.

Ao Dr. Antonio Sálvio Mangrich do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná pela disposição na realização dos espectros de EPR.

Aos colegas de laboratório pela amizade e colaboração nos trabalhos executados.

Aos funcionários da Central de Análises, Departamento de Química e biblioteca pelos serviços prestados.

A empresa Kin Master (Passo Fundo, RS) por ceder gentilmente a heparina sódica.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo que viabilizou a execução deste trabalho.

Enfim, a todos que direta e indiretamente colaboraram na execução deste trabalho, o meu muito obrigado.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Constante de interação hiperfina (cm^{-1})
C_{eq}	Concentração de equilíbrio (mg L^{-1})
C_i	Concentração inicial da solução (mg L^{-1})
C_f	Concentração final da solução num tempo específico (mg L^{-1})
Cu	Cobre
D	Difusão do soluto na partícula
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
$E_{1/2}$	Potencial de Meia-Onda
EPR	Ressonância Paramagnética Eletrônica
FAAS	Espectrometria de Absorção Atômica em Chama
g	Fator g
GD	Grau de desacetilação (%)
GHz	Gigahertz
h	Velocidade de adsorção inicial ($\text{mg g}^{-1}\text{min}^{-1}$)
HEP	Heparina
IV	Espectroscopia de Infravermelho
K_L	Constante de Langmuir (L mg^{-1})
k_1	Constante de velocidade de pseudo primeira-ordem (min^{-1})
k_2	Constante de velocidade de pseudo segunda ordem ($\text{g mg}^{-1}\text{min}^{-1}$)
M	Concentração da base titulante (mol L^{-1})
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
q	Quantidade de adsorção (mg g^{-1})
q_e	Quantidade de adsorção no equilíbrio (mg g^{-1})
$q_{\text{máx}}$	Quantidade máxima de adsorção (mg g^{-1})
q_t	Quantidade de adsorção no tempo t (mg g^{-1})
QTS	Quitosana
QTSR	Quitosana Reticulada com Epicloridrina
QTSR-Cu adsorvido	Quitosana Reticulada com Epicloridrina e com cobre (II)
QTSR-HEP	Quitosana Reticulada com Epicloridrina e com Heparina impregnada
QTSR-HEP-Cu	Quitosana Reticulada com Epicloridrina, com Heparina impregnada e cobre (II) adsorvido
r	raio da partícula
rpm	Rotação por minuto
t	tempo (min)
TGA	Análise Termogravimétrica
V_1	Volume 1 de base titulante (mL)
V_2	Volume 2 de base titulante (mL)
W	Massa da amostra (mg)
λ_{max}	Comprimento de onda máximo de adsorção

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da Quitina

Figura 2 - Estrutura da Quitosana

Figura 3 - Estrutura da Epicloridrina

Figura 4 - Processo de reticulação da quitosana com epicloridrina

Figura 5 - Estrutura da Heparina

Figura 6 - Isoterma de Langmuir

Figura 7 - Curva de titulação condutimétrica

Figura 8 - Termograma característico de um DSC

Figura 9 - Titulação Condutimétrica da Heparina

Figura 10 - Titulação Condutimétrica da Quitosana

Figura 11 - Espectro de Infravermelho: (a) QTS, (b) QTSR, (c) HEP e (d) QTSR-HEP

Figura 12 – Complexo Heparina - Quitosana reticulada com Epicloridrina

Figura 13 - Análise de TGA para: (a) QTS, (b) QTSR, (c) QTSR-HEP, (d) QTSR-Cu, (e) QTSR-HEP-Cu e (f) Heparina

Figura 14 - Análise de DSC para: (a) QTS, (b) QTSR, (c) QTSR-HEP, (d) QTSR-Cu, (e) QTSR-HEP-Cu e (f) Heparina

Figura 15 – Microscopia eletrônica de varredura das microesferas de: (a) QTSR com um aumento de 20x, (b) QTSR-HEP com aumento de 40 x e (c) QTSR-HEP com um aumento de 200 x

Figuras 16 – Secções transversais das microesferas de: (a) QTSR e (b) QTSR-HEP

Figura 17 - Efeito do pH na adsorção de cobre (II) utilizando microesferas de QTSR

Figura 18 - Efeito do pH na adsorção de cobre (II) utilizando microesferas de QTSR-HEP

Figura 19 - Cinética de adsorção de cobre (II) utilizando microesferas de QTSR

Figura 20 - Cinética de adsorção de cobre (II) utilizando microesferas de QTSR-HEP

Figura 21 - Modelo de cinética de pseudo-segunda ordem para soluções de cobre (II) adsorvido em microesferas de QTSR

Figura 22 - Modelo de cinética de pseudo-segunda ordem para soluções de cobre (II) adsorvido em microesferas de QTSR-HEP

Figura 23 - Isoterma de adsorção de cobre (II) utilizando microesferas de QTSR

Figura 24 - Isoterma de adsorção de cobre (II) utilizando microesferas de QTSR-HEP

Figura 25 - Linearização da isoterma de adsorção de cobre (II) utilizando microesferas de QTSR

Figura 26 - Linearização da isoterma de adsorção de cobre (II) utilizando microesferas de QTSR-HEP

Figura 27 - Espectros de EPR, em banda X: experimentais QTSR-Cu (a) e QTSR-HEP-Cu (c); simulados QTSR-Cu (b) e QTSR-HEP-Cu (d)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros operacionais utilizados para a determinação da concentração de cobre (II) nas amostras por FAAS

Tabela 2 - Parâmetros das regressões lineares determinados empregando os vários modelos de cinética para o cobre (II) adsorvido em microesferas de QTSR

Tabela 3 - Parâmetros das regressões lineares determinados empregando os vários modelos de cinética para o cobre (II) adsorvido em microesferas de QTSR-HEP

Tabela 4 - Parâmetros g , A e razão $g_{||}/A_{||}$ para as amostras QTSR-Cu e QTSR-HEP-Cu

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo a utilização de microesferas de quitosana reticulada com epícloridrina e impregnada com heparina para estudar a adsorção dos íons cobre (II) em solução aquosa. Os grupos sulfonatos e carboxílicos presentes na matriz polimérica da heparina e o grau de desacetilação da quitosana foram determinados por titulação condutimétrica. As microesferas de quitosana foram preparadas pelo método de inversão de fases, a seguir foram reticuladas aumentando sua resistência em meio ácido. As microesferas de quitosana reticulada foram impregnadas com heparina. As microesferas foram caracterizadas por IV, TGA, DSC e MEV, tais técnicas permitiram identificar o novo material. Os estudos do pH na adsorção dos íons cobre (II) mostram que o pH ótimo de adsorção ocorreu em pH 6,0, tanto para as microesferas de QTSR, quanto para as microesferas de QTSR-HEP. A partir dos estudos cinéticos verificou-se que o equilíbrio de adsorção foi alcançado após 8 horas para as microesferas de QTSR e após 25 horas para as microesferas de QTSR-HEP. O modelo cinético de pseudo segunda-ordem forneceu os melhores ajustes dos dados experimentais. As constantes de velocidade para QTSR e QTSR-HEP foram calculadas, obtendo-se os respectivos valores $2,23 \times 10^{-2}$ e $4,15 \times 10^{-3} \text{ g mg}^{-1}\text{min}^{-1}$. A velocidade inicial de adsorção dos íons cobre (II) também foi calculada e os valores para QTSR e QTSR-HEP foram de 0,22 e 0,10 $\text{mg g}^{-1} \text{ min}^{-1}$, respectivamente. Os estudos das isotermas de adsorção foram interpretados empregando o modelo matemático de Langmuir, onde a capacidade máxima de saturação da superfície das microesferas de QTSR e QTSR-HEP foi determinada, obtendo-se os valores 39,31 e 81,04 mg g^{-1} , respectivamente. Com os resultados da cinética e da isoterma verifica-se que o equilíbrio para as microesferas de QTSR-HEP foi atingido mais lentamente, porém apresentam capacidade de adsorção maior, quando comparada com as microesferas de QTSR. As interações entre o íon cobre (II) e a QTSR e QTSR-HEP, no processo de adsorção, foram confirmadas por espectroscopia de ressonância paramagnética (EPR) serem de natureza química de caráter covalente, com formação de complexo quadrado-planar apresentando distorção tetraédrica.

ABSTRACT

The present work had as objective the use of cross-linked with epichlorohydrin chitosan microspheres and chitosan microspheres impregnated with heparin to study the adsorption of copper (II) ions in aqueous solution. The sulfonate and carboxylic groups present in the polymeric matrix of the heparin and the deacetylation degree of the chitosan were determined by conductimetric titration. The chitosan microspheres were prepared by the method of inversion of phases. The use of cross-linking agent allowed achieve an increased resistance in acidic medium, and the cross-linked chitosan microspheres were impregnated with heparin. The microspheres were characterized by IR, TGA, DSC and SEM, such techniques allowed to identify a new material. The studies of pH on the adsorption of copper (II) ions showed that an optimum pH of 6,0 for the adsorption was found for both QTSR and QTSR-HEP microspheres. From the kinetic studies it was verified that the adsorption equilibrium was determined to be 8 hours for the QTSR microspheres and 25 hours for the of QTSR-HEP microspheres. The kinetic model of pseudo second-order provided the best fit for the experimental data. The rate constants for QTSR and QTSR-HEP were calculated to be 2.23×10^{-2} and $4.15 \times 10^{-3} \text{ g (mg min)}^{-1}$, respectively. The initial rates of adsorption of copper (II) ions also were calculated and their values were 0,22 and 0,10 $(\text{g min})^{-1}$, for QTSR and QTSR-HEP, respectively. The studies of the isotherms adsorption were interpreted using the mathematical model of Langmuir, where the maximum capacity of surface saturation of the QTSR and QTSR-HEP microspheres was determined to be the values 39.31 and 81,04 mg g^{-1} , respectively. From the results of the kinetics and the isotherm it was verified that the equilibrium was reached more slowly for the QTSR-HEP microspheres, however present higher adsorption capacity, when compared with the QTSR microspheres. The interactions between copper (II) ion and QTSR and QTSR-HEP the adsorption process were confirmed by spectroscopy of paramagnetic resonance (EPR) to be of chemical nature, with covalent character, resulting in a square-planar complex with tetrahedral distortion.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	Quitina	16
2.2	Quitosana	17
2.2.1	Agentes reticulantes	19
2.2.1.1	Epicloridrina	20
2.3	Heparina	21
2.4	Cobre	22
2.5	Adsorção	24
2.5.1	Isotermas de adsorção	25
2.5.1.1	Isoterma de Langmuir	26
2.5.2	Cinética de adsorção	27
2.6	Caracterização das amostras	28
2.6.1	Teor de grupos sulfonatos e carboxílicos da heparina	30
2.6.2	Grau de desacetilação da quitosana	30
2.6.3	Espectroscopia de infravermelho	32
2.6.4	Análises termogravimétricas (TGA)	32
2.6.5	Calorimetria de varredura diferencial (DSC)	33
2.6.6	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	34
2.6.7	Ressonância paramagnética eletrônica (EPR)	34
2.6.7.1	O valor “g” e a constante hiperfina “A”	35
3.	OBJETIVOS	36
3.1	Objetivo Geral	36
3.2	Objetivos Específicos	36

4.	PARTE EXPERIMENTAL	37
4.1	Materiais	37
4.2	Equipamentos	37
4.3	Métodos	38
4.3.1	Purificação da heparina	38
4.3.2	Determinação do teor de grupos sulfonatos e carboxílicos da heparina	38
4.3.3	Determinação do grau de desacetilação da quitosana	38
4.3.4	Preparação das microesferas de quitosana	39
4.3.5	Preparação das microesferas de quitosana reticuladas com epicloridrina	39
4.3.6	Impregnação de heparina nas microesferas de quitosana reticulada	39
4.3.7	Adsorção de cobre (II) em microesferas de quitosana reticulada (QTSR) e em quitosana reticulada/heparina (QTSR-HEP)	40
4.3.7.1	Espectrometria de absorção atômica	40
4.3.7.1.1	Dependência do pH na adsorção	40
4.3.7.1.2	Cinética de adsorção	41
4.3.7.1.3	Isoterma de adsorção	41
4.3.8	Caracterização das amostras	41
4.3.8.1	Espectroscopia no infravermelho	41
4.3.8.2	Análises de TGA e DSC	41
4.3.8.3	Análise de microscopia eletrônica de varredura	42
4.3.8.4	Ressonância paramagnética eletrônica	42
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	Caracterização das microesferas	43
5.1.1	Purificação da heparina	43
5.1.2	Teor de grupos sulfonatos e carboxílicos da heparina	43
5.1.3	Grau de desacetilação da quitosana	44
5.1.4	Espectroscopia no infravermelho	45
5.1.5	Análise de TGA e DSC	49

5.1.6	Análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV)	52
5.2	Estudos de adsorção de cobre (II) em microesferas de quitosana reticulada e em quitosana reticulada/heparina	53
5.2.1	Dependência do pH na adsorção de cobre (II)	54
5.2.2	Cinética de adsorção de cobre (II)	56
5.2.3	Isoterma de adsorção de cobre (II)	60
5.3	Determinação dos modos e sítios de coordenação de ligantes envolvidos nas microesferas de QTSR-Cu e QTSR-HEP-Cu	63
6.	CONCLUSÕES	66
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

1. INTRODUÇÃO

Polissacarídeos naturais constituem um grupo de importância tecnológica e têm sido empregados em várias aplicações industriais e médicas [MUZZARELLI, 1989]. Celulose é o polissacarídeo mais abundante produzido pela fotossíntese das plantas. O segundo polissacarídeo mais comum na natureza, a quitina, é produzido por uma variedade de animais marinhos, insetos e fungos. Podemos considerar o mar como a fonte principal de quitina, sendo assim os animais marinhos têm grande vantagem em relação aos vegetais, pois a produção natural de quitina não requer grandes espaços físicos como a celulose.

A quitosana, usualmente preparada pela desacetilação da quitina, através de uma reação de hidrólise básica, apresenta em maior proporção em sua cadeia polimérica unidades de β -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glicose. A quitosana também apresenta uma estrutura química similar à celulose, mas é considerada quimicamente mais versátil do que a celulose [MATHUR, 1990].

Uma ampla revisão das inúmeras possibilidades de aplicações da quitina e da quitosana foi apresentada [KUMAR, 2000]. Foi destacada a versatilidade física que pode ser obtida a partir desses polímeros como a obtenção de fibras, filmes, géis, microesferas e membranas. Dentre esses inúmeros estudos, destacam-se a remoção de metais e de corantes em soluções aquosas.

Muitos métodos físicos e químicos, incluindo a precipitação, eletrodeposição, troca iônica e osmose reversa, têm sido empregados no tratamento de efluentes com elevado teor de metais [TARLEY, 2004]. O tratamento através da adsorção é uma das poucas alternativas promissoras que existem para a remoção de metais em solução, especialmente quando se usa adsorventes naturais de baixo custo como rejeitos da indústria, da agricultura, materiais argilosos e biomassa [KUMAR, 1982]. Embora o uso desses materiais não seja ainda comum, em geral, apresentam boa capacidade de adsorção. Inúmeros estudos têm objetivado a busca de um material adsorvente natural que seja de baixo custo, e que tenha boa eficiência para remover metais em meio aquoso [KUMAR, 1982; KAPOOR, 1995; YABE, 2003].

O desenvolvimento de tecnologias adequadas ao tratamento de efluentes e das águas de rejeito tem sido objeto de grande interesse nos últimos tempos, devido ao aumento da rigidez das leis ambientais. A descarga de um determinado efluente, num receptor hídrico, deve estar dentro de certos parâmetros adotados pela legislação vigente, e que tem como objetivo principal, diminuir o impacto das atividades humanas sobre o ambiente aquático.

Os metais pesados dentre os vários poluentes existentes têm recebido atenção especial, uma vez que alguns são extremamente tóxicos, para uma grande variedade de organismos, mesmo em quantidades muito baixas, da ordem de mili ou até mesmo microgramas. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, os metais que mais preocupam são o alumínio, cromo, manganês, ferro, cobalto, níquel, cobre, zinco, cádmio, mercúrio e o chumbo [COSTA *et al.*, 2000].

Os biopolímeros quitina e quitosana têm atraído muita atenção nos últimos anos devido suas propriedades. Uma das propriedades mais importantes da quitina e quitosana é a habilidade de ambos formarem quelatos com íons de metais pesados.

A presença das unidades amino e acetamido na cadeia polimérica contribui para a heterogeneidade do polímero. Os grupos amino são fortemente reativos, devido à presença dos pares eletrônicos livres no átomo de nitrogênio. Estes grupos são os responsáveis pela ligação do cátion metálico por um mecanismo de quelação. Contudo, os grupos amino são facilmente protonados em solução ácida. Por esta razão, a protonação destes grupos pode causar uma atração eletrostática de compostos aniônicos [GUIBAL, 2004].

Portanto, neste trabalho foi utilizado a heparina como agente de modificação da superfície da quitosana através de interação iônica entre estes dois biopolímeros. A adição dos grupos funcionais carboxilatos e sulfonatos, além dos grupos amino e hidroxila, poderá propiciar uma maior interação com o íon cobre (II) em soluções aquosas, melhorar a seletividade e especificidade, e conseqüentemente aumentar a capacidade de adsorção por este novo bioadsorvente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Quitina

A quitina é a segunda maior fonte de biomassa de polissacarídeo. Estima-se que mais de um milhão de toneladas deste material é produzido anualmente, principalmente por animais marinhos, visto que estes animais possuem uma vida curta, e terem enorme capacidade de reprodução. A quitina é um dos polímeros naturais mais abundantes e é interessante encontrar novas aplicações para este material. A quitina, $\beta(1-4)$ -2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose, é obtida industrialmente de cascas de crustáceos como: camarão, siri, caranguejos, leveduras e parede celular de fungos. Nos países menos desenvolvidos, esses resíduos não são aproveitados, acarretando problemas de poluição.

A Figura 1 ilustra a estrutura da quitina, muito semelhante à celulose, pois os grupos hidroxilas referentes ao carbono dois são substituídos por resíduos acetamido.

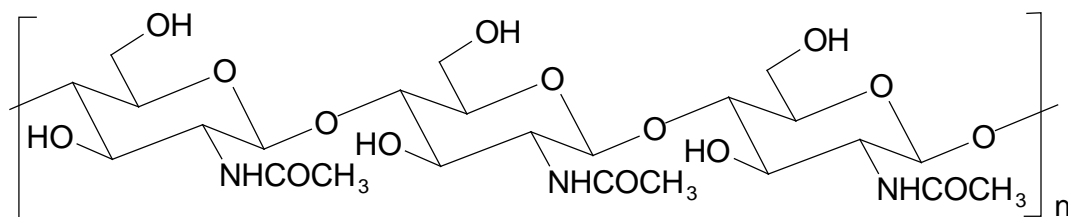


Figura 1 – Estrutura da Quitina

A configuração β das ligações glicosídicas também permitem uma estrutura de cadeia aproximadamente linear com fortes ligações de hidrogênio.

Devido à sua natureza ela é menos atacada pelos reagentes químicos que a celulose, ou seja, é mais estável quimicamente. Este polímero é insolúvel em água, solventes orgânicos, ácidos diluídos e álcalis. Pode ser dissolvida em ácidos minerais concentrados com simultânea degradação do polímero.

2.2 Quitosana

A quitosana pode ser definida como um copolímero de $\beta(1-4)$ -2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose e $\beta(1-4)$ -2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose, ilustrada pela Figura 2.

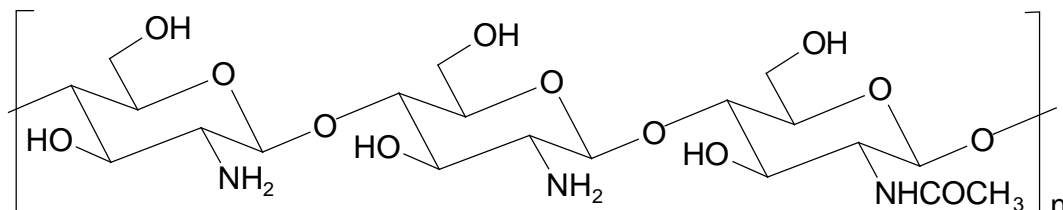


Figura 2 – Estrutura da Quitosana

O processo de desacetilação raramente é completo e a maioria dos produtos comerciais são copolímeros de unidades repetidas de quitosana e unidades repetidas de quitina [CHANDY, 1993].

Importantes características da quitosana são seu peso molecular, viscosidade, grau de desacetilação, cristalinidade, grau de polimerização, hidrofiliabilidade, pKa e energia de hidratação [KAS, 1997; HEJAZI, 2003]. Outras características importantes, como: biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedades antibactericidas e bioatividade. Devido suas características e disponibilidade, a quitosana pode ser potencialmente usada em diversas áreas tecnológicas, tais como, tratamento de água e efluentes líquidos industriais, nas indústrias de cosméticos, alimentos e têxtil, uso medicinal e farmacêutico [KIMURA, 2001].

A quitosana é insolúvel em água, porém se dissolve em soluções ácidas diluídas tais como ácido acético, ácido fórmico, ácidos minerais, bem como em outros solventes orgânicos, produzindo uma solução viscosa [KIMURA, 2001].

A quitosana é de baixa toxicidade, com uma DL_{50} calculada para ratos de 16g/Kg [ELGIBALY, 2002]. O processo de biodegradação da quitosana ocorre via hidrólise enzimática através de um mecanismo de despolimerização, similar à hidrólise enzimática das paredes celulares das bactérias e fungos. As enzimas responsáveis pela biodegradação são a lisozima e a quitinase.

A presença de grupos amino na cadeia polimérica permite que o polímero atue como polieletrólito catiônico e abaixo de pH 6,5 apresenta uma alta densidade de carga positiva que se adere facilmente nas superfícies negativamente carregadas. Pode formar complexos com íons metálicos [KIMURA, 2001]. O nitrogênio dos grupos amino e o oxigênio dos grupamentos hidroxila podem ser acilados para obter derivados formila, acetila e benzoila. A esterificação com ácido monocloroacético forma a carboximetilquitosana e pode formar bases de Schiff com aldeídos e cetonas. Reagindo-se a quitosana com glutaraldeído ou epícloridrina, ocorre a formação de um material insolúvel reticulado [MUZZARELLI, 1978; MATHUR, 1990; FÁVERE, 1994].

A principal característica que pode afetar a propriedade de adsorção da quitosana é o grau de desacetilação, uma vez que controla a fração de grupos amino livres que podem estar disponíveis para interagir com íons metálicos em solução. A quitosana possui uma capacidade de adsorção de 5 a 6 vezes maior que a da quitina [GUIBAL, 2004]. Outros fatores como cristalinidade, afinidade pela água e massa molar também pode influenciar no processo de adsorção [GUIBAL, 2004].

Em estudos anteriores a quitosana demonstrou ser um excelente material para a remoção da acidez bem como a remoção de metais tais como ferro, alumínio, cobre de efluentes de mineração de carvão. A excelente característica do biopolímero de remover metais se deve ao grande número de grupos amino primário com alta atividade para a neutralização da acidez do efluente e conseqüentemente a precipitação de metais na forma de hidróxidos. Além disso, a estrutura flexível da cadeia do polímero é capaz de adotar configurações adequadas para complexação de íons de metais [FÁVERE *et al.*, 2004].

A quitosana é usualmente obtida na forma de flocos ou de pó, ambos não porosos e solúveis em meio ácido. A pequena área interna do material limita o acesso ao interior dos sítios de adsorção e diminui a capacidade máxima de adsorção bem como a velocidade de adsorção. Além disso, a quitosana na forma de flocos ou pó não se comporta idealmente para empacotar colunas, por apresentar propriedades de intumescimento e retração.

A transformação da quitosana em flocos ou pó em cápsulas porosas pode superar muita destas limitações. Esta transformação melhora a resistência química, aumenta a força mecânica e a resistência à abrasão tornando o adsorvente adequado para o uso em colunas cromatográficas. Para aplicações em adsorção de íons metálicos a grande área superficial interna da cápsula porosa pode ajudar na capacidade de ligação do metal e também aumentar a velocidade de transporte do íon metálico para dentro das partículas. A adsorção de ligantes em cápsulas apresenta a vantagem de tornar a remoção dos metais muito mais seletiva.

A quitosana tem sido um promissor material polimérico, pois há grande interesse científico devido as suas propriedades e vasto campo de aplicação. No entanto, pouco trabalho tem sido relatado na literatura para remoção de metais de soluções aquosas por adsorção em microesferas [FÁVERE, 1994; TSENG *et al.*, 1999; JUANG, 2000; BASSI *et al.*, 2000].

2.2.1 Agentes reticulantes

A quitosana, obtida normalmente na forma de flocos ou pó, é solúvel em meio ácido, o que dificulta o seu uso como adsorvente em pH baixo. Se o polímero for tratado com um reagente que contenha dois ou mais grupos funcionais reativos, as moléculas podem ser estabilizadas por ligações intermoleculares ou ligações cruzadas (cross-linked).

A molécula da quitosana contém dois grupos funcionais, OH e NH₂ que podem ser modificados quimicamente. Essas modificações aumentam a resistência química e mecânica, a estabilidade, assim como a resistência contra a degradação bioquímica e microbiológica [GUIBAL *et al.*, 1999, YANG *et al.*, 2002]. Aumenta-se a estabilidade química em meios ácidos e especialmente, diminui a solubilidade na maior parte dos ácidos orgânicos e minerais [NGAH *et al.*, 2002; NGAH *et al.*, 2005].

A reticulação da quitosana pode ser feita pela reação da mesma com diferentes agentes reticulantes bifuncionais como, glutaraldeído, 1,1,3,3-tetrametoxipropano, etilenoglicol, glicerolpoliglicidileter ou hexametilenediisocianato. Ela também pode ser reticulada com agentes monofuncionais como a epícloridrina ou o clorometiloxirano [GUIBAL, 2004; NGAH *et al.*, 2005].

O tripolifosfato também é usado como agente reticulante para a preparação de microesferas de quitosana, pois o mesmo induz a uma reticulação iônica entre os grupos fosfatos e os grupos amino protonados da quitosana [GUIBAL, 2004; NGAH *et al.*, 2005].

Glutaraldeído pode ser usado para inibir a solubilização através da formação da base de Schiff com os grupos aminos livres da unidade glucosamina do polímero [MUZZARELLI, 1978; FÁVERE, 1994; MI *et al.*, 2000; GONÇALVES *et al.*, 2005]. Para reações com os grupos hidroxila, a epicloridrina tem sido muito utilizada [KUMBAR, 2002; NGAH *et al.*, 2005; GONÇALVES *et al.*, 2005].

A qualidade da reticulação deve ser avaliada quanto às variáveis concentração, tempo de contato, temperatura e pH [BEPPU, 1999].

2.2.1.1 Epicloridrina

Apresenta a fórmula molecular C_3H_5ClO e tem massa molar $92,53 \text{ g mol}^{-1}$. É insolúvel em água. Miscível em álcool, éter, clorofórmio, tricloroetileno e imiscível em hidrocarbonetos de petróleo. A estrutura está representada na Figura 3.

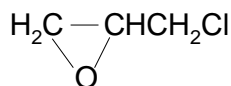


Figura 3 – Estrutura da Epicloridrina

A epicloridrina pode ser usada para a insolubilização da quitosana através da formação de uma rede tridimensional polimérica. A reação com a quitosana envolve a abertura do anel epóxido. A epicloridrina então reage apenas com os grupos hidroxila sob condições alcalinas, mantendo os grupos amino livres [KALTWASSER *et al.*, 1987; GONÇALVES *et al.*, 2005]. A Figura 4 ilustra a reação entre a quitosana e epicloridrina com a obtenção da quitosana reticulada.

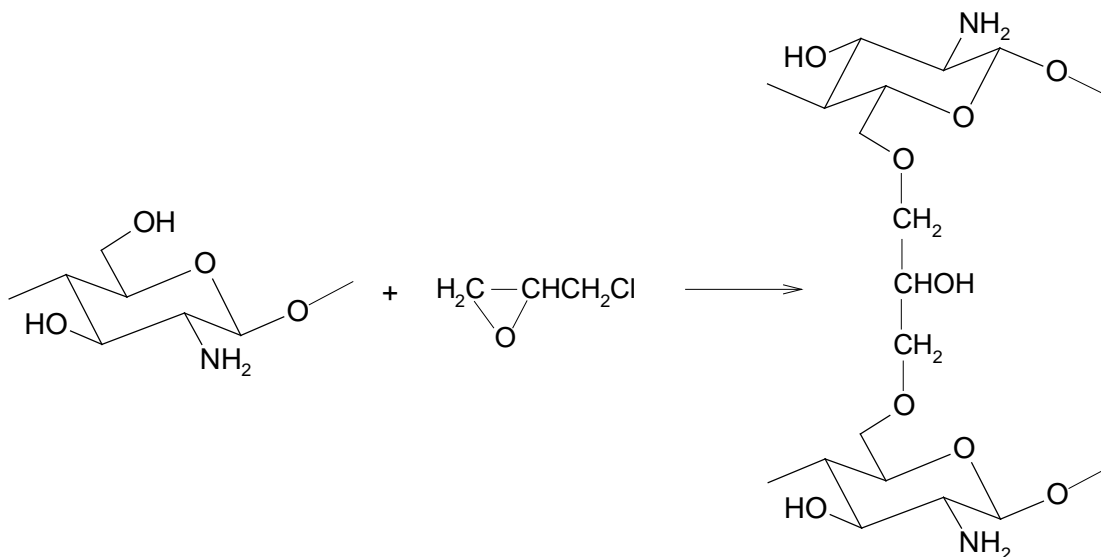


Figura 4 – Processo de reticulação da quitosana com epicloridrina

2.3 Heparina

A heparina é um polissacarídeo biologicamente ativo da família glicosaminoglicana, que é uma família de polímeros lineares compostos por unidades repetidas de dissacarídeos. Em contraste com a maioria dos outros glicosaminoglicanos, a heparina contém ligações α -glicosídicas [DEVLIN, 2002].

A heparina é constituída parcialmente de unidades sulfatadas de α -D-ácido glucorônico e 2-amino-desoxi- α -D-glicose, unidas por ligação 1 \rightarrow 4, mostrada na Figura 5. A heparina origina-se nas células mastócitos dos tecidos conectivos, sendo encontrada principalmente nas mucosas intestinais suína, ovina e bovina e no pulmão bovino [ERLICH, 1973; DEBRIE, 1995].

Desde a sua descoberta, em 1916, muitos estudos tem sido feitos com relação à sua estrutura química e sua farmacologia. Com relação aos aspectos físico-químicos da heparina, ela comporta-se como polieletrólito em soluções aquosas devido a sua densidade de carga altamente negativa. As massas molares de heparina não fragmentadas variam de 6.000 a 20.000 Daltons, e para heparina de baixa massa molar varia de 4000 a 6000 Daltons [ERLICH, 1973; JOHNSON *et al.*, 1976].

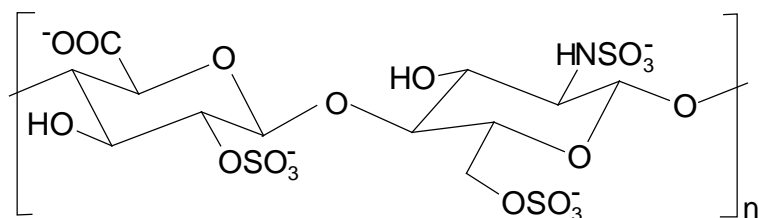


Figura 5 – Estrutura da Heparina

A heparina é fortemente ácida por causa de seu conteúdo de grupos sulfonatos e carboxílicos.

Na heparina sódica, os prótons ácidos das unidades de sulfonatos são substituídos parcialmente através de íons de sódio. A heparina também pode ser um sal de cálcio.

2.4 Cobre

O cobre é um metal de transição moderadamente abundante, sendo o vigésimo quinto elemento presente, em peso (68 ppm), na crosta terrestre. O nome *cobre* e o símbolo *Cu* são derivados da expressão "aes cyprium" (mais tarde Cuprum), em virtude de sua primeira obtenção pelo romano Cyprus. O cobre é utilizado em vários processos industriais, na obtenção de ligas, e tem grande importância biológica, como agente de transporte de oxigênio em invertebrados, na fotossíntese e como centro ativo de certas proteínas e enzimas [COTTON, 1980].

É um elemento da primeira série de transição, de número atômico 29, que ocorre nos estados de oxidação +1, +2 e +3. O estado +1 apresenta configuração eletrônica $[Ar]3d^{10}$, tendo os orbitais *eg* e *t_{2g}* completos. Portanto, a grande maioria dos complexos de cobre(I) é diamagnética e a ausência de transições d-d implica em compostos incolores. No estado +2 a configuração $[Ar]3d^9$ apresenta os orbitais *t_{2g}* completos, enquanto os orbitais *eg* estão semipreenchidos, o que faz que seus compostos sejam coloridos e paramagnéticos. Esse é o estado mais estável e importante do metal [JAMESON, 1981].

O cobre é essencial à vida e uma pessoa adulta tem no organismo cerca de 100 mg de Cu. É a terceira maior quantidade de um metal de transição, inferior apenas ao Fe (4 g) e ao Zn (2 g). Embora pequenas quantidades de Cu sejam essenciais, quantidades maiores são tóxicas, ocasionando estados patológicos bem caracterizados. Ao estado deficiente de cobre chama-se *hipocupremia*, ao passo que ao excesso do metal chama-se *hipercupremia*. As necessidades diárias na alimentação são da ordem de 4 a 5 mg de Cu, e em seres humanos a deficiência desse metal resulta na incapacidade de aproveitar o ferro armazenado no fígado; dessa forma a pessoa passa a sofrer de anemia. O cobre é transportado na sua maior parte através do fluxo sanguíneo em uma proteína denominada ceruloplasmina; todavia, quando é absorvido no intestino, é transportado até o fígado unido a albumina [KAIM, 1994; ASPIN, 1981].

A *enfermidade de Wilson* é um transtorno hereditário que provoca o acúmulo de cobre no fígado e outros órgãos, podendo produzir hepatites, alterações renais e outros transtornos se não existir um tratamento. Este elemento, quando ingerido, se associa à albumina, para depois se depositar sobre os tecidos do fígado e do cérebro, [TOMA,1984].

O cobre é encontrado em ostras, mariscos, legumes, vísceras e nozes (entre outros), assim como na água potável.

A água com conteúdo superiores a 1 mg L^{-1} pode contaminar com cobre as roupas e objetos lavados com ela, e conteúdos acima de 5 mg L^{-1} tornam a água colorida com sabor desagradável. A Organização Mundial da Saúde (OMS) no *Guia para a qualidade da água potável* recomenda um nível máximo de 2 mg L^{-1} , mesmo valor adotado na União Européia. Nos Estados Unidos a *Agência de Proteção Ambiental* tem estabelecido um limite de $1,3 \text{ mg L}^{-1}$.

Todos os compostos de cobre deveriam ser tratados como se fossem tóxicos, uma quantidade de 30 g de sulfato de cobre é potencialmente letal em humanos.

2.5 Adsorção

Adsorção é a acumulação e concentração seletiva de moléculas contidas num gás ou líquido sobre superfícies sólidas. O material sobre cuja superfície ocorre a adsorção chama-se adsorvente, a substância adsorvida é o adsorvato.

O mecanismo de adsorção depende de parâmetros tais como estrutura, composição química, propriedades físico-químicas e natureza do adsorvente e adsorvato.

A formação de uma camada adsorvida numa superfície não é um processo instantâneo, mas é geralmente governada pela velocidade de difusão da substância tensoativa através da solução, em direção à interface.

A adsorção na interface sólido-solução é em geral, similar àquela que ocorre na interface sólido-gás. Entretanto, no primeiro caso o fenômeno é mais complexo devido à presença do terceiro componente, isto é, do meio (solvente) cujas moléculas podem também ser adsorvidas na superfície da matriz adsorvente; dessa maneira, elas competem com as moléculas do soluto.

Se entre o adsorvato e a superfície do adsorvente atuarem apenas forças de Van der Waals, a adsorção é denominada física ou de Van der Waals. As moléculas encontram-se fracamente ligadas à superfície e os calores de adsorção são baixos, inferiores a 10 Kcal/mol, e comparam-se ao calor de vaporização do adsorvato. O aumento da temperatura produz uma diminuição notável na quantidade adsorvida.

Quando as moléculas adsorvidas reagem quimicamente com a superfície, o fenômeno é denominado de adsorção química. Como na adsorção química ligações são rompidas e formadas, o calor de adsorção é da mesma ordem dos calores de reação química, superiores a 25 Kcal/mol. A adsorção química não prossegue além da formação de uma única camada sobre a superfície do adsorvente.

O conhecimento do equilíbrio de adsorção constitui o primeiro passo para investigar as possibilidades do uso de um adsorvente em um determinado processo de separação [FÁVERE,1994].

O processo de adsorção é um campo importante para fenômenos tais como catálise heterogênea, análise cromatográfica, clarificação e despoluição de vários poluentes.

A adsorção tem-se mostrado um método economicamente viável possuindo ampla aplicabilidade em processos de:

- a) descolorimento, secagem ou separação das frações de petróleo (solventes, óleos, lubrificantes, ceras);
- b) remoção da cor, odor e sabor de abastecimentos de água municipal;
- c) descolorimento de óleos vegetais e animais;
- d) descolorimento de xaropes;
- e) clarificação de bebidas e produtos farmacêuticos;
- f) separação de gases raros (criptônio e xenônio);
- g) recuperação de vitaminas e outros produtos de misturas fermentadas;
- h) purificação de efluentes no controle de poluição da água (incluindo troca iônica).

Os processos de adsorção mais freqüentemente utilizados consistem na medida da razão entre a concentração do soluto na fase sólida e a concentração de equilíbrio na fase aquosa. Estas medidas são feitas à temperatura constante e os resultados são graficados pelas chamadas isotermas de adsorção.

2.5.1 Isotermas de adsorção

As isotermas experimentais são úteis para descrever a capacidade de adsorção, facilitar a avaliação deste processo numa aplicação determinada e para a seleção tanto do adsorvente mais adequado como das quantidades requeridas. Além disso, as isotermas desempenham um papel importante na construção de modelos para análise e descrição dos sistemas de adsorção, permitindo uma melhor avaliação teórica e interpretações termodinâmicas, tal como calor de adsorção [FÁVERE, 1994].

As isotermas de adsorção podem fornecer informações importantes sobre o mecanismo de adsorção. A isoterma é construída relacionando-se a fração de equivalente do cátion em equilíbrio com a solução contra a fração do mesmo cátion no adsorvente [ADAMSON, 1990].

As isotermas de Langmuir e Freundlich que foram introduzidas há aproximadamente 80 anos atrás, são as mais utilizadas até hoje para descrever os fenômenos de adsorção.

O sucesso dos modelos propostos por Freundlich e Langmuir se deve à habilidade da adaptação de vários dados de adsorção e também refletem a simplicidade das equações das isotermas e a facilidade com que os parâmetros ajustáveis podem ser determinados.

A escolha da melhor transformação é feita através do melhor ajuste dos dados experimentais, isto é, melhor coeficiente de correlação linear (r) e desvio padrão (σ). Por esta razão, uma isoterma de adsorção do tipo de Langmuir, que prevê uma única camada, é mais adequada para a interpretação dos dados.

2.5.1.1 Isoterma de Langmuir

A isoterma de Langmuir é o modelo mais conhecido e empregado para determinar os parâmetros de adsorção. E este foi proposto por Langmuir em 1914, para adsorções homogêneas. Supõe-se que haja uma superfície uniforme para o adsorvente com sítios de adsorção energeticamente iguais. A equação de Langmuir é representada pela Equação 1:

$$q = \frac{K_L \cdot C_{eq} \cdot q_{max}}{1 + K_L \cdot C_{eq}} \quad (1)$$

Onde, q_{max} é a quantidade máxima ou a monocamada de adsorvato no adsorvedor e C_{eq} é a concentração de adsorvato na solução em equilíbrio.

Os parâmetros de adsorção, q_{max} e K_L , podem ser determinados transformando a equação de Langmuir para a forma linear. A Equação 2 representa a melhor regressão linear da isoterma. Um gráfico poderá ser obtido e a partir do coeficiente angular e linear permitirá determinar a quantidade máxima adsorvida e a constante de equilíbrio. A constante de Langmuir é um indicativo da capacidade máxima de adsorção e da energia de adsorção [MCKAY, 1996; SPINELLI, 2005]. A Figura 6 ilustra a isoterma de Langmuir.

$$\frac{C_{eq}}{q} = \frac{1}{K_L \cdot q_{max}} + \frac{C_{eq}}{q_{max}} \quad (2)$$

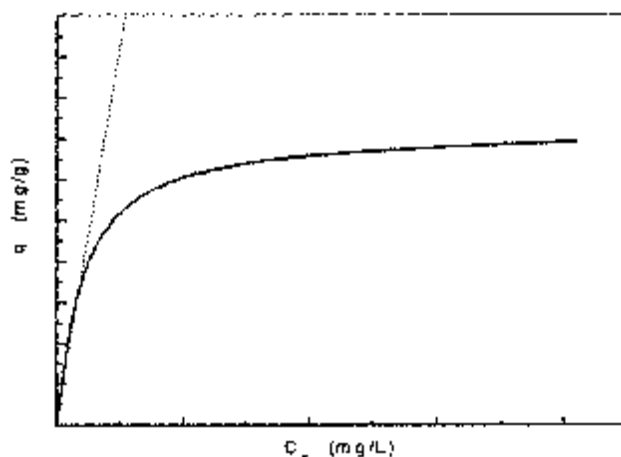


Figura 6 – Isoterma de Langmuir

Na Figura 6, a parte inicial linear da isoterma quase reta indica que nesta região a adsorção é proporcional às concentrações de equilíbrio, devido à existência considerável de sítios ainda livres na superfície do adsorvente. A parte quase horizontal da isoterma corresponde aos valores mais elevados de concentrações, indicando que nesta região a superfície do adsorvente se encontra completamente saturada com o agente adsorvativo e a quantidade de substância adsorvida não dependerá mais da concentração da solução. E na parte central da isoterma corresponde a diferentes graus de adsorção na superfície do adsorvente [ADAMSON, 1990].

2.5.2 Cinética de adsorção

Existem três estágios consecutivos associados com a adsorção de materiais em solução por adsorventes porosos. A primeira etapa é o transporte do adsorvato para a superfície externa do adsorvente; a segunda etapa é a difusão do adsorvato para dentro dos poros do adsorvente; e a terceira etapa é a adsorção do adsorvato na superfície interna do adsorvente. A velocidade de adsorção seria determinada em função de que a velocidade de adsorção mais lenta governa inteiramente o processo de adsorção. Em geral, a adsorção do adsorvato no interior da superfície de um adsorvente é relativamente rápida, comparada com outros dois processos; o transporte de adsorvato até a superfície do adsorvente é facilitada pela agitação da solução [YANG, 1984].

No exame referente ao mecanismo do processo de adsorção, à transferência de massa e à reação química, são usados modelos cinéticos que avaliam os resultados experimentais obtidos [WU et al., 2001]. Existem vários modelos cinéticos que tratam dos dados experimentais de adsorção. Ho e Mckay empregaram a equação de pseudo primeira-ordem e pseudo segunda-ordem para avaliar a cinética de adsorção [HO e MCKAY, 2002]. A equação de pseudo primeira-ordem está apresentada na Equação 3 :

$$dq_t/dt = k_1(q_e - q_t) \quad (3)$$

Em que, k_1 é a constante de velocidade de pseudo primeira-ordem e q_e representa a quantidade de adsorção no equilíbrio. Depois da integração da equação 3, e aplicando as condições que $q_t = 0$ a $t = 0$ e $q_t = q_t$ a $t = t$, a equação 3 transforma-se na equação 4:

$$\log(q_e - q_t) = \log q_e - \frac{k_1}{2,303} t \quad (4)$$

A equação de pseudo-segunda ordem pode ser expressa pela equação 5:

$$dq_t/dt = k_2(q_e - q_t)^2 \quad (5)$$

Em que k_2 é a constante de velocidade de segunda ordem. E ao integrar a equação 5 e aplicar as condições iniciais, têm-se :

$$\frac{1}{(q_e - q_t)} = \frac{1}{q_e} + k_2 t \quad (6)$$

A qual pode ser colocada na forma linear:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} t \quad (7)$$

Se a velocidade de adsorção inicial for ($h = k_2 q_e^2$), então a equação 7 tornar-se-á:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{h} + \frac{1}{q_e} t \quad (8)$$

O intercepto $1/h$ permite calcular a velocidade de adsorção inicial, a qual diminui com o decréscimo da concentração inicial [WU et al., 2001].

Além de ambos modelos citados anteriormente, existe o modelo de difusão intrapartícula proposto por Weber e Morris (1962). A fração aproximada para a mudança de equilíbrio está de acordo com a função de $(Dt/r^2)^{1/2}$, sendo que r é o raio da partícula e D a difusão do soluto na partícula. A velocidade inicial de difusão intrapartícula pode ser obtida pela linearização da curva da equação 9 [DAIFULLAH et al., 1997; GUIBAL et al., 1998; SPINELLI, 2005]:

$$Q_t = f t^{1/2} \quad (9)$$

Estudos mostram que duas ou mais etapas podem ocorrer na cinética de adsorção. A primeira é a adsorção na superfície externa e é rápida. A segunda é a adsorção gradual, na qual a difusão intrapartícula começa a diminuir lentamente devido à concentração extremamente baixa do soluto na solução. Uma boa correlação dos dados cinéticos pode justificar o mecanismo de adsorção [WU et al., 2001].

A validade destes modelos pode ser checada pelos plotes lineares de cada equação: $\log(q_e - q_t)$ versus t para o modelo da pseudo primeira-ordem; t/q_t versus t para o modelo de pseudo-segunda ordem e q_t versus $t^{1/2}$ para a difusão intrapartícula. Por conseguinte, a avaliação quantitativa da aplicabilidade de cada modelo é feita ao se comparar o coeficiente de correlação.

Embora existam muitos fatores que influenciem a adsorção, tais como: tempo de contato, pH, temperatura, concentração do adsorvente, natureza e concentração do soluto, um modelo cinético está relacionado somente aos efeitos dos parâmetros observáveis na velocidade completa. Estes incluem concentração, temperatura, quantidade de adsorvente e natureza do adsorvato.

2.6 Caracterização das amostras

2.6.1 Teor de grupos sulfonatos e carboxílicos da heparina

Instrumentos e material para realizar titulações condutimétricas são geralmente baratos e simples. Um dos usos mais freqüentes da condutância é nas titulações quantitativas de sistemas onde a condutância da solução varia de tal maneira (antes e depois do ponto final da titulação) que a intersecção de duas retas permitem determinar o ponto de equivalência. A forma da curva depende: da amostra, do titulante, das reações que ocorrem.

A titulação condutimétrica é uma ferramenta analítica reconhecida para a quantificação de grupos funcionais ácidos. Numerosas aplicações têm sido feitas, tais como medidas do número de grupos sulfonatos e carboxílicos em polpa da madeira, quantificação limite dos ácidos fracos e fortes no látex e caracterização da heparina [RAYMOND, 1993].

A condutância é uma função do somatório das condutâncias individuais de cada tipo de íons presente na solução. Como o íon hidrogênio e hidroxila são bons condutores, observa-se no monitor do condutivímetro a mudança da condutância devido a esses íons serem em função do volume do titulante adicionado. A condutância produzida por quaisquer íons é proporcional a sua concentração (à temperatura constante), mas a condutância de uma determinada solução não varia linearmente com a adição de reagente, devido ao efeito da diluição da água que está sendo adicionada junto com o reagente [EWING, 1993].

2.6.2 Grau de desacetilação da quitosana

Uma das mais importantes propriedades para caracterização da quitosana é o grau de desacetilação (% GD), o qual permite determinar se o biopolímero é quitina ou quitosana; arbitrariamente, o grau de desacetilação ≥ 60 define um material polimérico como quitosana [TAN, 1998].

A determinação exata do grau de desacetilação da quitosana é essencial quando se estuda a relação estrutura/propriedades e um possível uso industrial [RAYMOND, 1993].

A literatura descreve vários métodos para avaliar o conteúdo de grupos aminos livres na QTS. Raymond desenvolveu o método condutimétrico em que o polímero é dissolvido em um excesso de ácido clorídrico $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ e diluído num grande volume de água destilada para permitir uma boa dispersão do precipitado formado após ter sido efetuada a titulação com hidróxido de sódio [RAYMOND, 1993].

Um gráfico da condutância em função do volume do titulante é representado e os pontos de equivalência são determinados para calcular o teor de grupos amino, mostrado na Figura 7.

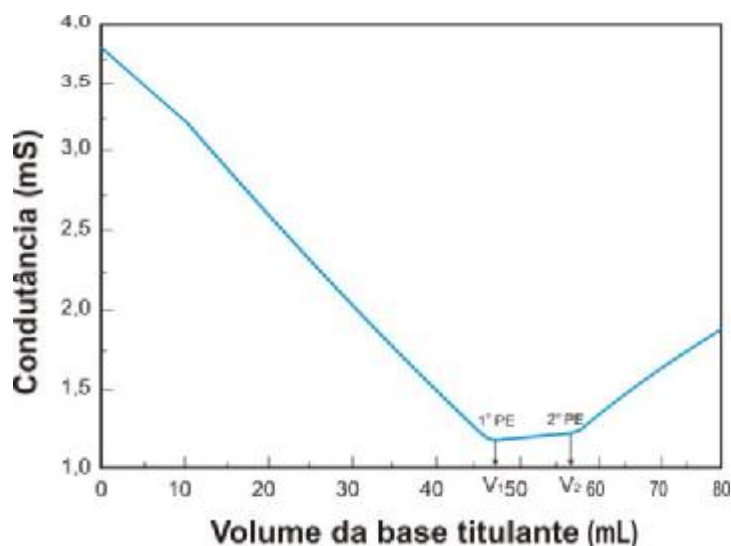


Figura 7 - Curva de titulação condutimétrica

A diferença entre os dois pontos de equivalência corresponde ao volume de base requerido para neutralizar os grupos amino. A porcentagem de grupos amino, isto é, o grau de desacetilação, pode ser calculado usando a Equação 10:

$$\%GD = \frac{M (V_2 - V_1) 161}{W} \times 100 \quad (10)$$

Onde M é a concentração da solução de NaOH em mol L⁻¹, V₁ e V₂ são os volumes de NaOH em mL empregado para neutralizar o excesso de ácido clorídrico e a quitosana protonada, 161 é a massa molar da unidade monomérica do polímero e W é a massa de amostra (em mg) utilizada para a titulação.

2.6.3 Espectroscopia de infravermelho

A região do infravermelho do espectro eletromagnético é a região onde está localizada maior parte da energia das vibrações moleculares. As vibrações de átomos ou de grupos funcionais de um dado composto têm frequência característica, permitindo assim, atribuir à substância, mediante espectroscopia de infravermelho combinado com outras técnicas, a classe correspondente dos compostos. Devido à riqueza em bandas de absorção de boa resolução, o método é apropriado para fornecer as informações importantes sobre a estrutura da molécula.

A espectroscopia no IV tem sido muito utilizada para a identificação da ocorrência ou não de interações fracas (dipolares e ligações de hidrogênio) entre os componentes poliméricos. Deslocamentos de bandas de absorção de certos grupos funcionais -OH (3200-3600 cm⁻¹), =NH (3300-3500 cm⁻¹), grupos carbonílicos (1640-1870 cm⁻¹) entre outros.

2.6.4 Análises termogravimétricas (TGA)

A análise termogravimétrica é uma técnica na qual se pode acompanhar as mudanças na massa de uma amostra durante um período de tempo, enquanto varia sua temperatura. Durante o processo, a temperatura é aumentada, mas a taxa de aquecimento da amostra permanece constante.

Na prática alguns itens como a evaporação, a sublimação, a decomposição, a oxidação, a redução, podem ser medidos. Um gráfico da massa ou do percentual da massa em função da temperatura ou do tempo é chamado termograma ou curva de decomposição térmica. Talvez a mais importante das aplicações de métodos termogravimétricos esteja no estudo de polímeros. Os termogramas fornecem informações sobre mecanismos de decomposição para diferentes tipos de polímeros. Além disso, os padrões de decomposição são característicos para cada tipo de polímero e, em alguns casos, podem ser usados para propósitos de identificação [JOSUÉ, 2002; SKOOG, 2002].

2.6.5 Calorimetria de varredura diferencial (DSC)

Quando um material sofre mudanças no seu estado físico, tais como fusão ou transição de uma forma cristalina para outra, ou quando reage quimicamente, uma quantidade de calor é liberada ou absorvida. Muitos desses processos poderão ser iniciados simplesmente com a elevação da temperatura do material.

Calorimetria de varredura diferencial (DSC) é empregada para determinar a entalpia destes processos, através da medida do fluxo de calor diferencial requerido para manter a amostra e um material de referência inerte à mesma temperatura. Essa temperatura é geralmente programada para varrer uma faixa de temperatura, aumentando linearmente a uma velocidade pré-determinada.

O DSC é empregado para medir condutividade térmica, emissividade térmica, ponto de fusão, entalpias de vaporização e sublimação, mudanças de fases, caracterização de materiais poliméricos, caracterização de complexos etc [BRANDRUP, 1975; FÁVERE, 1994].

Uma variação da temperatura gera uma diferença de potencial que é captada por dois termopares conectados, na amostra e na referência. Esta variação de temperatura (ΔT) é compensada por um fluxo de calor que é registrada em um termograma. A Figura 8 mostra um comportamento típico de um termograma de DSC, onde temos a ocorrência de fenômenos exotérmico e endotérmico.

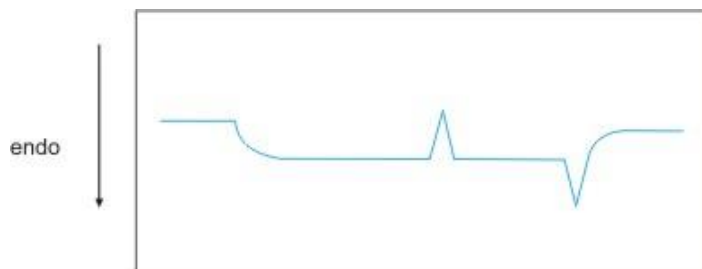


Figura 8 – Termograma característico de um DSC

2.6.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura tem como principal aplicação à observação da superfície da amostra, podendo ser analisado a presença de fissuras e poros. É uma técnica muito utilizada no estudo de morfologia de polímeros. Pode-se também, verificar a partir do MEV, a homogeneidade do tamanho das microesferas formadas [MUZZARELLI et al., 2004].

A MEV apresenta algumas vantagens em relação à microscopia óptica, como maior resolução, maior profundidade de campo, o que permite a observação da amostra em três dimensões.

2.6.7 Ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

A ressonância paramagnética eletrônica (RPE), EPR em inglês, também conhecida como ressonância do spin eletrônico (ESR) é o nome dado ao processo de absorção ressonante de microondas por átomos, íons ou moléculas paramagnéticas, com ao menos um elétron desemparelhado, e na presença de um campo magnético estático. É usada para mapear a distribuição de um elétron desemparelhado em uma molécula, fornecendo várias informações sobre os níveis de energia de complexos. Pode comprovar a estrutura estática de sistemas sólidos e líquidos, e é também muito utilizada no estudo de processos dinâmicos. Mais precisamente neste trabalho, a espectroscopia foi usada para determinar os modos de coordenação dos complexos Cu(II)-quitosana reticulada e Cu(II)-quitosana reticulada/heparina.

2.6.7.1 O valor “g” e a constante hiperfina “A”

O fator g caracteriza o ambiente de coordenação no qual o centro paramagnético está inserido. Um centro paramagnético pode apresentar diferentes valores de g dependendo dos ligantes envolvidos com este centro e da simetria molecular do composto [GOODMA, 1970; MANGRICH, 1998]. Pode-se dizer que o fator g é uma espécie de "impressão digital" do centro paramagnético e de seu ambiente molecular. Em linhas gerais, o fator G em espectroscopia de EPR assemelha-se com o λ_{\max} em espectroscopia eletrônica ou ao $E_{1/2}$ em voltametria cíclica.

A interação hiperfina (A) é uma interação de natureza dipolar entre o spin do elétron desemparelhado e o spin do núcleo a que este elétron pertence. O Hamiltoniano da interação hiperfina é representado por $\mathbf{S} \cdot \mathbf{A} \cdot \mathbf{I}$, onde \mathbf{S} e \mathbf{I} são vetores (relacionados com o spin eletrônico e o spin nuclear, respectivamente) e A é um tensor que mede o comprimento das transições formadas pela interação entre os spins; assim, a constante de interação hiperfina A mede a grandeza dessa interação. Uma interação super-hiperfina também é uma interação de natureza dipolar, só que entre o spin do elétron desemparelhado e o(s) spin do(s) núcleo(s) ligado(s) ao átomo ou íon paramagnético a que pertence este elétron [GOODMA, 1970; MANGRICH, 1998].

O cobre (^{63}Cu ou ^{65}Cu) tem spin nuclear $I = 3/2$, o qual dá origem a um desdobramento hiperfino. Dessa forma um espectro de EPR de complexos de Cu (II) consiste de quatro linhas largas. Mas para muitos compostos, os elétrons d estão deslocalizados, em uma considerável extensão, por sobre os ligantes e, assim, se os átomos dos ligantes tiverem, eles mesmos, um spin nuclear, então se pode esperar por padrões de desdobramento super-hiperfino sobrepostos a estas linhas. No caso de Cu (II) com distorção Jahn-Teller, as configurações tetragonal, quadrada, piramidal quadrada e bipiramidal trigonal, apresentam geralmente um espectro axial com dois componentes g coincidentes ($g_x = g_y = g_{\perp}$), perpendiculares ao eixo do campo magnético e, um componente g diferente ($g_z = g_{\parallel}$) paralelo ao campo magnético [GOODMA, 1970; JAMESON, 1981; MANGRICH, 1998].

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem por objetivo a utilização de microesferas quitosana reticulada com epicloridrina e modificada com heparina para estudar a adsorção de íons cobre (II) em solução, e comparar os resultados com os estudos da quitosana reticulada com epicloridrina sem modificação.

3.2 Objetivos Específicos

- Purificar as amostras de heparina.
- Determinar o teor de grupos sulfonatos e carboxílicos da heparina por titulação condutimétrica.
- Determinar o grau de desacetilação da quitosana por titulação condutimétrica.
- Preparar microesferas de quitosana.
- Reticular as microesferas de quitosana com epicloridrina para impedir a solubilização em meio aquoso.
- Impregnar a heparina nas microesferas de quitosana.
- Caracterizar os produtos por espectroscopia no infravermelho, análise termogravimétrica, calorimetria de varredura diferencial e microscopia eletrônica de varredura.
- Avaliar alguns fatores, tais como: massa, concentração, tempo e volume da solução para avaliar o efeito desses fatores na eficiência da remoção de cobre (II) em solução.
- Estudar a dependência do pH na adsorção do cobre (II) em experimentos de batelada para determinar o pH ótimo de adsorção.
- Investigar a cinética de adsorção empregando o pH ótimo de adsorção.
- Determinar a capacidade máxima de adsorção das microesferas e o teor de cobre (II) retido pelas mesmas através de espectrometria de absorção atômica.
- Estudar os tipos de interações envolvidas entre a quitosana reticulada e quitosana reticulada/heparina com íons cobre (II) no processo de adsorção.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAIS

A heparina sódica foi cedida gentilmente pela empresa: Kin Master (Passo Fundo, RS). E a quitosana foi adquirida pela empresa Purifarma (SP).

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico (P.A). Acetato de Sódio (Synth), Ácido Acético (Nuclear), Ácido Clorídrico (Dinâmica), Ácido Nítrico (Dinâmica), Cloreto de Sódio (Nuclear), Epicloridrina (Synth), Hidróxido de Sódio (Nuclear), Metanol (Nuclear), Resina Amberlite IR-120 (Sigma-Aldrich), Solução Padrão de Cobre II (Titrisol[®] - Merck).

4.2 EQUIPAMENTOS

As pesagens foram realizadas em uma balança analítica marca Shangping Eletronic Balance, modelo FAI 6045.

Utilizou-se uma bomba peristáltica de marca Ismatec, modelo 78016-30.

As medidas de pH foram feitas com pH-metro marca Corning, modelo pH / íon analyser 350.

Para os estudos de adsorção utilizou-se o banho termostatzado Mini Shaker, modelo MA 832 Marconi.

A titulação condutimétrica foi realizada utilizando-se um titulador automático da marca Schott Gerate, modelo T80/20 e um condutivímetro da marca Mettler Toledo, modelo MC 226.

As análises de IV foram realizadas em pastilhas de KBr, utilizando-se um aparelho de Infravermelho Perkin Elmer FTIR 16 PC.

Para determinação da quantidade de cobre foi utilizado o espectrômetro de absorção atômica Hitachi Z8230.

As análises de TGA e DSC foram realizadas em um analisador termogravimétrico (TGA-50-Shimadzu) e em um calorímetro diferencial de varredura (DSC-50-Shimadzu), respectivamente.

Para as análises de morfologia e diâmetro médio das microesferas utilizou-se um microscópio eletrônico de varredura Philips XL-30.

As análises de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) foram realizadas em um equipamento BRUKER ESP 300E no Laboratório Regional Sul de EPR do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná. Os espectros foram tratados com o programa de computador WinEPR[®] e simulados com o programa SimFonia[®].

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Purificação da heparina

A heparina comercial na forma sódica (10g) foi dissolvida em 100 mL de água contendo 3 g de cloreto de sódio, posteriormente foi adicionado 180 mL de metanol. Após a precipitação o produto foi filtrado e lavado com metanol e seco a temperatura ambiente [EBERT, et al., 1982].

4.3.2 Determinação do teor de grupos sulfonatos e carboxílicos da heparina

A heparina sódica foi inicialmente convertida na forma ácida por eluição de uma quantidade conhecida de heparina (50 mg), dissolvida em água deionizada, através de uma coluna previamente empacotada com resina Amberlite IR-120 (H⁺), a qual ocupou 7 cm³, foram coletados 150 mL de eluente. A solução que saiu da coluna foi titulada com a solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹. A titulação condutimétrica foi feita em triplicata [EBERT, et al., 1982].

4.3.3 Determinação do grau de desacetilação da quitosana

Foram dissolvidos 200 mg de quitosana em 20 mL de HCl 0,3 mol L⁻¹ e diluídos com 200 mL de água neutra deionizada para uma boa dispersão do polímero em solução. A solução foi titulada com a solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ adicionada. A titulação condutimétrica foi feita em triplicata.

4.3.4 Preparação das microesferas de quitosana

A quitosana (4,0 g) foi dissolvida em 100,0 mL de ácido acético 5% (m/v), mantido sob agitação constante até completa dissolução da quitosana. A solução polimérica de quitosana foi gotejada com auxílio de uma bomba peristáltica sobre uma solução de NaOH 2 mol L⁻¹. Através do fenômeno de separação de fases ocorreu a precipitação das microesferas. As microesferas formadas foram lavadas com água destilada até neutralização do pH.

4.3.5 Preparação das microesferas de quitosana reticuladas com epícloridrina

Uma alíquota de 25 mL de epícloridrina foi adicionado a uma suspensão contendo 100 g de microesferas úmidas em 1000 mL de água e mantida em 50 °C por 30 minutos. Subseqüentemente, 700 mL de NaOH 0,1 mol L⁻¹ foi adicionado e o sistema foi levado à ebulição por 2h. Na seqüência, as microesferas foram lavadas com água destilada até pH neutro e secas em dessecador.

4.3.6 Impregnação de heparina nas microesferas de quitosana reticulada

As microesferas de quitosana foram impregnadas com heparina de acordo com a técnica de absorção por contato. A heparina na forma sólida foi dissolvida em água e a solução resultante foi colocada em contato com as microesferas de quitosana para impregnação por 24 horas a 25°C em um sistema de batelada. As microesferas foram lavadas rapidamente com água para remover o excesso de heparina nas superfícies das microesferas. O solvente foi removido por evaporação.

4.3.7 Adsorção de cobre (II) em microesferas de quitosana reticulada (QTSR) e em quitosana reticulada/heparina (QTSR-HEP)

4.3.7.1 Espectrometria de absorção atômica

As concentrações de cobre (II) foram determinadas em um espectrômetro de absorção atômica em chama, onde foram utilizados os parâmetros operacionais descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros operacionais utilizados para a determinação da concentração de cobre (II) nas amostras por FAAS

Condições de trabalho	Cobre (II)
Corrente da lâmpada	5,0 mA
Combustível	Acetileno
Oxidante	Ar
Comprimento de onda	324,8 nm
Faixa de concentração de trabalho	0 – 5 mg L ⁻¹

4.3.7.1.1 Dependência do pH na adsorção

Foi realizado um estudo para estimar o pH ótimo de adsorção. Estes experimentos foram realizados em erlenmeyers fechados de 250 mL. Várias amostras de 500 mg de microesferas de QTSR e QTSR-HEP foram colocadas numa série de frascos contendo 100 mL de solução 25 mg L⁻¹ de cobre (II). O pH foi ajustado entre 3,0 e 6,0 com tampão ácido acético/acetato de sódio 0,1 mol L⁻¹. O sistema foi colocado num banho termostatizado, sob agitação de 200 rpm a 25°C durante 48 horas. Alíquotas foram retiradas e colocadas em balões volumétricos, avolumados com ácido nítrico 1% (v/v) para determinar a concentração remanescente dos íons cobre (II) por FAAS.

4.3.7.1.2 Cinética de adsorção

O tempo necessário para o sistema sólido atingir as condições de equilíbrio foram determinadas pelo processo de batelada, colocando-se 500 mg de microesferas secas de QTSR e QTSR-HEP em contato com 100 mL de solução de cobre (II) 25 mg L⁻¹, tamponados em pH adequado, em um banho termostatizado a 25°C e sob agitação de 200 rpm por 48 horas. Em intervalos de tempos diferentes foram retiradas alíquotas, colocadas em balões volumétricos e avolumados com ácido nítrico 1% (v/v). A quantidade de íons cobre (II) remanescente em solução foi determinada por FAAS.

4.3.7.1.3 Isoterma de adsorção

Os estudos de equilíbrio de adsorção foram conduzidos num banho termostatizado a uma temperatura de 25°C e sob agitação de 200 rpm, em que 500 mg de microesferas de QTSR e QTSR-HEP foram colocados em vários frascos fechados, contendo 100 mL de solução de cobre (II) com concentrações variando entre 10 mg L⁻¹ a 800 mg L⁻¹ e tamponados em pH adequado. Em 48 horas, após ter atingido o equilíbrio de adsorção, alíquotas foram retiradas e colocadas em balões volumétricos, avolumados com ácido nítrico 1% (v/v) para determinar a concentração remanescente dos íons cobre (II) por FAAS.

4.3.8 Caracterização das Amostras

4.3.8.1 Espectroscopia no infravermelho

Para a obtenção dos espectros de IV as amostras de QTS, QTSR, QTSR-HEP e HEP foram trituradas e posteriormente analisadas no espectrômetro de infravermelho na região de 4000– 400 cm⁻¹, com pastilhas de KBr.

4.3.8.2 Análises de TGA e DSC

As amostras foram colocadas dentro de um cadinho de platina e submetidas a um programa de temperatura de 25 – 900 °C com uma taxa de aquecimento de 10 °C/ minuto, sob atmosfera de nitrogênio.

4.3.8.3 Análise de microscopia eletrônica de varredura

As amostras para análise de microscopia eletrônica de varredura foram trituradas e colocadas em um suporte para amostra e a seguir transportadas para um metalizador (modelo P-S2 Diode Sputtering System) onde foram recobertas com uma fina camada de ouro.

4.3.8.4 Ressonância paramagnética eletrônica

As amostras de microesferas de QTSR-Cu e de QTSR-HEP-Cu submetidas para análise de ressonância paramagnética eletrônica foram trituradas e colocadas num espectrômetro a temperatura de 77 K (temperatura do nitrogênio líquido), operando próximo de 9.5 GHz (X-band).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização das microesferas

5.1.1 Purificação da heparina

As propriedades da heparina possivelmente podem ser otimizadas através da redução do índice de impurezas, isto porque a grande maioria das heparinas contém contaminantes tais como ácidos nucleicos e polipeptídeos ou até mesmo diversos polissacarídeos. Dentre os últimos os sulfatos de condroitinas e sulfatos de dermatanas são especialmente representativos. Estes contaminantes, em consequência de elevadas massas molares, da presença de substituintes e do grau de sulfatação, são capazes de interferir na preparação do produto afetando a distribuição final da massa molar [NELSON, 2002].

5.1.2 Teor de grupos sulfonatos e carboxílicos da heparina

A Figura 9 ilustra a titulação condutimétrica de uma amostra de heparina. A extrapolação da curva condutimétrica forneceu dois pontos de intersecção, o primeiro corresponde ao número de grupos $-\text{SO}_3\text{H}$ ($v_1= 2,83$ mL) enquanto o segundo corresponde ao número de grupos $-\text{COOH}$ ($v_2= 4,02$ mL).

A condutividade da solução da amostra é inicialmente alta principalmente devido à contribuição de prótons dos grupos sulfonatos, diminuindo linearmente os prótons $-\text{SO}_3\text{H}$ são substituídos por íons Na^+ . A quantidade de grupos sulfonatos foi de 3,83 mmol/g de heparina.

Depois que todos os prótons são neutralizados, há um nivelamento da curva. Esta região do platô corresponde ao próton dissociado do grupo carboxílico. A condutividade dificilmente muda nesta região devido ao efeito compensatório de prótons carboxílicos neutralizados, aumentando a concentração do íon Na^+ . A quantidade de grupos carboxílicos foi de 1,62 mmol/g de heparina. Depois de dissociado e neutralizado todos os prótons carboxílicos, a condutividade aumenta agudamente, principalmente devido à contribuição do íon OH^- [EBERT, 1982].

Assim, a titulação condutimétrica revelou ser uma ferramenta analítica para a quantificação de grupos funcionais sulfonatos e carboxílicos na heparina, confirmando a estrutura molecular do polieletrólito aniônico.

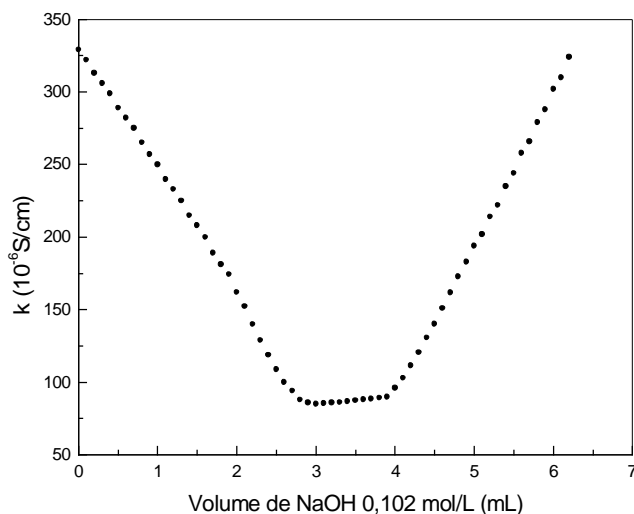


Figura 9 – Titulação Condutimétrica da Heparina

5.1.3 Grau de desacetilação da quitosana

A Figura 10 ilustra a titulação condutimétrica de uma amostra de quitosana. O primeiro ponto de equivalência corresponde à neutralização do excesso de ácido empregado para dissolução do polímero ($v_1 = 53,81$ mL) e a diferença entre os dois pontos de equivalência corresponde ao volume de base requerido para neutralizar os grupos amino ($v_2 = 63,94$ mL).

A condutividade da solução da amostra vai diminuindo linearmente, pois os prótons H^+ do ácido clorídrico são substituídos por íons Na^+ . Depois que todos os prótons são neutralizados, há um nivelamento da curva. Esta região do platô corresponde ao próton dissociado do grupo amino. Depois de dissociado e neutralizado todos os prótons do grupo amino, a condutividade aumenta agudamente, principalmente devido à contribuição do íon OH^- .

O resultado da titulação condutimétrica foi calculado segundo a Equação 10. O grau de desacetilação calculada por este método foi de 83,18 %, sendo que este valor representa a média de três determinações. Este resultado mostra que o polímero em estudo é quitosana e apresenta um grau de desacetilação relativamente elevado.

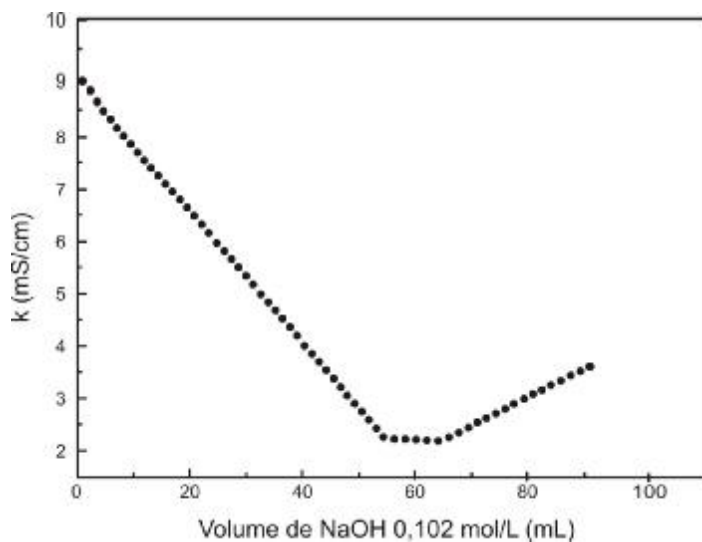


Figura 10 – Titulação Condutimétrica da Quitosana

5.1.4 Espectroscopia no infravermelho

A Figura 11 mostra os espectros de infravermelho da QTS, QTSR, QTSR-HEP e HEP, respectivamente.

No espectro de infravermelho da QTS (Figura 11a), observa-se à banda de absorção em 3439 cm^{-1} muito intensa devido às vibrações de estiramento da ligação -OH , enquanto em 2930 e 2880 cm^{-1} corresponde à vibração de estiramento C-H . As bandas em 1655 e 1602 cm^{-1} referem-se ao estiramento C=O da amida secundária e as vibrações de deformação de N-H de amina primária, respectivamente. A banda em 1381 cm^{-1} é atribuída à deformação de C-H do grupo CH_3 , referente ao grupo acetamido ainda presente na cadeia polimérica em pequena proporção, pois a quitosana não está completamente desacetilada. A banda em 1081 cm^{-1} origina do estiramento vibracional C-O de álcool primário.

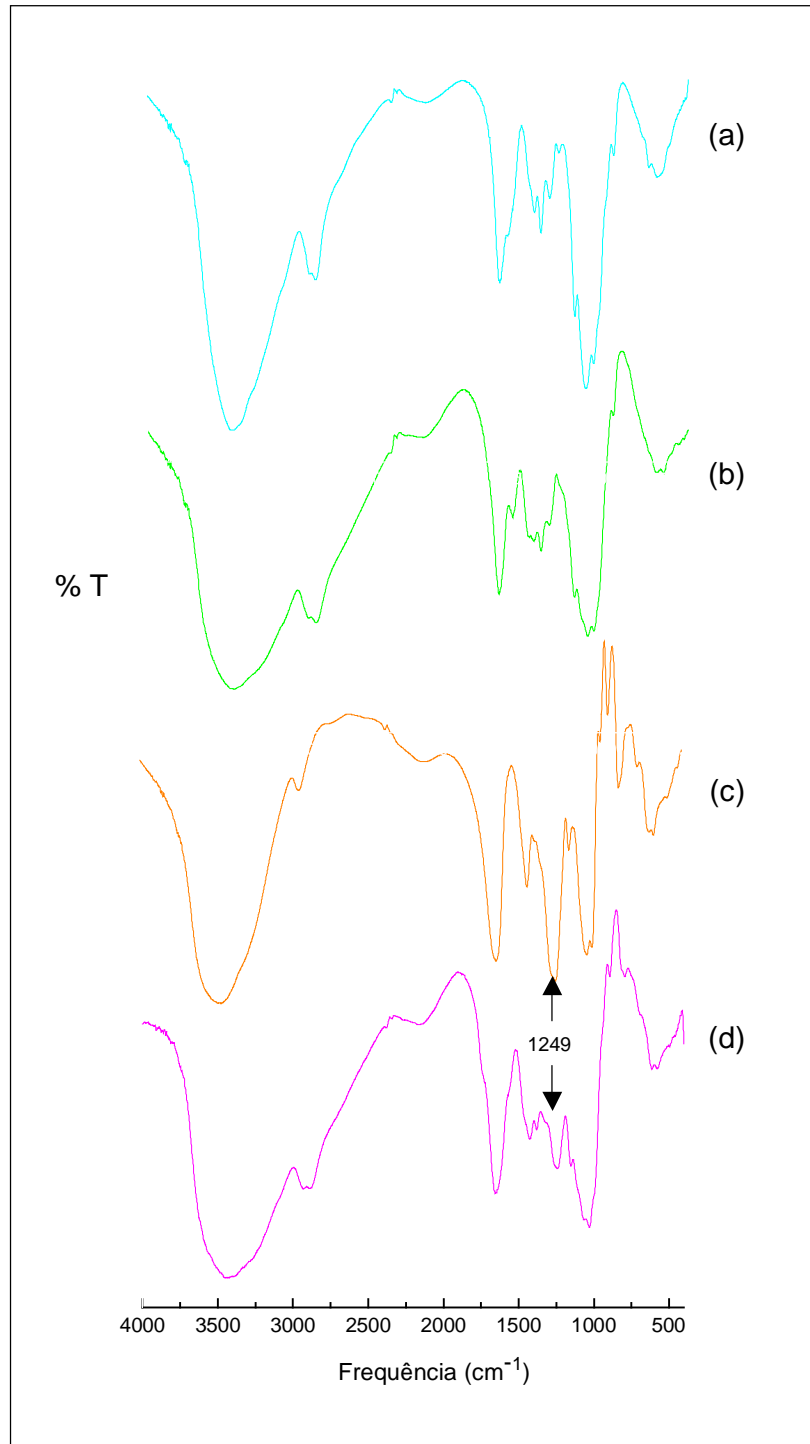


Figura 11 - Espectro de Infravermelho: (a) QTS, (b) QTSR, (c) HEP e (d) QTSR-HEP

A Figura 11b apresenta o espectro de infravermelho da QTSR, observa-se a banda de absorção em 3422 cm^{-1} muito intensa devido às vibrações de estiramento da ligação -OH , enquanto em 2930 e 2871 cm^{-1} corresponde à vibração de estiramento C-H . As bandas em 1662 e 1602 cm^{-1} referem-se ao estiramento C=O da amida secundária e as vibrações de deformação de N-H de amina primária, respectivamente. A banda em 1381 cm^{-1} é atribuída à deformação de C-H do grupo CH_3 , referente ao grupo acetamido. A banda em 1069 cm^{-1} origina do estiramento vibracional C-O de álcool primário. Os espectros da QTS e da QTSR foram muito semelhantes, o que era de se esperar, já que os grupos funcionais da epicloridrina já estão presentes na quitosana, logo, tem as mesmas vibrações e deformações existentes no IV quitosana; mudou-se apenas as intensidades relativas.

Observa-se para a HEP (Figura 11c) as principais bandas: 3480 cm^{-1} banda de estiramento da ligação O-H ; em 2941 cm^{-1} banda de estiramento C-H ; 1632 cm^{-1} e 1428 cm^{-1} são bandas de deformação axial assimétrica e simétrica, respectivamente, do ânion carboxilato; 1238 cm^{-1} deformação axial assimétrica do grupo C-O-C , também sobreposto nesta banda está a banda de deformação axial assimétrica de grupo S=O ; 1028 cm^{-1} deformação axial simétrica do grupo C-O-C [OLIVEIRA, 2003].

No espectro de infravermelho da QTSR-HEP (Figura 11d), observa-se a banda de absorção em 3450 cm^{-1} muito intensa devido às vibrações de estiramento da ligação -OH , enquanto em 2930 e 2880 cm^{-1} corresponde à vibração de estiramento C-H . A banda em 1655 cm^{-1} refere-se ao estiramento C=O da amida secundária e da deformação axial assimétrica do ânion carboxilato, assim como em 1430 cm^{-1} aparece a banda de deformação axial simétrica do carboxilato. A banda em 1381 cm^{-1} é atribuída à deformação de C-H do grupo CH_3 . A banda em 1027 cm^{-1} origina do estiramento vibracional C-O de álcool primário e da deformação do grupo C-O-C [SILVERSTEIN, 1979]. É importante destacar o aparecimento de uma nova banda em 1249 cm^{-1} , a qual é atribuída ao estiramento assimétrico do grupo sulfonato quando forma complexo entre a heparina e um polication ou um simples cation [GRANT et al., 1987]. Assim, é sugerida uma interação iônica entre os grupos amino protonados da quitosana reticulada e os grupos sulfonatos da heparina com formação de complexo polimérico aniônico-catiônico, mostrado na Figura 12.

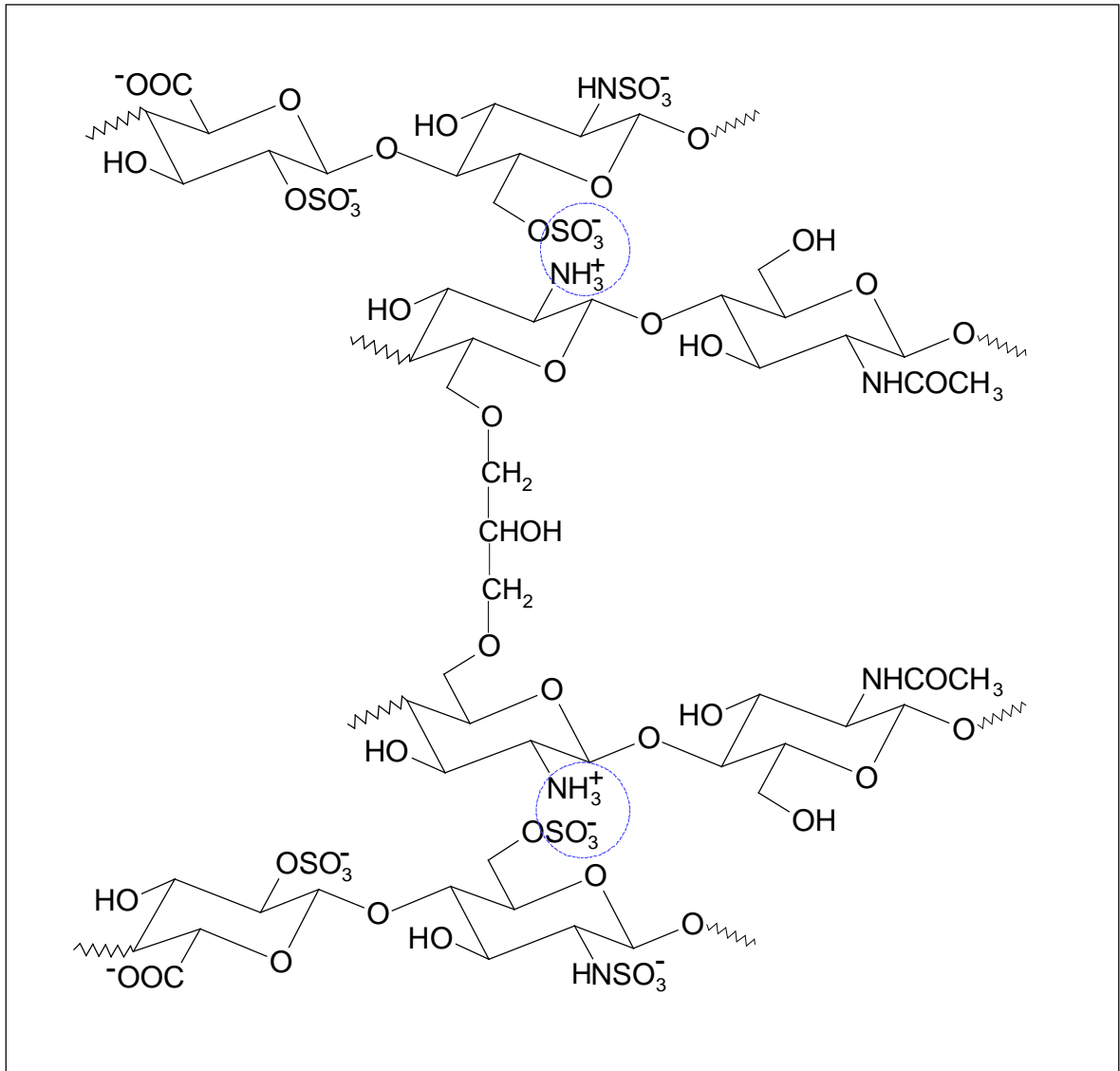


Figura 12 - Complexo Heparina- Quitosana reticulada com Epicloridrina

5.1.5 Análise de TGA e DSC

Objetivando avaliar as características térmicas das microesferas em estudo, foram feitas análises de TGA e DSC das amostras.

As curvas termogravimétricas das amostras estão mostradas na Figura 13. Elas mostram perda de massa em dois estágios. No primeiro estágio, observa-se que as amostras apresentam perda de massa a partir de 68°C que é atribuído à perda de água adsorvida e estrutural contida nos materiais.

No segundo estágio, outras perdas de massa são verificadas em: 332,15°C (49,68%) para as microesferas de quitosana; 275,35°C (44,94%) para as microesferas de quitosana reticulada; 269,03°C (47,71%) para as microesferas de quitosana reticulada/heparina; 281,84°C (43,47%) para as microesferas de quitosana reticulada com cobre adsorvido; 267,87°C (49,63%) para as microesferas de quitosana reticulada/heparina com cobre adsorvido; 271,36°C (40,42%) para heparina. Estas perdas referem-se à decomposição do polímero.

Estes valores de temperatura representam os pontos de máxima perda de massa dos materiais poliméricos e foram determinados através da derivada primeira das curvas termogravimétricas.

Ao comparar as temperaturas de decomposição das microesferas de quitosana e das outras microesferas, constata-se uma diminuição da estabilidade térmica destas, atribuída à introdução de novos grupos funcionais [NG, 2002].

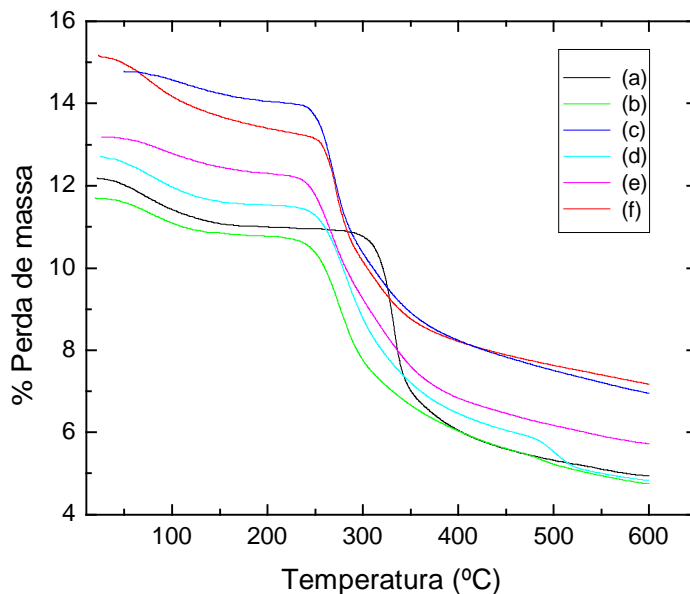


Figura 13 - Análise de TGA para: (a) QTS, (b) QTSR, (c) QTSR-HEP, (d) QTSR-Cu, (e) QTSR-HEP-Cu e (f) Heparina

A técnica de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foi empregada para examinar possíveis interações entre a matriz polimérica e o cobre (II).

Observa-se para as amostras, um pico endotérmico por volta de 90 – 140°C (Figura 14), correspondente ao processo de remoção de água presente nas amostras. Este pico é comprovado através das análises de TGA para todas as amostras.

Na Figura 14a, verifica-se um pico exotérmico em 309°C correspondente ao processo de decomposição térmica da quitosana. Este pico aparece deslocado para temperaturas mais baixas para as outras amostras, num valor que varia de 238 – 260°C. Para as amostras de QTSR e QTSR-HEP quando adsorvidas com íon cobre(II) os respectivos picos exotérmicos se deslocam para temperaturas mais baixas, sugerindo uma provável formação de complexos de coordenação. Também pode-se observar a grande diferença nos valores dos picos exotérmicos 260°C e 238°C, respectivamente para microesferas de QTSR-Cu e QTSR-HEP-Cu, o qual pode ser atribuído a uma possível mudança estrutural entre estes dois complexos de cobre(II), que será confirmado posteriormente por estudos de EPR.

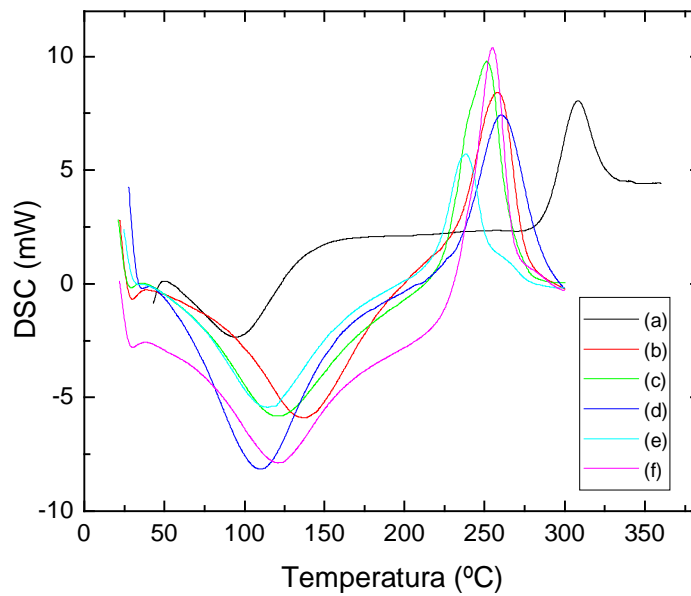


Figura 14 - Análise de DSC para: (a) QTS, (b) QTSR, (c) QTSR-HEP, (d) QTSR-Cu, (e) QTSR-HEP-Cu e (f) Heparina

Os resultados das análises de TGA e DSC das microesferas permitiram verificar que houve uma diferença estrutural das microesferas, confirmando por estas duas técnicas que se trata de um novo material.

5.1.6 Análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A Figura 15 ilustra as fotomicrografias por microscopia eletrônica de varredura mostrando a morfologia das microesferas.

O diâmetro médio das microesferas foi determinado a partir da micrografia de uma população de microesferas. O diâmetro médio das microesferas de QTSR encontrado foi de 760 μm , e para as microesferas de QTSR-HEP foi de 906 μm . Este aumento no diâmetro confirma a impregnação da heparina.

A estrutura externa obtida das microesferas mostrou-se sem fissuras ou porosidade aparente. A diminuição da porosidade pode influenciar na velocidade de adsorção, uma vez que limita ou mesmo dificulta a penetração do adsorvato de interesse no interior da microesfera.

As análises das micrografias das microesferas contendo a heparina revelam uma impregnação eficiente sugerindo que a heparina está dissolvida na matriz polimérica.

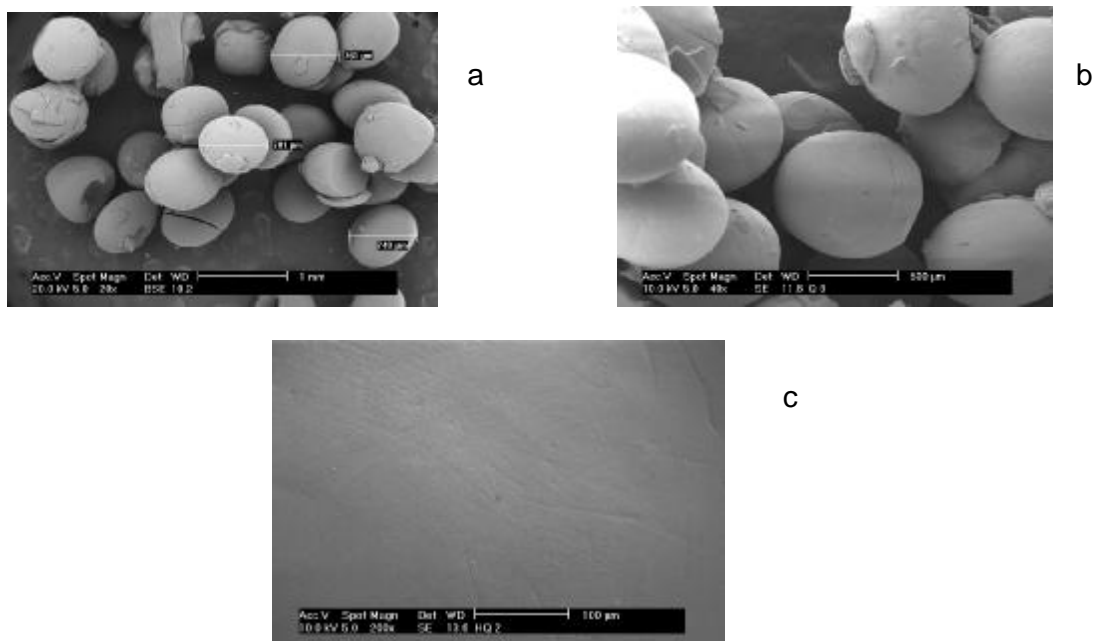
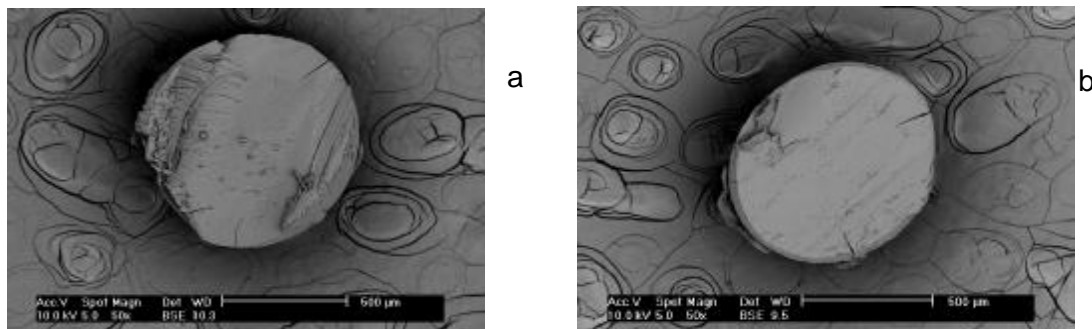


Figura 15 – Microscopia eletrônica de varredura das microesferas de: (a) QTSR com um aumento de 20x, (b) QTSR-HEP com aumento de 40 x e (c) QTSR-HEP com um aumento de 200 x

Foram feitas secções transversais nas microesferas para a avaliação das características internas de cada amostra, as quais são mostradas na Figura 16.



Figuras 16 – Secções transversais das microesferas de: (a) QTSR e (b) QTSR-HEP

Através da análise da secção transversal, pode-se perceber a ausência de poros e fissuras na parte interna das microesferas.

5.2 Estudos de adsorção de cobre (II) em microesferas de quitosana reticulada e em quitosana reticulada/heparina

A eficiência da reação pode ser aumentada através do rígido controle das proporções dos reagentes, da temperatura e do tempo reacional. Para tanto, foram realizados estudos para verificar a eficiência da remoção de cobre (II) em solução. Foram escolhidas as condições ótimas de trabalho. A massa das microesferas variou de 0,10 a 0,50 g, ocorrendo preferencialmente com 0,5 g. O volume da solução de cobre (II) variou de 25 a 100 mL, obtendo melhores resultados com 100 mL.

A concentração de cobre (II) foi ajustada para valores entre 25 e 100 mg L⁻¹, como os valores de adsorção foram proporcionais, optou-se pela concentração mais baixa de 25 mg L⁻¹. A temperatura reacional do meio foi realizada em 25°C, o tempo reacional variou de 11 a 60 horas, ocorrendo preferencialmente em 48 horas.

5.2.1 Dependência do pH na adsorção de cobre (II)

Microesferas de quitosana foram reticuladas visando o aumento da sua resistência, pois em pH muito baixo pode ocorrer a dissolução das mesmas, uma vez que a quitosana é solúvel em meio ácido.

Devido ao processo de reticulação da quitosana com epícloridrina ocorrer em condições reacionais brandas, nem todos os grupos de $-OH$ foram comprometidos.

Para alcançarmos os valores de pH se fez necessário a utilização de um tampão. Este estudo foi realizado na faixa de pH 3,0 – 6,0. Em pH abaixo de 3,0 o tampão não era capaz de manter o pH, variando muito o pH final. A concentração utilizada neste experimento foi de 25 mg L^{-1} , nesta concentração o cobre começa a precipitar em pH 6,3, justificando a escolha até pH 6,0. Em valores de pH mais altos (solução básica), a precipitação do hidróxido de cobre (II) acontece simultaneamente com a adsorção de íons Cu(II) . O pH 6,0 foi escolhido para a adsorção de íons cobre (II) para evitar a formação de hidróxido de cobre (II) que afeta o valor interpretado para a capacidade de adsorção.

No meio aquoso com pH menor que 6,5 o grupo amino da quitosana adquire um próton e se ioniza positivamente. A quitosana tem um pK_a em torno de 6,3. A partir do valor de pK_a , pode ser calculado que a extensão de protonação é 9; 50; 91 e 99 % para um pH de 7,3; 6,3; 5,3 e 4,3; respectivamente [GUIBAL, 1999; SCHMUHL, 2001].

Segundo Domard a formação do complexo de quitosana - cobre envolve a ligação do íon cobre com o monômero da quitosana através de um grupo amino e dois grupos hidroxila e a liberação de dois íons hidrogênio [DOMARD, 1987].

Os grupos amino da quitosana são os principais sítios efetivos de ligação para os íons de metais, formando complexos estáveis por coordenação. Os elétrons do nitrogênio presentes nos grupos amino e N-acetilamino podem estabelecer ligações covalentes coordenadas com os íons de metais de transição. Alguns grupos hidroxila neste biopolímero podem funcionar como doadores. Portanto, grupos hidroxila desprotonados podem ser envolvidos na coordenação com os íons de metais [SCHMUHL, 2001].

Baseado nos resultados obtidos nos estudos da dependência da adsorção de cobre (II) pelas microesferas de QTSR em função do pH (Figura 17), observa-se um aumento de adsorção de cobre (II) com o aumento de pH, sendo que a quantidade máxima do soluto adsorvido ocorre em pH 6,0, próximo do pKa da quitosana ($pK_a \sim 6,3$) onde os grupos NH_2 estão praticamente com mais de 50% protonados. O pH baixo pode favorecer a protonação dos sítios aminos, resultando num impedimento devido ao aumento de carga positiva, a qual poderia diminuir a capacidade quelante da quitosana pelo metal. Isto sugere que em pH próximo de 7,0 a maioria dos metais seria adsorvida pela quitosana.

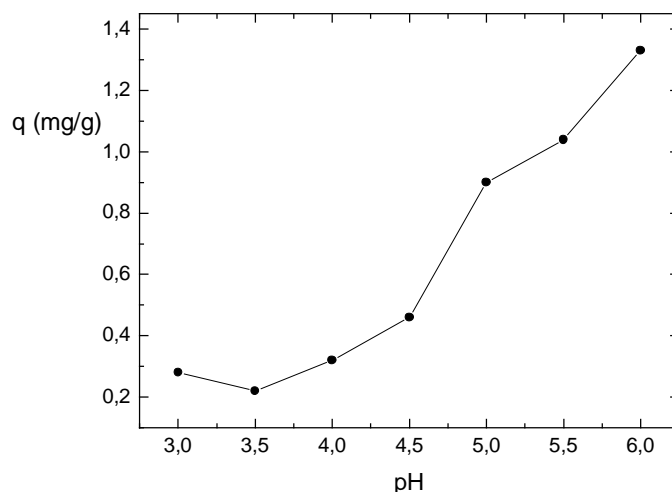


Figura 17 – Efeito do pH na adsorção de cobre (II) utilizando microesferas de QTSR

A Figura 18, mostra a dependência da adsorção de cobre (II) pelas microesferas de QTSR-HEP em função do pH onde também se observa um aumento de adsorção de cobre (II) com o aumento de pH. A maior adsorção também foi em pH 6,0.

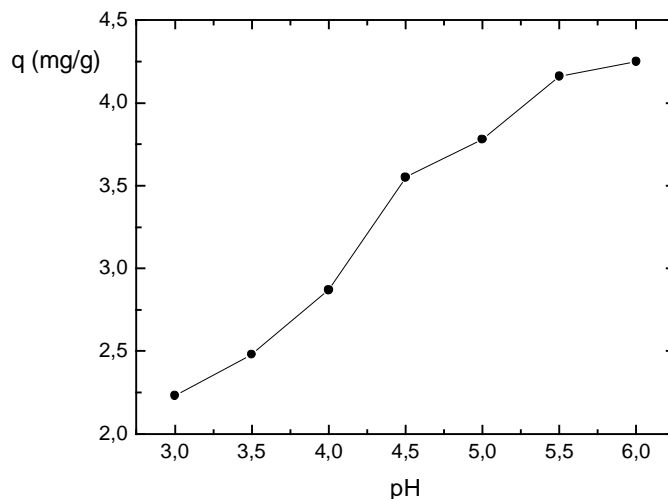


Figura 18 – Efeito do pH na adsorção de cobre (II) utilizando microesferas de QTSR-HEP

A comparação entre as duas microesferas se torna válida uma vez que foram feitas nas mesmas condições, de máxima adsorção, em um mesmo pH.

5.2.2 Cinética de adsorção de cobre (II)

Utilizando o pH ótimo de adsorção (pH=6,0), foram realizadas cinéticas de adsorção a fim de se determinar o tempo para o sistema atingir o equilíbrio.

A Figura 19 apresenta o decaimento da concentração de cobre (II), utilizando as microesferas de QTSR, em função do tempo; sendo que C_i é a concentração inicial da solução e C_f a concentração final da solução num tempo específico.

Foi observado um decaimento rápido nas primeiras horas, seguida por um gradual equilíbrio. Em torno de 8 horas foi alcançado o equilíbrio.

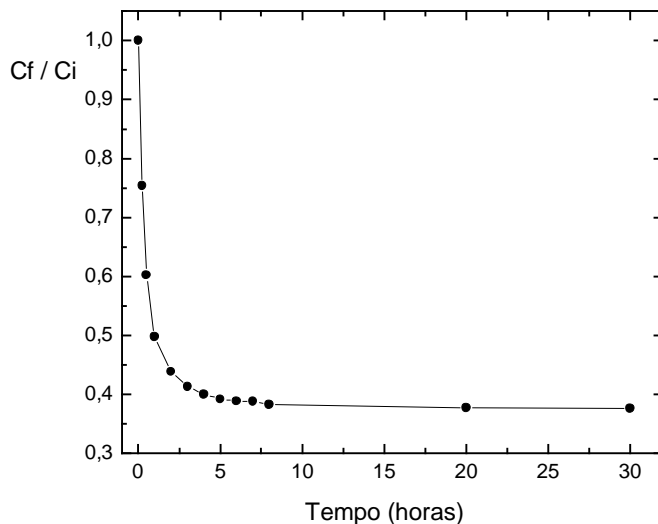


Figura 19 – Cinética de adsorção de cobre (II) utilizando microesferas de QTSR

A Figura 20 apresenta o decaimento da concentração de cobre (II), utilizando as microesferas de QTSR-HEP, em função do tempo. Também foi observado um decaimento rápido nas primeiras horas, seguida por um gradual equilíbrio. Em torno de 25 horas foi alcançado o equilíbrio. Esta cinética apresentou um equilíbrio mais lento e uma relação C_f/C_i menor, logo, sua adsorção foi maior.

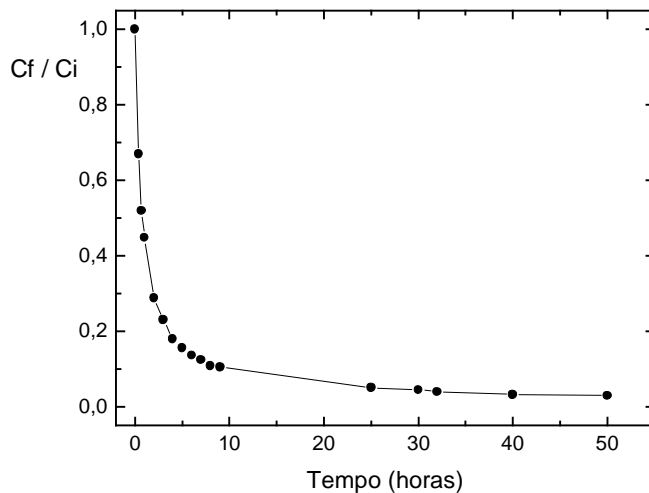


Figura 20 – Cinética de adsorção de cobre (II) utilizando microesferas de QTSR-HEP

De acordo com Wu et al. [2001] foi observado que, para examinar o mecanismo que controla o processo de adsorção, tais como transferência de massa na solução e reação química, os modelos cinéticos de pseudo primeira-ordem, pseudo segunda-ordem e difusão intrapartícula foram testados neste estudo. Uma boa correlação dos dados cinéticos revela o mecanismo de adsorção, deste modo a validade destes modelos foi testada pela linearização da curva e parâmetros da equação: $\log(q_e - q_t)$ vs t para o modelo da pseudo primeira-ordem, t/q_t vs t para o modelo de pseudo-segunda ordem e q_t vs $t^{1/2}$ para a difusão intrapartícula. A avaliação quantitativa requer que o coeficiente de correlação de cada modelo seja comparado. Os parâmetros das regressões lineares determinados empregando os vários modelos e as curvas lineares obtidos estão apresentados nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Parâmetros das regressões lineares determinados empregando os vários modelos de cinética para o cobre (II) adsorvido em microesferas de QTSR

Modelo de Cinética	Equação da reta
Pseudo primeira-ordem	$Y = -0,21156 - 0,00211X$ (R = 0,92873)
Pseudo segunda-ordem	$Y = 4,539 + 0,31797X$ (R = 0,99997)
Difusão intrapartícula	$Y = 2,13856 + 0,03401X$ (R = 0,67001)

Os dados cinéticos de adsorção foram melhor ajustados com o uso do modelo cinético de pseudo-segunda ordem, a qual forneceu o melhor coeficiente de correlação (R = 0,99997).

A Figura 21 ilustra o plote linear (t/q_t versus t) obtido pela equação de pseudo-segunda ordem. Este modelo indicou que o controle do mecanismo de velocidade é a adsorção química (reação química), e que a velocidade de adsorção do metal pelo adsorvente foi dependente da concentração dos íons no adsorvente e a concentração destes adsorvidos no equilíbrio. O valor da constante de velocidade determinado foi de $2,23 \times 10^{-2} \text{ g mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$, com uma velocidade de adsorção inicial de $0,22 \text{ mg g}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

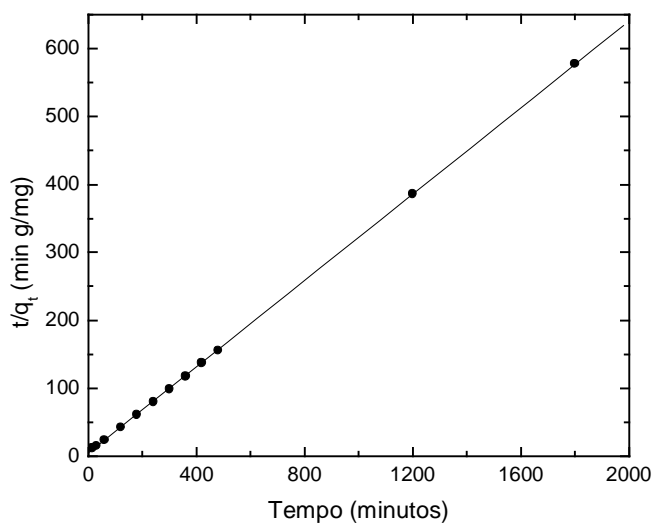


Figura 21 - Modelo de cinética de pseudo-segunda ordem para soluções de cobre (II) adsorvido em microesferas de QTSR

Tabela 3 - Parâmetros das regressões lineares determinados empregando os vários modelos de cinética para o cobre (II) adsorvido em microesferas de QTSR-HEP

Modelo de Cinética	Equação da reta
Pseudo primeira-ordem	$Y = 0,19401 - 8,48716 \cdot 10^{-4}X$ (R = 0,96703)
Pseudo segunda-ordem	$Y = 10,07859 + 0,20458X$ (R = 0,99999)
Difusão intrapartícula	$Y = 2,85166 + 0,0464X$ (R = 0,78597)

Os dados cinéticos de adsorção também foram melhor ajustados com o uso do modelo cinético de pseudo-segunda ordem a qual forneceu o melhor coeficiente de correlação (R = 0,99999).

A Figura 22 ilustra o plote de $(t/q_t$ versus $t)$ obtido pela equação de pseudo-segunda ordem. O valor da constante de velocidade determinado foi de $4,15 \times 10^{-3} \text{ g mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$, com uma velocidade de adsorção inicial de $0,10 \text{ mg g}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

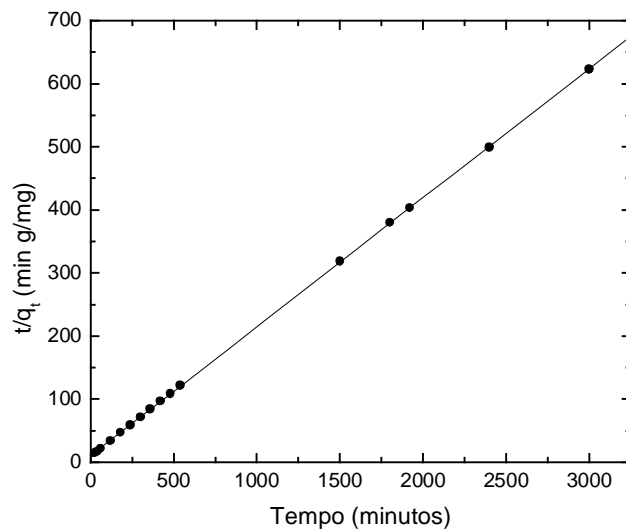


Figura 22 - Modelo de cinética de pseudo-segunda ordem para soluções de cobre (II) adsorvido em microesferas de QTSR-HEP

5.2.3 Isoterma de adsorção de cobre (II)

A Figura 23 ilustra a curva da quantidade soluto adsorvido (q) versus a concentração de equilíbrio na fase líquida (C_{eq}). Neste estudo as curvas de adsorção se aproximaram bastante do modelo proposto por Langmuir e, portanto, foram analisadas segundo este modelo.

Os principais sítios de adsorção das microesferas de QTSR são os grupos amino e com menor possibilidade os grupos hidroxila do polímero.

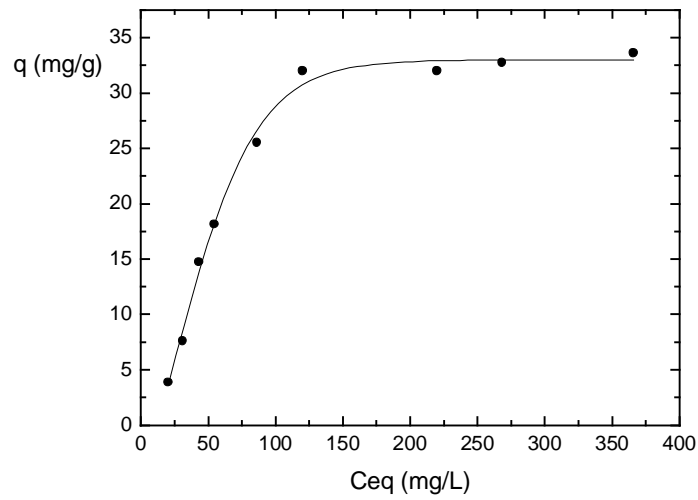


Figura 23 – Isoterma de adsorção de cobre (II) utilizando microesferas de QTSR

Os principais sítios de adsorção das microesferas de QTSR-HEP são os grupos amino da quitosana e carboxilato ou sulfonato da heparina (Figura 24).

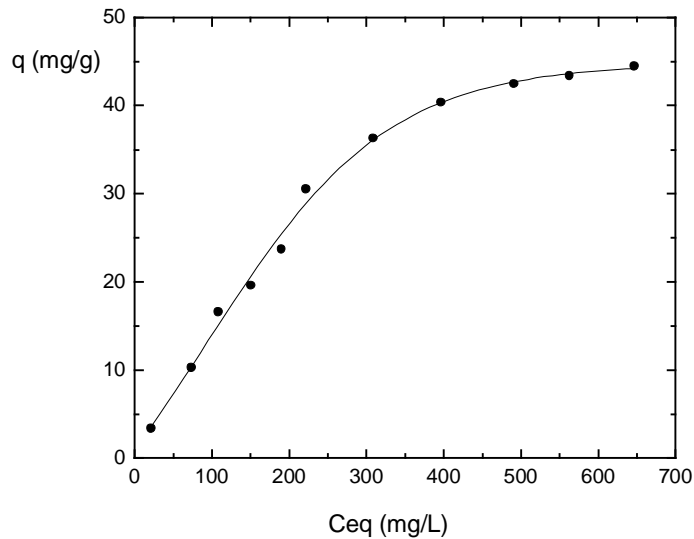


Figura 24 – Isoterma de adsorção de cobre (II) utilizando microesferas de QTSR-HEP

A forma mais simplificada para a determinação dos parâmetros de adsorção é colocá-la na sua forma linear, para obter os valores de K_L e $q_{máx}$, que correspondem à constante de Langmuir e à capacidade máxima de adsorção, respectivamente.

O valor encontrado para a constante de Langmuir foi de $0,0187 \text{ L mg}^{-1}$ e para a capacidade máxima de adsorção de $39,31 \text{ mg g}^{-1}$, através da linearização da isoterma utilizando microesferas de QTSR (Figura 25).

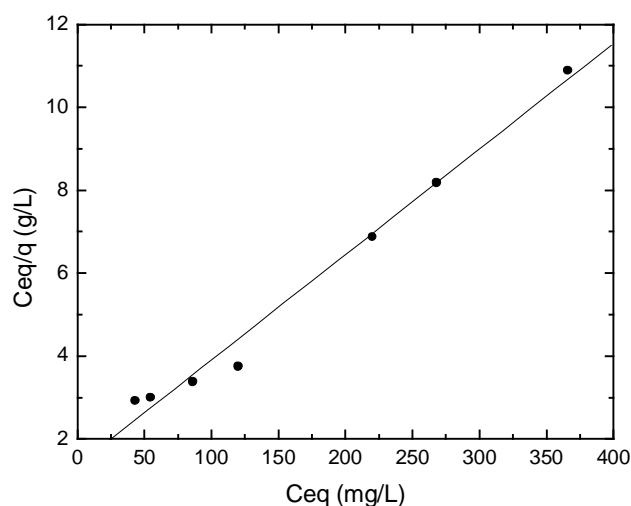


Figura 25 – Linearização da isoterma de adsorção de cobre (II) utilizando microesferas de QTSR

O valor encontrado para a constante de Langmuir foi de $2,11 \text{ L mg}^{-1}$ e para a capacidade máxima de adsorção de $81,04 \text{ mg g}^{-1}$, através da linearização da isoterma utilizando microesferas de QTSR-HEP (Figura 26).

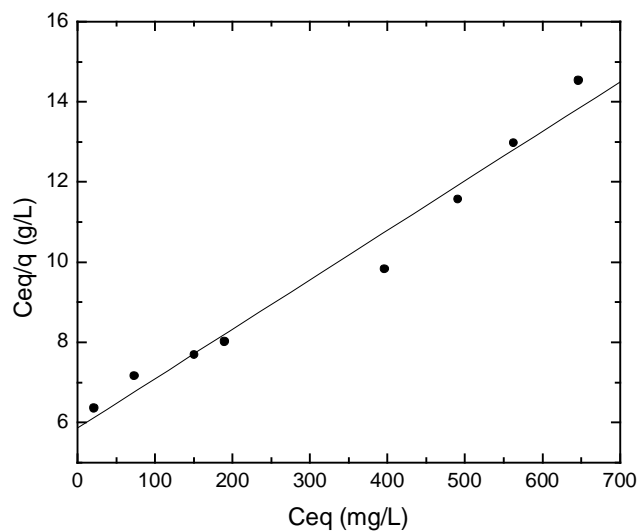


Figura 26 – Linearização da isoterma de adsorção de cobre (II) utilizando microesferas de QTSR-HEP

5.3 Determinação dos modos e sítios de coordenação de ligantes envolvidos nas microesferas de QTSR-Cu e QTSR-HEP-Cu

A Figura 27 mostra os espectros de EPR, em banda X, das amostras de QTSR-Cu e QTSR-HEP-Cu, são apresentados juntamente os espectros simulados dos mesmos.

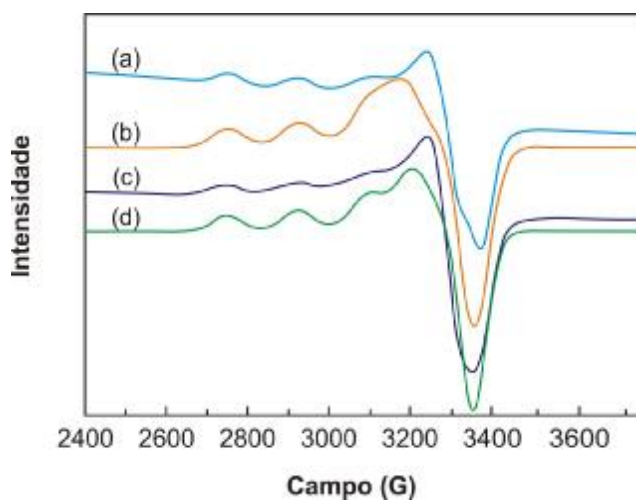


Figura 27 – Espectros de EPR, em banda X: experimentais QTSR-Cu (a) e QTSR-HEP-Cu (c); simulados QTSR-Cu (b) e QTSR-HEP-Cu (d)

Os parâmetros Hamiltonianos são: $g_{\perp} = 2,0750$, $g_{\parallel} = 2,2500$ e $A_{\perp} = 30 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, $A_{\parallel} = 182 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, para as microesferas de QTSR-Cu; $g_{\perp} = 2,0700$, $g_{\parallel} = 2,2550$, $A_{\perp} = 30 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, $A_{\parallel} = 170 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, para as microesferas de QTSR-HEP-Cu.

Os espectros de EPR de dois sítios de coordenação de cobre (II) para as amostras QTSR-Cu e QTSR-HEP-Cu, descritas aqui, indicam uma simetria axial. Para as duas amostras, $g_{\parallel} > g_{\perp} > 2$, sugere um sítio de cobre (II) com geometria tetragonal distorcida, piramidal-quadrada ou quadrada-planar. Além disso, os valores de g_{\parallel} e A_{\parallel} das duas estruturas de cobre (II) são encontrados nas regiões características de cromóforos CuNO no diagrama g_{\parallel} vs. A_{\parallel} .

Sakagushi e Addison mostraram que a razão $g_{\parallel}/A_{\parallel}$ pode ser usada como uma conveniente regra empírica para prever distorções em unidades CuN₄. Valores entre 105 a 135 cm sugerem uma configuração de estrutura quadrada planar, e este quociente aumenta quando é introduzida no cromóforo uma distorção tetraédrica [SAKAGUSHI, 1979]. Além disso, a distorção tetraédrica de um cromóforo quadrado-planar é observada quando quaisquer átomos doadores (N, O, S) reduz A_{\parallel} e aumenta g_{\parallel} . Utilizando-se a relação proposta e os resultados na Tabela 4, o sítio de coordenação de cobre (II) da amostra QTSR-HEP-Cu possui mais distorções tetraédricas a partir de uma geometria quadrado-planar do que a amostra QTSR-Cu.

Tabela 4 - Parâmetros g , A e razão $g_{\parallel}/A_{\parallel}$ para as amostras QTSR-Cu e QTSR-HEP-Cu

Amostras	g_{\parallel}	$A_{\parallel} (\times 10^{-4} \text{ cm}^{-1})$	$g_{\parallel}/A_{\parallel} (\text{cm})$
QTSR-Cu	2.2500	182	124
QTSR-HEP-Cu	2.2550	170	133

Os valores aumentados g_{\parallel} e os valores diminuídos A_{\parallel} para as amostras estudadas, na ordem de QTSR-Cu para QTSR-HEP-Cu, mostram que a força do campo ligante diminui nestes sítios de coordenação de cobre (II) na mesma ordem, para as duas amostras estudadas ($A_{\parallel} = 182$ vs. $170 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ e $g_{\parallel} = 2,2500$ vs. $2,2550$) [ROMANOWSKI *et al*, 2004].

Considerando as constatações experimentais de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica para as amostras de QTSR-Cu e QTSR-HEP-Cu, pode-se sugerir que a amostra QTSR-HEP-Cu, o qual é mais tetraedricamente mais distorcida, possui sítios de coordenação 4 envolvendo provavelmente dois átomos de nitrogênio da quitosana, um átomo de oxigênio da quitosana (hidroxila desprotonada) e um átomo de oxigênio da heparina (grupo carboxilato ou sulfonato). Estes resultados suportam aqueles encontrados nos estudos de DSC discutidos anteriormente, confirmando a mudança estrutural entre estes dois complexos de cobre (II).

Este modelo de coordenação proposto por EPR indicou que o controle do mecanismo de velocidade adsorção dos íons cobre (II) pelas microesferas de QTSR e QTSR-HEP é a adsorção química (reação química), e que a velocidade de adsorção do metal pelo adsorvente foi dependente da concentração dos íons no adsorvente e a concentração destes adsorvidos no equilíbrio.

6. CONCLUSÕES

Com base nos objetivos propostos e nos resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho, pode-se fazer as seguintes considerações finais:

A titulação condutimétrica, devido a sua simplicidade, disponibilidade de equipamento, utilização de pequenas quantidades de amostras e reagentes simples mostrou ser uma eficiente técnica para quantificar o teor de grupos sulfonatos e carboxílicos da heparina, bem como determinar o grau de desacetilação da quitosana. Este resultado mostra que o polímero em estudo é quitosana e apresenta um grau de desacetilação relativamente elevado.

A análise de infravermelho é um método eficiente e reprodutível, comprovou a presença de todos os grupos funcionais da quitosana e de suas modificações, sendo útil para a caracterização dos polímeros. Pelo infravermelho foi sugerido uma interação iônica entre os grupos amino protonados da quitosana reticulada e os grupos sulfonatos da heparina com formação de complexo polimérico aniônico-catiônico.

As técnicas termoanalíticas fornecem informações sobre o mecanismo de decomposição e estabilidade térmica. As análises termogravimétricas revelaram que a estabilidade térmica das microesferas é diminuída pela presença de cadeias laterais resultantes da reticulação, da adição da heparina e das interações com o íon cobre (II).

A estrutura externa obtida das microesferas mostrou-se sem fissuras ou porosidade aparente. As análises das micrografias das microesferas contendo a heparina revelam uma impregnação eficiente sugerindo que a heparina está dissolvida na matriz polimérica.

Os resultados do efeito do pH na adsorção de íons cobre (II) demonstraram que a adsorção é dependente do pH, sendo que a quantidade adsorvida aumenta com o aumento de pH. Em pH 6,0 a adsorção é maior tanto para as microesferas de QTSR quanto para as microesferas de QTSR-HEP.

Os estudos cinéticos revelaram que a equação de pseudo segunda-ordem forneceu os melhores ajustes dos dados experimentais, pois forneceu o melhor coeficiente de correlação. Este modelo indicou que o controle do mecanismo de velocidade é a adsorção química (reação química), e que a velocidade de adsorção do metal pelo adsorvente foi dependente da concentração dos íons no adsorvente e a concentração destes adsorvidos no equilíbrio.

Nos estudos da isoterma, observou-se que as curvas obtidas para a adsorção de íons cobre (II) se aproximaram bastante do modelo proposto por Langmuir, mostrando um comportamento característico de adsorção em monocamada.

A capacidade máxima de adsorção dos íons cobre (II) foi maior para as microesferas de QTSR-HEP.

Com os resultados da cinética e da isoterma verifica-se que o equilíbrio para as microesferas de QTSR-HEP foi atingido mais lentamente, porém apresentou capacidade de adsorção maior, quando comparada com as microesferas de QTSR.

As interações entre o íon cobre (II) com as microesferas de QTSR e com as microesferas de QTSR-HEP, no processo de adsorção, foram confirmadas por EPR serem de natureza química de caráter covalente, com formação de complexo quadrado-planar apresentando distorção tetraédrica.

Através da realização desse experimento, verificou-se a potencialidade da técnica de EPR na identificação e caracterização de materiais paramagnéticos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMSOM, A. W. **Physical Chemistry of Surfaces**. 5. ed. New York: John Wiley & Sons, 1990.

ASPIN, N.; SASS-KORTSAK, A. **Copper, disorders of mineral metabolism**. New York: Academic Press, v. 1, p. 59, 1981.

BASSI, R.; PRASHER, S. O.; SIMPSON, B. K. Removal of selected metal ions from aqueous solutions using chitosan flakes. **Separation Science and Technology**, v. 35, p. 547-560, 2000.

BEPPU, M. M.; ARRUDA, E. J.; SANTANA, C. C. Síntese e caracterização de estruturas densas e porosas de quitosana. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, n. 4, p. 163-169, out/dez, 1999.

BRANDRUP, J.; IMMERGUT, E.H. **Polymer Handbook**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1975.

CHANDY, T.; SHARMA, C. Chitosan matriz for oral sustained delivery of ampicilin. **Biomat**, v. 12, n.12, p. 939-943, 1993.

COSTA, C. A.; SCHNEIDER, I. A. H.; RUBIO, J. Remoção de metais pesados por sorção em subproduto do beneficiamento do carvão. **Saneamento Ambiental**, v. 59, p. 50-56, 2000.

COTTON, F.; WILKINSON, G. **Advanced Inorganic Chemistry**. New York: Wiley, 1980.

DAIFULLAH, A. A. M.; ABDEL RAOUF, M. W. Potential use Bone Charcoal in the removal of antimony and europium radioisotopes from radioactive wastes. **Adsorption Science and Technology**, v. 15, n. 8, p. 559 – 569, 1997.

DEBRIE, R. Mixtures of particular LMW heparinic polysaccharides for the prophylaxis/treatment of acute thrombotic events. **US Pat. 5, 389, 618**, 1995.

DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. 4. ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2002.

DOMARD, A. pH and c. d. measurements on a fully deacetylated chitosan: application to copper-chitosan interaction. **Inter.J. Biol. Macromol.**, v. 9, p. 98-104, 1987.

EBERT, C. D.; LEE, E. S.; DENERIS, J.; KIM, S. W. The Anticoagulant Activity of Derivatized and Immobilized Heparins. In *Biomaterials: Interfacial Phenomena and Applications*, Cooper, S. L. & Peppas, N. A. Editors, **Advances In Chemistry Series 199**, Washington, D. C., v. 12, p.161-176, 1982.

ELGIBALY, I. Development and in vitro evaluation of novel floating chitosan microcapsules for oral use: comparison with non-floating chitosan microspheres. **Int. J. Pharm.**, v. 249, p. 7-21, 2002.

ERLICH, J.; STIVALA, S. S. Chemistry and Pharmacology of Heparin. **J. of Pharmaceutical Sciences**, v. 62, n. 4, p. 517-544, 1973.

EWING, G. W. **Métodos Instrumentais de análise química**. São Paulo: Edgar Blumer, 1993.

FÁVERE, V. T. **Adsorção de íons Cu (II), Cd (II), Ni (II), Pb (II) e Zn (II) pelo biopolímero quitina, quitosana e pelas quitosanas modificadas**. 1994. 154 f. Tese (Doutorado em Química), Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

FÁVERE, V. T.; LAUS, R.; LARANJEIRA, M. C. M.; MARTINS, A. O.; PEDROSA, R. C. Use of chitosan microspheres as remedial material for acidity and iron (III) contents of coal mining wastewaters. **Environmental Technology**, v. 25, 2004.

GOODMA, B. A.; RAYNOR, J. B. Electron spin resonance of transition metal complexes. **Adv. Inorg. Chem. Radiochem.** v. 13, p. 135-362, 1970.

GONÇALVES, V. L.; LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T.; PEDROSA, R. C. Effect of crosslinking agents on chitosan microspheres in controlled release of diclofenac sodium. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 1, p. 6 -12, 2005.

GRANT, D.; LONG, W. F.; WILLIAMSON, F. B. Infrared spectroscopy of heparin-cation complexes. **Biochem. J.**, v. 244, p. 143-149, 1987.

GUIBAL, E.; MILOT, C.; TOBIN, J. M. Metal anion sorption by chitosan beads: equilibrium and kinetic studies. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 37, p. 1454 – 1460, 1998.

GUIBAL, E.; DAMBIES, L.; MILOT, C. et al. Influence of polymer structural parameters and experimental conditions on metal anion sorption by chitosan. **Polym. Int.**, v. 48, p. 671-680, 1999.

GUIBAL, E.; LARKIN, A.; VINCENT, T., et. al. Chitosan sorbents for platinum sorption from dilute solutions. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 38, p. 401 – 412, 1999.

GUIBAL, E. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review. **Sep. Purif. Technol.** v. 38, p. 43-74, 2004.

HEJAZI, R.; AMIJI, M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. **J. Control. Release.** v. 89, p. 151-165, 2003.

HO, S. Y.; PORTER, F. J.; MCAY, G. Equilibrium isotherm studies for the sorption of divalent metal ions onto peat: copper, nickel, and lead single component systems. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 141, p. 1 – 33, 2002.

JAMESON, R. F. Coordination chemistry of copper with regard to biological systems. In: SIGEL, H.; SIGEL, A. **Metal ions in biological systems**. New York: M. Dekker, v. 12, p. 1-30, 1981.

JOHNSON, E. A.; KIRKWOOD, T. B. L.; STIRLING, Y., et al. Four Heparin Preparation: Anti-Xa Potentiating Effect of Heparin after Subcutaneous Injection. **Thromb. Haemostas. (Stuttg.)**, v. 35, p. 586-591, 1976.

JOSUÉ, A. **Desenvolvimento de um novo sistema de microencapsulação de fármacos a partir da quitosana para uso oral**. 2002. 143 f. Tese (Doutorado em Química), Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

JUANG, R. S.; SHIAU, R.C. Metal removal from aqueous solutions using chitosan-enhanced membrane filtration. **J. of Membrane Science**, v. 165, p. 159-167, 2000.

KAIM, W.; SCHWEDERSKI, B. **Bioinorganic Chemistry: inorganic elements in the chemistry of life**. New York: Wiley, 1994.

KALTWASSER, J. P.; WERNER, E.; NIECKZIEAL, M. Bioavailability and therapeutic efficacy of bivalent and trivalent iron preparations. **Arzneimittelforschung**, v. 37, n. 1A, p. 122-129, 1987.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal biosorption. An alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review. **Bioresource Technol.**, v. 53, p. 195 - 206, 1995.

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

KIMURA, I.Y. **Remoção de corantes reativos contendo grupos vinilsulfona e triazina por adsorção e coagulação/floculação com quitosana.** 2001. 200f. Tese (Doutorado em Química), Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

KUMAR, P.; DARA, S. S. Utilization of agricultural wastes for decontaminating industrial/domestic wastewaters from toxic metals. **Agr. Wastes.**, v. 4, p. 213 - 223, 1982.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **React. Funct. Polym.**, v. 46, p. 1, 2000.

KUMBAR, S. G.; KULKARNI, A. R.; AMINABHAVI, T. M. Crosslinked chitosan microspheres for encapsulation of diclofenac sodium: effect of crosslinking agent. **J. Microencapsul.**; v. 19, p. 173-180, 2002.

MANGRICH, A. S. **Cadernos de EPR**, Curitiba, 1998.

MATHUR, N. K.; NARANG, C. K. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. **J. of Chem. Educ.**, v.67, p. 938-942, 1990.

MCKAY, G. **Use of adsorbents for the removal of pollutants from wastewaters.** New York: CRC Press, 1996.

MI, F. L.; KUAN, C. Y.; SHYU, S. S. et al. The study of gelation kinetics and chain-relaxation properties of glutaraldehyde-cross-linked chitosan gel and their effects on microspheres preparation and drug release. **Carbohydr. Polym.**, v. 41, p. 389-396, 2000.

MUZZARELLI, R. A. A.; WECKX, M.; FILIPPINI, O.; SIGON, F. O. Removal of trace-metal ions from industrial waters, nuclear effluents and drinking-water, with the aid of cross-linked normal-carboxymethyl chitosan. **Carbohydr. Polym.**, v. 11, p. 293 - 306, 1989.

MUZZARELLI, R. A. A. **Chitin**. Oxford, England: Pergamon Press Ltda, 1978.

MUZZARELLI, C., STANIC, V., GOBBI, V., TOSI, G., MUZZARELLI, R. A. A. Spray-drying of solutions containing chitosan together with polyuronans and characterization of the microspheres. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, p. 73-82, 2004.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3. ed: Sarvier editora de livros médicos Ltda, p. 237, 2002.

NG, J. C. Y.; CHEUNG, W. H.; MCKAY, G. Equilibrium studies of the sorption of Cu(II) ions onto chitosan. **J. of Colloid and Interface Science**, v. 255, p. 64–74, 2002.

NGAH, W. W.; ENDUAL, C. S.; MAYAMAR, R. Removal of copper (II) ions from aqueous solution into chitosan and cross-linked chitosan beads. **React & Funct. Polym**, v. 50, p. 181-190, 2002.

NGAH, W. W.; AB GHANI, S.; KAMARI, A. Adsorption behavior of Fe (II) and Fe (III) ions aqueous solution on chitosan and cross-linked chitosan beads. **Biores. Techn.**, v. 96, p. 443-450, 2005.

OLIVEIRA, G. B.; CARVALHO Jr., L.B.; SILVA, M.P.C. Properties of carbodiimide treated heparin. **Biomaterials**, v. 24, p. 4777–4783, 2003.

RAYMOND, L.; FREDERICK, G. M.; MARCHESSAULT, R. H. Degree of deacetylation of chitosan using conductometric titration and solid-state NMR. **Carbohydrate Research**, v. 246, p.331-336, 1993.

ROMANOWSKI, S. M. M.; TORMENA, F.; SANTOS, V. A.; HERMANN, M. F.; MANGRICH, A. S. Solution studies of copper (II) complexes as a contribution to the study of the active site of galactose oxidase. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 15, n. 6, p. 897-903, 2004.

SAKAGUSHI, U.; ADDISON, A. W. Spectroscopic and redox studies of some copper (II) complexes with biomimetic donor atoms: implications for protein copper centers. **J. Chem. Soc. Dalton Trans.**, n. 600, 1979.

SCHMUHL, R.; KRIEG, H. M.; KEIZER, K. Adsorption of Cu (II) and Cr (VI) ions by chitosan: Kinetics and equilibrium studies. **Water SA**, v. 27, n. 1, 2001.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 179.

SKOOG, A. D.; HOLLER, J. F.; NIEMAN, A. T. **Princípios da Análise Instrumental**. 5. ed. Bookman, 2002. 838 p.

SPINELLI, V. A. **Preparação do sal de amônio quaternário de quitosana reticulado, caracterização e estudos cinéticos de equilíbrio dos oxianions de cromo (VI), molibdênio (VI) e selênio (VI)**. 2005. 137f. Tese (Doutorado em Química), Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

TAN, C. S.; KHOR, E.; TAN T. K.; WONG, S. M. The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivate UV-spectrophotometry method of determination. **Talanta**, v. 45, p. 713-719, 1998.

TARLEY, C. R. T.; ARRUDA, M. A. Z. Biosorption of Heavy Metals Using Rice Milling By-Products. Characterisation and Application for Removal of Metals from Aqueous Effluents. **Chemosphere**, v. 54, n. 7, p. 987 – 995, 2004.

TOMA, H. E. **Química Bioinorgânica**. São Paulo: Secretaria dos Estados Americanos, 1984.

TSENG, R. L.; WU, F. C.; JUANG, R. S. Pore structure and metal adsorption ability of chitosan prepared from fishery wastes. **J. Environ. Sci. Health.**, v. 34, n. 9, p. 1815-1828, 1999.

WU, C. F., TSENG, L. R., JUANG, S. R. Kinetic modeling of liquid-phase adsorption of reactive dyes and metal ions on chitosan. **Wat. Res.**, v. 35, n. 3, p. 613-618, 2001.

YABE, M. J. S.; OLIVEIRA, E. Heavy Metals Removal in Industrial Effluents by Sequential Adsorbent Treatment. **Adv. Environ. Res.**, v. 263, n. 7, 2003.

YANG, T. C.; ZALL, R. R. Absorption of metals by natural polymers generated from seafood processing wastes. **Ind. Eng. Chem. Res. Div.**, v. 23, p. 168-172, 1984.

YANG, Z.; ZHUANG, L.; TAN, G. Preparation and adsorption behavior for metal of chitosan crosslinked by dihydroxy azacrown ether. **J. Appl. Polym. Sci.**, v. 85, p. 530-535, 2002.