



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS
(P2CEM)

²
PCEM

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE MATERIAIS À BASE DE QUITOSANA – APLICAÇÃO EM ADSORÇÃO DE BSA.

Tese de Doutorado

Fernanda Santos Carvalho dos Anjos

Orientador: Prof. Dr. Antonio Reinaldo Cestari

Julho – 2018

Fernanda Santos Carvalho dos Anjos

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE MATERIAIS À BASE DE
QUITOSANA – APLICAÇÃO EM ADSORÇÃO DE BSA.**

Tese apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais pela Universidade Federal de Sergipe como requisito para a obtenção do Grau de doutor em Ciência e Engenharia dos Materiais.

Linha de pesquisa: Cerâmicas e seus compósitos

Orientador: Prof. Antonio Reinaldo Cestari

São Cristóvão - SE

2018

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

A597s Anjos, Fernanda Santos Carvalho dos
Síntese e caracterização de materiais à base de quitosana –
aplicação em adsorção de BSA / Fernanda Santos Carvalho dos
Anjos ; orientador Antonio Reinaldo Cestari. - São Cristóvão,
2018.

154 f. : il.

Tese (doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) –
Universidade Federal de Sergipe, 2018.

1. Ciência dos materiais. 2. Polissacarídeos. 3. Quitosana. 4.
Cinética química. 5. Proteínas. I. Cestari, Antonio Reinaldo orient.
II. Título.

CDU 66.017

Agradecimentos

Agradeço a Deus primeiramente. A minha família, por todo amor, apoio e incentivo durante estes anos de estudos. A minha irmã Débora pela ajuda imensurável na tese, sem ela eu não teria conseguido, pelo grande suporte e apoio nas correções do meu texto e ideias para tornar a tese melhor. Ao meu orientador Antonio Reinaldo Cestari, pela orientação, ajuda, apoio e compreensão durante a confecção da tese e durante todo o doutorado. Agradeço também a todas as correções que com certeza aprimoraram meu texto. Ao meu orientador, desculpas pelos atropelos ocorridos durante este último ano que foi bem difícil para mim. A minha psicóloga e terapeuta Camila, que me ajudou a escrever de outra maneira, me incentivando e conversando comigo para que eu conseguisse terminar de escrever a tese. Ela sabe bem o quão foi difícil para mim, principalmente no momento que a procurei. Aos novos amigos queridos que fiz durante esta jornada que me incentivaram e me apoiaram. A Gabriella, que chamo de Gaby, uma amiga que ama falar e que sempre esteve ao meu lado. A Bertilia ou Bertie, uma dominicana muito amiga pelo apoio e pelas horas de estudos juntas. A Ivory uma pessoa que aprendi a gostar, quando o conheci não gostava muito dele (risos), mas que se tornou um grande amigo que sempre me ajudou. A Renê, um velho amigo que fiz na minha época de graduação e que tive a felicidade de reencontrá-lo agora no doutorado. A Ginaldo, Marcelo, Mário, Edinalva, Ricardo, Karla, Sidicléia, Thamires e Daniel, amigos que também fizeram parte da minha vida durante estes 4 anos. Foi muito bom estar com vocês amigos durante estes anos e espero vocês em Petrolina. A Eucymara e a Rosanne pelo apoio dado, principalmente no meu primeiro ano em Aracaju, me hospedando na casa de vocês todas as vezes que precisei. Aos colegas do LSAM pelos momentos juntos. A pós-graduação P²CEM e aos professores do programa pela assistência e ensinamentos. Aos professores da banca pelas críticas e correções ao trabalho. A UNIVASF pelo afastamento concedido para que o doutorado fosse possível.

Resumo da Tese apresentada ao P²CEM/UFS como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais (D.Sc.)

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE MATERIAIS À BASE DE QUITOSANA – APLICAÇÃO EM ADSORÇÃO DE BSA.

Fernanda Santos Carvalho dos Anjos

Julho/2018

Orientador: Prof. Dr. Antonio Reinaldo Cestari

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais

As quitosanas têm diversas características interessantes como a biocompatibilidade, biodegradabilidade, uma boa bioaderência e afinidade celular. A presença de grupos de aminas primárias ($-NH_2$) e hidroxila ($-OH$) na quitosana facilita sua modificação utilizando citratos, polifosfatos, organosilanos, entre outros. Neste trabalho membranas de quitosana foram modificadas com citrato (CIT), tripolifosfato (TPP) e 3-amino-propiltrimetoxisilano (APTES) para aplicação em sorção de proteínas. A caracterização dos materiais foi realizada por FTIR, MEV, TG/DTG, DSC e DRX. As membranas foram sintetizadas com sucesso e permaneceram estáveis durante os testes de sorção. Foram obtidos e avaliados dados de isothermas de sorção da albumina do soro bovino (BSA) em soluções com diferentes pH e temperaturas. Alguns modelos matemáticos foram utilizados para avaliar as características cinéticas da sorção do BSA sobre os materiais. Para as análises estatísticas foram utilizados o desvio padrão e o chi-quadrado. O modelo cinético de ordem variada foi o que apresentou a melhor correlação entre os valores teóricos e experimentais da sorção da BSA. Os valores das constantes de sorção de ordem variada (k_n) apresentaram-se entre 0,0002 e 264,91 min^{-1} e os valores das constantes n apresentaram-se entre 0,142 e 1,492 min^{-1} . O modelo cinético de Morris-Weber sugeriu que a difusão intrapartícula é uma característica mecânica importante na interação membrana-BSA. Foi observado que as membranas de quitosana modificadas são promissoras para uso em processos que demandam interação de proteínas em meio aquoso.

Palavras chave: quitosana. modelos cinéticos. proteínas.

Abstract of Thesis presented to P²CEM/UFS as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Materials Science and Engineering (D.Sc.)

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF MATERIALS BASED ON QUITOSANA -
APPLICATION IN ADSORPTION OF BSA.

Fernanda Santos Carvalho dos Anjos

Julho/2018

Advisor: Prof. Dr. Antonio Reinaldo Cestari

Department: Materials Science and Engineering

Chitosans have interesting features, such as biocompatibility, biodegradability, good adherence and cellular affinity. The presence of amine ($-NH_2$) and hydroxyl groups ($-OH$) on chitosan structure enables their chemical modification using citrates, polyphosphates, organosilanes, among others. In this work, membrane chitosans were chemically crosslinked with citrate (CIT), tripolyphosphate (TPP) and 3-amino-propyltrimetoxisilano (APTES) were synthesized for application in sorption of proteins. The characterization of the materials was made by FTIR, MEV, TG/DTG and XRD. It was found that the membranes were successful synthesized and remained stable during the sorption tests. Sorption isotherms of bovine serum albumin (BSA) in relation to solution pH and temperature were obtained and evaluated. Some mathematical models were used to evaluate the kinetic features of sorption of BSA onto the materials. From a statistical analysis using standard deviation and chi-square methodologies, the so-called kinetic order-variable model has presented the best fittings in relation to comparisons between the experimental and theoretical values of BSA sorption. The values of the variable order sorption constants (k_n) were between 0.0002 and 264.91 min^{-1} and the values of the n constants were between 0.142 and 1.492 min^{-1} . The Morris-Weber kinetic model has also suggested that intraparticle diffusion is an important mechanistic feature of BSA-membranes interactions. It has found that the membranous chitosan-modified materials are promising for using in processes, which demand interaction of proteins in aqueous media.

Keywords: chitosan. kinetic model. proteins.

Índice

1.	Introdução.....	15
2.	Revisão da literatura	18
2.1	Quitina e quitosana	18
2.2	Grau de desacetilação	22
2.2	Modificação das quitosanas	24
2.3.	Organosilanos.....	26
2.4.	Citrato de sódio (CIT).....	32
2.5.	Tripolifosfatos (TPP)	34
2.6	Proteínas	36
2.7	Processos de sorção.....	38
3.	Objetivos.....	43
3.1	Geral.....	43
3.2	Específicos	43
4.	Metodologia	44
4.1	Preparação das soluções.....	44
a.	Solução tampão a pH 7,0 (PBS).....	44
b.	Solução tampão pH 4,0, 5,0, 6,0 e 8,0	44
c.	Solução de Albumina do soro bovino (BSA)	45
d.	Preparo do reagente de Biureto para determinação da albumina.....	45
4.2	Purificação da quitosana	45
4.3	Preparação das membranas de quitosana quimicamente modificadas	47
a.	Membranas de quitosana (CH).....	47
b.	Membranas de quitosana reticuladas com citrato de sódio (CH/CIT)	47
c.	Membranas de quitosana reticuladas com tripolifosfato (CH/TPP)	48
d.	Membranas de quitosana imersas em solução de 3-aminopropiltriétoxisilano (CH/APTES).....	49
e.	Membranas de quitosana modificadas com 3-aminopropiltriétoxisilano (CH/Add/APTES)	50

4.4 Caracterização das membranas de quitosana	51
a. Determinação do grau de desacetilação por titulação potenciométrica.....	51
b. Grau de intumescimento das membranas.....	52
c. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (do inglês: FTIR). 53	
d. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	53
e. Difração de raios X (DRX)	53
f. Análise termogravimétrica (TG).	54
g. Calorimetria exploratória diferencial (do inglês: DSC).	54
4.5. Estudos de sorção da proteína albumina do soro bovino (BSA) nas membranas de quitosana	55
4.6 Estudo do efeito do potencial hidrogeniônico (pH)	56
4.7 Estudo da sorção da proteína albumina do soro bovino (BSA) e modelos cinéticos.....	57
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
5.1 Determinação do grau de desacetilação por titulação potenciométrica.	58
5.2 Grau de intumescimento das membranas.....	61
5.3. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR).	63
5.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	68
5.5 Difração de raios X.....	73
5.6 Análise térmica (TG)	77
5.7. Calorimetria Exploratória Diferencial	81
5.8. Estudos de sorção da proteína albumina do soro bovino (BSA) nas membranas de quitosana.	84
5.8.1 Estudo do efeito do potencial hidrogeniônico (pH).....	84
5.8.2. Estudo da sorção da proteína albumina do soro bovino (BSA) e modelos cinéticos.....	86
5.8.3. Estudo da cinética de sorção	94
5.8.3.1. Modelo de pseudo primeira ordem	94
5.8.3.2. Modelo de pseudo segunda ordem	97
5.8.3.3. Modelo de ordem variável	112

5.8.3.4. Modelo de Morris-Weber	122
6. Conclusão	131
7. Perspectivas para continuação do trabalho.....	132
8. Referências.....	133
Anexo I	148

Índice de Tabelas

Tabela 01: Volumes das soluções para o preparo dos tampões.	44
Tabela 02: Volumes de equivalência e graus de desacetilação obtidos das titulações potenciométricas das quitosanas.	60
Tabela 03: Atribuição das bandas do infravermelho das membranas estudadas.	65
Tabela 04: Atribuição das bandas do infravermelho das membranas estudadas.	67
Tabela 05: Índices de cristalinidade das membranas de quitosana.	75
Tabela 06: Dados dos parâmetros cinéticos de Lagregen, pseudo primeira ordem, relacionados a sorção da proteína albumina do soro bovino (BSA) nas membranas de quitosana.	96
Tabela 07: Dados dos parâmetros cinéticos de Lagregen, pseudo segunda ordem, relacionados a sorção da proteína albumina do soro bovino (BSA) nas membranas de quitosana.	104
Tabela 08: Dados dos parâmetros cinéticos de ordem variável relacionados à sorção da proteína (BSA) nas membranas de quitosana.	119
Tabela 09: Dados obtidos dos desvios padrão e dos chi-quadrados (χ^2) para os modelos de pseudo segunda ordem e de ordem variável.	121
Tabela 10: Dados dos parâmetros cinéticos do modelo de Morris-Weber, difusão intrapartícula.	129

Índice de Figuras

Figura 01: Esquema da preparação de quitina e quitosana a partir dos exoesqueletos de crustáceos e fungos e suas aplicações [16].	18
Figura 02: Reação idealizada de desacetilação total da quitina para obtenção da quitosana.	19
Figura 03: Representação das ligações β -(1 $\rightarrow$ 4)-glucosaminas.	21
Figura 04: Representação esquemática da estrutura do 3-amino-propiltrietoxissilano (APTES).	26
Figura 05: Representação esquemática da reação entre a quitosana e o TEOS para a formação da membrana de quitosana modificada [44].	28
Figura 06: Representação esquemática da interação entre a quitosana e o silano [39].	29
Figura 08: Reação de reticulação da quitosana e formação <i>in situ</i> das membranas híbridas sílica-quitosana [46].	31
Figura 09: Representação esquemática da estrutura básica do citrato de sódio.	32
Figura 10: Representação esquemática da estrutura do tripolifosfato de sódio.	34
Figura 11: Estruturas das proteínas: primária, secundária, terciária e quaternária [57].	36
Figura 12: Representação esquemática da estrutura em 3D da albumina do soro bovino (BSA) [60].	37
Figura 13: Representação esquemática da sorção de proteínas sobre um biomaterial. (Adaptado da ref. [62]).	38
Figura 14: Representação esquemática da purificação da quitosana	46
Figura 15: Representação esquemática da metodologia de obtenção da membrana de quitosana (CH).	47
Figura 16: Representação esquemática da metodologia de obtenção das membranas de quitosana reticuladas com citrato de sódio (CH/CIT).	48
Figura 17: Representação esquemática da metodologia de obtenção das membranas de quitosana reticuladas com tripolifosfato (CH/TPP).	49
Figura 18: Representação esquemática da metodologia de obtenção das membranas de quitosana imersas em APTES (CH/APTES).	50

Figura 19: Representação esquemática da metodologia de obtenção da membrana de quitosana modificada com APTES (CH/Add/APTES).....	51
Figura 20: Gráfico da função de Y versus X para a determinação dos valores do volume de equivalência (Ve) para o cálculo do grau de desacetilação da quitosana B58	
Figura 21: Gráficos do grau de intumescimento das membranas estudadas em água (acima) e em PBS (abaixo). (a) Membrana de quitosana CH; (b) Membrana CH/CIT; (c) Membrana CH/TPP; (d) Membrana CH/Add/APTES e (e) Membrana CH/APTES.	61
Figura 22: Espectros de absorção na região do infravermelho: (a) Membrana de quitosana (CH); (b) membrana reticulada com citrato (CH/CIT) e (c) membrana reticulada com tripolifosfato (CH/TPP).	63
Figura 23: Espectros de absorção na região do infravermelho: (a) Membrana de quitosana (CH); (b) membrana imersa em APTES (CH/APTES) e (c) membrana modificada com APTES (CH/Add/APTES).	66
Figura 24: Micrografia das superfícies das membranas: (a) Membrana de quitosana CH e (b) Membrana CH/CIT.	69
Figura 25: Micrografia das superfícies das membranas: (a) Membrana CH/TPP e (b) Membrana CH/APTES. Aumento de 5.000x para todas as membranas.	70
Figura 26: Micrografia das superfícies da membrana CH/Add/APTES. Aumento de 5.000x para todas as membranas.	71
Figura 27: Padrões de difração de raios X: (a) Membrana de quitosana e (b) Membrana de quitosana/CIT.	73
Figura 28: Padrões de difração de raios X: (a) Membrana de quitosana/TPP e (b) Membrana de quitosana/Add/APTES.	74
Figura 29: Curva termogravimétrica e respectiva curva DTG da membrana de quitosana.	77
Figura 30: Curvas termogravimétricas e respectivas curvas DTG das membranas de quitosana: (a) Membrana de quitosana CH/CIT e (b) Membrana de quitosana CH/TPP.	78
Figura 31: Curvas termogravimétricas e respectivas curvas DTG das membranas de quitosana: (a) Membrana de quitosana CH/APTES e (b) Membrana de quitosana CH/Add/APTES.	79

Figura 32: DSC: a) Membrana de quitosana (CH); b) Membrana de quitosana imersa em APTES (CH/APTES) e c) Membrana de quitosana modificada com APTES (CH/Add/APTES).....	81
Figura 33: DSC: a) Membrana de quitosana (CH); b) Membrana de quitosana reticulada com citrato (CH/CIT) e c) Membrana de quitosana reticulada com tripolifosfato (CH/TPP).....	83
Figura 34: Gráfico da quantidade adsorvida de albumina do soro bovino (BSA) sobre as membranas de quitosana: CH/CIT, CH/Add/APTES e CH/TPP, a 30 °C.....	85
Figura 35: Isotermas de sorção da albumina do soro bovino (BSA) sobre as membranas de quitosana reticuladas com citrato de sódio (CH/CIT): (A) 25 °C e (B) 30 °C	88
Figura 36: Isotermas de sorção da albumina do soro bovino (BSA) sobre as membranas de quitosana reticuladas com citrato de sódio (CH/CIT), 37 °C.....	89
Figura 37: Isotermas de sorção da albumina do soro bovino (BSA) sobre as membranas de quitosana reticuladas com tripolifosfato (CH/TPP), 25 °C.....	90
Figura 38: Isotermas de sorção da albumina do soro bovino (BSA) sobre as membranas de quitosana reticuladas com tripolifosfato (CH/TPP): (A) 30 °C e (B) 37 °C.	91
Figura 39: Isoterma de sorção da albumina do soro bovino (BSA) sobre as membranas de quitosana modificada com APTES (CH/Add/APTES), 25 °C.....	92
Figura 40: Isotermas de sorção da albumina do soro bovino (BSA) sobre as membranas de quitosana modificada com APTES (CH/Add/APTES): (A) 30 °C e (B) 37 °C.	93
Figura 41: Gráfico referente a aplicação do modelo de pseudo segunda ordem para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) na membrana de quitosana reticulada com citrato (CH/CIT), 25 °C.....	98
Figura 42: Gráficos referentes a aplicação do modelo de pseudo segunda ordem para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) na membrana de quitosana reticulada com citrato (CH/CIT): (A) 30 °C e (B) 37 °C.....	99
Figura 43: Gráfico referente a aplicação do modelo de pseudo segunda ordem para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) na membrana de quitosana reticulada com tripolifosfato (CH/TPP), 25 °C.	100

Figura 44: Gráficos referentes a aplicação do modelo de pseudo segunda ordem para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) na membrana de quitosana reticulada com tripolifosfato (CH/TPP): (A) 30 °C e (B) 37 °C.	101
Figura 45: Gráfico referente a aplicação do modelo de pseudo segunda ordem para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) na membrana de quitosana modificada com APTES (CH/Add/APTES), 25 °C.	102
Figura 46: Gráficos referentes a aplicação do modelo de pseudo segunda ordem para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) na membrana de quitosana modificada com APTES (CH/Add/APTES): (A) 30 °C e (B) 37 °C.	103
Figura 47: Gráficos referentes aos valores obtidos de (●) q_t experimental e aos valores de (○) q_t calculado, para a sorção da proteína albumina do soro bovino (BSA) na membrana de quitosana reticulada com citrato (CH/CIT): (A) 25 °C e (B) 30 °C..	106
Figura 48: Gráfico referente aos valores obtidos de (●) q_t experimental e aos valores de (○) q_t calculado, para a sorção da proteína albumina do soro bovino (BSA) na membrana de quitosana reticulada com citrato (CH/CIT), 37 °C.	107
Figura 49: Gráficos referentes aos valores obtidos de (●) q_t experimental e aos valores de (○) q_t calculado, para a sorção da proteína albumina do soro bovino (BSA) na membrana de quitosana reticulada com tripolifosfato (CH/TPP): (A) 25 °C e (B) 30 °C.	108
Figura 50: Gráficos referentes aos valores obtidos de (●) q_t experimental e aos valores de (○) q_t calculado, para a sorção da proteína albumina do soro bovino (BSA) na membrana de quitosana reticulada com tripolifosfato (CH/TPP), 37 °C.	109
Figura 51: Gráficos referentes aos valores obtidos de (●) q_t experimental com os valores de (○) q_t calculado para a sorção da proteína albumina do soro bovino (BSA) na membrana de quitosana modificada com APTES (CH/Add/APTES): (A) 25 °C e (B) 30 °C	110
Figura 52: Gráficos referentes aos valores obtidos de (●) q_t experimental com os valores de (○) q_t calculado para a sorção da proteína albumina do soro bovino (BSA) na membrana de quitosana modificada com APTES (CH/Add/APTES), 37 °C.	111
Figura 53: Gráficos referentes à aplicação do modelo de ordem variável para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) nas membranas de quitosana reticuladas com citrato (CH/CIT), 25 °C.	113

Figura 54: Gráficos referentes à aplicação do modelo de ordem variável para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) nas membranas de quitosana reticuladas com citrato (CH/CIT): (A) 30 °C e (B) 37 °C.....	114
Figura 55: Gráfico referente à aplicação do modelo de ordem variável para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) nas membranas de quitosana reticuladas com tripolifosfato (CH/TPP), 25 °C;	115
Figura 56: Gráficos referentes à aplicação do modelo de ordem variável para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) nas membranas de quitosana reticuladas com tripolifosfato (CH/TPP): (A) 30 °C e (B) 37 °C.	116
Figura 57: Gráfico referente à aplicação do modelo de ordem variável para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) nas membranas de quitosana modificadas com APTES (CH/Add/APTES), 25 °C.	117
Figura 58: Gráficos referentes à aplicação do modelo de ordem variável para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) nas membranas de quitosana modificadas com APTES (CH/Add/APTES): (A) 30 °C e (B) 37 °C.....	118
Figura 59: Gráficos referentes ao modelo de Morris-Weber para a membrana de quitosana reticulada com citrato (CH/CIT), 25 °C.....	123
Figura 60: Gráficos referentes ao modelo de Morris-Weber para a membrana de quitosana reticulada com citrato (CH/CIT): (A) 30 °C e (B) 37 °C.	124
Figura 61: Gráficos referentes ao modelo de Morris-Weber para a membrana de quitosana reticulada com tripolifosfato (CH/TPP): (A) 25 °C e (B) 30 °C.....	125
Figura 62: Gráficos referentes ao modelo de Morris-Weber para a membrana de quitosana reticulada com tripolifosfato (CH/TPP), 37 °C.	126
Figura 63: Gráficos referentes ao modelo de Morris-Weber para a membrana de quitosana modificada com APTES (CH/Add/APTES): (A) 25 °C e (B) 30 °C.....	127
Figura 64: Gráfico referente ao modelo de Morris-Weber para a membrana de quitosana modificada com APTES (CH/Add/APTES), 37 °C.....	128
Figura 65: Gráficos referentes ao modelo de pseudo primeira ordem para a membrana de quitosana reticulada com tripolifosfato (CH/Add/APTES): (A) 25 °C e (B) 30 °C..	148
Figura 66: Gráficos referentes ao modelo de pseudo primeira ordem para a membrana de quitosana reticulada com tripolifosfato (CH/Add/APTES), a 37 °C.	149
Figura 68: Gráficos referentes ao modelo de pseudo primeira ordem para a membrana de quitosana reticulada com tripolifosfato (CH/TPP): (A) 30 °C e (B) 37 °C.	150

Figura 69: Gráficos referentes ao modelo de pseudo primeira ordem para a membrana de quitosana reticulada com tripolifosfato (CH/CIT): (A) 25 °C e (B) 30 °C. 151

Lista de Abreviaturas

APTES – 3-amino-propiltrimetoxissilano

BSA – Albumina do soro bovino.

CH – Quitosana

CH/Add/APTES – Membrana de quitosana com a adição de APTES

CH/APTES – Membrana de quitosana imersa em APTES

CH/CIT – Membrana de quitosana com citrato

CH/TPP – Membrana de quitosana com tripolifosfato

CIT – Citrato de sódio

DRX – Difração de raios X

DSC - Calorimetria Exploratória Diferencial

FTIR – Espectroscopia de absorção no infravermelho

MEV – Microscopia eletrônica de Varredura

PBS – Tampão fosfato salino (Phosphate-buffered saline)

TG/DTG – Análise termogravimétrica

TPP – Tripolifosfato de sódio

1. Introdução

A quitosana e seus derivados apresentam-se como biopolímeros versáteis para inúmeras aplicações na medicina, na indústria alimentícia, na agricultura e em ciências dos materiais, devido às suas características singulares, como biocompatibilidade, atoxicidade e biodegradabilidade [1]. Relatos na literatura mostram diferentes estratégias para modificar quimicamente a quitosana a partir de reações com os grupos químicos funcionais amina ($-NH_2$) e hidroxila ($-OH$) de suas estruturas, visando o aprimoramento de suas propriedades para as mais diversas aplicações [2 – 4]. Além disto, a presença destes grupos funcionais possibilita a sua utilização como material adsorvente para a remoção de corantes, metais pesados e proteínas [1].

Quando um determinado material entra em contato com um fluido biológico, a adsorção de proteínas presentes à superfície do material é uns dos primeiros eventos que ocorre na superfície. Isso é considerado de suma importância, uma vez que as interações que ocorrem na superfície do material refletirão no seu desempenho quando o mesmo for utilizado como dispositivo biomédico [5]. Nesse contexto, a adsorção de proteínas depende das propriedades químicas tanto da superfície das proteínas quanto da superfície do material. A quantidade de proteínas adsorvidas e a cinética deste processo de adsorção dependem fortemente do grau de hidrofobicidade, hidrofiliabilidade e da carga superficial presentes nas superfícies dos materiais [6. 7].

As propriedades do material adsorvente como área superficial, distribuição do tamanho dos poros, sítios adsorventes, grupos funcionais presentes no adsorvente e no adsorbato são propriedades importantes que influenciam na capacidade de sorção [8]. Dois importantes aspectos físico-químicos para avaliação de um processo de sorção são o equilíbrio e a cinética de sorção. O equilíbrio de sorção é estabelecido quando a concentração do sorbato na solução *bulk* encontra-se em um equilíbrio

dinâmico com a interface do adsorvente. A análise deste equilíbrio pode fornecer informações fundamentais para avaliar a afinidade ou a capacidade de um adsorvente.

De maneira genérica, a interação de um adsorbato em solução sobre um adsorvente sólido envolve diversas etapas: (a) transporte do adsorbato, íons ou moléculas em solução para a superfície externa do adsorvente; (b) passagem do adsorbato líquido através da superfície do sólido; (c) interação com os átomos da superfície do sólido para a quimiosorção (interação forte entre adsorvente-adsorbato equivalente à formação de uma ligação covalente) ou sorção fraca (interação adsorvente-adsorbato similar à força de Van der Waals) [8].

Todos os processos de sorção envolvem aspectos cinéticos e termodinâmicos, e que permitem conhecer mais sobre o desempenho e os mecanismos da sorção. O desempenho cinético de um adsorvente é importante para direcionar e otimizar a sua aplicação [9]. A cinética de sorção depende das interações entre adsorvente-adsorbato e das condições externas do sistema (temperatura, força iônica, pH), dentre outras.

Alguns modelos matemáticos foram desenvolvidos para descrever os comportamentos cinéticos de processos de sorção. Entre esses modelos encontram-se: modelo de pseudo de primeira ordem (Lagergren, 1898), modelo pseudo segunda ordem (Ho, 1995), modelo de Morris e Weber e modelo de ordem cinética variável [8, 10, 11].

Em 1898, Lagergren descreveu a primeira equação para descrever a cinética de sorção de processos de interação de primeira ordem cinética, em sistemas do tipo sólido-líquido para a sorção de ácido malônico e ácido oxálico sobre carvão. Ainda hoje, as equações cinéticas de Lagergren são utilizadas para descrever a sorção de sistemas sólido-líquido baseados na capacidade de sorção. Pelo fato desse modelo ser utilizado somente na capacidade de sorção dos sólidos adsorventes em relação à concentração de soluções, o modelo de Lagergren foi chamado de pseudo primeira

ordem [11]. O modelo de difusão intrapartícula ou modelo de Weber e Morris é de grande interesse pois a difusão determina a taxa de adsorção na maioria dos sistemas líquidos [12].

Para que seja possível estabelecer qual modelo cinético é melhor ajustado ao sistema em estudo analisam-se os dados experimentais utilizando-se os diferentes modelos ou mecanismos de difusão de poros/fase sólida. Os coeficientes de correlação entre dados experimentais e teóricos fornecerão o modelo que apresenta melhor ajuste [13].

Este estudo tem como principal meta sintetizar materiais à base de quitosana com fins de aplicação em sorção de proteínas. A modificação química da quitosana e a determinação dos dados cinéticos do processo físico químico de sorção de proteínas são de suma importância para o entendimento do comportamento biológico sobre a superfície do biomaterial e para futuras aplicações dos materiais preparados e estudados.

2. Revisão da literatura

2.1 Quitina e quitosana

A quitina é um polissacarídeo natural, encontrada na carapaça de crustáceos, tais como o caranguejo e o camarão, bem como em insetos e fungos, sendo o segundo biopolímero mais abundante na natureza após a celulose. Ela foi isolada pela primeira vez em 1811 por Braconnot, quando trabalhava com fungos [14]. Em 1823, Odier isolou uma substância das carapaças de insetos, a qual chamou de quitina. Odier e Childre relataram que isolaram a quitina com vários tratamentos utilizando soluções de hidróxido de potássio. Isso os levou a um equívoco, pois na realidade eles isolaram um derivado da quitina, a quitosana. Esta foi descrita pela primeira vez em 1859 por Rouget, e o seu nome foi proposto em 1894 por Hoppe-Seyler pelo fato de a quitosana possuir a mesma quantidade de nitrogênio da quitina [15]. A quitosana apenas foi produzida industrialmente pela primeira vez em 1971, no Japão.

Na Figura 01 é apresentado um esquema da preparação de quitina e quitosana a partir dos exoesqueletos de crustáceos e fungos e suas aplicações.

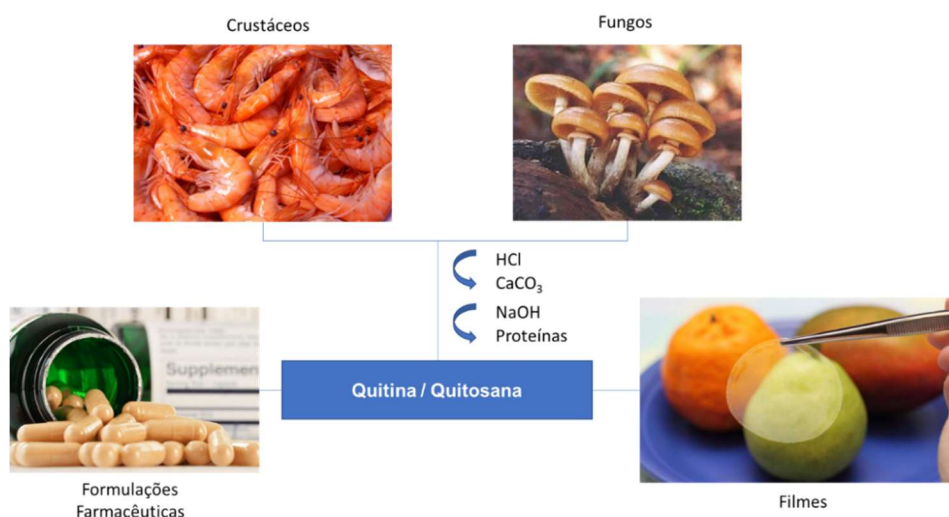


Figura 01: Esquema da preparação de quitina e quitosana a partir dos exoesqueletos de crustáceos e fungos e suas aplicações [16].

As quitosanas são obtidas principalmente da N-desacetilação da quitina em meio alcalino, sendo que a N-desacetilação em meio ácido também pode ocorrer, porém é pouco utilizada devido à susceptibilidade das ligações glicosídicas à hidrólise ácida [17] [17], como apresentado na Figura 02. As estruturas das quitinas e das quitosanas são similares entre si, diferenciando-se somente nos grupos químicos presentes no carbono-2 dos anéis glicosídicos de suas estruturas. Nas quitinas há a presença de grupos acetil ($-\text{CO}-\text{CH}_3$) e nas quitosanas há grupos amina ($-\text{NH}_2$). Convencionou-se nomear de quitosana, a quitina com grau de desacetilação (GD) acima de 65% [18].

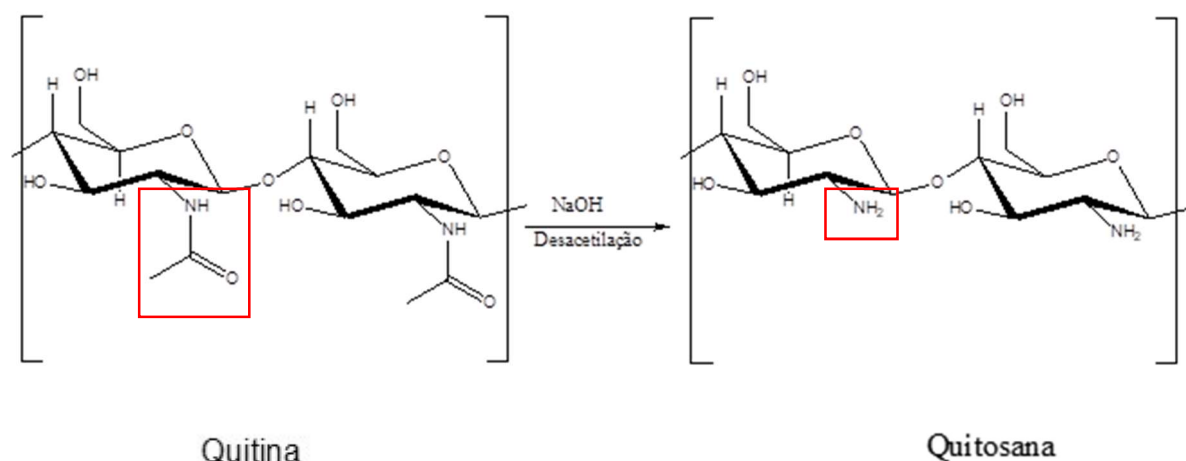


Figura 02: Reação idealizada de desacetilação total da quitina para obtenção da quitosana.

O grau de desacetilação (GD) é uma propriedade química importante das quitosanas, pois influencia em suas características intrínsecas, como hidrofobicidade, solubilidade em meios aquosos e não aquosos, viscosidade, capacidade de reticulação na presença de determinados agentes de reticulação, solubilidade e em sua capacidade de sorção [19]. Assim, a determinação do grau de desacetilação (GD) das quitosanas é uma das mais importantes propriedades desse polissacarídeo. Os

principais métodos estudados com esta finalidade são a titulação potenciométrica, a espectroscopia na região do infravermelho (do inglês: FTIR), a análise elementar (AE), a ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H RMN) e a titulação potenciométrica [20 – 23].

Jiang e colaboradores [23] propuseram uma nova função linearizada simplificada para o método de determinação do GD por titulação potenciométrica. As quitosanas foram purificadas para a retirada de impurezas não solúveis, e então dissolvidas em uma solução de ácido clorídrico, sendo o excesso do ácido titulado com hidróxido de sódio. O método teve boa concordância com outros métodos de determinação como a análise elementar e RMN ^1H .

Quanto à estrutura das quitosanas, destacam-se as suas unidades de repetição que formam ligações β -(1 $\rightarrow$ 4)-glucosaminas, que contêm os grupos hidroxis (-OH) e aminas primárias (-NH₂), como apresentado na Figura 03. A importância destas ligações é descrita em estudos, que mostram que os grupos aminados (-NH₂) da estrutura das quitosanas são quimicamente reativos na presença de cloretos de ácidos graxos (R-CO-Cl) e de aldeídos (R-COH), por exemplo. Portanto, esses dois grupos químicos funcionais oferecem diversas possibilidades de modificação na estrutura das quitosanas, e imobilização de várias espécies ativas biologicamente, como as proteínas e enzimas [24].

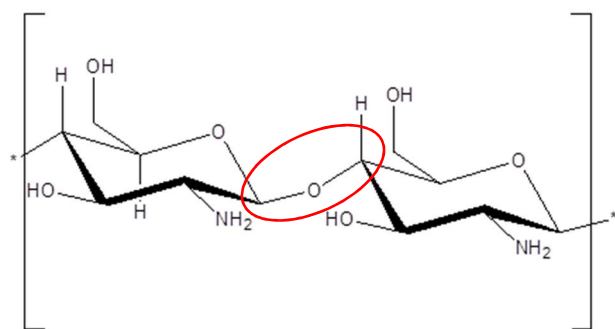


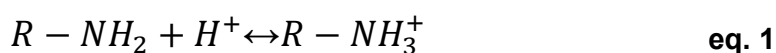
Figura 03: Representação das ligações β -(1 $\rightarrow$ 4)-glucosaminas.

Do ponto de vista químico, as quitosanas são consideradas uma base fraca, insolúvel em água e em solventes orgânicos, mas solúvel em soluções aquosas de ácidos orgânicos, como acético, fórmico, cítrico, além de ácidos inorgânicos, como clorídrico diluído ($\text{pH} < 6,5$), os quais protonam os grupos aminados ($-\text{NH}_2$) resultando em soluções viscosas [25]. Os grupos aminos presentes nas quitosanas possuem pK_a 's entre 6,2 a 7,0, fazendo com que as quitosanas comportem-se como polieletrólitos quando dissolvida em soluções ácidas, o que causa o surgimento de interações repulsivas eletrostáticas entre os grupos amino ionizados ao longo da cadeia [26].

2.2 Grau de desacetilação

O grau de desacetilação é uma propriedade química importante da quitosana, pois influencia em suas características intrínsecas, como hidrofobicidade, solubilidade em meios aquosos e não aquosos, viscosidade, capacidade de sorção e de reticulação na presença de determinados agentes químicos específicos [19]. Foram determinados o grau de desacetilação de duas quitosanas diferentes utilizadas nesse trabalho, denominadas de quitosana A e quitosana B. A titulação da quitosana para a determinação do grau de desacetilação é um método indireto bastante utilizado nas indústrias por ser uma técnica de baixo custo [23].

A quitosana foi solubilizada em uma solução de ácido clorídrico padronizada (0,102 mol L⁻¹) e titulada potenciométricamente com uma solução de hidróxido de sódio padronizada (0,09 mol L⁻¹) contendo 0,1 mol L⁻¹ de cloreto de potássio. Considera-se a titulação do excesso de ácido, ou seja, uma titulação indireta de ácido forte com base forte. A quitosana em solução de HCl torna-se um polieletrólito devido a protonação dos grupos de amina primárias (-NH₂). A reação de equilíbrio (Equação 1) descrita no estado de ionização é [23]:



A constante de dissociação (Equação 2) da quitosana é definida como:

$$K^a = \frac{[R - NH_2][H^+]}{[R - NH_3^+]} \quad \text{eq. 2}$$

Partindo-se dessas equações, das equações de balanço de carga e da concentração de quitosana durante a titulação, Jiang e colaboradores [23] propuseram uma função linear para a determinação do grau de desacetilação da quitosana. A função é mostrada a seguir na Equação 3:

$$V + \frac{V_0 + V}{C_B} ([H^+] + [OH^-]) = V_e + \left\{ \frac{C_1 V_1}{C_B \times 10^{-p}} + \frac{K_w (V_0 + V)}{C_B \times 10^{-2pH}} - \frac{V_0 + V}{C_B} - \frac{V}{[H^+]} \right\} K^a \quad \text{eq. 3}$$

Onde:

V_e – volume no ponto de equivalência;

V_0 – volume da solução de quitosana;

V – volume da base forte adicionada;

C_B – concentração da base forte (mol L⁻¹)

C_1 – concentração da solução de HCl (mol L⁻¹);

V_1 – volume da solução de HCl adicionado para a dissolução da quitosana (mL);

K_w – produto iônico da água;

K^a – constante de dissociação da quitosana;

pH – em cada ponto da titulação potenciométrica;

$[H^+]$ – concentração em mol L⁻¹ de H⁺ no decorrer da titulação e

$[OH^-]$ – concentração em mol L⁻¹ de OH⁻ no decorrer da titulação.

A equação (5) pode ser transformada em uma equação linear, sendo os valores de X e Y descritos nas equações 4 e 5:

$$Y = V + \frac{V_0 + V}{C_B} ([H^+] + [OH^-]) \quad \text{eq. 4}$$

e

eq. 5

$$X = \left\{ \frac{C_1 V_1}{C_B \times 10^{-p}} + \frac{K_w (V_0 + V)}{C_B \times 10^{-2pH}} - \frac{V_0 + V}{C_B} - \frac{V}{[H^+]} \right\}$$

2.2 Modificação das quitosanas

As quitosanas vem sendo estudada visando diferentes aplicações nas mais diversas áreas do conhecimento, tais como no tratamento de efluentes [27, 28], como suporte para cromatografia, em aplicações biotecnológicas, biomédicas e farmacêuticas, como biomateriais [26, 29] e na preparação de sistemas específicos para liberação controlada de fármacos [29 – 31].

As quitosanas têm diversas características interessantes como a biocompatibilidade, biodegradabilidade, uma boa bioaderência e afinidade celular. Como biomaterial, registra-se que a sua biocompatibilidade foi comprovada em implantes em tecidos vivos e a sua baixa toxicidade foi verificada em animais. Ressalta-se que para a utilização da quitosana em aplicações biomédicas os reagentes utilizados não devem ser tóxicos [32 – 34].

A fim de aprimorar suas propriedades, vários estudos vêm sendo desenvolvidos, os quais relatam rotas para modificações químicas da quitosana com a introdução de diferentes grupos químicos em suas estruturas [35]. As modificações das quitosanas são, portanto, extremamente útil para aprimorar e desenvolver materiais com aplicações biomédicas específicas, como na engenharia de tecidos e como carreadores de fármacos. Alguns artigos relatam a modificação da superfície do filme de quitosana para incrementar a biocompatibilidade e biofuncionalidade, aprimorando desta forma as suas propriedades [1, 34, 36]. Devido às quitosanas conterem grupos hidroxil e aminas primárias nas unidades de repetição das ligações β -(1→4)-glucosaminas, as suas modificações utilizando estes grupos são facilitadas.

Há estudos que relatam que o caráter hidrofílico ou hidrofóbico da estrutura química das quitosanas influenciam fortemente no processo de sorção de proteínas [24, 37]. Diversas rotas de modificação das quitosanas vêm sendo estudadas com a adição de grupos que conferem caracteres hidrofílico/hidrofóbico às estruturas das quitosanas quimicamente modificadas.

Membranas nanoporosas de quitosana foram sintetizadas por NAN e colaboradores [29] para utilização no transporte de fármacos, utilizando-se polietileno glicol (PEG) para gerar a estrutura de nanoporos na membrana de quitosana. Os resultados mostraram que as membranas nanoporosas de quitosana podem ser utilizadas para o transporte de fármacos por difusão controlada.

Além da modificação da superfície das quitosanas com a finalidade de aprimorar as suas propriedades de biocompatibilidade, é importante também ressaltar que para melhorar a estabilidade das quitosanas em meios ácidos, bem como as suas propriedades mecânicas, é necessário que as estruturas das quitosanas sofram reações de reticulação, conhecidas como *cross link*. Alguns compostos, como tripolifosfato, glutaraldeído, etilenoglicol, epícloridrina e organosilanos têm sido utilizados com essa finalidade [2].

Nas próximas seções, serão apresentadas informações gerais e exemplos de pesquisas científicas realizadas com os agentes de modificação/reticulação que foram utilizados neste estudo para a modificação da superfície da quitosana, sendo estes o 3-amino-propiltrimetoxisilano (APTES), o tripolifosfato de sódio (TPP) e o citrato de sódio (CIT).

2.3. Organosilanos

Os organosilanos fazem parte de uma importante classe de compostos que é largamente utilizada na obtenção de sílicas gel a partir de precursores do tipo alcóxidos, tal como o tetraetilortossilicato (TEOS) [38]. Estes compostos vêm sendo utilizados na modificação das superfícies de sílica gel e de diversos materiais [39 – 41]. A partir de condições apropriadas, os organosilanos sofrem reações sucessivas de hidrólise e condensação, gerando uma rede de sílica, conferindo desta forma ao material propriedades específicas, como aprimoramento nas propriedades mecânicas dos materiais modificados pelo organosilanos.

O 3-amino-propiltriétossilano (APTES) é um dos agentes organosilanos mais utilizados para a preparação de filmes com a presença de grupos amina (NH_2). Destaca-se que a presença desse grupo é importante para aplicações em biomateriais, pois permite que proteínas e outras biomoléculas sejam imobilizadas [40]. A Figura 04 apresenta a estrutura química do 3-amino-propiltriétossilano (APTES).

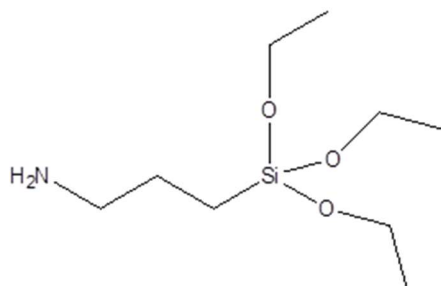


Figura 04: Representação esquemática da estrutura do 3-amino-propiltriétossilano (APTES).

Para obtenção de materiais do tipo biopolímero-sílica, são descritas duas principais rotas de síntese. A primeira rota considera a rede de sílica como componente principal do material, onde o biopolímero é introduzido à esta rede em

uma pequena quantidade para tornar o material mais biocompatível ou conferir alguma flexibilidade mecânica à rede [42].

A segunda estratégia para a obtenção deste material é a formação da rede principal pelo biopolímero, geralmente um hidrogel. Nessa rede é então adicionada uma pequena quantidade da sílica. Esse processo geralmente aprimora as propriedades mecânicas e/ou a estabilidade química do material.

Podem ser utilizadas a sílica solúvel ou o seu precursor, formando um colóide [42]. Por exemplo, encontra-se descrito na literatura um sistema aquoso para a formação de uma sílica bifuncionalizada e de um biopolímero, onde a quitosana foi utilizada para acelerar o processo sol-gel do glicol modificado com tetraetoxisilano (GMT). O material apresentou boa compatibilidade [43].

Outros autores como Jing Ma e colaboradores [44] prepararam membranas híbridas de quitosana com tetraetilortossilicato (TEOS). A incorporação de TEOS na rede de quitosana melhorou a hidrofiliabilidade, a estabilidade térmica e reduziu a cristalinidade da quitosana. A estabilidade térmica das membranas modificadas com o TEOS foi maior em relação à membrana sem o TEOS, o que poderia ser explicado pela formação de ligações do tipo Si-O-C e de ligações de hidrogênio entre a quitosana e a sílica (SiO_2) gerada na reação, como apresentada na Figura 05. De acordo com difratogramas de raios X, os autores observaram que a cristalinidade diminuiu devido às cadeias de quitosana estarem menos compactadas.

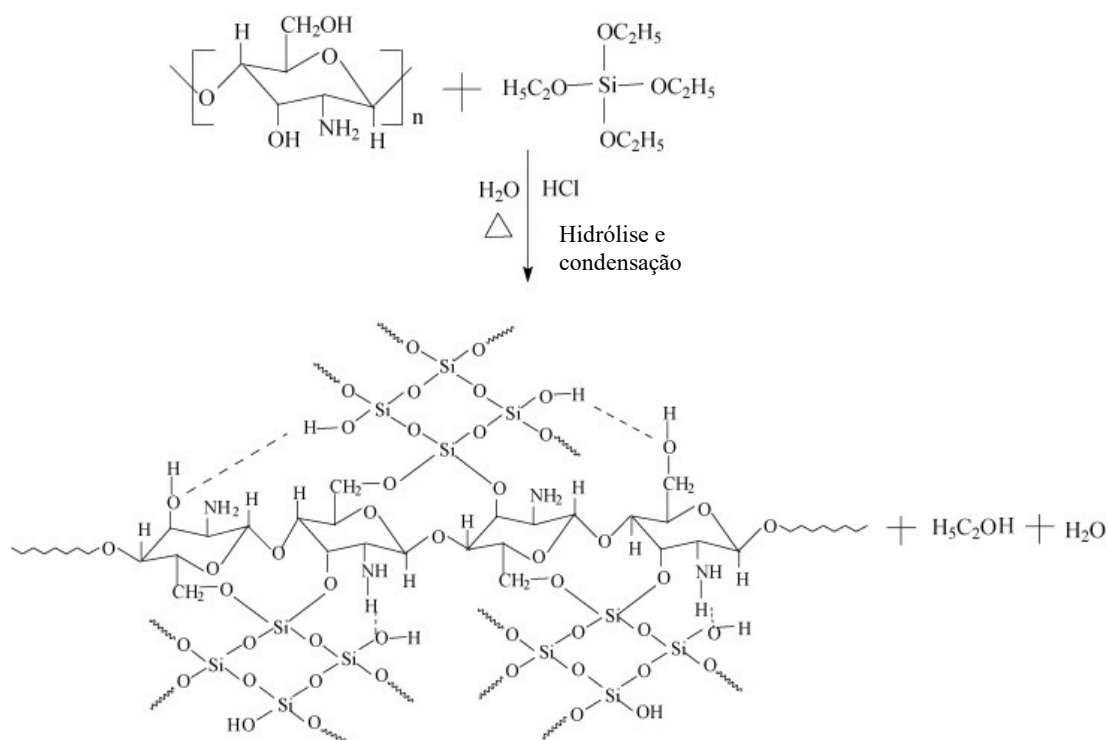


Figura 05: Representação esquemática da reação entre a quitosana e o TEOS para a formação da membrana de quitosana modificada [44].

Vários silanos foram utilizados no trabalho de Spirk e colaboradores [39], que preparam filmes finos híbridos de quitosana-silanos pelo processo sol-gel e *spin coating*. Em uma solução de quitosana foi adicionada, sob agitação, uma solução alcoólica acidificada de silano. As razões quitosana e silano foram mantidas constantes. Os filmes finos variaram entre 5 e 70 nm de espessura. Os autores observaram que os silanos formaram ligações covalentes com a cadeia de quitosana, bem como ligações de hidrogênio. Como a reação ocorre em condições ácidas, os grupos aminados ($-\text{NH}_2$) da quitosana estavam protonados, possibilitando interações por ligações de hidrogênio, como mostrado na Figura 06.

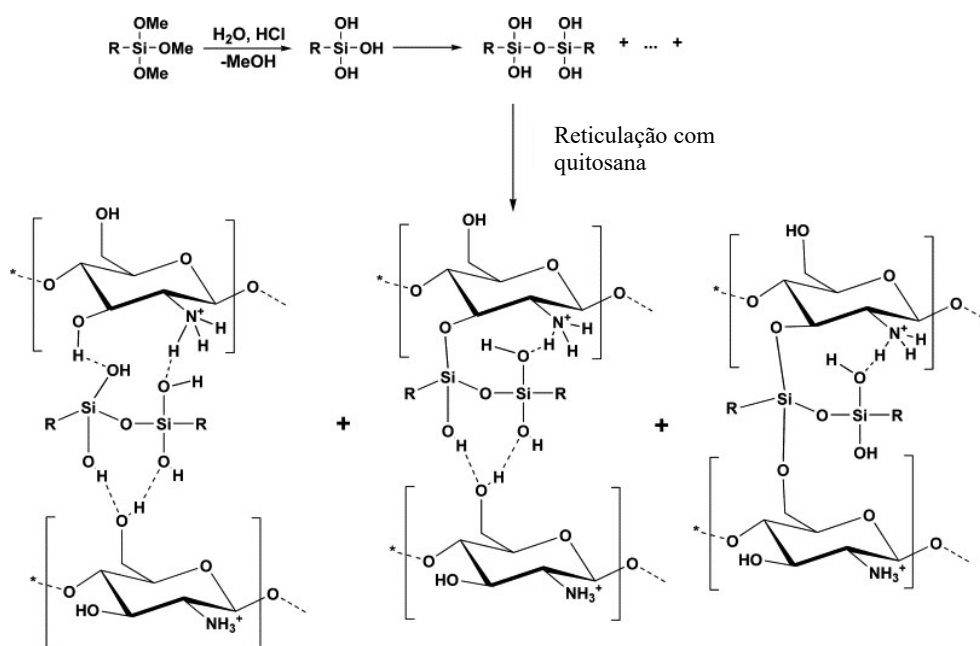


Figura 06: Representação esquemática da interação entre a quitosana e o silano [39].

Park e colaboradores [45] estudaram a formação de membranas constituídas por um compósito orgânico-inorgânico, utilizando o tetraetilortossilicato (TEOS) como material inorgânico e quitosana como composto orgânico. Foi preparada uma rede interpenetrante, sendo o TEOS hidrolisado e condensado, gerando a estrutura inorgânica. Posteriormente a quitosana foi incorporada à rede formada, conferindo à membrana sensibilidade a mudanças de pH do meio. Dependendo do pH do meio, ocorre um intumescimento ou contração da quitosana incorporada. Foram realizados experimentos de permeação de drogas no material obtido, em soluções aquosas de pH's entre 2,5 e 7,5. Neste estudo, a quitosana incorporada à rede intumesciu em pH 2,5 e contraiu em pH 7,5, sendo estes processos reversíveis (Figura 07). Três tipos diferentes de drogas foram utilizados para o estudo de liberação: 4-acetamido-fenol (não iônica), lidocaína em HCl (catiônica) e a salicilato de sódio (aniônica).

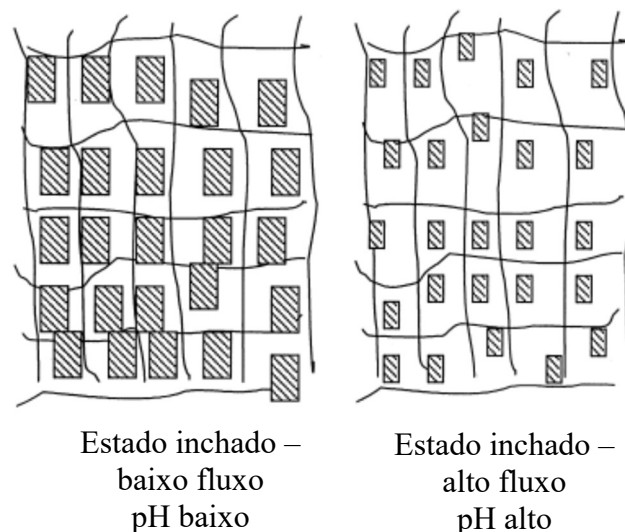


Figura 07: Mecanismo proposto para o comportamento do híbrido TEOS/quitosana em pH ácido e básico [45].

O processo de difusão das drogas mostrou que com o aumento do pH de 2,5 para 7,5 ocorre um aumento da taxa de difusão das drogas. Quando o pH diminuiu para 2,5, a taxa de difusão diminuiu, devido aos fenômenos de contração e intumescimento da estrutura da quitosana. A permeação das drogas através do material é fortemente afetada por interações iônicas específicas, bem como pelo pH das soluções da droga.

Liu e colaboradores [46] prepararam um material híbrido quitosana/GPTMS/sílica, na forma de membrana, cuja reação é apresentada na Figura 08. A análise da estrutura de sílica formada mostrou que a sílica se encontra dispersa de forma homogênea na estrutura da quitosana. Os autores notaram uma diminuição do intumescimento da rede da quitosana na presença da sílica e do (3-glicidiloxipropil)trimetoxisilano (GPTMS). A hidrofiliabilidade das membranas foi mantida após a reação de reticulação.

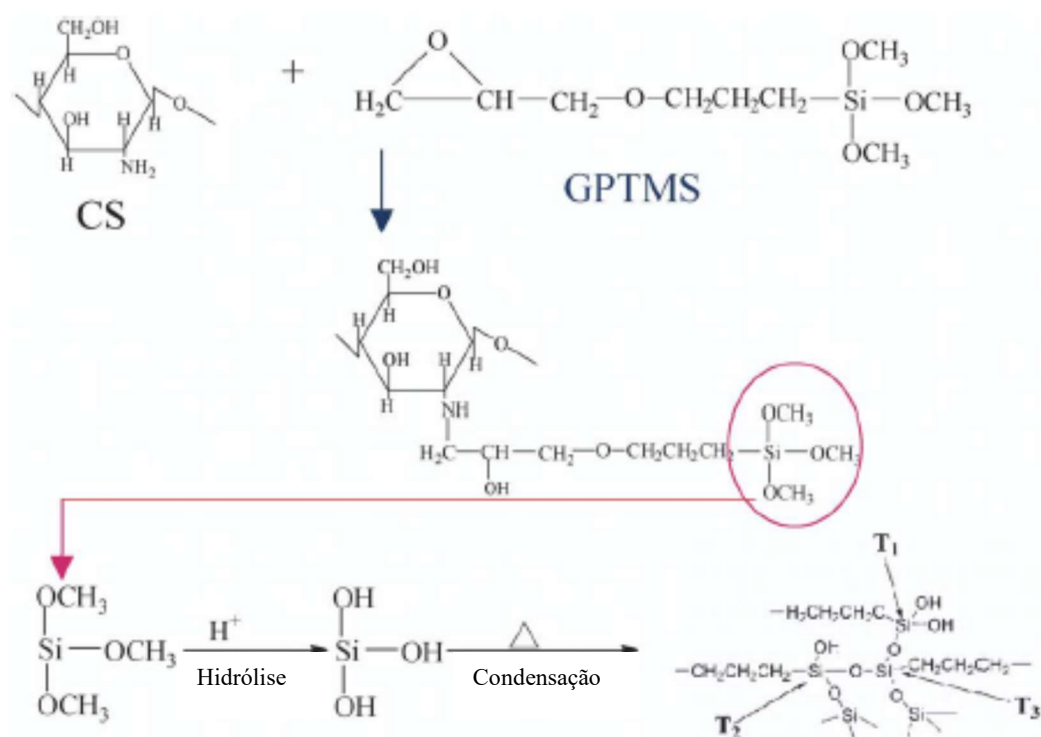


Figura 08: Reação de reticulação da quitosana e formação *in situ* das membranas híbridas sílica-quitosana [46].

2.4. Citrato de sódio (CIT)

O citrato de sódio consiste no sal de sódio do ácido cítrico. A sua estrutura encontra-se apresentada na Figura 09.

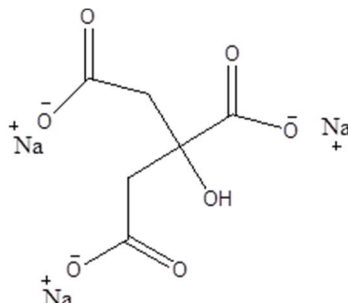


Figura 09: Representação esquemática da estrutura básica do citrato de sódio.

Quanto à modificação da quitosana com citrato, alguns artigos podem ser mencionados, tal como o estudo descrito por Honary e colaboradores [47] que desenvolveram filmes de quitosana com três massas molares diferentes, reticuladas com citrato, e estudaram como a massa molar da quitosana influencia na liberação de uma droga apolar dos filmes de quitosana. Neste estudo, foi variada a concentração do agente reticulante e o tempo de reticulação. Foi observado que o tempo de reticulação e a concentração do reticulante influenciam na liberação *in vitro* da droga. A indometacina foi liberada mais rapidamente em pH 3,5, independente do tempo de reticulação ou concentração, porém diminuiu significativamente com o aumento da massa molar. Portanto, a quitosana com alta massa molar liberou a droga mais lentamente. Em pH 6,2 a razão de liberação da droga diminuiu com o tempo e com a concentração do agente reticulante.

A utilização de fibras de quitosana em presença de ácido cítrico e hidróxido de sódio foram estudadas por Ghosh e colaboradores [48]. As fibras reticuladas exibiram maior estabilidade contra degradação enzimática, hidrofobicidade e biomineralização, além da propriedade mecânica melhorada. A reticulação das fibras influenciou a sorção da lisozima, onde observou-se que as fibras reticuladas apresentaram maiores

adsorções em relação às fibras não reticuladas. Essa diferença de sorção influenciou nas atividades celulares nas fibras, mostrando maior proliferação e diferenciação osteogênica *in vitro*, bem como melhor regeneração do tecido ósseo em um modelo de coelho.

2.5. Tripolifosfatos (TPP)

Os tripolifosfatos são polímeros inorgânicos pertencentes ao grupo dos fosfatos condensados, constituídos por unidades básicas de íons ortofosfatos (PO_4^{3-}). Possuem fórmula geral $(\text{PO}_3)^-_n$, sendo n o grau de polimerização. Tipicamente, o tripolifosfato de sódio pode ser obtido com n variando de 2 a 300, enquanto os fosfatos disponíveis na natureza, o n atinge uma ordem de grandeza de 10^6 [49, 50]. A estrutura do tripolifosfato de sódio é apresentada na Figura 10.

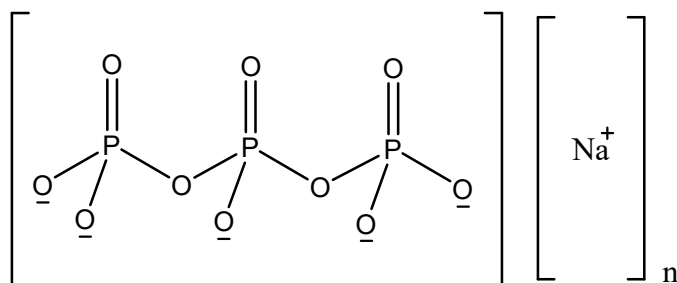


Figura 10: Representação esquemática da estrutura do tripolifosfato de sódio.

O tripolifosfato é um poliânion que interage com a quitosana por interações eletrostáticas, pois os grupos aminados ($-\text{NH}_2$) da quitosana são protonados pelo ácido utilizado para a dissolução da quitosana [51].

Antoniou e colaboradores [52] otimizaram a formação de nanopartículas de quitosana a partir da utilização de agente de reticulação à base de fosfato. Foi utilizado o trifosfato na reticulação das nanopartículas, conferindo interações entre os grupos aminos ($-\text{NH}_2$) da cadeia da quitosana os grupos aniônicos fosfatos dos tripolifosfatos (PO_4^{3-}). Estas interações foram confirmadas por espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR). Os autores verificaram que os tamanhos das nanopartículas podem ser controlados selecionando-se condições experimentais apropriadas. O

tamanho das nanopartículas de quitosana depende da razão entre a quantidade de quitosana e trifosfato, da massa molar da quitosana, pH e da salinidade da concentração inicial de quitosana.

Ma e colaboradores [53] relataram um estudo que teve como objetivo a síntese de uma membrana a ser utilizada como guia no processo de regeneração óssea a base de quitosana. O tripolifosfato (TPP) foi utilizado como agente de reticulação (*cross link*). Os resultados deste estudo indicaram que a membrana de quitosana pode ser utilizada como reconstrutor do tecido ósseo e a utilização do tripolifosfato promove uma maior resistência à tensão ao material. Experimentos *in vitro* mostraram que a membrana possui uma boa biocompatibilidade.

Sarkar e colaboradores [54] estudaram a síntese de nanofibras (78 nm de diâmetro) de uma blenda de quitosana-PEO em uma solução de ácido acético. A estabilidade da nanofibra foi relacionada ao *cross link* entre quitosana e íons tripolifosfato (TPP). Os resultados indicaram uma natureza atóxica das nanofibras de quitosana reticuladas com tripolifosfato e um potencial a ser explorado para aplicação como matriz em engenharia de tecidos.

Nanopartículas de quitosana N-trimetila (TMC) foram preparadas por reticulação de TMC com tripolifosfato (TPP). Chen e colaboradores [55] utilizaram duas proteínas como modelo, a albumina do soro bovino (BSA) e a hemoglobina bovina para a sorção e liberação de proteínas. Os resultados mostraram que as nanopartículas foram eficientes na sorção para a BSA, porém pouco eficientes para a hemoglobina bovina. A concentração de BSA influenciou as características físico-químicas do material, como no potencial zeta, no tamanho de partícula e nos perfis de liberação das nanopartículas, o que não aconteceu com a hemoglobina bovina. Estes estudos demonstraram que as nanopartículas de TMC são potenciais portadores de proteína, e que suas propriedades físico-químicas e perfis de liberação podem ser otimizados por meio de várias modificações.

2.6 Proteínas

As proteínas são biopolímeros formados por sequências lineares em uma estrutura primária, arranjados em uma estrutura tridimensional. Esta estrutura tridimensional é formada por estruturas secundárias, terciárias e quaternárias. As estruturas secundárias são formadas por ligações de hidrogênio chamadas de alfa-hélice e a beta-folha, e as estruturas terciárias são os dobramentos das cadeias polipeptídicas sobre si mesma, conferindo à proteína uma estrutura 3D. A estrutura quaternária corresponde a estrutura formada quando a proteína tem duas ou mais cadeias polipeptídicas iguais ou não, ligadas para formar a estrutura da proteína [56]. (Figura 11).

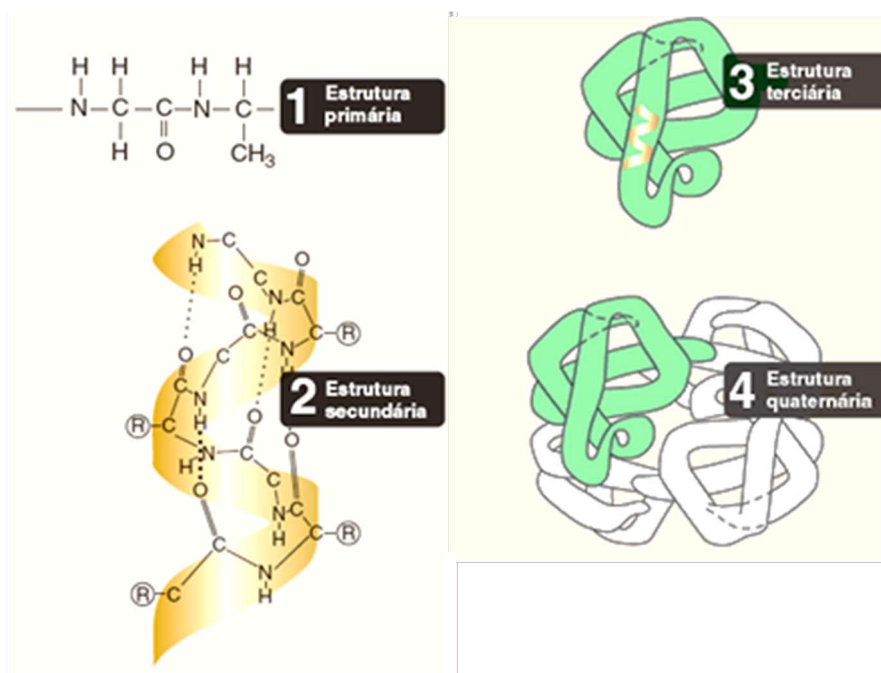


Figura 11: Estruturas das proteínas: primária, secundária, terciária e quaternária [57].

As proteínas são responsáveis por várias funções fisiológicas e têm um papel importante no metabolismo, na expressão dos genes e na transdução dos sinais [58]. A sorção de proteínas é um fenômeno complexo que está estritamente relacionada às propriedades físicas e químicas da proteína e do substrato [59].

Especificamente, a albumina do soro bovino (BSA) é uma cadeia polipeptídica simples constituída de 583 resíduos de aminoácidos e 3 (três) domínios, sendo 76% da sequência de aminoácidos iguais à albumina do soro humano (HSA), sendo assim muito semelhante. Além disso, a BSA é a proteína mais abundante no sangue bovino. A albumina do soro bovino altera sua conformação com a variação do pH, tendo o ponto isoelétrico em torno de 4,7 e 5,6.

A proteína albumina do soro bovino (BSA) tem sido utilizada como modelo para a avaliação da sorção de proteínas em biomateriais. A Figura 12 mostra a representação esquemática da sua estrutura em 3D.

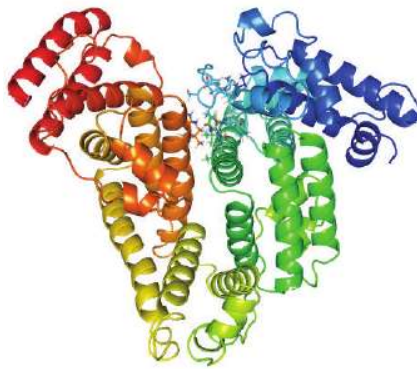


Figura 12: Representação esquemática da estrutura em 3D da albumina do soro bovino (BSA) [60].

Baki e colaboradores prepararam microesferas de quitosana utilizando o glutaraldeído como agente reticulante para a adsorção da albumina do soro humano. Os estudos foram realizados na faixa de pH entre 4,0 e 7,0. Foi observado que a saturação máxima de HSA obtido em pH 5,0 foi $11,35 \text{ mg mL}^{-1}$ [61].

2.7 Processos de sorção

Quando fluidos biológicos entram em contato com diferentes superfícies sólidas específicas, sejam poliméricas, metálicas ou cerâmicas, ocorrem eventos específicos nas interfaces sólido/solução. O primeiro evento consiste de interações entre a proteína e a superfície do substrato. As interações, neste caso, podem ser eletrostáticas, interações hidrofóbicas e/ou ligações de hidrogênio. O segundo evento, devido ao efeito Vroman, é a troca de proteínas por outras com maior afinidade pela superfície do material. As proteínas com maior afinidade pela superfície sofrem uma mudança conformacional irreversível e camadas dessas proteínas são formadas na superfície do biomaterial, como mostrada na Figura 13 [62].

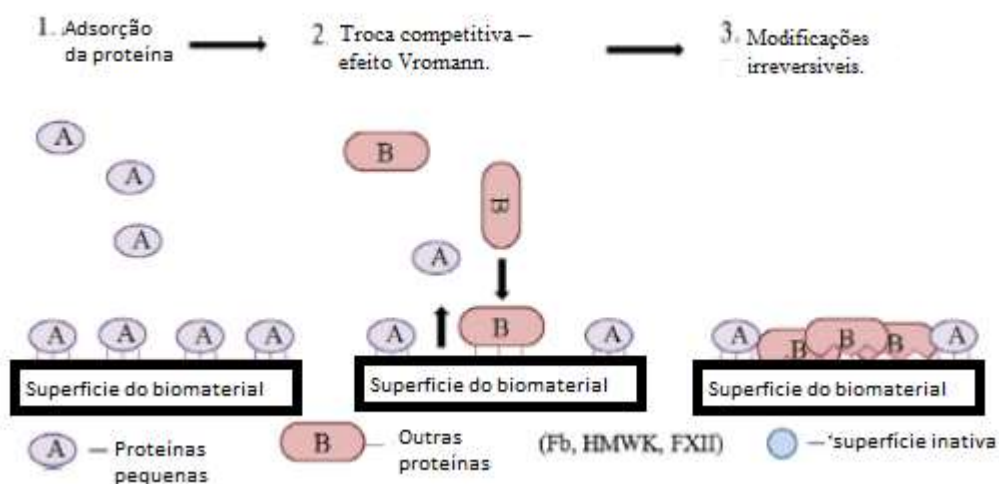


Figura 13: Representação esquemática da sorção de proteínas sobre um biomaterial. (Adaptado da ref. [62])

Encontra-se descrito também na literatura que processos de sorção, sendo esse o termo tipicamente utilizado quando não se conhece se ocorrem adsorções físicas ou químicas de proteínas, envolvem várias etapas. Estas etapas incluem: (1) transporte da proteína do *bulk* da solução para a região interfacial; (2) interação

(sorção) da proteína na superfície do adsorvente; (3) relaxamento da proteína sobre a superfície; (4) dessorção e (5) transporte de volta da proteína para a solução até o estado de equilíbrio [56].

É reportado que a quantidade de proteína adsorvida na superfície do substrato é influenciada pelas diversas interações entre as moléculas de proteína e do substrato, incluindo forças de Van der Waals e forças eletrostáticas [56]. Além disso, propriedades das proteínas, tais como a carga e a sua distribuição na estrutura protéica, bem como propriedades da solução, tais como força iônica, concentração inicial da proteína e pH da solução, e características da superfície do substrato, tais como a hidrofiliabilidade, rugosidade e carga, influenciam significativamente na quantidade de proteína adsorvida [58]. Adsorções de proteína sobre materiais à base de quitosana têm sido estudadas para uso biomédico, incluindo liberação controlada de fármacos, aplicações antimicrobica, engenharia de tecidos e liberação controlada de vacinas [63]. A quitosana modificada aumenta a sorção de proteínas, assim como reportado por Boggione e colaboradores [64], que observaram que a quitosana modificada pela adição de epícloridrina sorveu até 40% da proteína endoglucanase, enquanto a membrana de quitosana sem modificação sorveu 30%.

Kim e colaboradores prepararam um material à base de quitosana por reação com formação de base de Schiff da quitosana utilizando-se a celulose funcionalizada com dialdeído e subsequente redução para a formação do adsorvente. Este material foi utilizado na sorção da proteína albumina do soro bovino (BSA). O adsorvente se manteve estável na faixa de pH entre 2,0 e 9,0, sendo que em pH 5,5, se observou a maior quantidade de proteína adsorvida [65].

As sínteses de 3 (três) diferentes membranas de quitosana para sorção de proteínas foram estudados por Zhao e colaboradores [66]. As membranas de quitosana foram modificadas com metacrilato de glicidila (GMA) e poli(etileno glicol) diacrilato (PEG-DA). Foram utilizadas 3 (três) proteínas, albumina do soro bovino,

fibrinogênio e lisozima, como modelos para avaliar a sorção das proteínas nestas membranas. As sorções de todas as proteínas foram irreversíveis, em todas as membranas, e são dependentes do tipo de proteína e da estrutura da membrana. A membrana de metacrilato de glicidilo-fosforilcolina-quitosana (PCCs-GMA) apresentou a maior sorção das três proteínas.

Há também estudos sobre microesferas magnéticas obtidas a partir do Cibacron Blue (CB), poli(etileno glicol) (PEG), álcool polivinílico (PVA), poli(metilmetacrilato) (PMMA) e etilenodiamina (EDA), para estudo da sorção da albumina do soro bovino (BSA). A proteína apresentou boa afinidade pelas microesferas, e a capacidade de sorção aumentou com o aumento da quantidade de CB presente nas microesferas. A microesfera CB-EDA-PMMA apresentou maior capacidade de sorção dentre as sintetizadas [67].

Hoven e colaboradores [24] estudaram a sorção de proteínas na superfície de quitosana modificada com a adição de cargas negativas e positivas. O filme de quitosana com grupos n-sulfo furfuril (filme SFC) apresentou carga negativa e sorção seletiva de proteínas. Neste filme, observou-se que as proteínas com carga negativa (albumina e fibrinogênio) tiveram então, uma quantidade sorvida menor que as proteínas de carga positiva (ribonuclease e lisozima). A sorção seletiva observada foi explicada em termos das interações eletrostáticas entre as cargas da quitosana e das proteínas. Já para a quitosana modificada com a adição de grupo de amônio quaternário (filme QAC), a qual adquiriu carga positiva, foi observado um comportamento anômalo. A quantidade de proteína sorvida aumentou em função do intumescimento do filme QAC, independente das cargas negativas e positivas de cada proteína estudada.

O pH é um fator importante para a sorção de proteínas, assim a sorção da albumina em quitosana *reticulada*-celulose dialdeído foi estudada em diferentes pH's [32]. Kim e colaboradores [32] observaram que uma maior quantidade de proteína foi

sorvida em pH 5,8, devido ao aumento do número de grupos de aminas primárias ($-NH_2$), e conseqüentemente, uma maior interação proveniente das reações entre a celulose dialdeído e a quitosana foi relatada. Já no estudo de sorção de albumina em vidro bioativo de quitosana/fosfato-Ca foi observado uma maior sorção em pH em torno de 7,2, a 37 °C. A análise da superfície do biomaterial mostrou que a proteína foi adsorvida na superfície, e que os íons cálcio e fosfato provocaram uma diminuição na sorção da proteína [68].

A sorção de proteínas em nanotubos de carbono e nanotubos funcionalizados com grupos de aminas primárias ($-NH_2$) foi registrada na literatura, e o equilíbrio de sorção da albumina sobre os nanotubos ocorreu em 9 (nove) minutos para os nanotubos não funcionalizados, e em 20 (vinte) minutos para os funcionalizados. Os dados das isotermas de sorção para ambos adsorventes foram ajustados ao modelo de Langmuir [69].

O estudo da sorção da albumina do soro bovino (BSA) em nanopartículas de quitosana carboximetila/ κ -carragenina foi estudado por Mahdavinia e colaboradores [59]. Foi observado que a cinética de sorção da proteína seguiu o modelo de Ho-Mckay de pseudo segunda ordem. A primeira etapa da sorção é a mais rápida, pois as moléculas ocupam rapidamente os sítios mais acessíveis do adsorvente. Com o aumento do tempo de contato, os sítios são progressivamente ocupados, sendo que a velocidade da sorção diminui na etapa final do processo, devido à saturação dos sítios. Os nanocompósitos magnéticos apresentaram uma capacidade de sorção maior que os nanocompósitos que não são magnéticos, o que pode ser atribuído à maior área superficial desse nanocompósito.

Sarkar e colaboradores [70] estudaram a cinética e a termodinâmica de sorção de três diferentes proteínas, lisozima, β -lactoglobulina e hemoglobina em solução aquosa sobre a superfície de sílica em pó em diferentes pH's, temperaturas e concentrações das proteínas. Os autores observaram que a cinética de sorção para

todas as proteínas é de primeira ordem, com duas constantes cinéticas. A primeira constante (K_1^*) é referente à ligação inicial das moléculas de proteínas com os sítios ativos da superfície da sílica, e à remoção e reorganização das moléculas de água adsorvidas na superfície. A segunda constante (K_2^*) representa a desnaturação das moléculas de proteínas. Os valores de K_1^* tiveram a seguinte ordem: lisozime > β -lactoglobulina > hemoglobina.

Neste trabalho foram obtidos dados cinéticos para o processo de sorção de proteínas sobre um substrato, como a membrana de quitosana, pois estes dados são poucos estudados na literatura e são de suma importância para o entendimento do processo de sorção e para adequadas aplicações de novos biomateriais.

3. Objetivos

3.1 Geral

- ✓ Sintetizar materiais à base de quitosana com fins de aplicação em sorção de proteínas.

3.2 Específicos

- ✓ Sintetizar membranas de quitosana modificadas/reticuladas com citrato (CIT), tripolifosfato (TPP) e 3-amino-propiltrimetoxisilano (APTES);
- ✓ Avaliar as características morfológicas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV); estruturais por Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR) e Difração de Raios-X (DRX); e propriedades térmicas por termogravimetria (TG) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC);
- ✓ Avaliar a sorção da proteína albumina do soro bovino (BSA) nas membranas de quitosana modificadas/reticuladas em diferentes pH's;
- ✓ Construir isotermas de sorção da proteína albumina do soro bovino (BSA) nas membranas de quitosana modificadas/reticuladas em diferentes temperaturas 25 °C, 30 °C e 37 °C;
- ✓ Realizar e avaliar um estudo cinético do processo de sorção da proteína albumina do soro bovino (BSA) nas membranas de quitosana modificadas/reticuladas por diferentes modelos cinéticos. Dados que são inéditos na literatura.

4. Metodologia

4.1 Preparação das soluções

a. Solução tampão a pH 7,0 (PBS)

Para o preparo da solução tampão pH 7,0, foram inicialmente dissolvidos em água destilada 37,9 g de cloreto de sódio (NaCl), 4,965 g de fosfato dibásico de sódio (Na_2HPO_4) e 2,07 g de fosfato monobásico de sódio (NaH_2PO_4). Em seguida, o volume da solução foi completado para 500 mL em um balão volumétrico, e a solução foi homogeneizada e armazenada.

b. Solução tampão pH 4,0, 5,0, 6,0 e 8,0

Para o preparo das soluções tampões a pH 4,0, 5,0, 6,0 e 8,0, foram preparadas soluções de biftalato de potássio ($\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, fosfato monobásico de sódio (NaH_2PO_4) a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e de hidróxido de sódio (NaOH) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Os volumes utilizados para cada pH são mostrados na Tabela 01. O pH foi ajustado com a adição de hidróxido de sódio ou biftalato de potássio, utilizando-se um pHmetro. O volume da solução foi completado para 100 mL em um balão volumétrico, e em seguida a solução foi homogeneizada e armazenada.

Tabela 01: Volumes das soluções para o preparo dos tampões.

Solução tampão pH	$\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$	NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$	NaH_2PO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$
	Volume (mL)		
4,0	50	0,4	-
5,0	50	24	-
6,0	50	45	-
8,0	-	47	50

c. Solução de Albumina do soro bovino (BSA)

Foram preparadas soluções padrões de albumina entre 100 e 1000 mg L⁻¹. Para isto, inicialmente foi preparada uma solução estoque de 1000 mg L⁻¹. Para preparar a solução estoque foram dissolvidos 0,2500 g de albumina do soro bovino (BSA) em soluções de tampões descritas na Tabela 01. Em seguida, o volume da solução foi completado em balão volumétrico de 250 mL e a solução homogeneizada. Foram retiradas alíquotas da solução estoque para o preparo das soluções padrões de concentrações de 100, 200, 300, 400, 500 e 1000 mg L⁻¹.

d. Preparo do reagente de Biureto para determinação da albumina

Foram dissolvidos 1,5 g de sulfato de cobre (CuSO₄.5H₂O) e 6,0 g de tartarato duplo de sódio e potássio (KNaC₄H₄O₆.4H₂O) em 500 mL de água destilada. Sob agitação constante, foram adicionados 300 mL de uma solução de NaOH a 10% e 1,0 g de iodeto de potássio (KI). Em um balão volumétrico, o volume da solução foi completado a 1 L com água destilada, e em seguida a solução foi homogeneizada e armazenada.

4.2 Purificação da quitosana

A purificação foi realizada para eliminar impurezas insolúveis em meio ácido que possam estar presentes na quitosana. Foram dissolvidos 5,0 g de quitosana em 200 mL de solução de ácido acético a 0,35 mol L⁻¹, sendo em seguida o material filtrado a vácuo. Foram então adicionados 150 mL de uma solução de hidróxido de sódio a 1,0 mol L⁻¹ para a precipitação da quitosana. O precipitado foi lavado com água destilada até que o pH do filtrado atingisse valor igual ao da água destilada (pH 6,0). Em seguida, o material foi lavado com acetona e, após várias lavagens, o produto final foi seco em estufa a 60°C, por 12 horas. A Figura 14 mostra um desenho esquemático do processo de purificação.

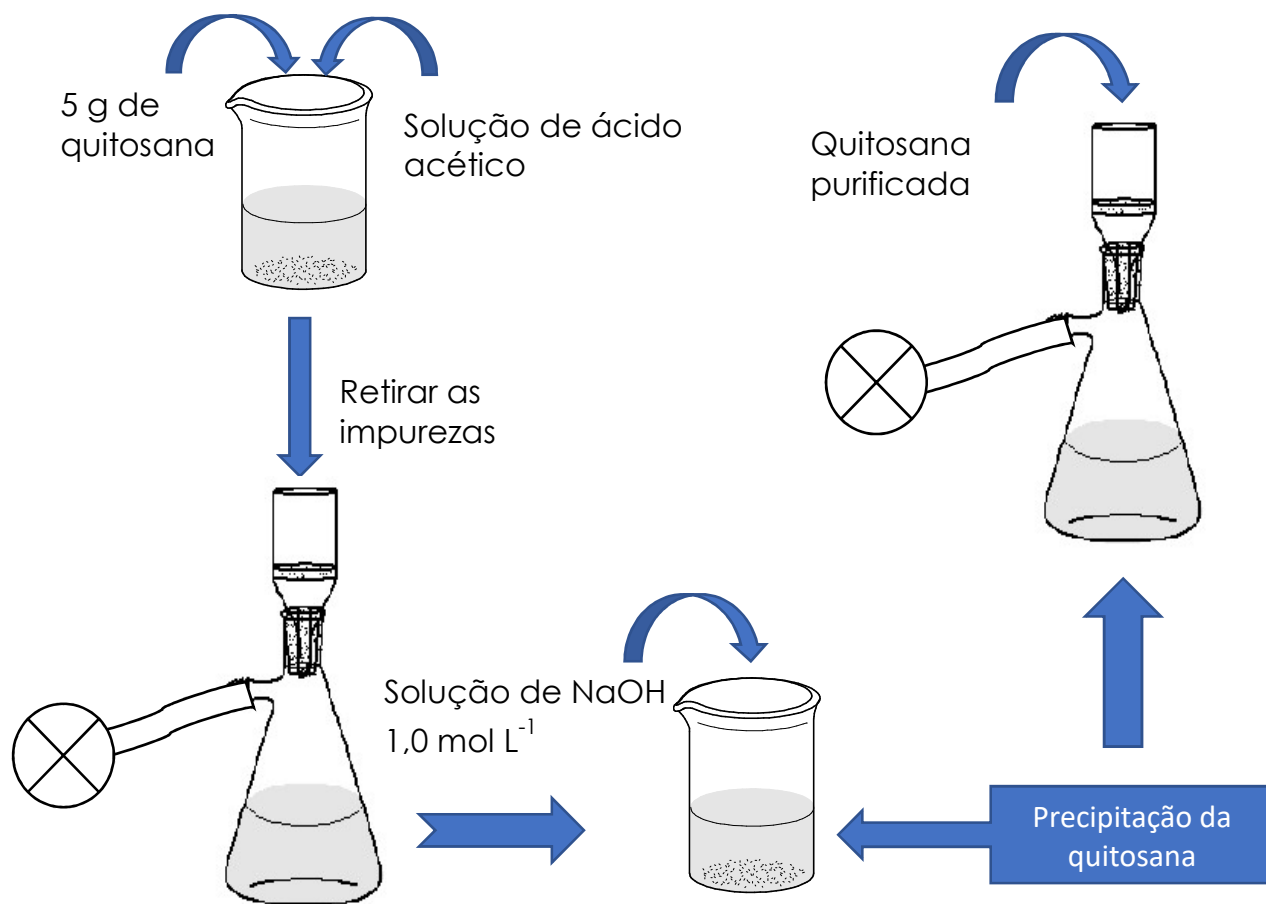


Figura 14: Representação esquemática da purificação da quitosana

4.3 Preparação das membranas de quitosana quimicamente modificadas

a. Membranas de quitosana (CH)

As membranas foram preparadas pela dissolução de 1,0 g de quitosana em 100 mL de ácido acético a $0,35 \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, a suspensão foi vertida em uma superfície de polietileno e colocada em estufa a 60°C durante 12 horas para a evaporação do solvente. Após este tempo a membrana foi formada e retirada da estufa. Após este processo, a membrana foi imersa em uma solução de hidróxido de sódio a $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ por 24 horas, e em seguida foi lavada com água destilada (Figura 15).

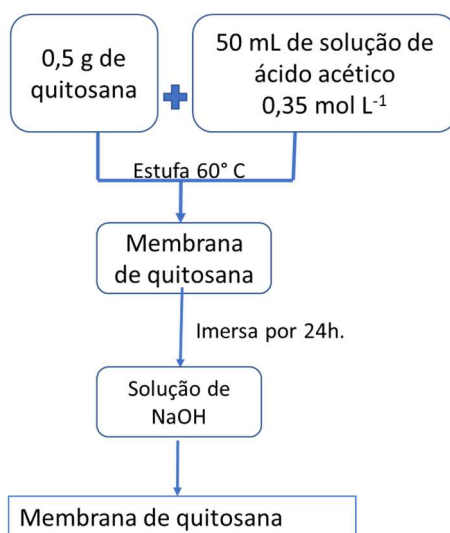


Figura 15: Representação esquemática da metodologia de obtenção da membrana de quitosana (CH).

b. Membranas de quitosana reticuladas com citrato de sódio (CH/CIT)

As membranas de quitosana reticuladas com CIT foram preparadas pela dissolução de 1,0 g de quitosana em 100 mL de ácido acético a $0,35 \text{ mol L}^{-1}$. Esta suspensão foi vertida em uma superfície de polietileno e colocada em estufa a 60°C durante 12 horas para a evaporação do solvente e formação da membrana. Após este processo, as membranas foram imersas em solução de hidróxido de sódio a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, e lavadas com água destilada. Em seguida, as membranas foram imersas em uma

solução de citrato de sódio a $0,19 \text{ mol L}^{-1}$ por 24 horas e lavadas com água destilada. Neste processo, foi obtida uma membrana transparente e amarelada de quitosana, insolúvel em água [71] (Figura 16).

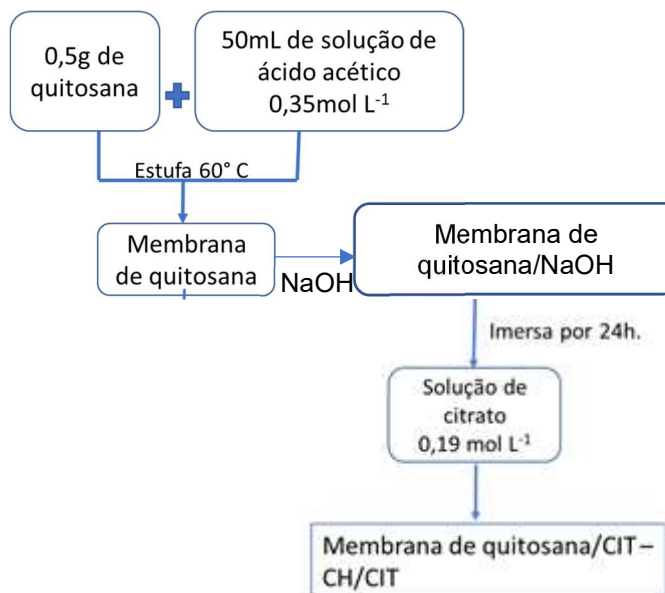


Figura 16: Representação esquemática da metodologia de obtenção das membranas de quitosana reticuladas com citrato de sódio (CH/CIT).

c. Membranas de quitosana reticuladas com tripolifosfato (CH/TPP)

As membranas de quitosana reticuladas com TPP foram preparadas pela dissolução de 1,0 g de quitosana em 100 mL de ácido acético a $0,35 \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, a suspensão foi vertida em uma superfície de polietileno e colocada em estufa a 60°C por 12 horas para a evaporação do solvente e formação da membrana. Após este processo, as membranas foram imersas em solução de hidróxido de sódio a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, as membranas foram lavadas com água destilada e então, a membrana foi imersa em uma solução de tripolifosfato a $0,41 \text{ mol L}^{-1}$ por 24 horas e, em seguida foi lavada com água destilada [71 – 73]. Neste processo, foi obtida uma membrana transparente e amarelada de quitosana, insolúvel em água (Figura 17).

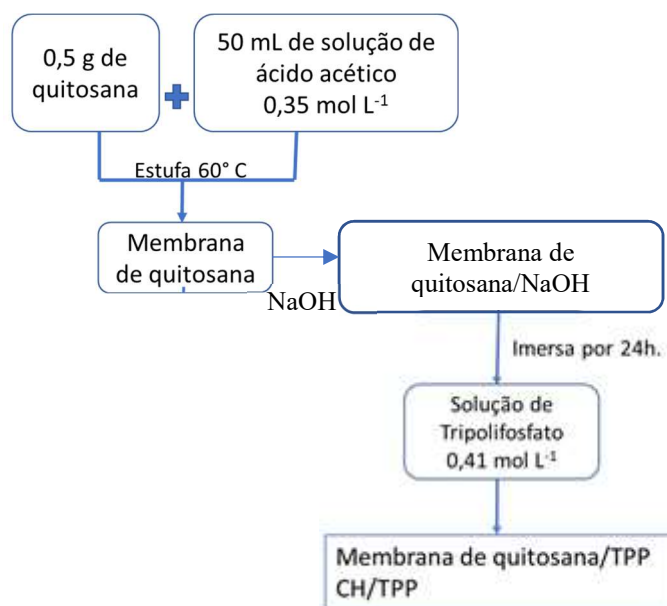


Figura 17: Representação esquemática da metodologia de obtenção das membranas de quitosana reticuladas com tripolifosfato (CH/TPP).

d. Membranas de quitosana imersas em solução de 3-aminopropiltriétóxisilano (CH/APTES)

As membranas de quitosana foram preparadas dissolvendo-se 1,0 g de quitosana em 100 mL de uma solução de ácido acético a 0,35 mol L⁻¹, sob agitação, por 24 horas. A solução de APTES foi preparada dissolvendo-se 0,5 g de APTES em 50 mL de etanol acidificado pela adição de 0,5 g de água acidificada com HCl (pH ~ 1,5). Esta solução foi mantida sob agitação por 48 horas para completa hidrólise do APTES.

A suspensão de quitosana foi vertida em uma superfície de polietileno e colocada em estufa a 60°C por 12 horas para a evaporação do solvente e formação da membrana. Após este processo, as membranas foram imersas em solução de hidróxido de sódio a 0,5 mol L⁻¹, as membranas foram lavadas com água destilada e então imersas na solução de APTES por 24 horas, e em seguida foram lavadas com água destilada (Figura 18).

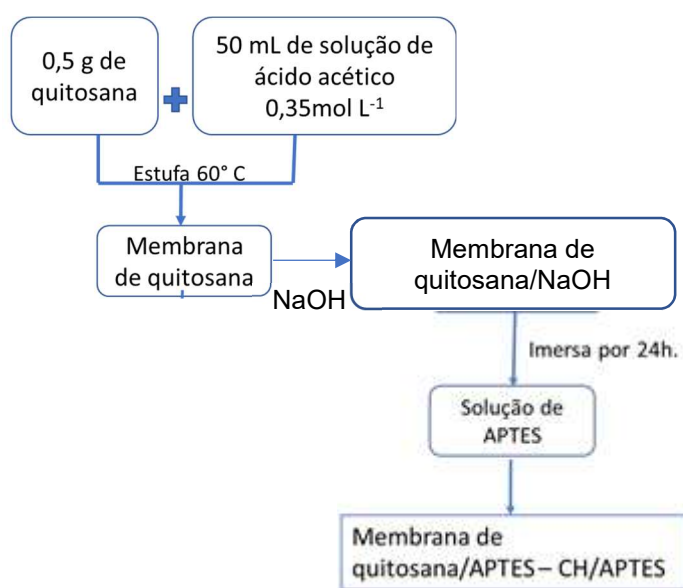


Figura 18: Representação esquemática da metodologia de obtenção das membranas de quitosana imersas em APTES (CH/APTES).

e. Membranas de quitosana modificadas com 3-aminopropiltriétóxisilano (CH/Add/APTES)

As membranas de quitosana modificadas com 3-aminopropiltriétóxisilano (CH/Add/APTES) foram preparadas dissolvendo-se 1,0 g de quitosana em 100 mL de uma solução de ácido acético a 0,35 mol L⁻¹, sob agitação por 24 horas. A solução de APTES foi preparada dissolvendo-se 0,5 g de APTES em 50 mL de etanol acidificado

pela adição de 0,5g de água acidificada com HCl (pH ~ 1,5). Esta solução foi mantida sob agitação por 48 horas, para completa hidrólise do APTES.

Para a modificação da quitosana com o APTES, foram pesados 12 g da suspensão de quitosana e adicionados 6 g da solução de APTES, mantendo-se o sistema sob agitação vigorosa, por 30 minutos. Para a formação da membrana, 20 mL desta solução foi vertida em uma superfície de polietileno, que por sua vez foi colocada em estufa a 60°C para a evaporação do solvente [39]. Após um período de 18 horas, a membrana é então formada. Em seguida, a membrana foi imersa por 30 minutos em uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1 mol L⁻¹ (Figura 19).

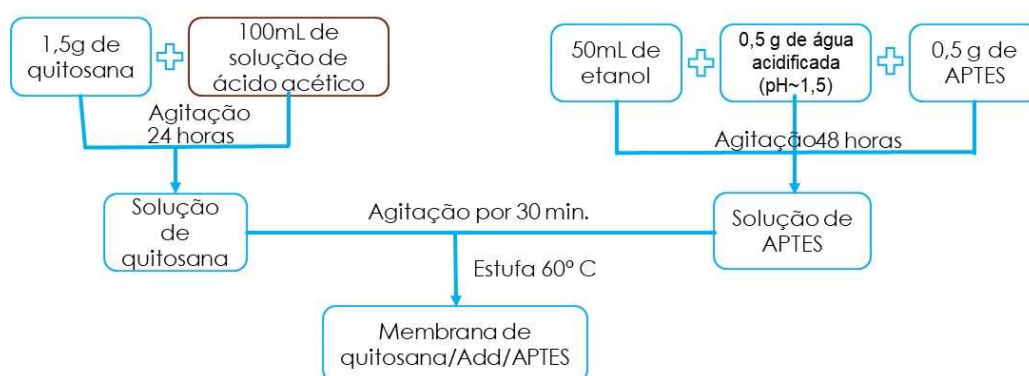


Figura 19: Representação esquemática da metodologia de obtenção da membrana de quitosana modificada com APTES (CH/Add/APTES).

4.4 Caracterização das membranas de quitosana

a. Determinação do grau de desacetilação por titulação potenciométrica.

A titulação potenciométrica foi realizada de acordo com o procedimento descrito na literatura [23]. A quitosana purificada (0,20 – 0,23 g) foi dissolvida em 25 mL de uma solução de ácido clorídrico padronizada (0,102 mol L⁻¹) e em 100 mL de

água destilada. Sob agitação vigorosa, o excesso de ácido clorídrico foi titulado com solução de hidróxido de sódio padronizada ($0,09 \text{ mol L}^{-1}$), contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de cloreto de potássio. A solução de NaOH foi adicionada com incrementos de 0,5 mL, e o pH para cada volume adicionado foi anotado. A titulação seguiu até atingir pH 6,0. As titulações foram realizadas em triplicata para cada quitosana, assim como foram utilizadas duas quitosanas de fontes diferentes.

b. Grau de intumescimento das membranas.

A determinação do grau de intumescimento das membranas foi realizada em água e em solução tampão fosfato salino (do inglês: PBS), pH 7,4. As capacidades de intumescer dos materiais foram determinadas pela imersão das membranas de massas conhecidas nas soluções a temperatura constante, 37°C . Em diferentes intervalos de tempos, as membranas tiveram sua superfície seca por papel absorvente e suas massas medidas em balança analítica. O grau de intumescimento (S) foi calculado segundo a Equação 6 abaixo:

$$S = \left(\frac{W_t - W_0}{W_0} \right) \times 100 \quad \text{eq .6}$$

Onde:

W_0 é a massa da membrana seca (gramas);

W_t é a massa da membrana em diferentes intervalos de tempo durante a imersão (gramas).

Todas as medidas foram realizadas em triplicata e o desvio padrão calculado.

c. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (do inglês: FTIR).

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos utilizando-se um espectrômetro da Perkin Elmer, em uma faixa de comprimento de onda de 4000 a 600 cm^{-1} . A análise para FTIR foi realizada com as amostras na forma de membranas, assim, as medidas foram feitas no modo reflectância total atenuada (ATR). As medidas foram realizadas no Núcleo Regional de Competência em Petróleo, Gás e Biocombustíveis de Sergipe (NUPEG) da UFS.

d. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).

As morfologias das superfícies das membranas foram observadas em um microscópio eletrônico de varredura (Modelo Jeol, Carry Scope JCM-5700), modo SEI (imagem de elétrons secundários), utilizando a potência do feixe de 10 kV e abertura do feixe de 30 nm. As amostras foram fixadas em um porta-amostra (*stubs*) com adesivo de carbono dupla face, e então, recobertas com uma fina camada de ouro com espessura de ~20 nm depositada por *sputtering*, sob vácuo de $\sim 10^{-5}$ torr. As análises foram realizadas no Laboratório de Caracterização de Materiais, no Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais da UFS.

e. Difração de raios X (DRX)

Os difratogramas de raios X de todas as amostras de membranas de quitosana foram obtidas usando-se um aparelho de difração de raios X da SHIMADZU modelo XRD-6000, com fonte de radiação Cu-K α , sendo $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$, em uma faixa de

varredura entre 4° e 60° com uma taxa de 2° min⁻¹. As medidas foram realizadas no Laboratório de Caracterização de Materiais, no Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais da UFS.

f. Análise termogravimétrica (TG).

A análise térmica foi realizada, com o objetivo de verificar as perdas de massa de acordo com o aumento da temperatura, avaliando-se possíveis alterações dos componentes das membranas em uma dada faixa de aquecimento. Para esta análise, utilizou-se um termoanalisador da NETZSCH STA 449 F1. As curvas foram obtidas para as membranas utilizando uma massa entre 20 e 30 mg em panelinhas de platina, dentro da faixa de temperatura de 30 a 600°C, com uma taxa de aquecimento de 10°C min⁻¹ e sob fluxo de nitrogênio de 50 mL min⁻¹. As medidas foram realizadas no Laboratório de Caracterização de Materiais, no Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais da UFS.

g. Calorimetria exploratória diferencial (do inglês: DSC).

Os experimentos de Calorimetria exploratória diferencial (do inglês: DSC) foram realizados para identificar os eventos endotérmicos e exotérmicos que ocorrem durante o aquecimento da amostra, ocorrendo ou não perda de massa. Para estes experimentos foi utilizado um DSC da Shimadzu, modelo DSC-60WS. As curvas foram obtidas dentro da faixa de temperatura de 30 a 450°C para as membranas de quitosana utilizando-se massas das amostras entre 3 a 5 mg. Foram utilizadas panelinhas de alumínio hermeticamente fechadas, onde a alumina foi utilizada como referência. As taxas de aquecimento foram de 10°C min⁻¹, sob fluxo de nitrogênio de 40 mL min⁻¹. As medidas foram realizadas no Laboratório de Materiais Vítreos e Nanodispositivos Fotônicos do Departamento de Química Fundamental da UFPE.

4.5. Estudos de sorção da proteína albumina do soro bovino (BSA) nas membranas de quitosana

As concentrações de proteína albumina do soro bovino (BSA) foram determinadas por espectroscopia de absorção na região do visível, utilizando o comprimento de onda de 550 nm.

Para esta análise, foram adicionados 2 mL da solução de biureto a uma alíquota de 5 mL da solução a ser determinada a concentração. Após um período de tempo de 15-20 min, as leituras das absorbâncias foram realizadas em um espectrofotômetro de absorção na região do visível, marca Varian, modelo Cary 100 scan, no Núcleo Regional de Competência em Petróleo, Gás e Biocombustíveis de Sergipe (NUPEG) da UFS.

As quantidades de proteína albumina do soro bovino (BSA) adsorvidas foram calculadas pela subtração da concentração de proteína adicionada (inicial) pela concentração encontrada após o processo de sorção (final), dividida pela massa do adsorvente (Equação 7).

$$q_t = \frac{(C_0 - C_f) \times V}{m} \quad \text{eq. 7}$$

Onde:

C_0 é a concentração inicial da proteína sérum bovina (BSA);

C_f é a concentração final da proteína sérum bovina (BSA) após a sorção;

V é volume em Litros (L) da solução da proteína (BSA) e

m é massa em gramas do adsorvente.

As membranas foram previamente hidratadas, com as soluções tampão correspondentes, antes dos ensaios de sorção, visando eliminar o efeito de absorção do solvente, determinando-se assim o volume a ser corrigido.

4.6 Estudo do efeito do potencial hidrogeniônico (pH)

O estudo do efeito do potencial hidrogeniônico (pH) na sorção da albumina do soro bovino (BSA) foi realizado com as membranas de quitosana reticuladas em citrato (CH/CIT), com as membranas de quitosana reticuladas em tripolifosfato (CH/TPP) e com as membranas de quitosana modificadas com 3-aminopropiltriétoxissilano (CH/Add/APTES). Os ensaios foram realizados sob agitação constante, em batelada e em triplicata.

Foram realizadas hidratações prévias das membranas de quitosana a partir da imersão de 20 mg das membranas em 5 mL das soluções tampão com pH 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0, separadamente. Após 24 horas, foi adicionada a solução tampão correspondente contendo a proteína BSA na concentração de 2000 mg L⁻¹, até completar 10 mL, para a realização dos ensaios. A concentração inicial da solução da proteína foi determinada pela leitura da absorbância no espectrofotômetro de absorção na região do visível utilizando a curva analítica.

Os ensaios foram realizados a uma temperatura constante de 30°C, e após 24 horas foram coletadas alíquotas do sobrenadante para determinação da concentração de albumina do soro bovino (BSA) não adsorvida e posterior cálculo da quantidade adsorvida, conforme Equação 7.

4.7 Estudo da sorção da proteína albumina do soro bovino (BSA) e modelos cinéticos

O estudo da sorção da albumina do soro bovino (BSA) foi realizado com as membranas de quitosana reticulada com citrato (CH/CIT), com as membranas reticuladas com tripolifosfato (CH/TPP) e com as membranas modificadas com APTES (CH/Add/APTES), em diferentes temperaturas 25°C, 30°C e 37°C. Os ensaios foram realizados sob agitação constante, em batelada e em triplicata.

Foram realizadas hidratações prévias das membranas de quitosana a partir da imersão de 20 mg das membranas em 5 mL de uma solução tampão a 7,0 (PBS). Após 24 horas, foi adicionada a solução tampão PBS contendo a proteína BSA a 2000 mg L⁻¹, até completar 10 mL, para a realização dos ensaios. A concentração inicial da solução da proteína foi determinada pela leitura da absorbância no espectrofotômetro de absorção na região do visível utilizando a curva analítica.

Com o objetivo de avaliar o efeito do tempo na capacidade de retenção das membranas, foram retiradas alíquotas do sobrenadante em intervalos definidos de tempo de 0 a 240 min. A partir do sobrenadante a concentração de albumina do soro bovino (BSA) não adsorvida foi calculada, para posterior cálculo da quantidade adsorvida, conforme Equação 7.

Para avaliar o comportamento cinético do processo de sorção utilizou-se os modelos cinéticos de pseudo primeira e segunda ordem, modelo de ordem variável e o modelo de Morris-Weber.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação do grau de desacetilação por titulação potenciométrica.

A partir dessas equações apresentadas na fundamentação teórica foram traçados os gráficos Y em função de X. A Figura 20 apresenta o gráfico X *versus* Y obtido para a quitosana B.

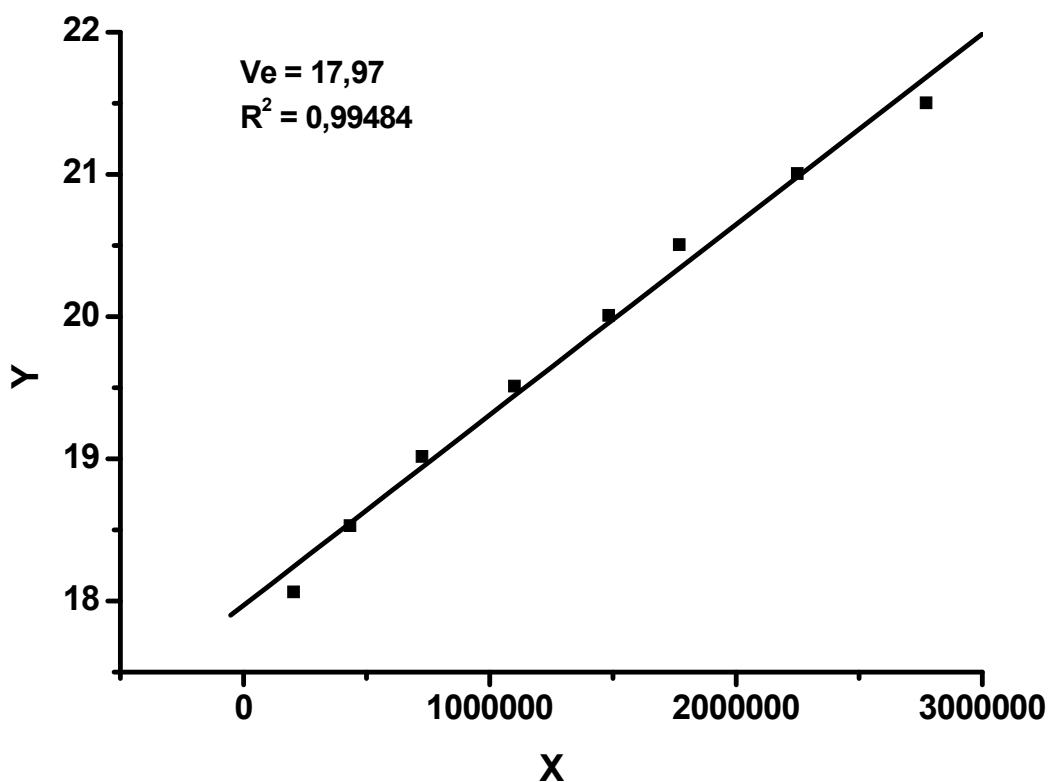


Figura 20: Gráfico da função de Y versus X para a determinação dos valores do volume de equivalência (V_e) para o cálculo do grau de desacetilação da quitosana B.

O coeficiente linear dessa reta fornece o valor do volume de equivalência (V_e), ou seja, o volume de ácido clorídrico em excesso que foi utilizado para o cálculo do grau de desacetilação (GD%) a partir da expressão abaixo (Equação 8) [74].

$$GD\% = \left(\frac{d}{\left(\frac{W - 161d}{204} + d \right)} \right) \times 100 \quad \text{eq. 8}$$

Onde W é a massa em gramas da quitosana utilizada em cada titulação e d é descrito pela Equação 9 abaixo.

$$d = \frac{(C_1 V_1 - C_B V_e)}{1000} \quad \text{eq. 9}$$

A quitosana normalmente precipita em soluções aquosas com pH's superiores a 6,0. Isso causa uma redução na concentração de quitosana na solução provocando um erro considerável na função linear. Além disso, a precipitação pode causar o recobrimento da superfície do eletrodo, perdendo a precisão das medidas. Por essa razão a titulação é finalizada antes do início da precipitação da quitosana, ou seja, antes que o valor do pH ultrapasse 6,0 [23].

Os volumes de equivalência obtidos da extrapolação dos gráficos *Y versus X* foram dispostos na Tabela 02, assim como o grau de desacetilação calculados a partir das equações 8 e 9:

Tabela 02: Volumes de equivalência e graus de desacetilação obtidos das titulações potenciométricas das quitosanas.

Quitosanas	V _e (mL)	W (g)	d/10 ⁻⁴	GD%
A	18,09	0,2215	8,278	67±1
	17,97	0,2140	8,392	
	17,76	0,2188	8,592	
B	18,17	0,2068	8,202	68,3±0,6
	17,17	0,2367	9,154	
	17,57	0,2248	8,773	

Os valores dos graus de desacetilação da duas quitosanas foram muito similares entre si, sendo possível afirmar que as duas quitosanas tem o mesmo valor do grau de desacetilação, considerando o erro da análise. Ambas as quitosanas apresentaram um grau de desatilação razoável. Assim, diante dos resultados apresentados a quitosana B foi escolhida para ser utilizada nos experimentos mostrados a seguir.

5.2 Grau de intumescimento das membranas.

O grau de intumescimento é um parâmetro importante que influencia consideravelmente o mecanismo de liberação de moléculas e íons da superfície das quitosanas, pois a permeabilidade de um sistema polimérico é fortemente dependente do seu conteúdo em água. A Figura 21 indica o comportamento de intumescimento das membranas em água e em PBS em diferentes intervalos de tempo.

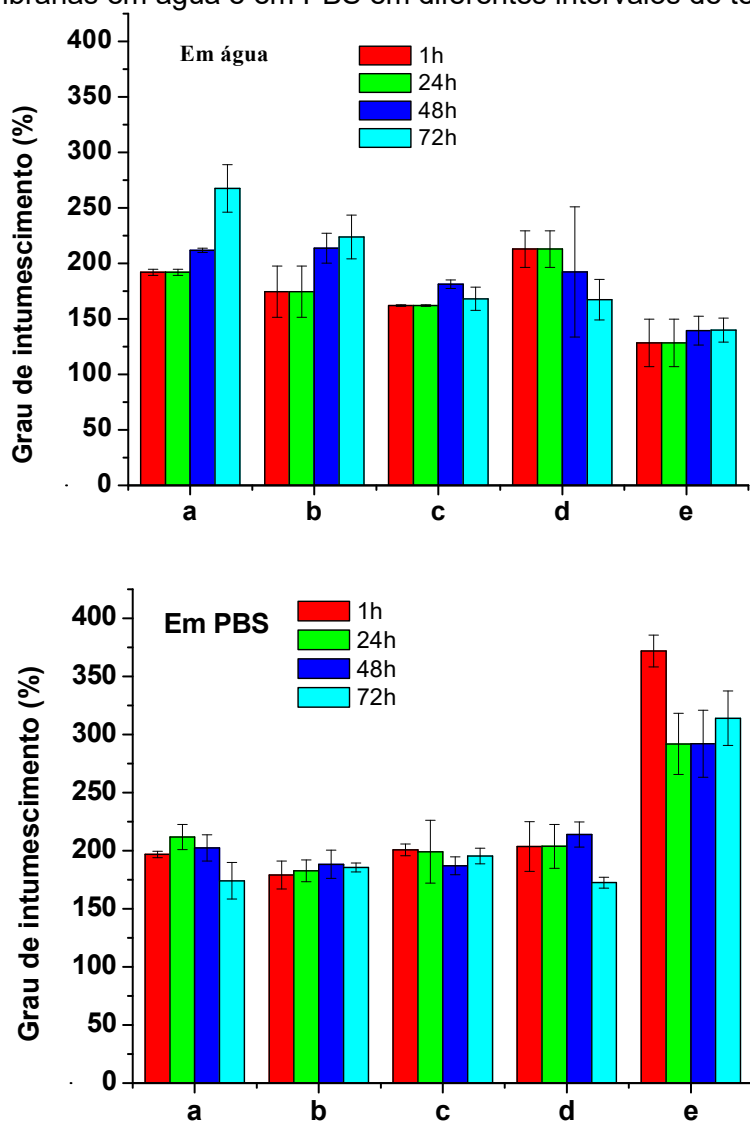


Figura 21: Gráficos do grau de intumescimento das membranas estudadas em água (acima) e em PBS (abaixo). (a) Membrana de quitosana CH; (b) Membrana CH/CIT; (c) Membrana CH/TPP; (d) Membrana CH/Add/APTES e (e) Membrana CH/APTES.

Observa-se que não há grandes variações do grau de intumescimento das membranas em meio aquoso, ou seja, as amostras apresentam altas taxas de intumescimento logo na primeira hora de contato, mantendo-se praticamente constante no período restante.

Utilizando o teste t de *student* foi verificado com 95% de confiança que não há diferenças significativas no grau de intumescimento das membranas em água entre os intervalos de tempos estudados. Já para o grau de intumescimento da membrana de quitosana em PBS, foram observadas diferenças significativas nos tempos de 24 h e 72 h. Assim, não foram observadas diferenças significativas no teste t de *student* para os graus de intumescimento das membranas utilizadas nos estudos cinéticos.

5.3. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR).

Foram obtidos espectros de absorção na região do infravermelho para todas as membranas utilizadas no estudo de sorção de proteína. A Figura 22 apresenta os espectros de infravermelho da membrana de quitosana (CH), da membrana de quitosana reticulada com citrato (CH/CIT) e da membrana de quitosana reticuladas com trifosfato (CH/TPP).

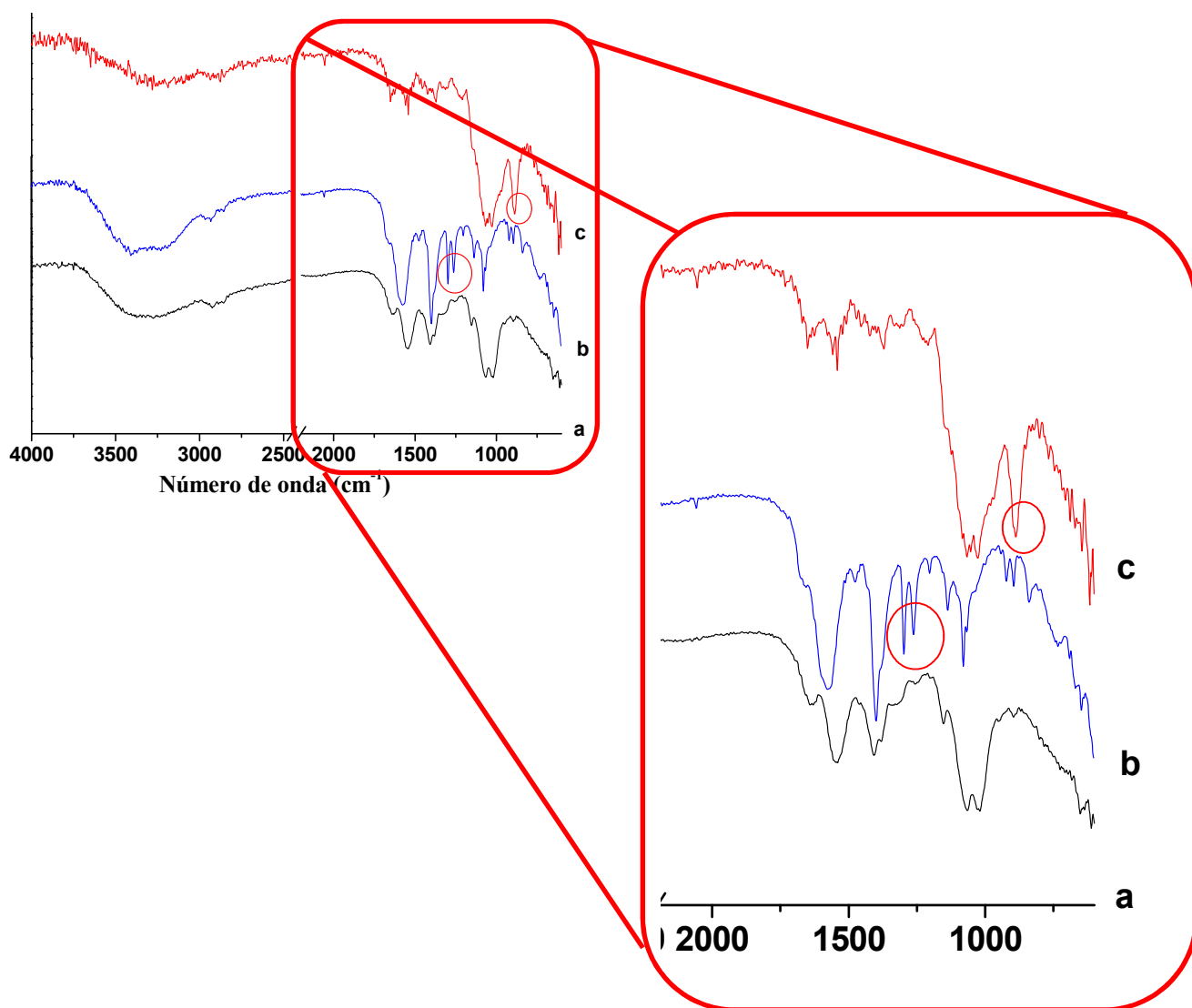


Figura 22: Espectros de absorção na região do infravermelho: (a) Membrana de quitosana (CH); (b) membrana reticulada com citrato (CH/CIT) e (c) membrana reticulada com tripolifosfato (CH/TPP).

Todos os espectros apresentaram bandas em torno de 3300 cm^{-1} e 2920 cm^{-1} , correspondentes às vibrações dos estiramentos dos grupos -OH e -CH , respectivamente, presentes na quitosana. No espectro de absorção da membrana CH/TPP destaca-se a presença do grupo P=O indicado pela banda pouco intensa da deformação axial em 1218 cm^{-1} , que confirma a provável interação ($\text{-NH}_3^+ \cdots \text{O} - \text{P}$) como ilustrado na Figura 04 [71]. Observou-se também banda referente as vibrações que correspondem às ligações $\text{P} - \text{OH}$ em 883 cm^{-1} , de forte intensidade, indicando a existência de prótons ácidos em excesso [75].

Quanto ao espectro de absorção da membrana CH/CIT são observadas duas bandas, em 1296 e 1261 cm^{-1} , que podem ser associadas aos estiramentos C-O de grupos carboxílicos, referentes aos grupamentos do citrato de sódio, sugerindo que a membrana foi reticulada pelo citrato [76]. As duas bandas entre 1650 e 1540 cm^{-1} são atribuídas ao íon carboxilato, principalmente oriundos da quitosana. Essas bandas podem ser observadas na membrana de quitosana CH e na membrana CH/CIT, porém as bandas na membrana reticulada estão deslocadas para maiores números de onda, o que pode indicar a presença de íons citrato ligados à membrana, como apresentado na Tabela 03.

Tabela 03: Atribuição das bandas do infravermelho das membranas estudadas.

Membrana	CH/CIT	CH/TPP	Atribuições
N° de onda (cm⁻¹)	N° de onda (cm⁻¹)	N° de onda (cm⁻¹)	
887 (f)	893	877	VC-O
1017	921		
1065	1057		
-	-	883 (F)	VP-O-H
1154	1137	-	VC-O-C
-	1261	-	VC-O
-	1296	-	
-	-	1218	VP=O
1403	1398	1369	VC-N
1543 e 1654	1583 e 1667	1542 e 1646	Amida II deformação angular (N-H) e C=O (estiramento amida I)
2918	2924	2872	C-H (deformação angular)
3300	3341	3267	O-H (deformação angular)

f – fraca; F – forte.

A Figura 23 apresenta os espectros de absorção na região do infravermelho da membrana de quitosana (CH), da membrana de quitosana imersa em solução de APTES (CH/APTES) e da membrana de quitosana modificada com APTES (CH/Add/APTES). A Tabela 04 apresenta as bandas observadas no infravermelho e suas atribuições.

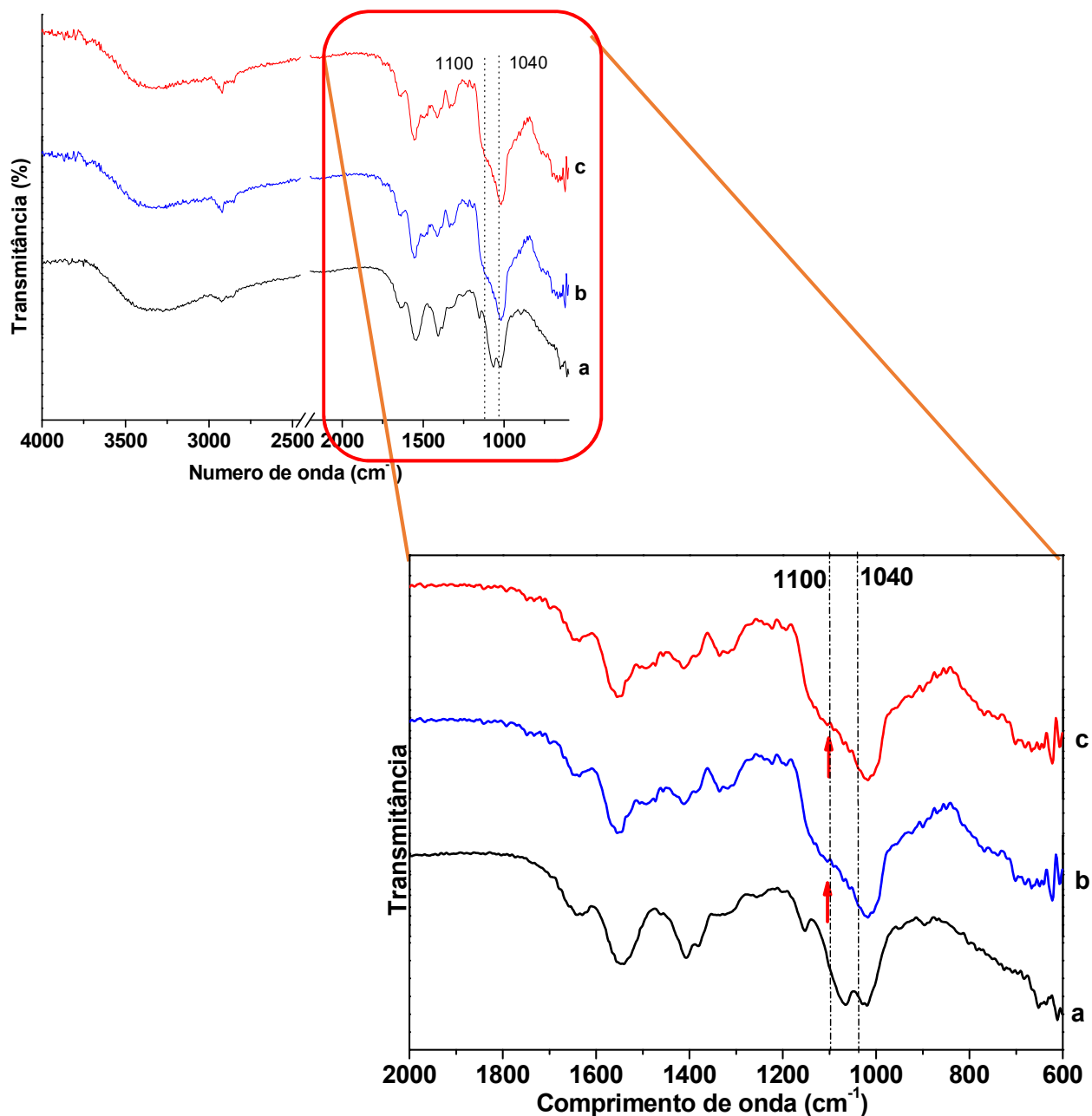


Figura 23: Espectros de absorção na região do infravermelho: (a) Membrana de quitosana (CH); (b) membrana imersa em APTES (CH/APTES) e (c) membrana modificada com APTES (CH/Add/APTES).

As bandas características da quitosana são observadas em 3300, 1634 e 1543 cm^{-1} , referentes às vibrações de estiramento do grupo -O-H, aos estiramentos relativos

aos grupamentos amida I (C=O) e às deformações angulares -N-H relativas à amida II, respectivamente [77].

A banda referente aos estiramentos Si-O-Si não pode ser facilmente associada, pois encontra-se sobreposta a banda referente às vibrações glicosídicas C-O-C da quitosana, na faixa entre 1100 e 1040 cm^{-1} [78,79]. Observam-se nos espectros das membranas com APTES (Figuras 22b e 22c) a formação de um ombro na região, o que pode confirmar esta sobreposição [46, 80]. Não foram observadas diferenças significativas entre os espectros de infravermelho das membranas CH/APTES e CH/Add/APTES.

Tabela 04: Atribuição das bandas do infravermelho das membranas estudadas.

Membrana	CH/APTES	CH/Add/APTES	Atribuições
Nº de onda	Nº de onda	Nº de onda (cm^{-1})	
887 (f)	-	-	VC-O
1017	1010	1013	
1065	-	-	
-	~1100	~1100	VS _i -O-Si, VC-C
1154	-	-	VC-O-C
1403	1408	1409	VC-N
1543	1552	1553	Amida II deformação angular (N-H)
1654	1645	1645	C=O (estiramento amida I)
2918	2919	2927	C-H (deformação angular)
3300	3339	3379	O-H (deformação angular)

Assim, o FTIR mostrou que as membranas de quitosana foram modificadas pela adição do organosilano (APTES) e reticuladas pelo citrato de sódio e o tripolifosfato de sódio.

5.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As morfologias das superfícies das membranas foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura, no intuito de verificar a influência da modificação do material nas características destas superfícies após as modificações químicas realizadas nos materiais. A depender da morfologia da superfície da membrana, é possível verificar diferentes mecanismos de sorção das proteínas no material.

As Figuras 24, 25 e 26 apresentam as micrografias da superfície das membranas de quitosana (CH), da membrana reticulada com citrato (CH/CIT), membrana reticulada com tripolifosfato (CH/TPP), membrana imersa em APTES (CH/APTES) e membrana reticulada com APTES (CH/Add/APTES).

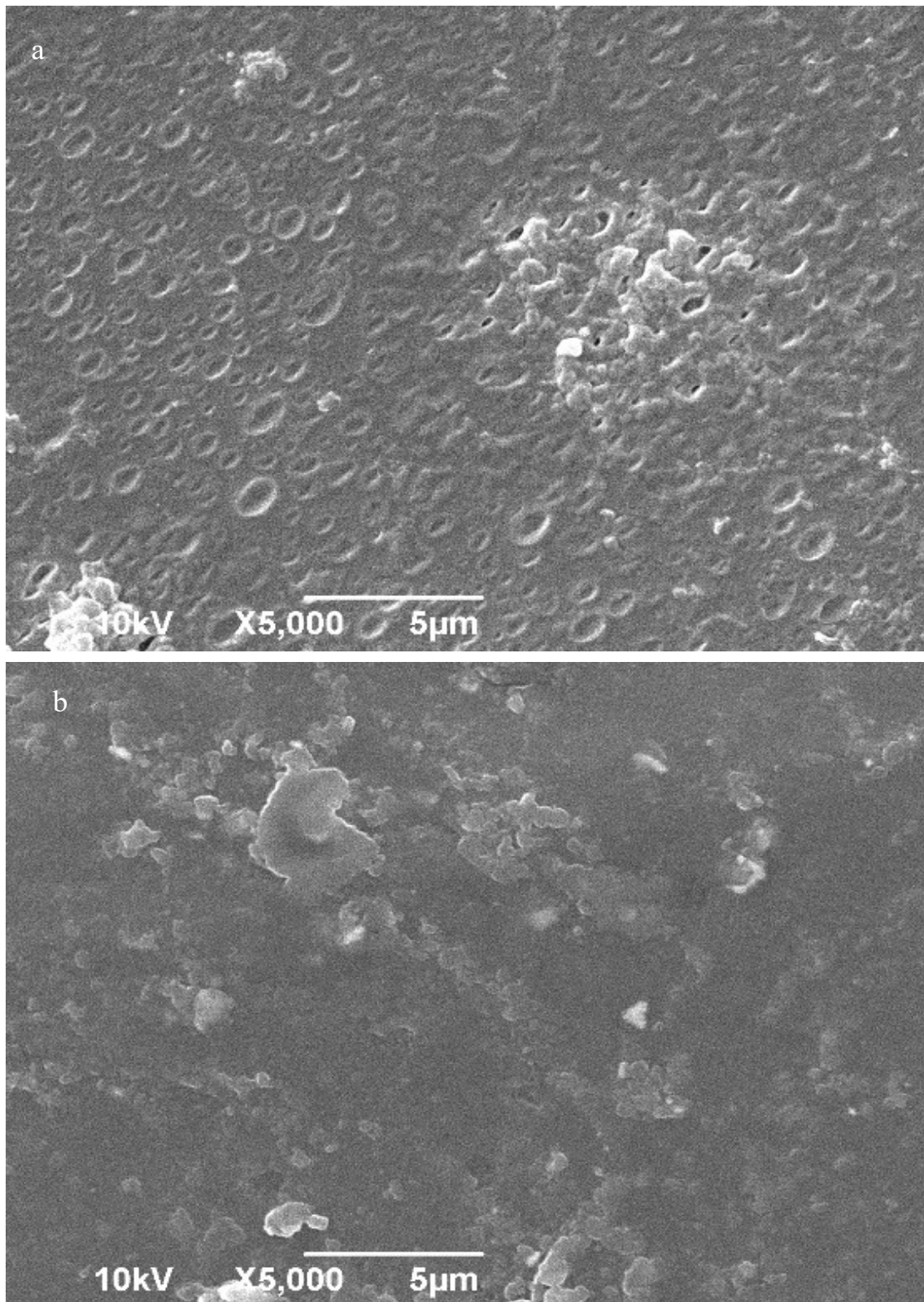


Figura 24: Micrografia das superfícies das membranas: (a) Membrana de quitosana CH e (b) Membrana CH/CIT.

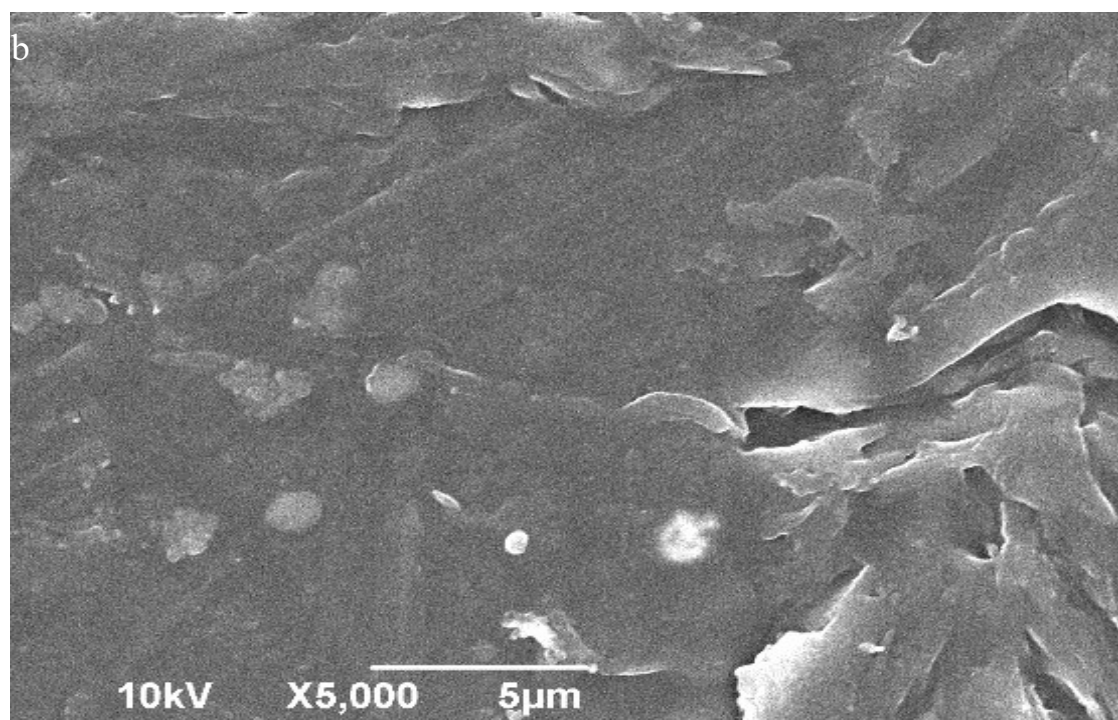
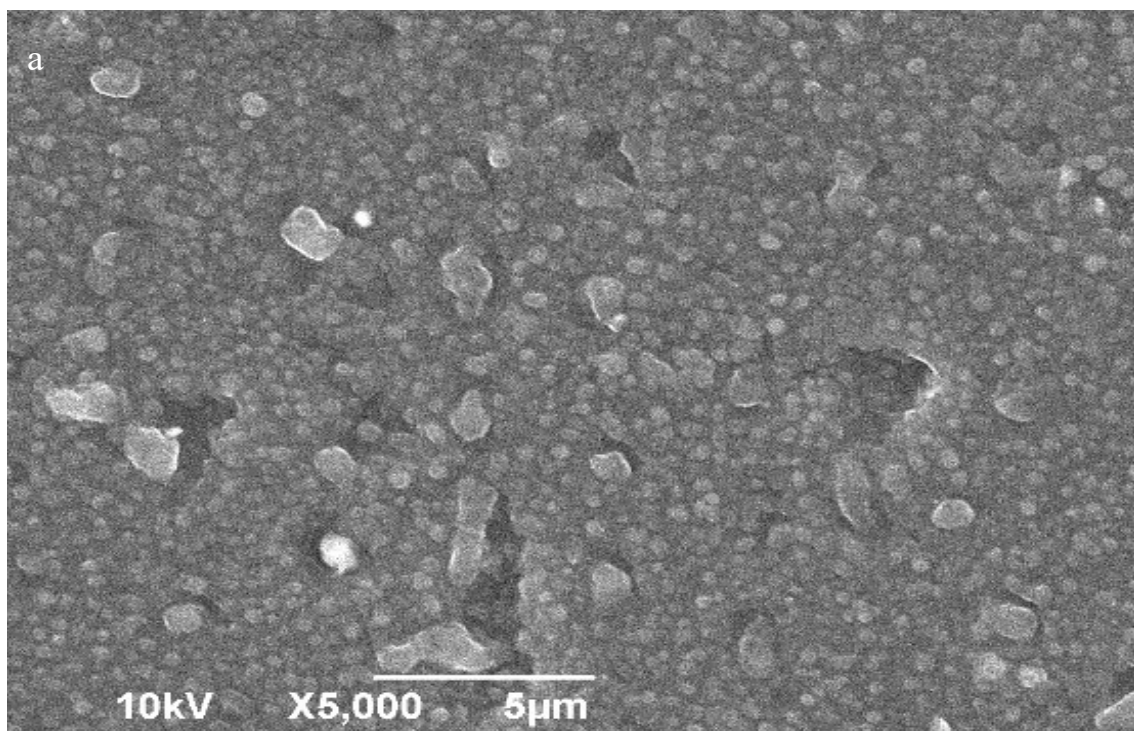


Figura 25: Micrografia das superfícies das membranas: (a) Membrana CH/TPP e (b) Membrana CH/APTES. Aumento de 5.000x para todas as membranas.

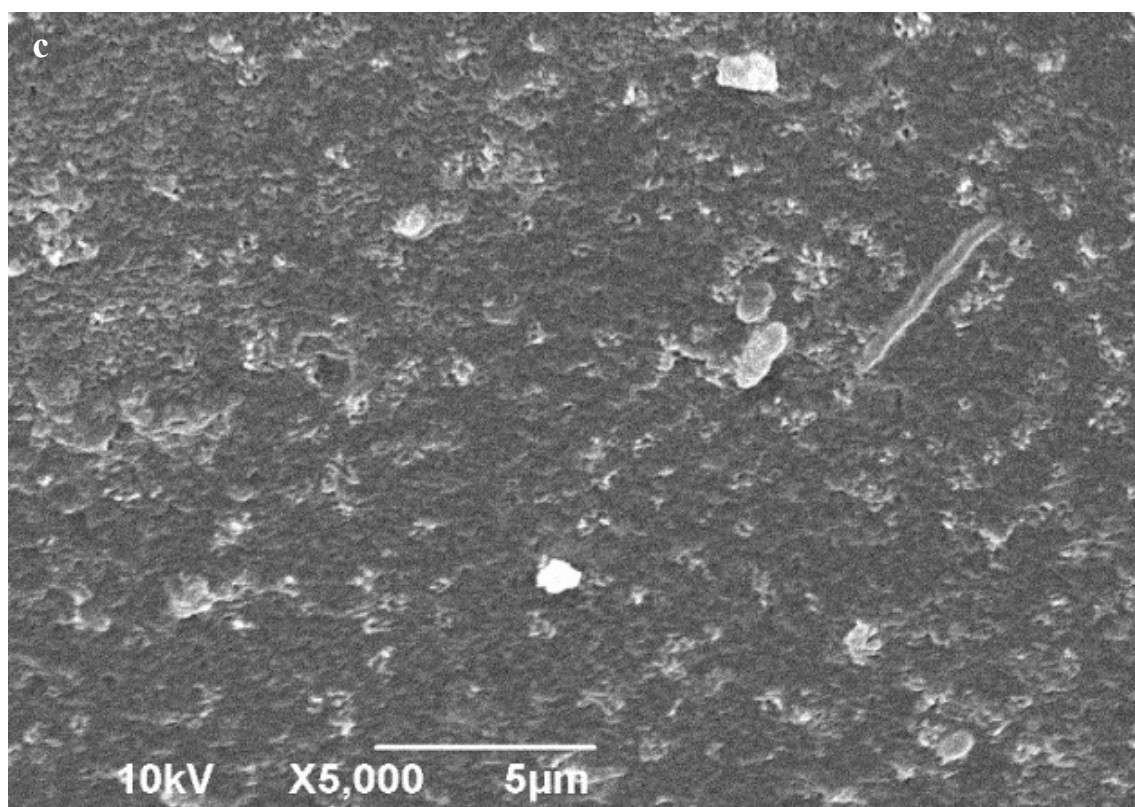


Figura 26: Micrografia das superfícies da membrana CH/Add/APTES. Aumento de 5.000x para todas as membranas.

As micrografias das superfícies das membranas de quitosana, mostradas na Figura 06, apresentam algumas diferenças entre as membranas de quitosana e as membranas modificadas. A membrana de quitosana tem a superfície um pouco irregular (Figura 24a). Quanto as membranas com a APTES, estas apresentaram algumas irregularidades. A membrana CH/APTES (Figura 24b) apresentou um aspecto menos irregular, sem a formação visível de poros, e a membrana CH/Add/APTES (Figura 24c) apresentou uma maior irregularidade. A presença do APTES na superfície pode ter contribuído para a formação de uma superfície com menos irregularidades e possivelmente não há separação de fases [46,77,81]. O contrário do que foi observado para as membranas CH/CIT (Figura 24a) e CH/TPP (Figura 25a), onde pode ser observado uma superfície com maior irregularidade.

As propriedades da superfície dos biomateriais e as propriedades das proteínas podem ter grande influência no processo de adsorção, pois podem determinar a organização da camada de proteína adsorvida e consequentemente determinar a resposta celular.

5.5 Difração de raios X

Foram realizadas a difração de raios X das amostras das membranas de quitosana para determinar a cristalinidade dessas membranas e para verificar se há aumento de cristalinidade com a modificação e reticulação da membrana com a utilização de citrato, tripolifosfato e organosilano (APTES). As Figuras 27 e 28 mostram os difratogramas das membranas de quitosana puras, membranas de quitosana CH/CIT, membranas de quitosana CH/TPP e membranas de quitosana/Add/APTES.

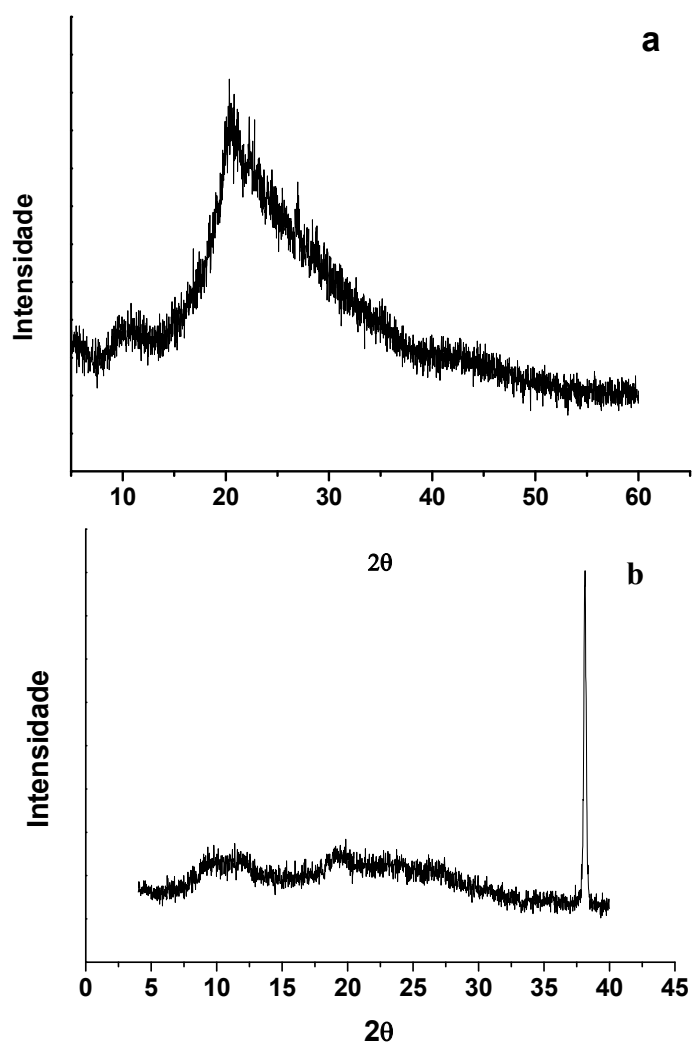


Figura 27: Padrões de difração de raios X: (a) Membrana de quitosana e (b) Membrana de quitosana/CIT.

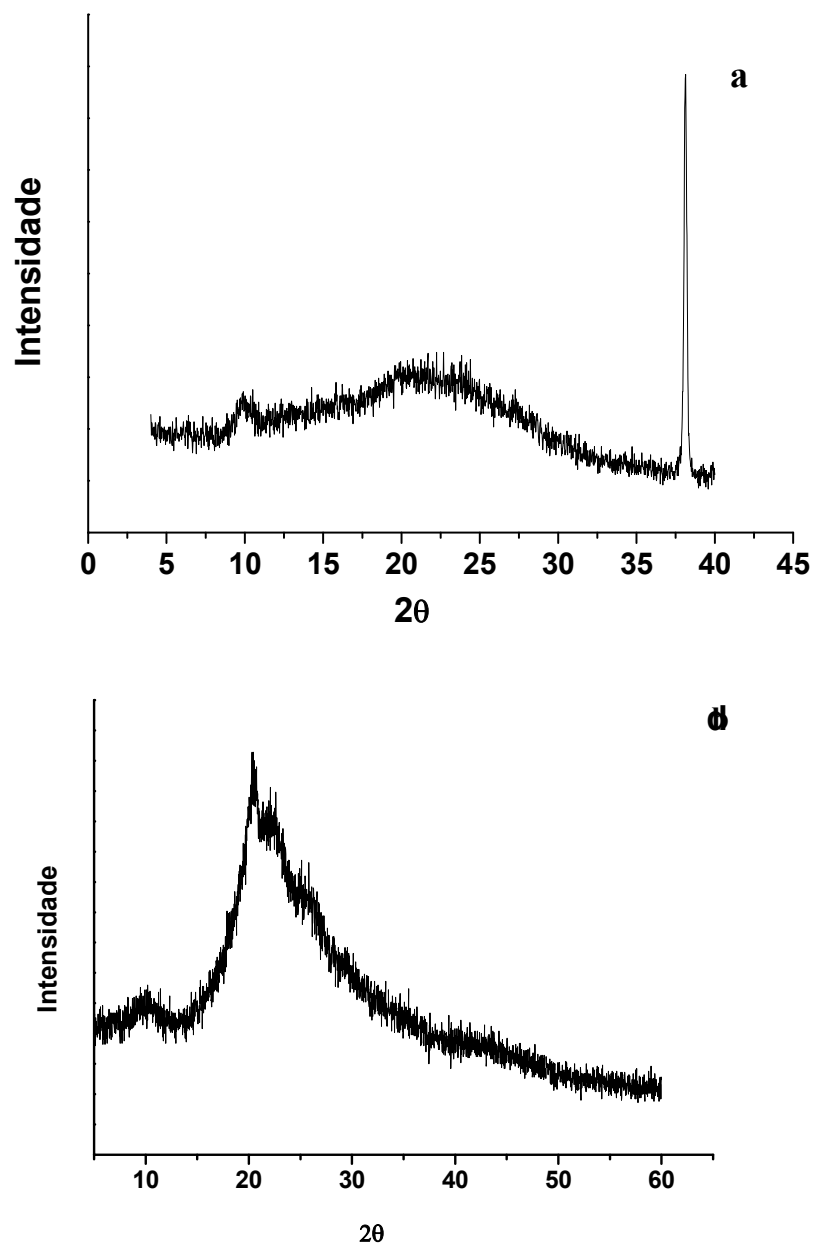


Figura 28: Padrões de difração de raios X: (a) Membrana de quitosana/TPP e (b) Membrana de quitosana/Add/APTES.

A partir da análise de difratometria de raios X podem ser determinados os índices de cristalinidade, ou graus de ordenamento, de polímeros. Existem na literatura metodologias específicas desenvolvidas para esse tipo de cálculo para serem aplicadas à celulose, quitina e quitosana [82].

Focher e colaboradores. [83] propuseram um método para determinar o índice de cristalinidade da quitosana. Este método consiste em medir a intensidade máxima em $2\theta=20^\circ$ referente ao plano (110) da quitosana e a intensidade relativa ao pico amorfo em $2\theta=10^\circ$. Em todos os difratogramas é observado um halo centrado em torno de $2\theta = 20^\circ$ que é associado a estrutura cristalina da quitosana [84]. O índice de cristalinidade (CrI, %) da quitosana pode ser calculado através da expressão abaixo:

$$CrI(\%) = \left(\frac{I_{110} - I_{am}}{I_{110}} \right) \times 100 \quad \text{Eq 10}$$

Onde:

I_{110} é a intensidade máxima em aproximadamente 20°

I_{am} é a intensidade do pico amorfo em aproximadamente 10° .

Na Tabela 05 são apresentados os índices de cristalinidade (CrI%) das membranas em estudo.

Tabela 05: Índices de cristalinidade das membranas de quitosana.

	I_{110}	I_{am}	CrI (%)
Membrana de quitosana	470	184	61,0
Membrana de quitosana (CH/CIT)	251	238	5,2
Membrana de quitosana (CH/TPP)	350	334	4,6
Membrana de quitosana (CH/Add/APTES)	643	257	60,0

Observa-se pouca diferença no índice de cristalinidade (CrI%) calculado para a membrana de quitosana (CH) quando esta foi modificada com APTES (CH/Add/APTES), sendo relatado na literatura que a reação sob condições homogêneas não destrói os domínios cristalinos da quitosana [85]. Isso difere do que Jing Ma e colaboradores [44] observaram quando introduziram TEOS à quitosana, onde observaram a ausência do pico em torno de 10° resultando em uma diminuição

da cristalinidade da membrana, sugerindo que as ligações de hidrogênio formadas pelas cadeias de quitosana foram rompidas pela reação com o organosilano. Os difratogramas da membrana de quitosana e da membrana CH/Add/APTES são similares, o que também é observado nos valores dos índices de cristalinidade, indicando que a adição de APTES na membrana não alterou a cristalinidade da membrana.

Os difratogramas para as membranas reticuladas com citrato (CH/CIT) e tripolifosfato (CH/TPP) apresentaram halos referentes à quitosana em 10° (amorfo) e 20° (cristalino), sendo possível calcular o índice de cristalinidade. Nestas membranas também foi observado um pico cristalino em um mesmo ângulo de difração (38°), ainda não foi possível identificar este pico.

Observou-se que o índice de cristalinidade (CrI%) diminuiu significativamente com a reticulação com citrato (CIT) e com tripolifosfato (TPP), o que resulta de um aumento da fração amorfa nessas membranas. Ritthidej e colaboradores estudaram filmes de citrato e malato de quitosana e não observaram pico acentuado dominante em seus difratogramas indicando que os filmes estavam em estado amorfo [86].

5.6 Análise térmica (TG)

A estabilidade térmica das membranas foi avaliada por análise térmica, realizada sob atmosfera de nitrogênio. As Figuras 29, 30 e 31 apresentam as curvas termogravimétricas (TG) e as curvas das derivadas (DTG) para as membranas em estudo.

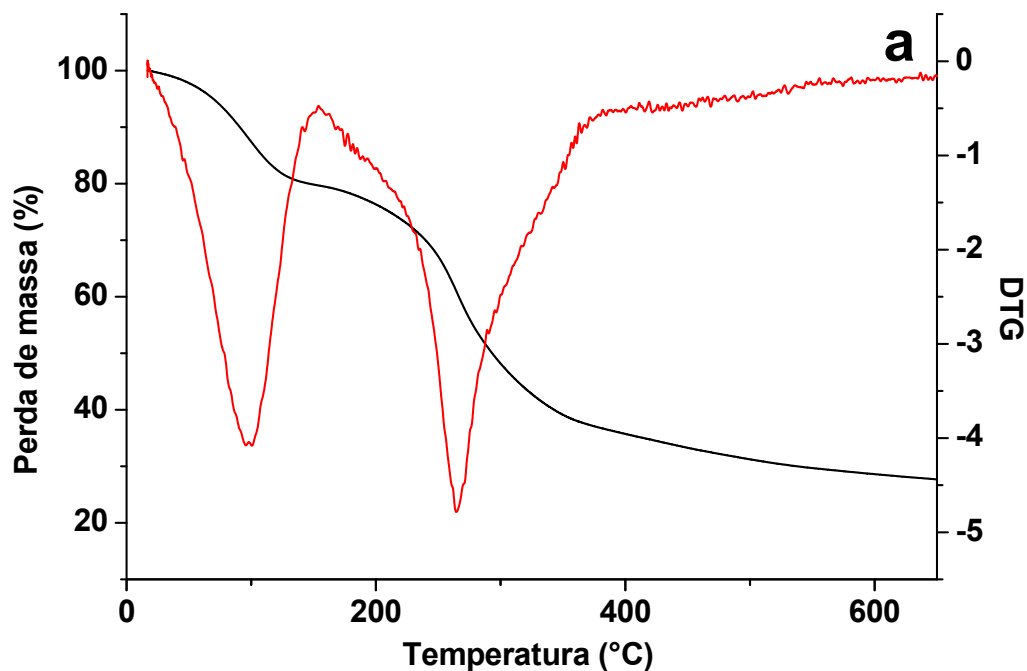


Figura 29: Curva termogravimétrica e respectiva curva DTG da membrana de quitosana.

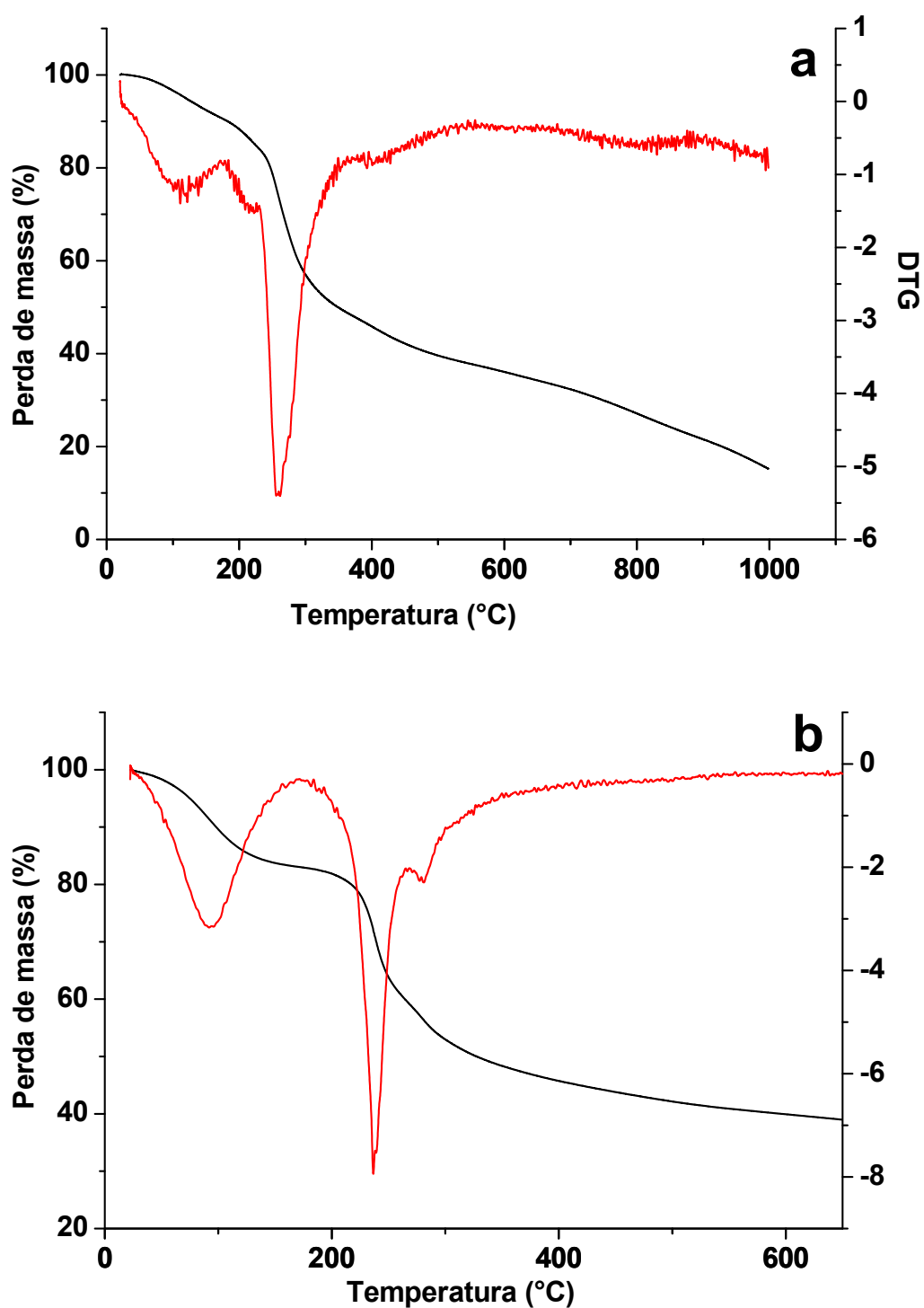


Figura 30: Curvas termogravimétricas e respectivas curvas DTG das membranas de quitosana: (a) Membrana de quitosana CH/CIT e (b) Membrana de quitosana CH/TPP.

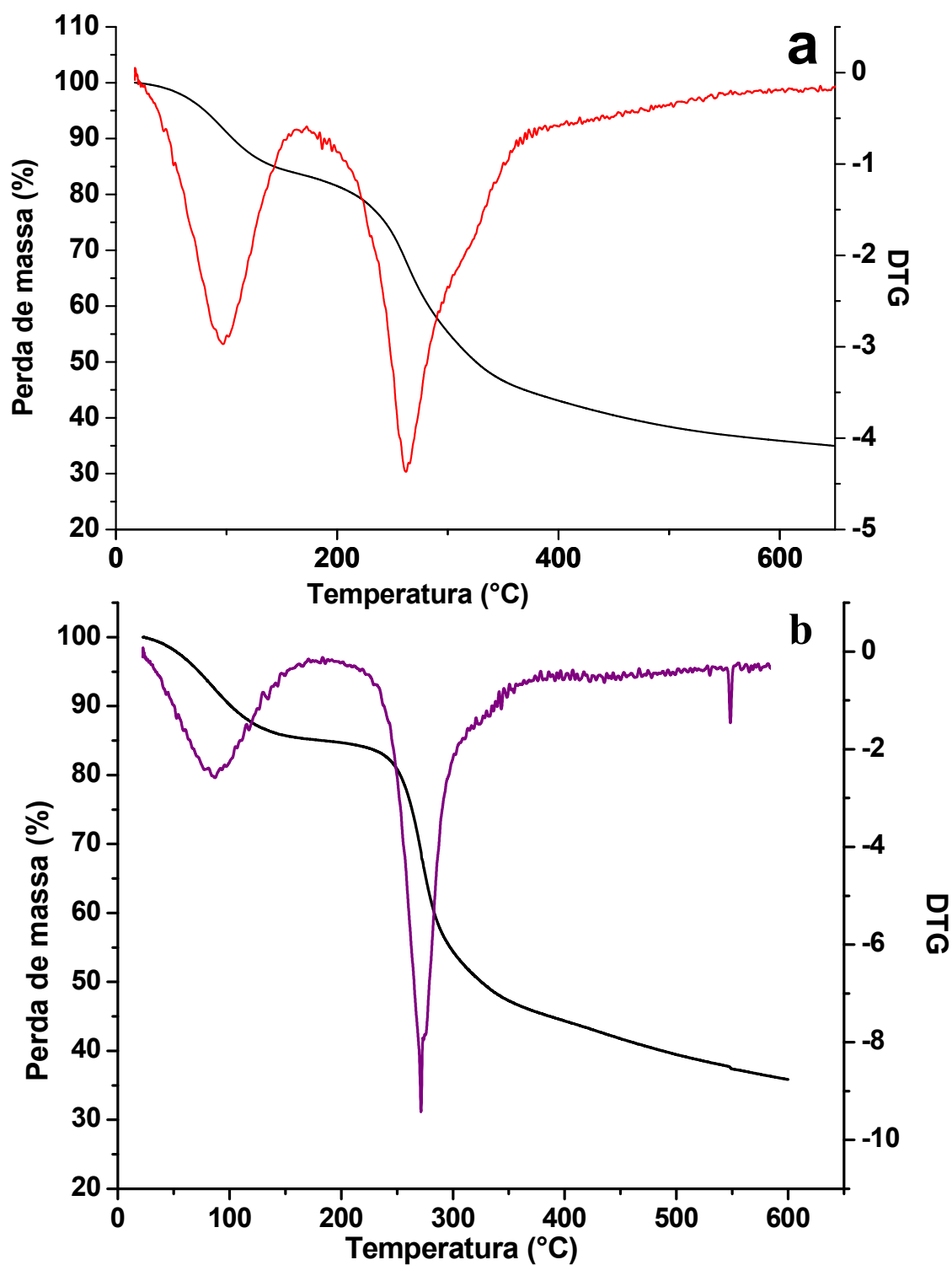


Figura 31: Curvas termogravimétricas e respectivas curvas DTG das membranas de quitosana: (a) Membrana de quitosana CH/APTES e (b) Membrana de quitosana CH/Add/APTES.

Observa-se que não há grandes diferenças entre as perdas de massas das membranas modificadas e não modificadas. Um primeiro evento de perda de massa foi observado nos termogramas das membranas (Figuras 29, 30 e 31), onde a temperatura inicial dessa perda foi entre 25 e 30°C e a final em 154°C para a membrana de quitosana, e em temperaturas mais elevadas para as membranas de quitosana modificadas. Para as membranas de quitosana modificadas, as temperaturas da perda de massa no primeiro evento, foram 175°C, 171°C, 179°C e 169°C para as membranas CH/CIT, CH/TPP, CH/APTES e CH/Add/APTES, respectivamente. Essa faixa de temperatura da primeira perda de massa pode ser atribuída à perda de água da superfície, entre 10 e 20%, pois a quitosana possui grupos hidroxilas e aminas primárias que conferem a quitosana um comportamento hidrofílico.

Para a membrana de quitosana (Figura 29) a segunda perda de massa que se inicia em 155°C pode estar associada à despolimerização da quitosana, [20, 23]. Após 390°C toda a quitosana foi decomposta, deixando uma massa residual de aproximadamente 30%.

Já a segunda perda de massa foi associada a despolimerização e decomposição. Para as membranas CH/CIT e CH/TPP (Figura 30), a decomposição iniciou-se em 175°C e 168°C, respectivamente. Estas temperaturas são superiores a temperatura de decomposição da membrana de quitosana indicando uma maior estabilidade térmica nas membranas reticuladas [73]. O aumento da estabilidade térmica nas membranas CH/TPP e CH/CIT pode estar associado ao aumento das ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas, o que contribui para o aumento da temperatura de degradação.

A primeira perda de massa da membrana CH/Add/APTES (Figura 31b) está entre 35°C e 152°C, é relativa à perda de água de superfície e de desidratação, já que geralmente a quitosana possui estrutura hidrofílica devido à presença em sua estrutura

de grupos hidroxila e aminas primárias [87, 88], sendo que a completa remoção da água torna-se difícil [89]. Além disso, há também a perda de água oriunda das reações de condensação dos grupos Si – O, para as membranas com a adição do APTES [90, 91].

Além disso, observa-se que a degradação térmica desse material se iniciou em 171°C, enquanto na membrana de quitosana iniciou-se em 155°C, sugerindo que a membrana CH/Add/APTES tem uma maior estabilidade térmica, e o mesmo foi observado por Liu e colaboradores [46]. A membrana CH/APTES (Figura 31a) iniciou a degradação em 179°C, temperatura muito próxima a membrana CH/Add/APTES, assim não foram observadas diferenças significativas entre essas duas membranas.

5.7. Calorimetria Exploratória Diferencial

A Figura 32 apresenta as curvas de DSC da membrana de quitosana (CH), da membrana de quitosana modificada em APTES (CH/APTES) e da membrana de quitosana modificada com APTES (CH/Add/APTES).

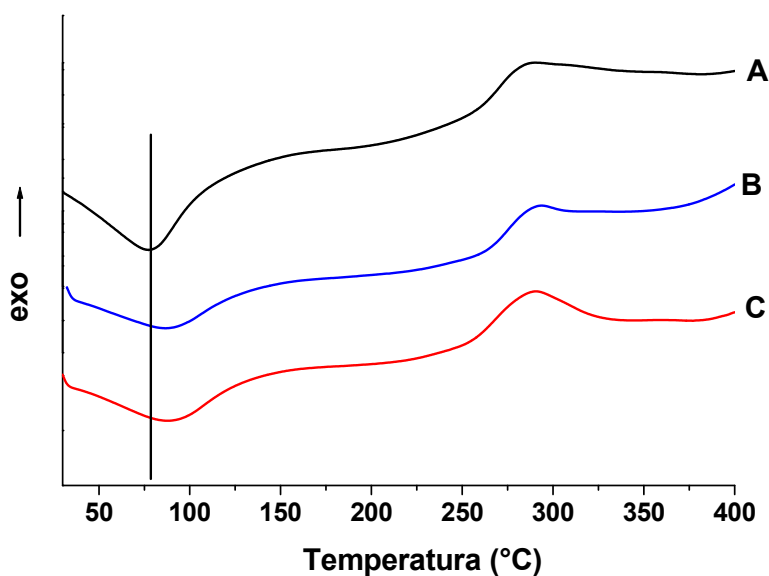


Figura 32: DSC: a) Membrana de quitosana (CH); b) Membrana de quitosana imersa em APTES (CH/APTES) e c) Membrana de quitosana modificada com APTES (CH/Add/APTES).

Para todas as membranas observa-se dois picos largos. O primeiro é endotérmico entre 40°C e 150°C, que corresponde a perda de água de hidratação. Observa-se uma diferença na posição do pico endotérmico referente à evaporação da água entre a membrana de quitosana e as membranas CH/Add/APTES e CH/APTES, podendo indicar que houve uma modificação na estrutura da quitosana com a adição do APTES, modificando as interações entre a quitosana e a água. Segundo Kittur e colaboradores, essa diferença na posição do pico endotérmico indica que a adição do APTES causa uma diferença na capacidade de retenção de água e na força da interação água-membrana. No caso das membranas de quitosana com a presença de APTES, o pico endotérmico foi deslocado para temperaturas mais altas, indicando que a interação da água com essas membranas é mais forte do que com a membrana de quitosana sem a presença do APTES [92, 93]. Assim, modificações nas estruturas dos polissacarídeos podem ser refletidos no pico endotérmico referente a evaporação da água. Desta forma, a modificação aumentou a capacidade de retenção da água indicando que a interação da água é mais forte nas membranas com APTES.

O segundo pico se inicia em torno de 260°C até 330°C está presente nas três curvas e pode ser associado à degradação da cadeia principal da quitosana. Não foi possível identificar as temperaturas de transição vítrea (T_g) dos materiais, provavelmente pelo encobrimento dos picos de T_g pela presença de água nas amostras, mesmo após secagem dos materiais em estufa. Alguns autores já determinaram a T_g da quitosana, porém os valores não são concordantes entre eles. Um dos motivos dessa variação se deve pela quitosana ser um polissacarídeo natural e suas propriedades como cristalinidade, massa molecular, grau de desacetilação podem alterar a temperatura de transição vítrea [93].

A Figura 33 apresenta as curvas de DSC da membrana de quitosana (CH), da membrana de quitosana reticulada com citrato (CH/CIT) e da membrana de quitosana reticulada com tripolifosfato (CH/TPP).

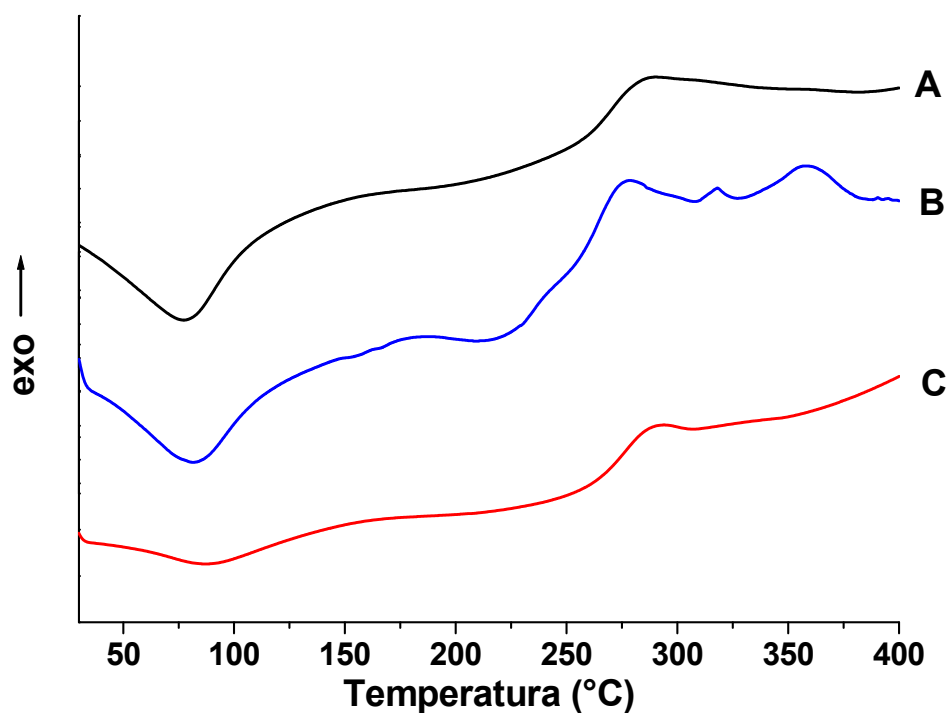


Figura 33: DSC: a) Membrana de quitosana (CH); b) Membrana de quitosana reticulada com citrato (CH/CIT) e c) Membrana de quitosana reticulada com tripolifosfato (CH/TPP).

Observa-se o primeiro pico endotérmico referente a evaporação da água. Do mesmo modo que na Figura 32, houve um deslocamento da temperatura inicial e final do pico. Assim, provavelmente houve uma mudança na estrutura da membrana reticuladas aumentando a interação desse material com a água. Observa-se que as curvas de DSC da membrana CH/CIT tem um segundo pico endotérmico em torno de 215°C que pode ser atribuído à diminuição das ligações de hidrogênio e a reorganização molecular devido as ligações cruzadas, de acordo com Salam e

colaboradores [94]. Os picos exotérmicos são referentes a degradação das cadeias da quitosana.

5.8. Estudos de sorção da proteína albumina do soro bovino (BSA) nas membranas de quitosana.

Neste etapa serão apresentados os resultados dos estudos de sorção da proteína albumina do soro bovino (BSA) nas membranas de quitosana reticuladas com citrato (CH/CIT), nas membranas reticuladas com tripolifosfato (CH/TPP) e nas membranas modificadas com APTES (CH/Add/APTES).

5.8.1 Estudo do efeito do potencial hidrogeniônico (pH)

A fim de avaliar a sorção da proteína albumina do soro bovino (BSA) nas membranas de quitosana CH/CIT, CH/Add/APTES e CH/TPP em diferentes potenciais hidrogeniônicos (pH), variou-se os pH's das soluções em 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0. Inicialmente, esta faixa de pH foi definida de acordo com o intervalo de pH em que a proteína BSA não sofre desnaturação [95]. Notou-se, porém, que para as isotermas utilizando o pH 4,0, houve o turvamento da solução sobrenadante, impossibilitando a leitura da absorbância e consequentemente a determinação da concentração da solução de BSA por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis.

Para a membrana CH/TPP observou-se que houve uma maior sorção nos ensaios utilizando-se as soluções com pH's 7,0 e 8,0, como mostrado na Figura 34.

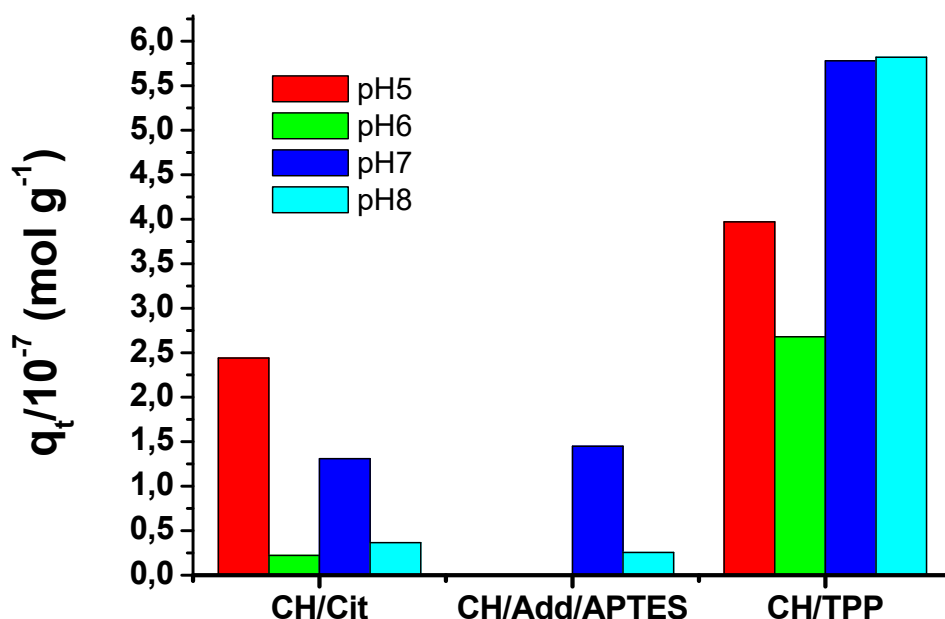


Figura 34: Gráfico da quantidade adsorvida de albumina do soro bovino (BSA) sobre as membranas de quitosana: CH/CIT, CH/Add/APTES e CH/TPP, a 30 °C.

O processo de interação de proteínas em superfícies sólidas é um fenômeno complexo e diversos fatores influenciam, tais como interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio, nas quais as interações eletrostáticas podem ser as interações dominantes nesse tipo de processo [96]. A constante de dissociação ácida da quitosana (pK_a) está entre 6,2 e 6,8, sendo que em pH 6,5 cerca de 50 % dos grupos de aminas primárias ($-NH_2$) estão carregados positivamente, formando grupos de aminas primárias protonados ($-NH_3^+$) [25, 32].

O mesmo raciocínio pode ser utilizado para a BSA, onde a sua carga negativa aumenta com o aumento do potencial hidrogeniônico (pH) devido à dissociação dos grupos carboxil, uma vez que ponto isoelétrico da albumina está entre 4,7 e 4,9. Assim, a interação da proteína na quitosana depende da distribuição das cargas,

positivas formadas na estrutura da quitosana e negativas presentes na cadeia da albumina [32].

Observa-se que no caso da sorção da BSA na maioria das membranas de quitosana estudadas, que o máximo de sorção ocorreu em pH 7,0, onde há grande quantidade de cargas negativas na albumina, o que favorece a sorção, e também cerca de 50% de grupos de aminas primárias protonadas ($-\text{NH}_3^+$) na quitosana. Somente para a membrana CH/CIT observou-se uma maior quantidade sorvida pH 5,0, porém a diferença entre as quantidades sorvidas em pH 7,0 e 5,0, neste caso, não foi muito elevada. Nos pH's 5,0 e 6,0 para a membrana CH/Add/APTES não foram observados adsorções da proteína.

5.8.2. Estudo da sorção da proteína albumina do soro bovino (BSA) e modelos cinéticos

O estudo da cinética da sorção da albumina do soro bovino (BSA) foi realizado com as membranas de quitosana reticuladas com citrato (CH/CIT), com as membranas de quitosana reticuladas com tripolifosfato (CH/TPP) e com as membranas de quitosana modificadas com APTES (CH/Add/APTES), em diferentes temperaturas, 25, 30 e 37°C.

A cinética de sorção foi realizada, inicialmente, com o objetivo de determinar o tempo necessário para atingir o equilíbrio durante o processo de sorção da proteína (BSA) sobre as membranas de quitosana, em diferentes temperaturas.

A determinação da concentração da proteína albumina do soro bovino (BSA) foi realizada utilizando o método de biureto. Existem alguns métodos de determinação da albumina, entre eles estão a determinação por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e na região do visível. A literatura relata a quantificação da albumina na região do ultravioleta, porém apresenta também a utilização de agentes

cromóforos que reagem com a proteína, gerando um produto que absorve na região do visível [24, 97, 98].

Dentre alguns dos métodos descritos na literatura para determinação de proteínas, o método de biureto pode ser utilizado para quantificar a albumina após estudos de sorção. Este método é baseado na reação do cobre em meio alcalino, que reage com a proteína formando um complexo [99, 100]. Este complexo apresenta duas bandas de absorção, em 280 e em 550 nm. Assim, as medidas foram realizadas em 550 nm, na região do visível, visando eliminar qualquer interferência que possa ocorrer na região do ultravioleta [101].

Para as determinações quantitativas foi construída uma curva analítica para quantificação da proteína (BSA) em solução tampão. Na construção da curva analítica foram utilizadas 7 (sete) soluções de concentrações entre 100 a 1000 mg L⁻¹, onde é observada a obediência à Lei de Lambert-Beer para as medidas na região do visível, com coeficiente de correlação de 0,999.

As Figuras 35 e 36 apresentam as isotermas para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) em membranas de quitosana reticuladas com citrato de sódio (CH/CIT), a 25°C, 30°C e 37°C, em função do tempo de contato.

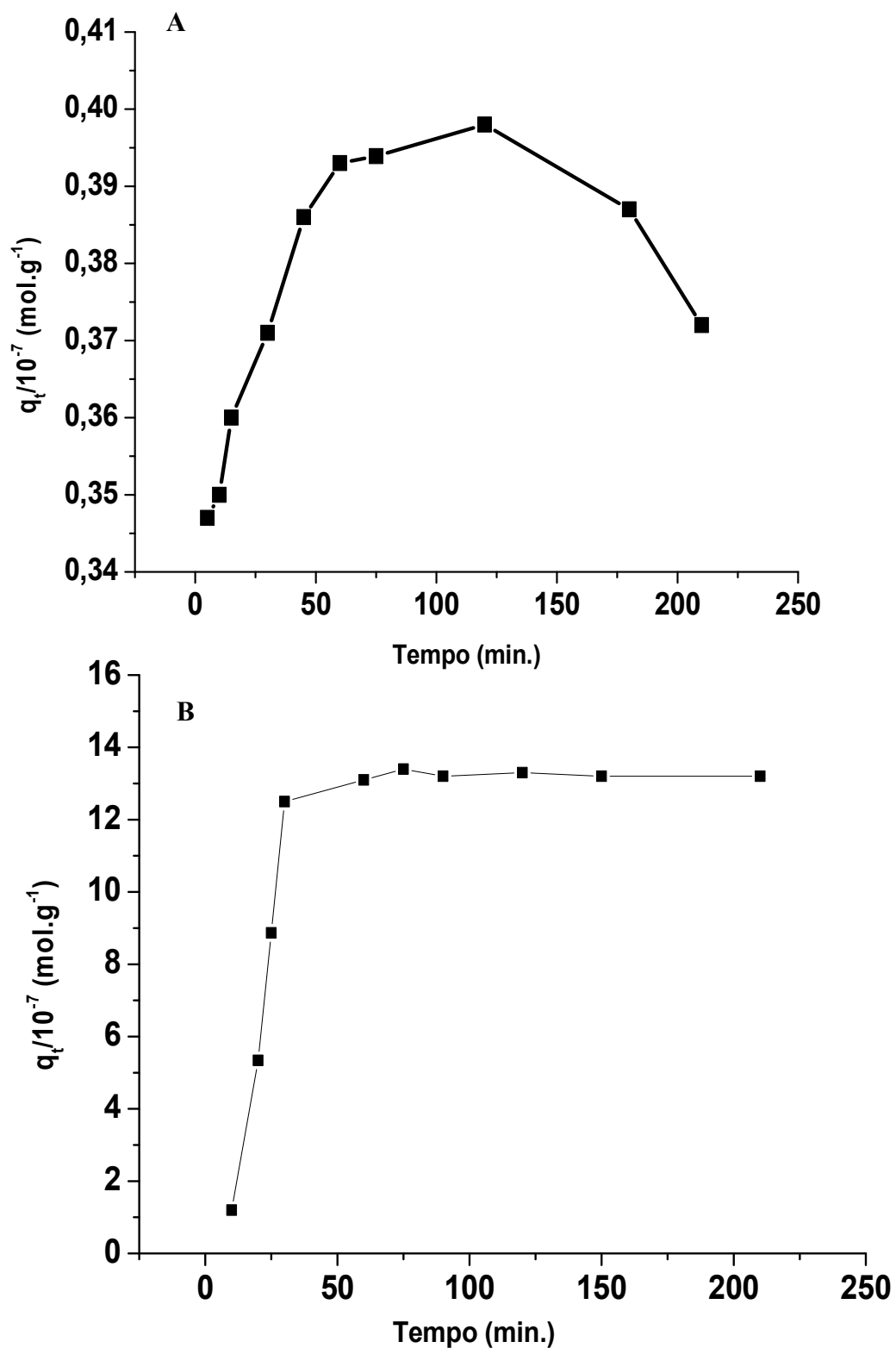


Figura 35: Isotermas de sorção da albumina do soro bovino (BSA) sobre as membranas de quitosana reticuladas com citrato de sódio (CH/CIT): (A) 25°C e (B) 30°C

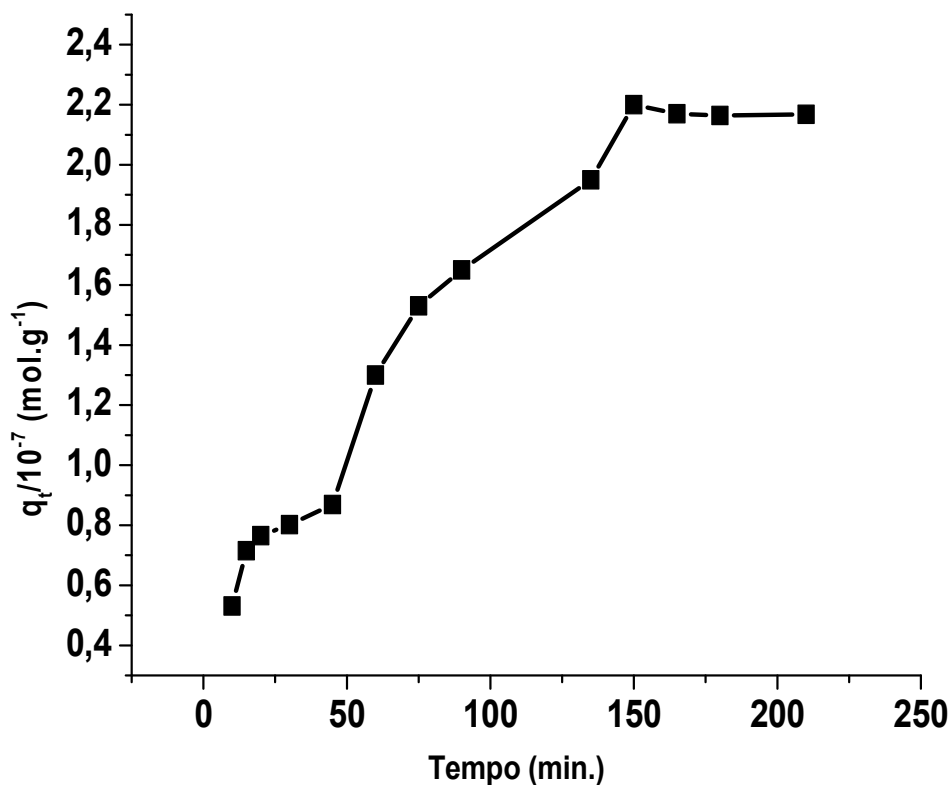


Figura 36: Isotermas de sorção da albumina do soro bovino (BSA) sobre as membranas de quitosana reticuladas com citrato de sódio (CH/CIT), 37°C.

Foi observado que o comportamento de sorção da albumina nas membranas de quitosana imersas em citrato (CH/CIT) é diferenciado quando altera-se a temperatura. A temperatura de 25°C observa-se que a sorção aumenta até 120 minutos e logo depois observa-se a dessorção da albumina. Já nas temperaturas mais altas como em 30°C e 37°C não foram observadas a dessorção, porém observa-se a formação de um patamar, onde ocorreu um equilíbrio no processo de sorção. Para a temperatura de 30°C observa-se uma sorção rápida até 30 minutos, após este tempo a sorção atinge o equilíbrio. A 37°C esse equilíbrio somente foi atingido apenas aos 150 minutos. O aumento da temperatura da isoterma para as membranas CH/CIT, causou um aumento do tempo para o equilíbrio ser atingido nas temperaturas de

30°C e 37°C, além de não ter sido observada a dessorção nestas temperaturas, diferentemente do comportamento a 25°C.

As Figuras 37 e 38 apresentam as isotermas para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) em membranas de quitosana reticuladas com tripolifosfato (CH/TPP), a 25°C, 30°C e 37°C.

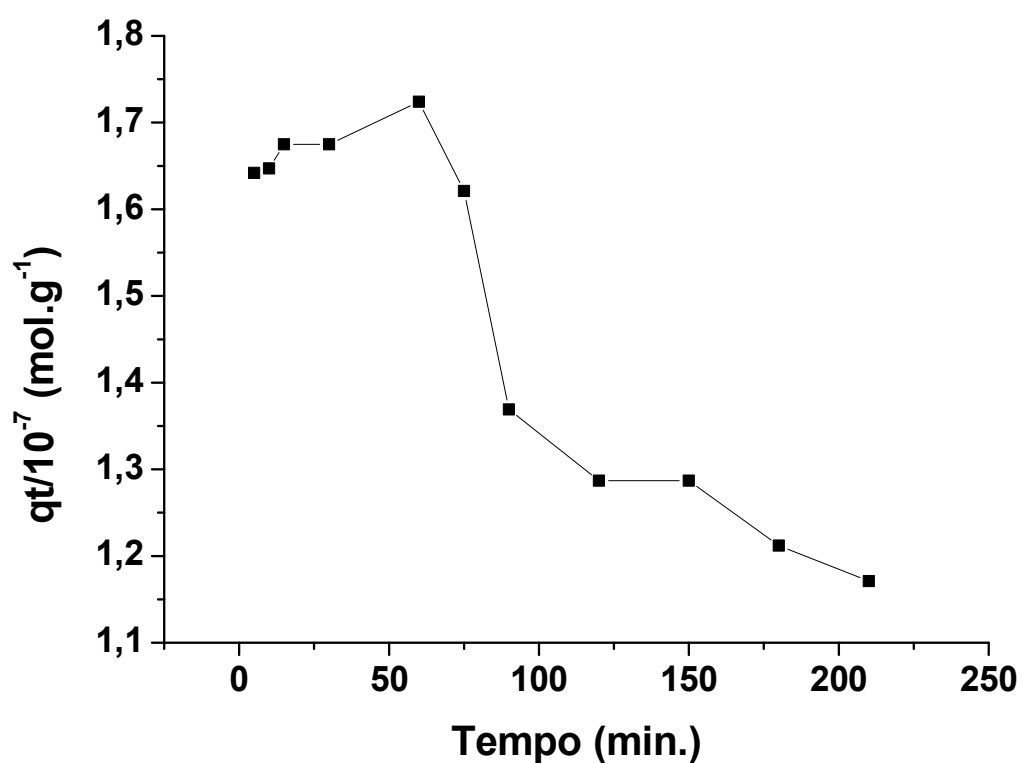


Figura 37: Isotermas de sorção da albumina do soro bovino (BSA) sobre as membranas de quitosana reticuladas com tripolifosfato (CH/TPP), 25°C.

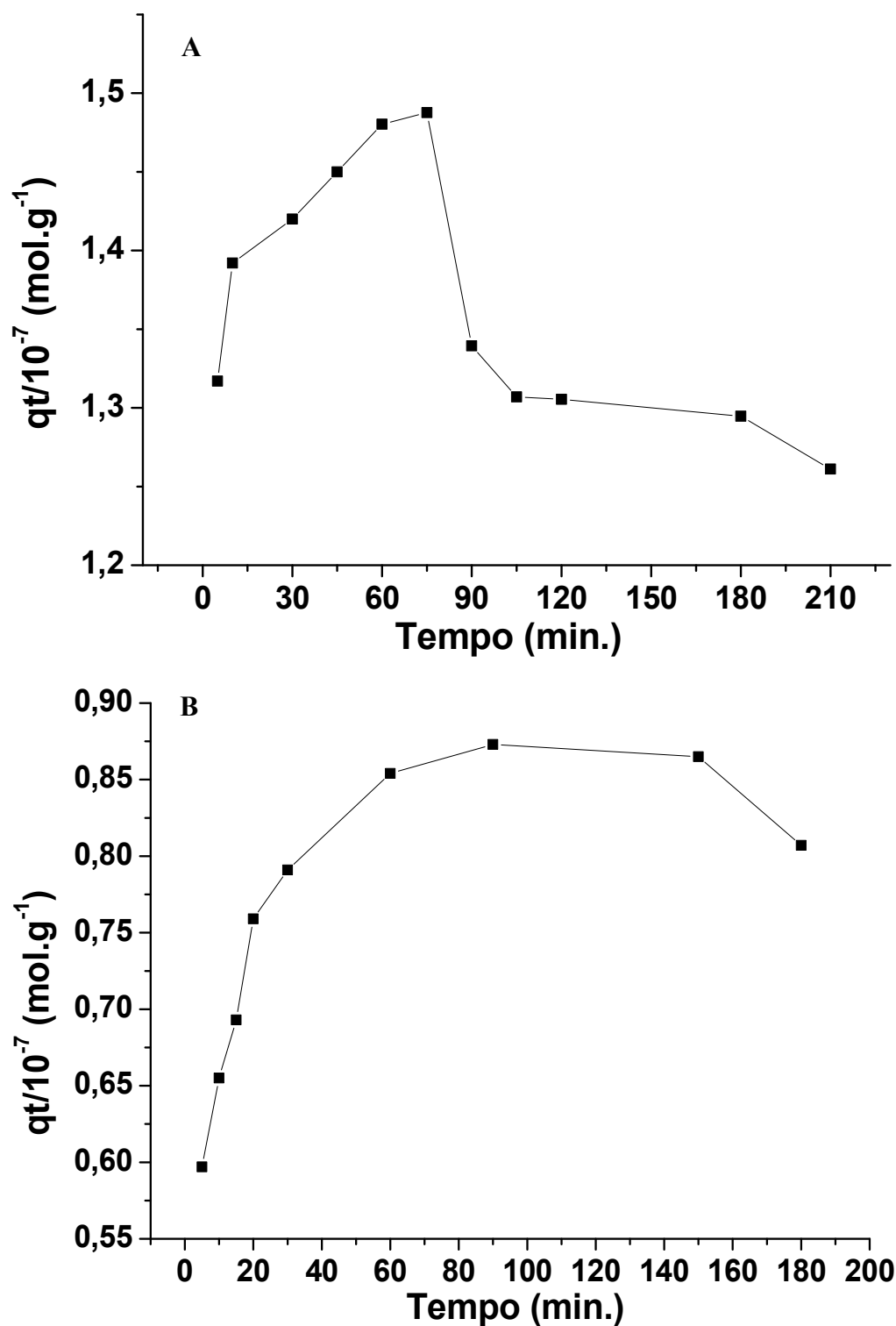


Figura 38: Isotermas de sorção da albumina do soro bovino (BSA) sobre as membranas de quitosana reticuladas com tripolifosfato (CH/TPP): (A) 30°C e (B) 37°C.

Para a membrana de CH/TPP a 25°C, foi observado um aumento da quantidade adsorvida da BSA até aproximadamente 60 min. A dessorção da albumina ocorreu após um certo tempo, a 25°C e 30°C, onde foram observados um máximo de sorção em 60 minutos e 75 minutos, respectivamente, e após este tempo observa-se uma acentuada dessorção da albumina. A 30°C a temperatura máxima de sorção ocorre a 75 minutos, e da mesma forma do que acontece a 25°C, observa-se uma dessorção acentuada após este tempo. Contudo, a 37°C observou-se um máximo de sorção apenas em 90 min, e uma dessorção não muito acentuada após este tempo.

As Figuras 39 e 40 apresentam as isotermas para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) em membranas de quitosana modificadas com APTES (CH/Add/APTES), a 25°C, 30°C e 37°C.

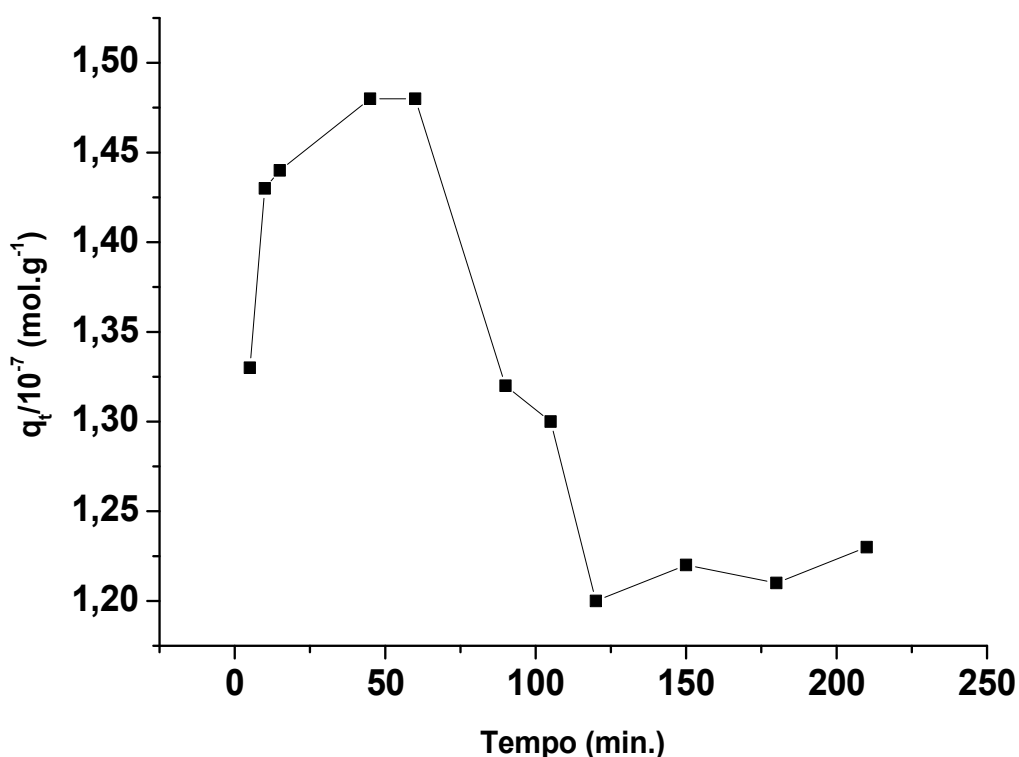


Figura 39: Isoterma de sorção da albumina do soro bovino (BSA) sobre as membranas de quitosana modificada com APTES (CH/Add/APTES), 25 °C.

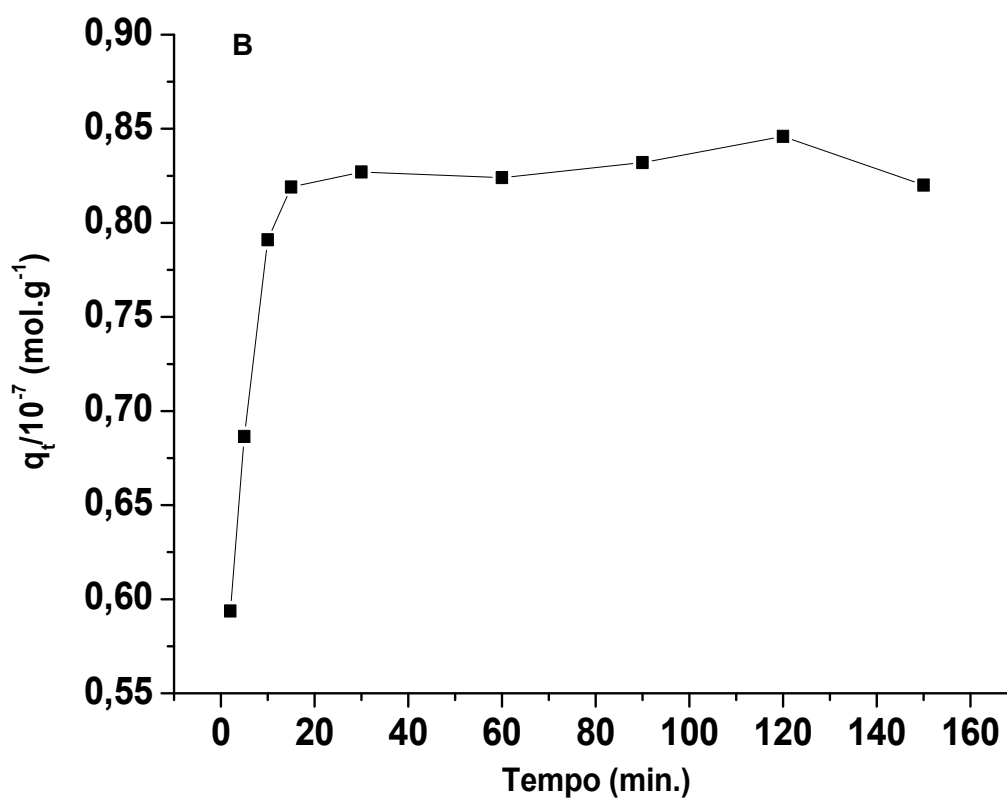
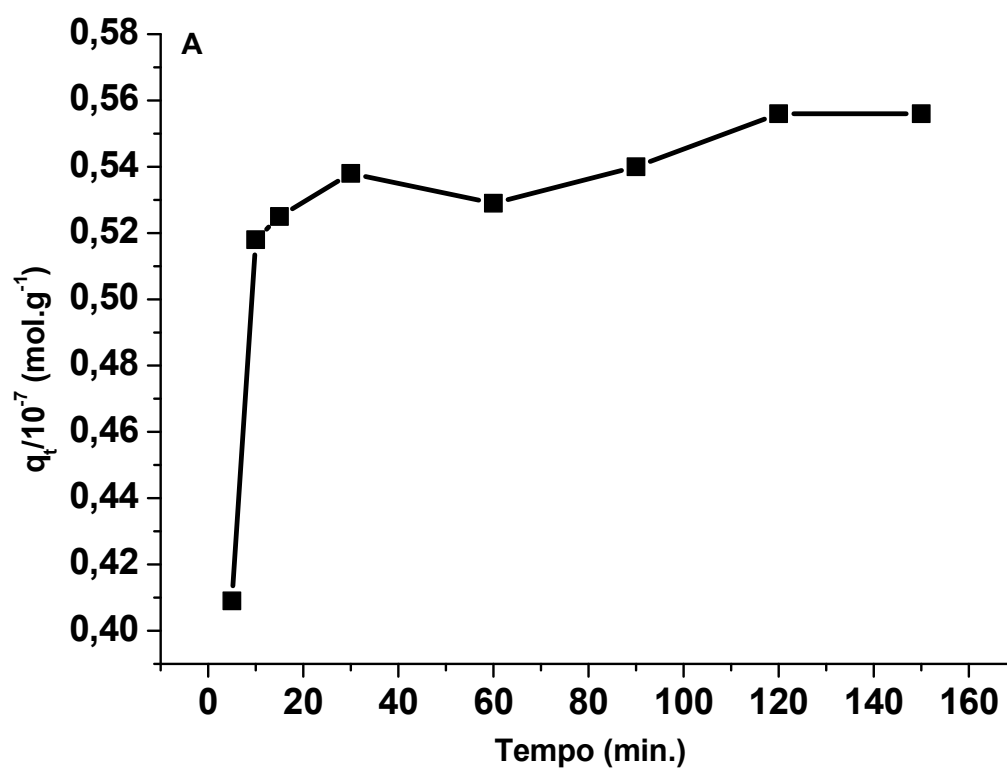


Figura 40: Isotermas de sorção da albumina do soro bovino (BSA) sobre as membranas de quitosana modificada com APTES (CH/Add/APTES): (A) 30°C e (B) 37°C.

Foi observado um aumento da quantidade adsorvida da proteína (BSA) até aproximadamente 60 min para as membranas CH/Add/APTES, a 25°C. A partir deste tempo, observou-se uma dessorção. Nas demais temperaturas não foi observada a dessorção da proteína. Na literatura não se encontrou relatos de dessorção de proteína sem um agente externo. O máximo de sorção a 25°C foi atingido, portanto, a 60 minutos. Já para as temperaturas mais elevadas o processo de sorção da proteína acontece muito rápido, atingindo o equilíbrio em apenas 30 minutos, a 30°C e 37°C (Figura 37). Este fato também foi observado por Mahdavi e colaboradores [59], que constataram o equilíbrio do processo de sorção entre nanopartículas de quitosana carboximetila/ κ -carragenina e a albumina do soro bovino, nos primeiros 30 minutos.

5.8.3. Estudo da cinética de sorção

5.8.3.1. Modelo de pseudo primeira ordem

Diferentes modelos cinéticos encontram-se descritos na literatura, sendo estes desenvolvidos para calcular e avaliar parâmetros cinéticos em interfaces sólido/solução [102]. Os dados obtidos nas isotermas de sorção foram aplicados aos modelos cinéticos de pseudo primeira e segunda ordem, modelo de ordem variável e o modelo de Morris-Weber para avaliar o comportamento cinético do processo de sorção entre as membranas de quitosana e a proteína albumina do soro bovino.

Inicialmente, a cinética de sorção pode ser descrita por expressões originalmente descritas por Lagergren e Ho-Mckay [103].

Para análise da cinética de sorção foram utilizadas as equações de pseudo primeira ordem e pseudo segunda ordem, descritas a seguir [104 – 106]. Para estudo da cinética de sorção de pseudo primeira ordem utiliza-se a equação 11:

$$\frac{dq_t}{dt} = k_1(q_e - q_t) \quad \text{eq. 11}$$

Onde:

q_t é a quantidade adsorvida de proteína (BSA) em determinado tempo;

k_1 é a constante de sorção de pseudo primeira ordem, que relaciona a quantidade de proteína adsorvida pela fase sólida (membrana) e

q_e é a quantidade de proteína adsorvida (BSA) no equilíbrio.

Integrando-se a equação diferencial, tem-se:

$$\int_0^t \frac{dQ_t}{dt} = \int_{Q_t}^{Q_t^{eq}} k_1 (Q_t^{eq} - Q_t) \quad \text{eq. 12}$$

Após a integração da equação 12 e aplicando as condições iniciais onde a quantidade adsorvida de proteína equivale a zero ($q_t = 0$), em tempo inicial ($t = 0$) e q_t equivale a q_t em determinado tempo ($q_t = q_t$ em $t = t$), obtêm-se a equação 12.

$$Q_t = Q_t^{eq} (1 - \exp^{-(k_1 t)}) \quad \text{eq. 13}$$

A equação 13 é linearizada para obter-se a equação da reta:

$$\ln(q_e - q_t) = \ln(q_e) - k_1 t \quad \text{eq. 14}$$

Foram traçados os gráficos $\ln(q_e - q_t)$ *versus* tempo para o modelo de pseudo primeira ordem. Assim, com as retas obtidas dessas equações, são encontrados os valores das constantes cinéticas (k_1) e os valores da quantidade de proteína adsorvida no equilíbrio (q_e) para cada temperatura e membrana estudada. Os gráficos de pseudo primeira ordem são mostrados no anexo 1.

Na Tabela 06 são apresentados os valores das constantes k_1 , quantidade de proteína adsorvida no equilíbrio (q_e) e coeficiente de correlação (R^2) calculados pelo modelo de pseudo primeira ordem.

Tabela 06: Dados dos parâmetros cinéticos de Lagregen, pseudo primeira ordem, relacionados a sorção da proteína albumina do soro bovino (BSA) nas membranas de quitosana.

Adsorvente	Temperatura (°C)	Pseudo 1° ordem			
		$k_1/10^{-2}$ (min ⁻¹)	$q_e/10^{-6}$ (mol g ⁻¹) Calculado	$q_e/10^{-6}$ (mol g ⁻¹) Experimental	R ²
CH/CIT	25	6,75	0,96	3,98	0,94
	30	1,14	0,01	1,33	0,76
	37	2,36	2,39	2,02	0,95
CH/TPP	25	-	0,07	1,72	0,25
	30	4,81	0,21	1,49	0,94
	37	4,94	0,36	8,74	0,99
CH/Add/APTES	25	5,98	0,13	1,41	0,90
	30	1,63	0,06	0,56	0,67
	37	25,71	2,39	0,85	0,99

Os dados experimentais obtidos para todos os sistemas de sorção estudados não se ajustaram de forma adequada ao modelo cinético de pseudo de primeira ordem, uma vez que os ajustes nos gráficos $\ln(q_e - q_t)$ *versus* tempo apresentaram-se com baixo padrão de linearidade. Os valores encontrados para os valores de q_e calculado para o modelo de pseudo primeira ordem são bem diferentes daqueles encontrados experimentalmente, mostrando que os dados experimentais não são ajustados a esse modelo.

5.8.3.2. Modelo de pseudo segunda ordem

Para estudo da cinética de sorção de pseudo segunda ordem utiliza-se a equação 15:

$$\frac{dq_t}{dt} = k_2(q_e - q_t)^2 \quad \text{eq. 15}$$

Onde:

k_2 é a constante de sorção de pseudo segunda ordem, que relaciona a quantidade de proteína adsorvida pela fase sólida (membrana) e

q_e é a quantidade de proteína adsorvida (BSA) no equilíbrio.

Integrando-se e aplicando-se também as condições iniciais, obtêm-se a equação 15.

$$Q_t = \frac{k_2(Q_t^{eq})^2 t}{1 + (k_2 Q_t^{eq} t)} \quad \text{eq. 16}$$

A equação 16 é linearizada para obter-se a equação da reta:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} t \quad \text{eq. 17}$$

Foram traçados os gráficos t/q_t versus t para o modelo de pseudo segunda ordem. Assim, com as retas obtidas dessas equações, são encontrados os valores das constantes cinéticas (k_2) e os valores de q_e para cada temperatura e membrana estudadas. Os gráficos relacionados ao modelo de pseudo segunda ordem são apresentados nas Figuras 41 e 42, e os parâmetros cinéticos da sorção da proteína (BSA) sobre as membranas de quitosana encontram-se apresentados na Tabela 06.

Nas Figuras 41 e 42 são apresentados os gráficos referentes a aplicação do modelo de pseudo segunda ordem para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) na membrana de quitosana reticulada com citrato (CH/CIT), a 25°C, 30°C e 37°C.

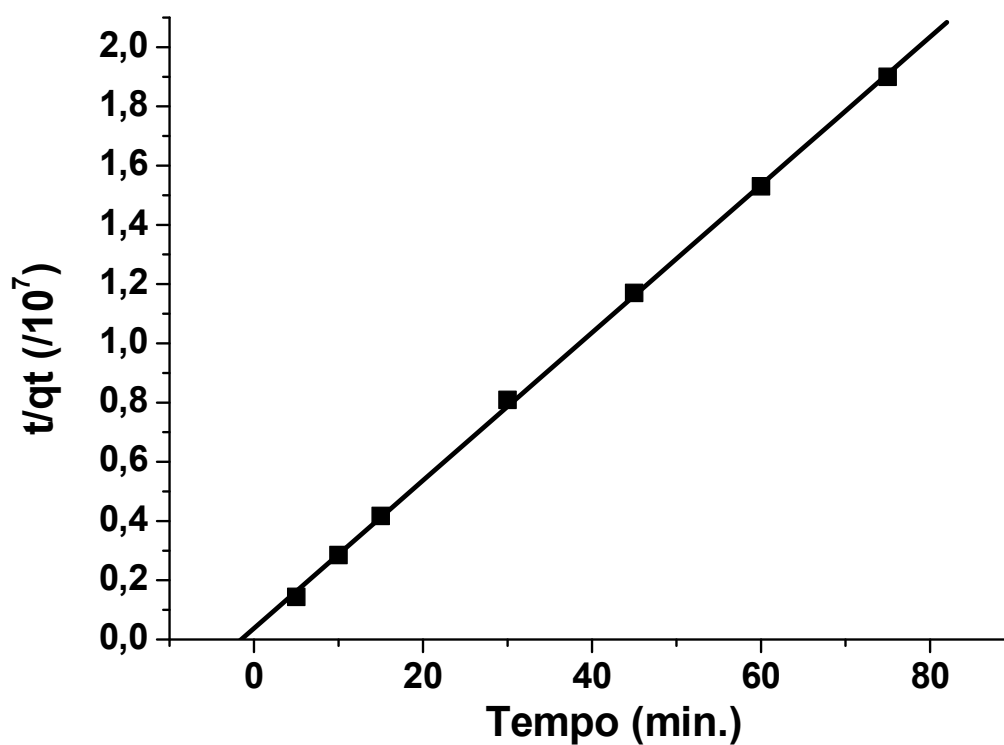


Figura 41: Gráfico referente a aplicação do modelo de pseudo segunda ordem para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) na membrana de quitosana reticulada com citrato (CH/CIT), 25°C.

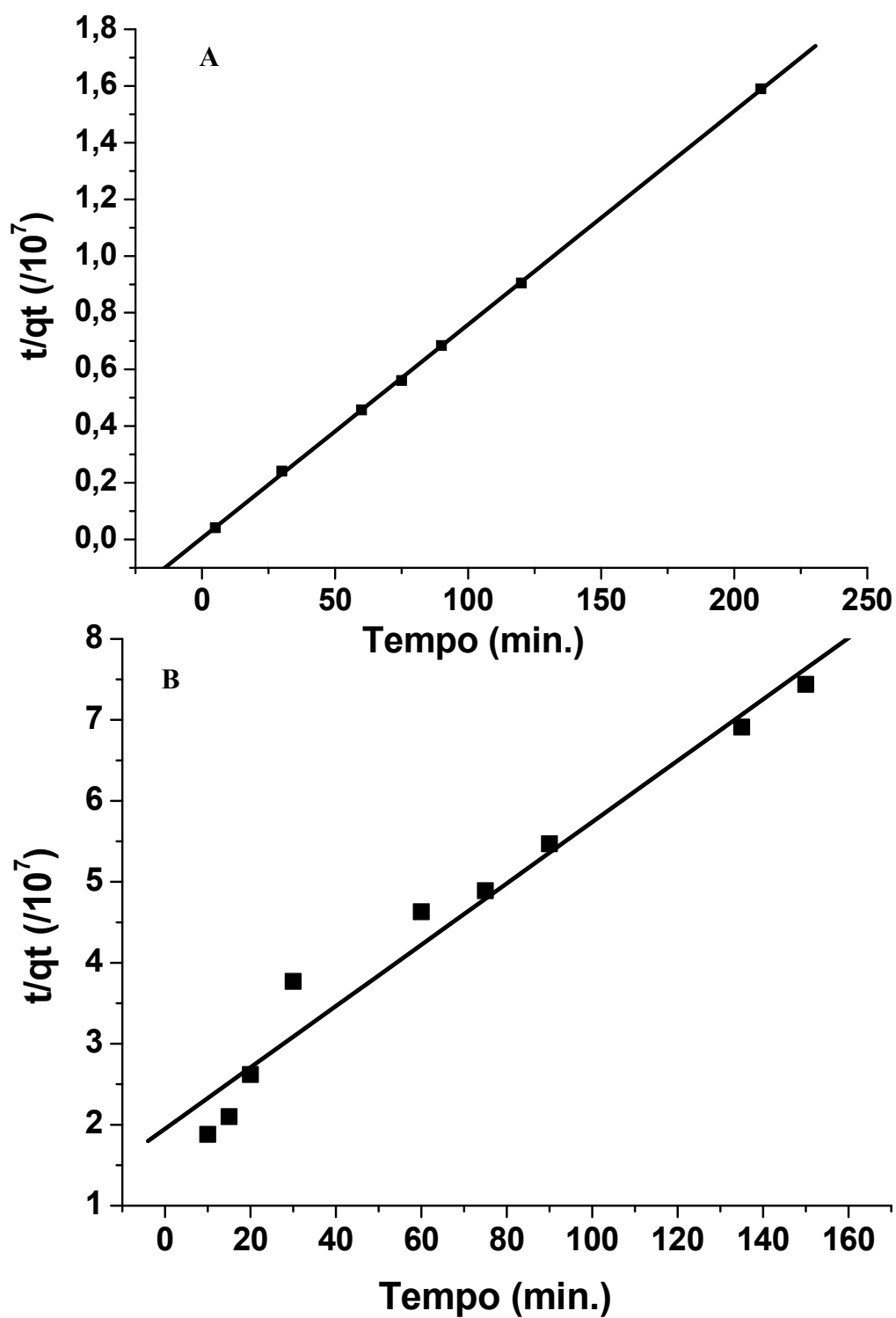


Figura 42: Gráficos referentes a aplicação do modelo de pseudo segunda ordem para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) na membrana de quitosana reticulada com citrato (CH/CIT): (A) 30°C e (B) 37°C.

Nas Figuras 43 e 44 são apresentados os gráficos referentes a aplicação do modelo de pseudo segunda ordem para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) na membrana de quitosana reticulada com tripolifosfato (CH/TPP), a 25°C, 30°C e 37°C.

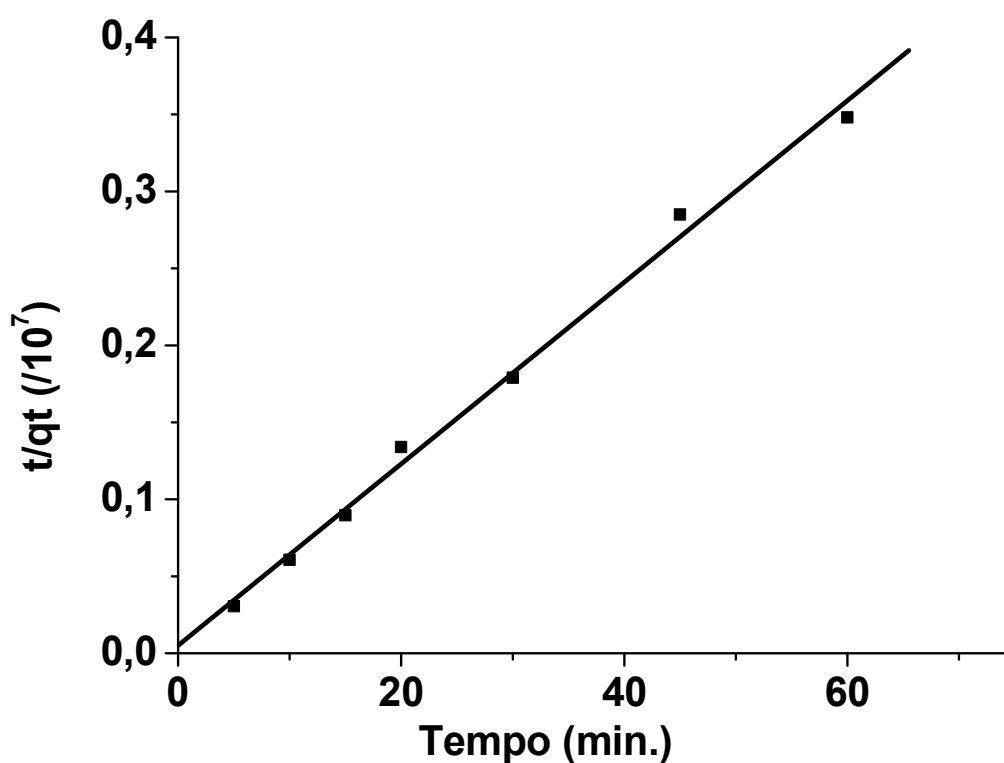


Figura 43: Gráfico referente a aplicação do modelo de pseudo segunda ordem para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) na membrana de quitosana reticulada com tripolifosfato (CH/TPP), 25°C.

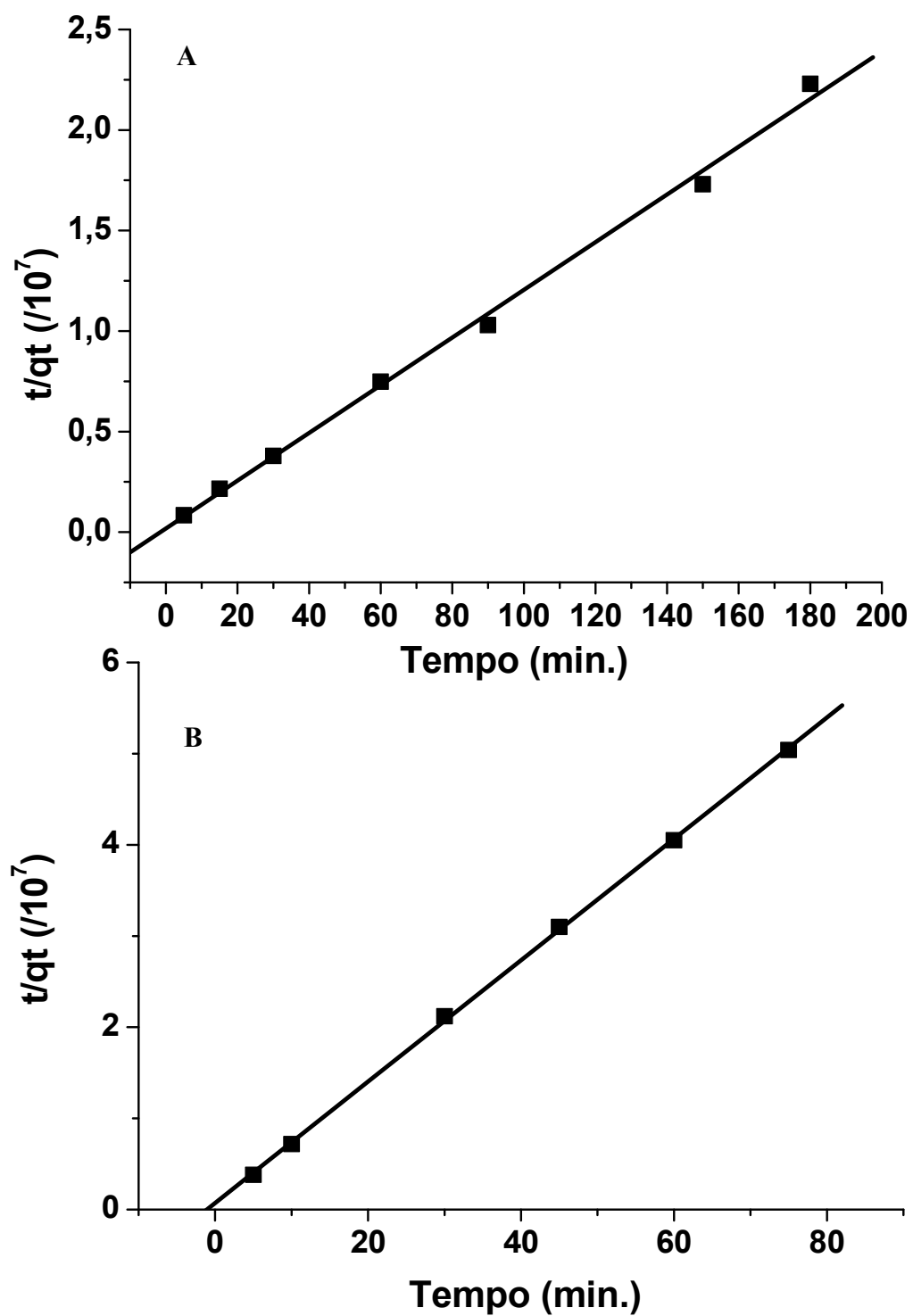


Figura 44: Gráficos referentes a aplicação do modelo de pseudo segunda ordem para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) na membrana de quitosana reticulada com tripolifosfato (CH/TPP): (A) 30°C e (B) 37°C.

Nas Figuras 45 e 46 são apresentados os gráficos referentes a aplicação do modelo de pseudo segunda ordem para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) na membrana de quitosana modificada com APTES (CH/Add/APTES), a 25°C, 30°C e 37°C.

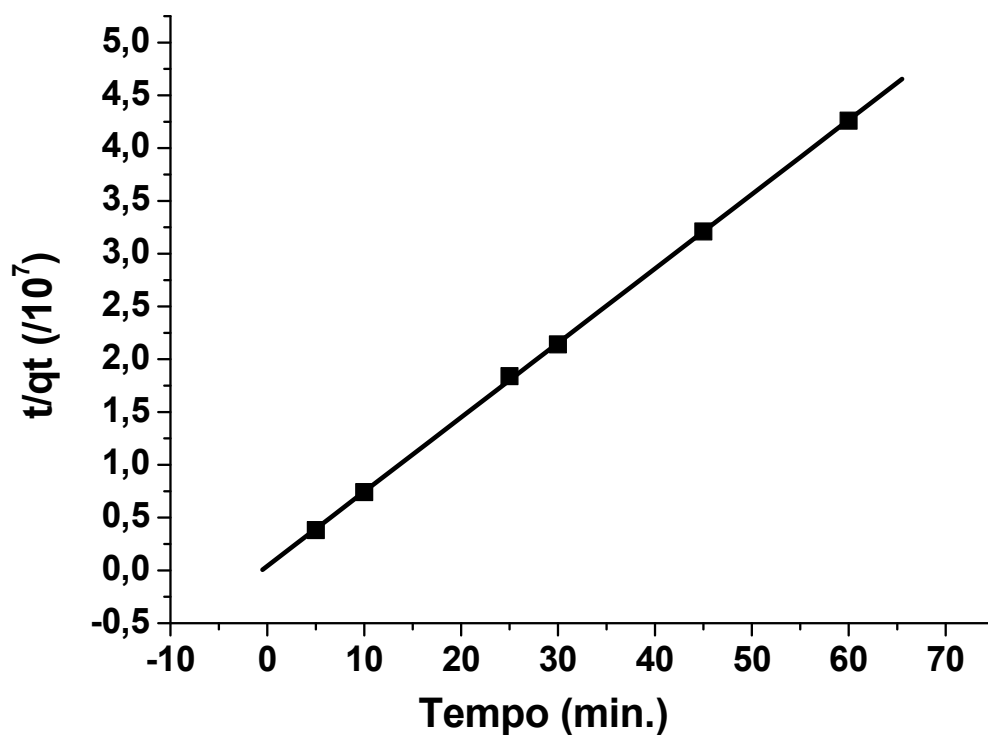


Figura 45: Gráfico referente a aplicação do modelo de pseudo segunda ordem para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) na membrana de quitosana modificada com APTES (CH/Add/APTES), 25°C.

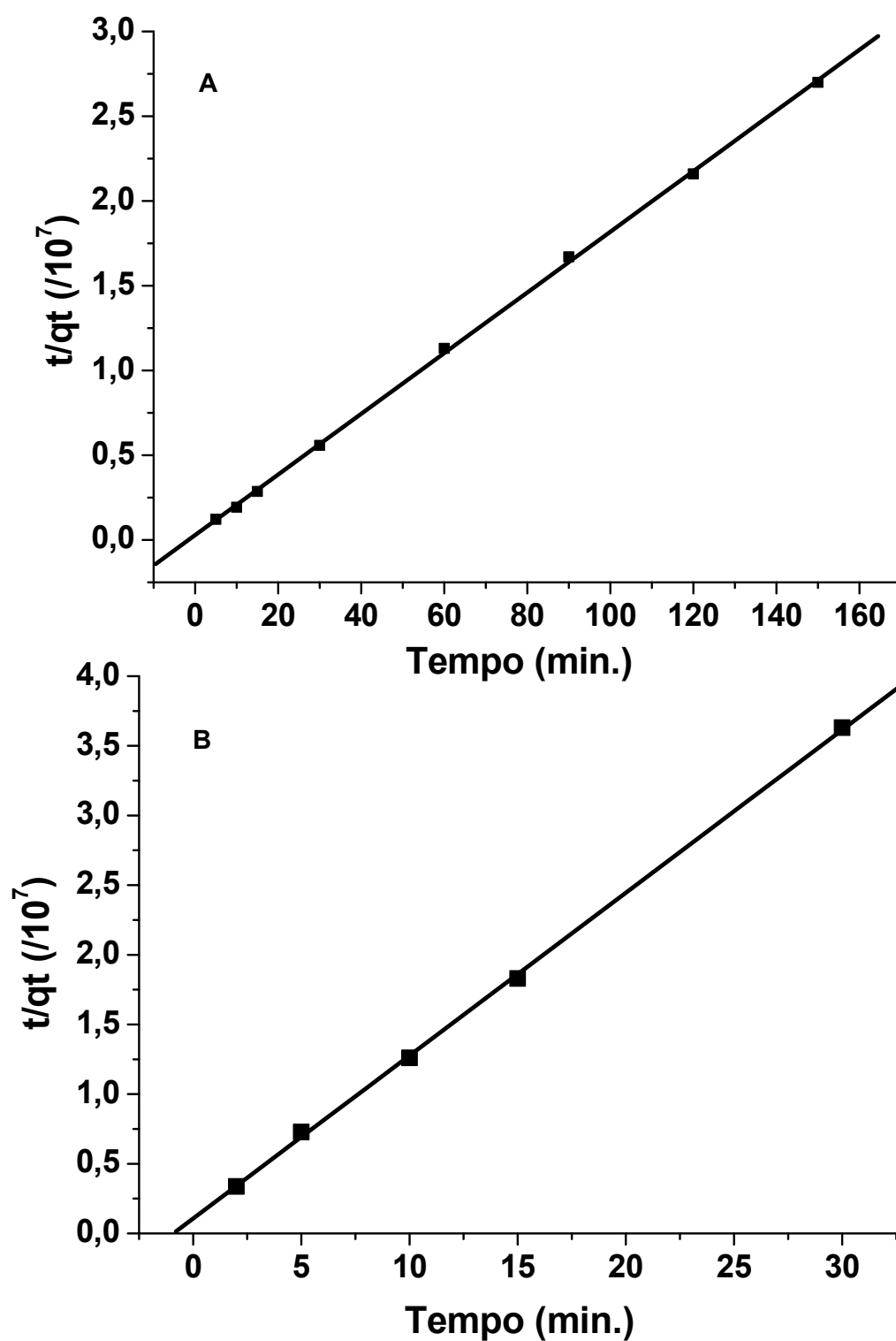


Figura 46: Gráficos referentes a aplicação do modelo de pseudo segunda ordem para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) na membrana de quitosana modificada com APTES (CH/Add/APTES): (A) 30°C e (B) 37°C.

Na Tabela 07 são apresentados os valores das constantes k_2 , da quantidade de proteína adsorvida no equilíbrio (q_e) e dos coeficientes de correlação (R^2) calculados pelo modelo de pseudo segunda ordem.

Tabela 07: Dados dos parâmetros cinéticos de Lagregen, pseudo segunda ordem, relacionados a sorção da proteína albumina do soro bovino (BSA) nas membranas de quitosana.

Adsorvente	Temperatura (°C)	Pseudo 2° ordem			
		$k_2 / 10^5$ (L min ⁻¹ mol ⁻¹)	$q_e / 10^{-6}$ (mol g ⁻¹) Calculado	$q_e / 10^{-6}$ (mol g ⁻¹) Experimental	R^2
CH/CIT	25	1,64	4,01	3,98	0,99
	30	1,03	1,33	1,33	0,99
	37	0,74	2,64	2,02	0,98
CH/TPP	25	6,95	1,69	1,72	0,99
	30	6,11	1,50	1,49	0,99
	37	2,86	0,91	0,87	0,99
CH/Add/APTES	25	11,88	1,42	1,41	0,99
	30	11,21	0,56	0,56	0,99
	37	12,75	0,85	0,56	0,99

Ressalta-se que os coeficientes de correlação obtidos para o modelo de pseudo de segunda ordem (Tabela 07) foram bem mais altos em relação aos dados obtidos para o pseudo de primeira ordem anteriormente apresentados na Tabela 06. Assim o modelo cinético que melhor descreve o comportamento cinético é o pseudo de segunda ordem, como foi observado também por Sahnoun e colaboradores na

sorção em quitosana modificadas com PANI [107]. Os valores encontrados para a quantidades de proteína adsorvidas no equilíbrio (q_e), utilizando-se o modelo pseudo segunda ordem, foram bem próximos dos valores experimentais, corroborando para a afirmação que os dados experimentais se ajustaram melhor para este modelo, sendo as maiores diferenças observadas para a temperatura de 37°C.

Os valores das constantes de sorção de pseudo segunda ordem (k_2) apresentaram-se entre $0,737 \times 10^5$ e $12,75 \times 10^5 \text{ L min}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ e os valores das quantidades da proteína (BSA) adsorvidas no equilíbrio (q_e) apresentaram-se entre $0,56 \times 10^{-6}$ e $3,98 \times 10^{-6} \text{ mol g}^{-1}$. Os valores de k_2 diminuíram com o aumento da temperatura, exceto para a membrana CH/Add/APTES, onde observa-se um aumento do valor de k_2 com a temperatura.

O aumento do valor de k_2 com a temperatura também foi observado por Yunjin e colaboradores onde a sorção do azul de metileno em nanotubos de carbono foi melhor descrita pela cinética pseudo segunda ordem [108]. Em um outro estudo observou-se que a sorção de proteína em quitosana polication e poliânion também foi melhor ajustada ao modelo cinético de pseudo segunda ordem [104]. Em seguida são apresentados os gráficos referentes a comparação dos valores de q_t experimental e o q_t obtido a partir da modelagem dos dados de pseudo segunda ordem para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) na membrana de quitosana modificada com citrato (CH/CIT), a 25°C, 30°C e 37°C (Figuras 47 e 48).

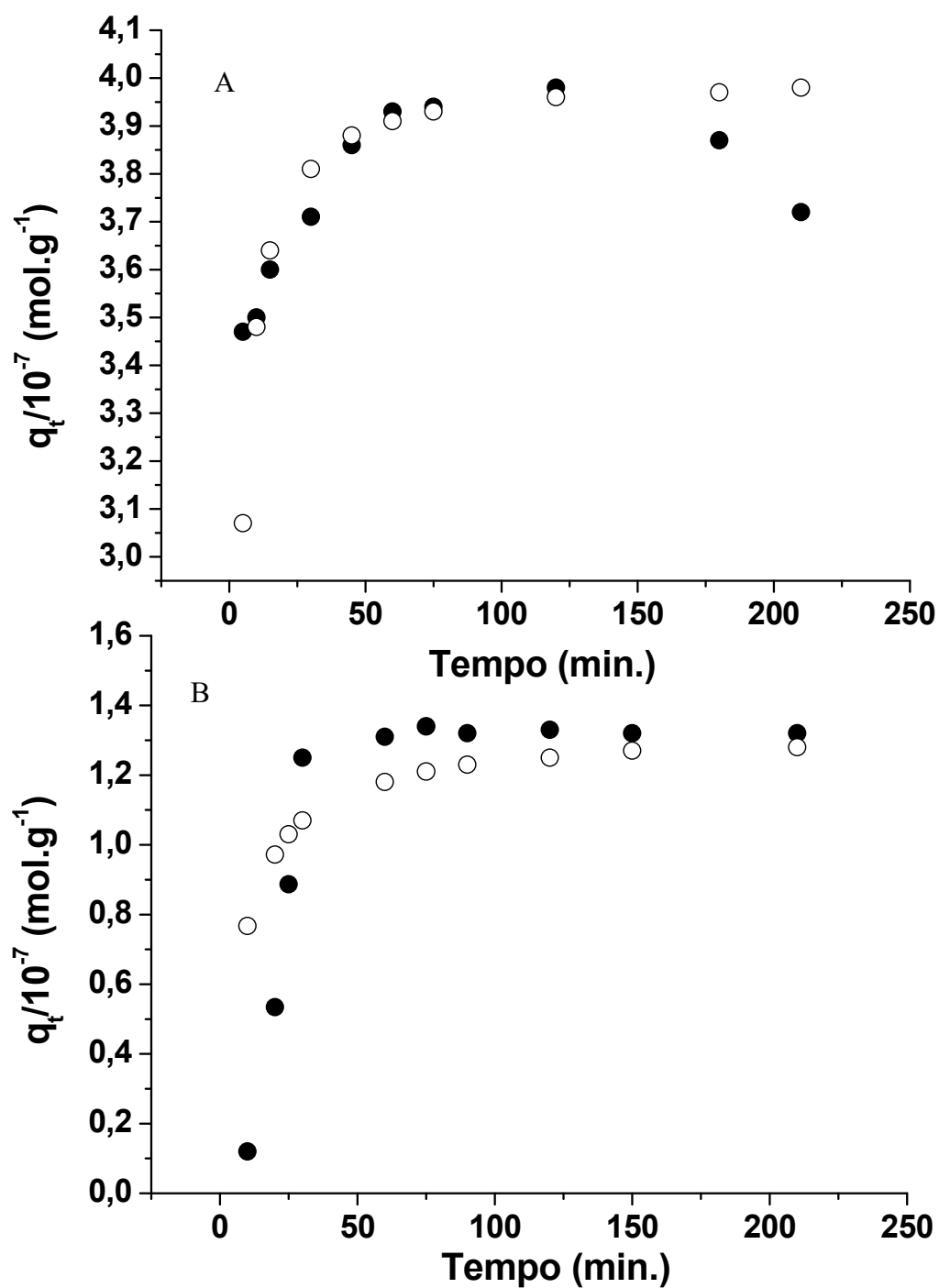


Figura 47: Gráficos referentes aos valores obtidos de (●) q_t experimental e aos valores de (○) q_t calculado, para a sorção da proteína albumina do soro bovino (BSA) na membrana de quitosana reticulada com citrato (CH/CIT): (A) 25°C e (B) 30°C.

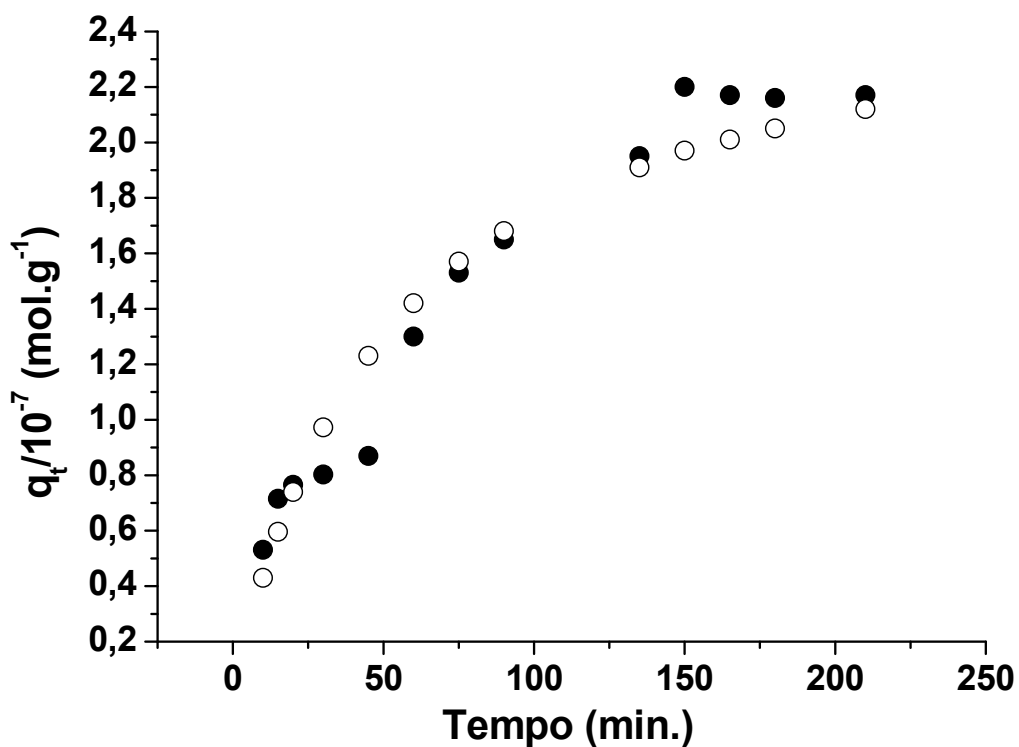


Figura 48: Gráfico referente aos valores obtidos de (●) q_t experimental e aos valores de (○) q_t calculado, para a sorção da proteína albumina do soro bovino (BSA) na membrana de quitosana reticulada com citrato (CH/CIT), 37°C.

Nas Figuras 49 e 50 são apresentados os gráficos referentes a comparação dos valores de q_t experimental e o q_t obtido a partir da modelagem dos dados de pseudo segunda ordem para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) na membrana de quitosana reticulada com tripolifosfato (CH/TPP), a 25°C, 30°C e 37°C.

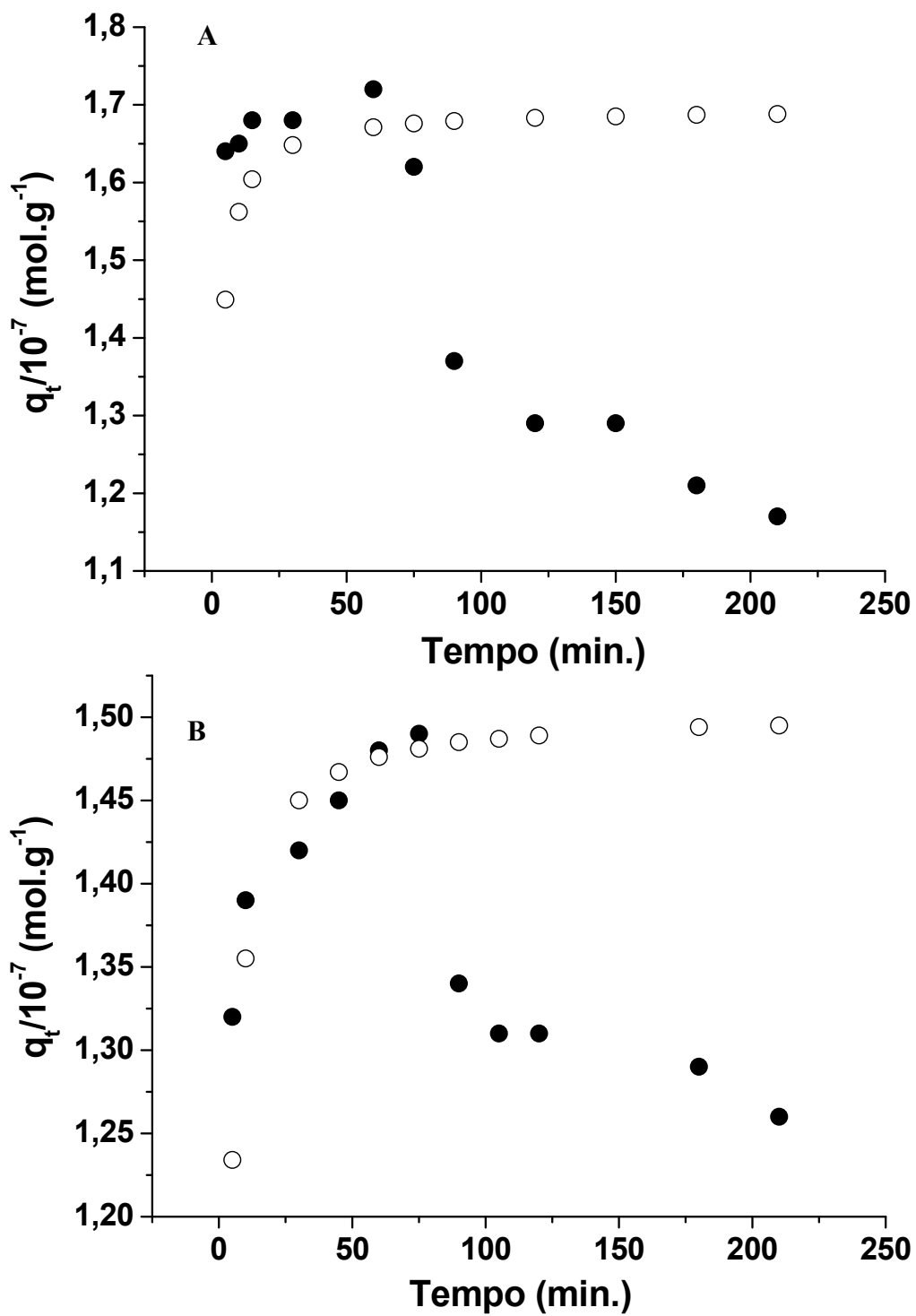


Figura 49: Gráficos referentes aos valores obtidos de (●) q_t experimental e aos valores de (○) q_t calculado, para a sorção da proteína albumina do soro bovino (BSA) na membrana de quitosana reticulada com tripolifosfato (CH/TPP): (A) 25°C e (B) 30°C.

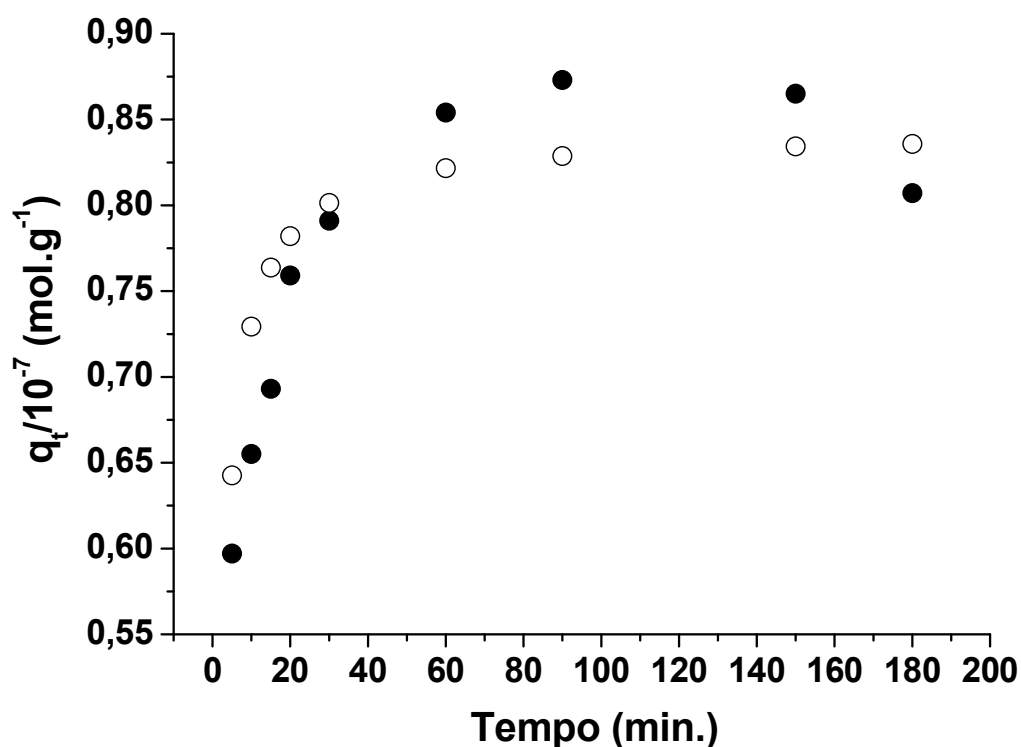


Figura 50: Gráficos referentes aos valores obtidos de (●) q_t experimental e aos valores de (○) q_t calculado, para a sorção da proteína albumina do soro bovino (BSA) na membrana de quitosana reticulada com tripolifosfato (CH/TPP), 37°C.

Nas Figuras 51 e 52 são apresentados os gráficos referentes a comparação dos valores de q_t experimental e o q_t obtido a partir da modelagem dos dados de pseudo segunda ordem para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) na membrana de quitosana modificada com APTES (CH/Add/APTES), a 25°C, 30°C e 37°C.

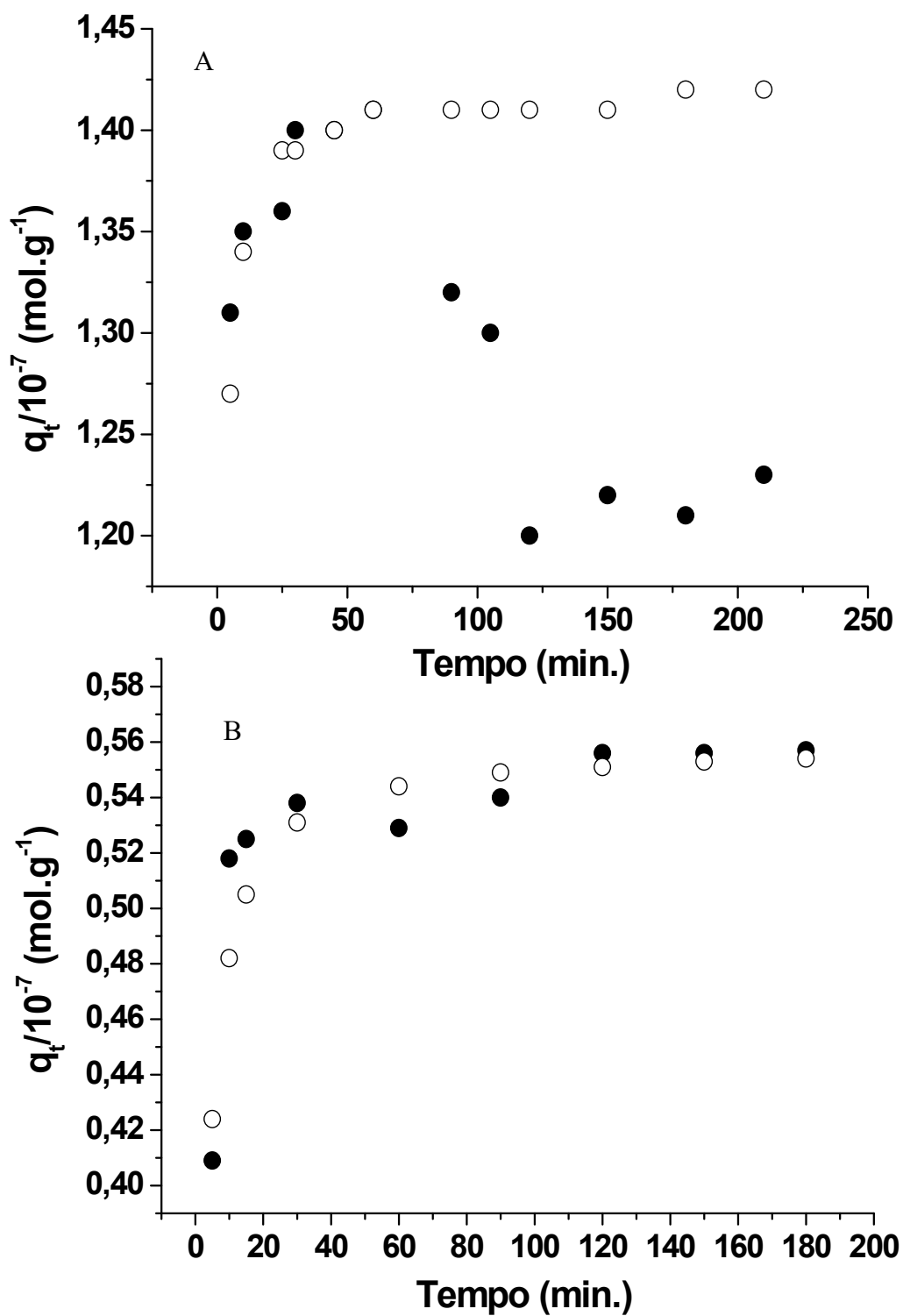


Figura 51: Gráficos referentes aos valores obtidos de (●) q_t experimental com os valores de (○) q_t calculado para a sorção da proteína albumina do soro bovino (BSA) na membrana de quitosana modificada com APTES (CH/Add/APTES): (A) 25°C e (B) 30°C

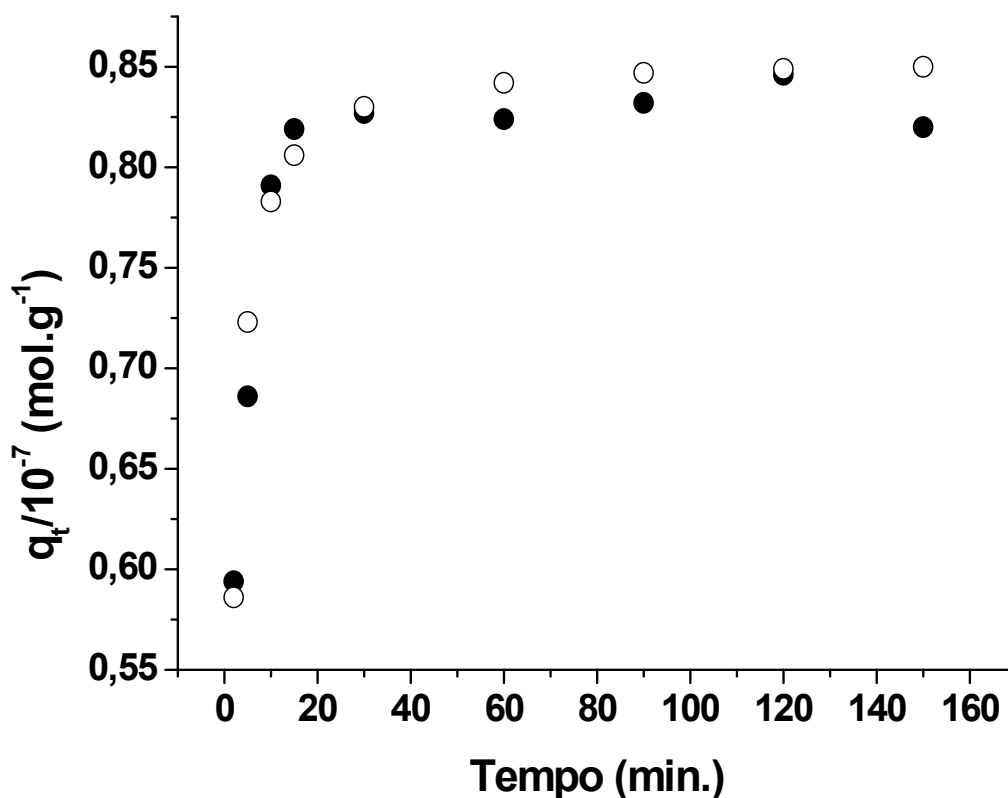


Figura 52: Gráficos referentes aos valores obtidos de (●) q_t experimental com os valores de (○) q_t calculado para a sorção da proteína albumina do soro bovino (BSA) na membrana de quitosana modificada com APTES (CH/Add/APTES), 37°C.

Comparando-se os valores da quantidade adsorvida (q_t) para os experimentos de sorção sobre a membrana CH/APTES, a 25°C, e a membrana CH/TPP, onde havia sido observado uma dessorção da proteína albumina do soro bovino (BSA), com os valores de q_t calculados, estes não se apresentaram próximos aos valores experimentais a partir do ponto onde começa o processo de dessorção da proteína. Isso pode ser explicado pelo fato do modelo prever que a sorção atinge um equilíbrio, e como nesses experimentos não foi observado um equilíbrio, e sim um processo de

sorção até atingir um ponto máximo e em seguida a dessorção da proteína, observa-se um distanciamento entre os valores de q_t experimental e q_t calculado pelo modelo. Já em todos os outros experimentos observa-se o equilíbrio no processo de sorção, e, portanto, uma boa concordância entre os valores de q_t experimentais e q_t calculados.

As equações dos modelos cinéticos utilizadas acima são as aplicadas pela maioria dos autores nos estudos de sorção para a determinação dos parâmetros cinéticos [109 – 111].

5.8.3.3. Modelo de ordem variável

Uma alternativa para a determinação dos parâmetros cinéticos é o modelo de ordem variável, pois alguns processos de sorção podem apresentar ordens cinéticas fracionárias, ou mesmo mudanças das constantes cinéticas em relação ao tempo de sorção, e isso os outros modelos cinéticos apresentados não preveem [112].

A equação cinética do modelo de ordem variável é apresentada na equação 18.

$$q_t = q_e (1 - \exp^{-(k_n t)^n}) \quad \text{eq. 18}$$

Onde:

q_t é a quantidade adsorvida de proteína (BSA) em determinado tempo;

k_n é a constante cinética de ordem variável;

q_e é a quantidade de proteína adsorvida (BSA) no equilíbrio e

n é uma constante relacionada à ordem cinética e às mudanças no mecanismo de sorção.

A forma linearizada dessa equação é apresentada na equação 19.

$$\ln \left(\ln \left(\frac{q_e}{q_e - q_t} \right) \right) = n \ln k_n + n \ln t \quad \text{eq. 19}$$

Foram traçados os gráficos $\ln(\ln(q_e/q_e - q_t))$ *versus* $\ln t$ para cada sistema de sorção estudado, e a partir dos respectivos valores dos coeficientes angulares e lineares foi possível calcular os valores dos parâmetros cinéticos k_n e n . Os gráficos para o modelo de ordem variável são apresentados nas Figuras 52, 53 e 54 e a Tabela 07 mostra os valores dos parâmetros cinéticos obtidos para este modelo.

Nas Figuras 53 e 54 são apresentados os gráficos referentes a aplicação do modelo de ordem variável para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) na membrana de quitosana reticulada com citrato (CH/CIT), a 25°C, 30°C e 37°C.

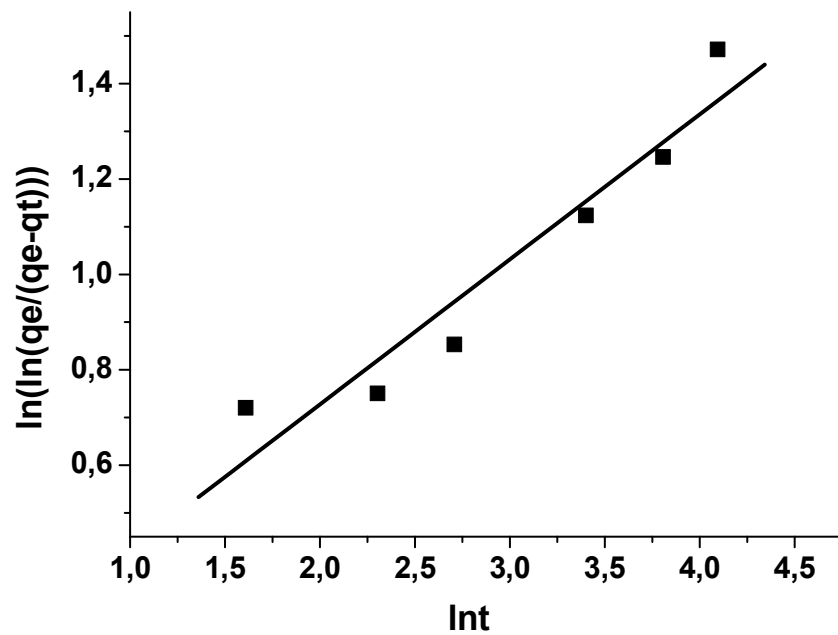


Figura 53: Gráficos referentes à aplicação do modelo de ordem variável para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) nas membranas de quitosana reticuladas com citrato (CH/CIT), 25°C.

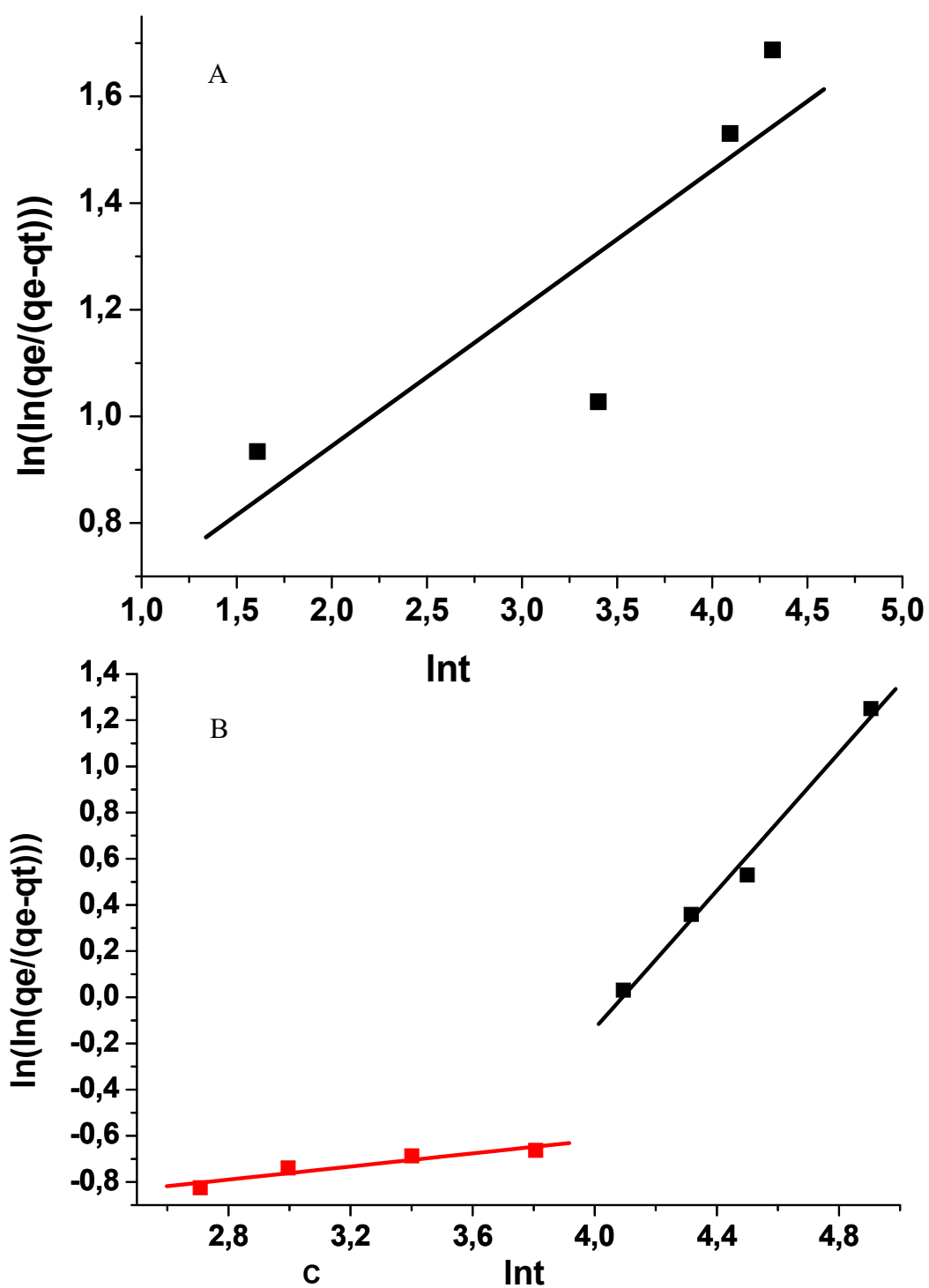


Figura 54: Gráficos referentes à aplicação do modelo de ordem variável para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) nas membranas de quitosana reticuladas com citrato (CH/CIT): (A) 30°C e (B) 37°C.

Nas Figuras 55 e 56 são apresentados os gráficos referentes a aplicação do modelo de ordem variável para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) na membrana de quitosana reticulada com tripolifosfato (CH/TPP), a 25°C, 30°C e 37°C.

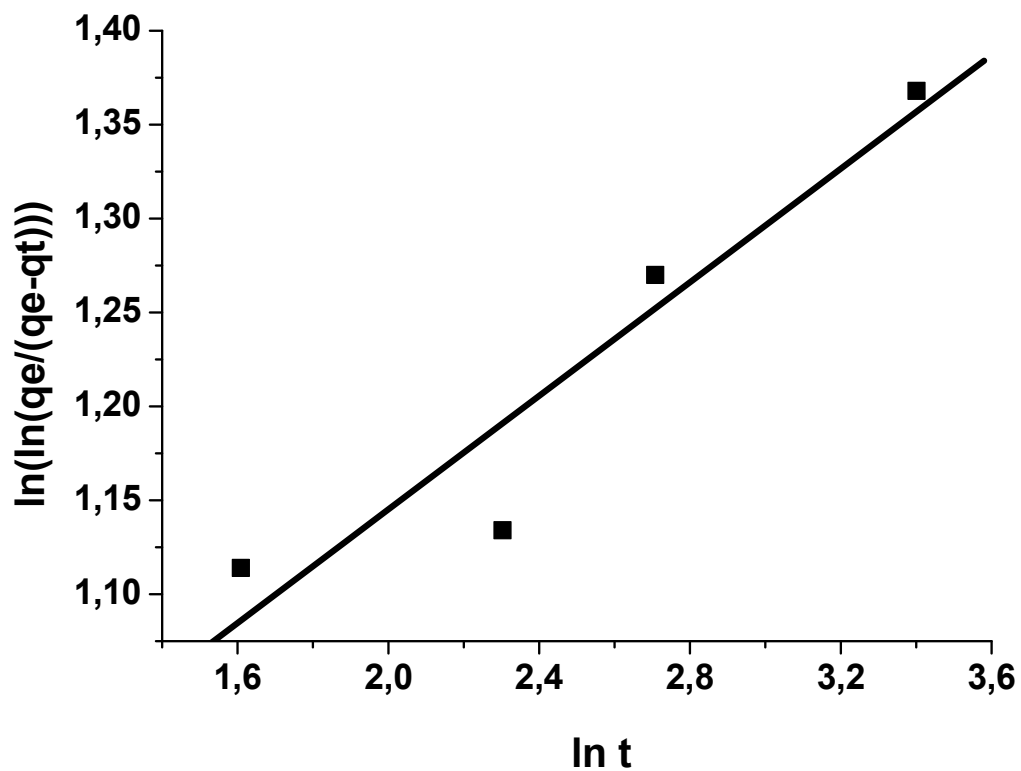


Figura 55: Gráfico referente à aplicação do modelo de ordem variável para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) nas membranas de quitosana reticuladas com tripolifosfato (CH/TPP), 25°C;

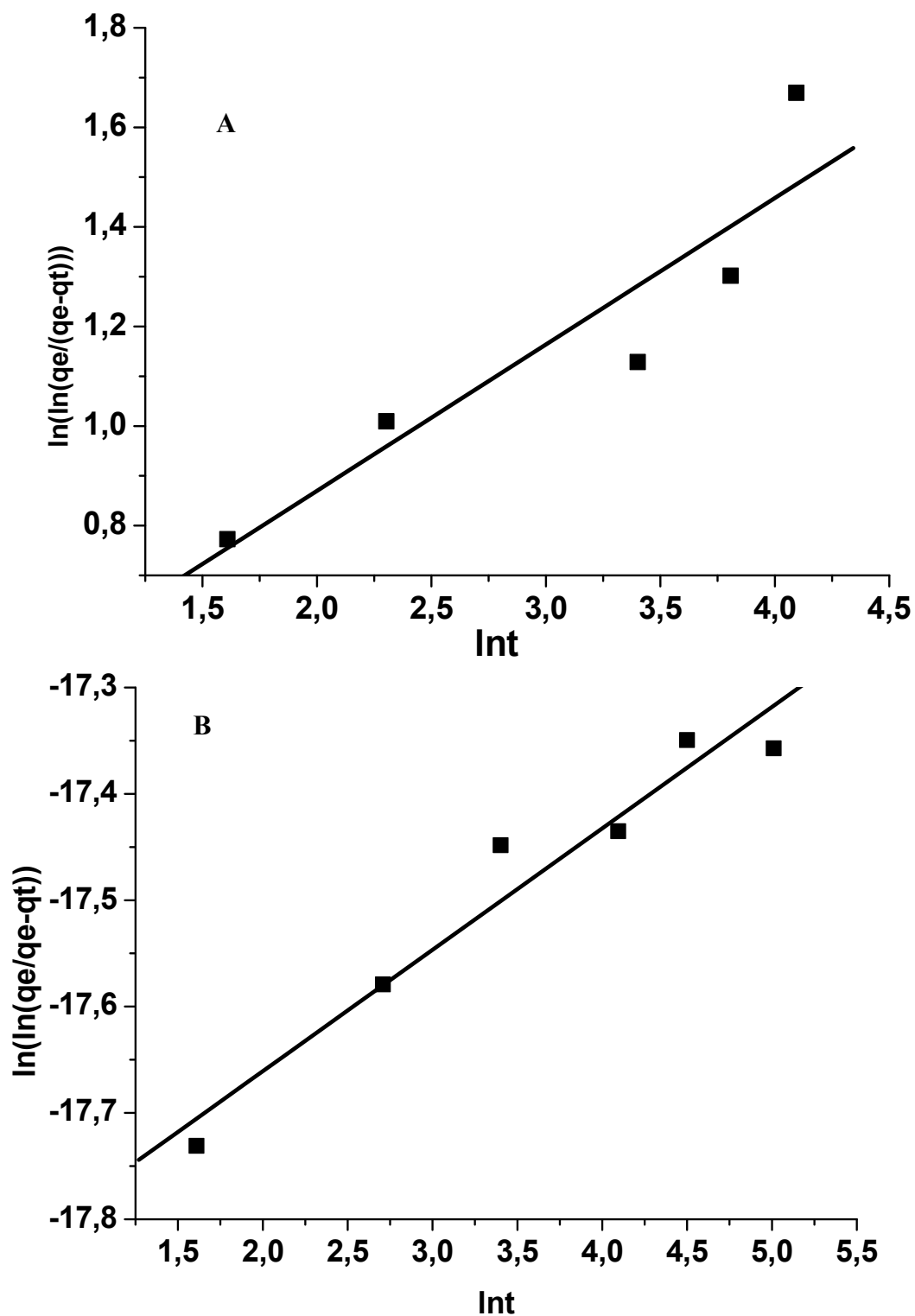


Figura 56: Gráficos referentes à aplicação do modelo de ordem variável para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) nas membranas de quitosana reticuladas com tripolifosfato (CH/TPP): (A) 30°C e (B) 37°C.

Nas Figuras 57 e 58 são apresentados os gráficos referentes a aplicação do modelo de ordem variável para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) nas membranas de quitosana modificadas com APTES (CH/Add/APTES), a 25°C, 30°C e 37°C.

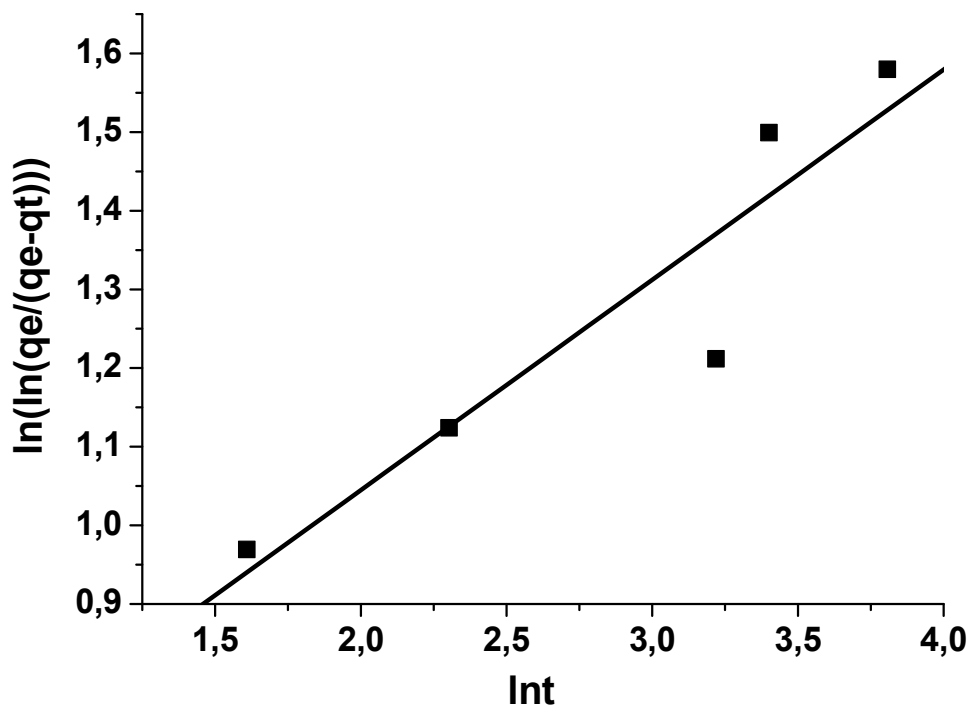


Figura 57: Gráfico referente à aplicação do modelo de ordem variável para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) nas membranas de quitosana modificadas com APTES (CH/Add/APTES), 25°C.

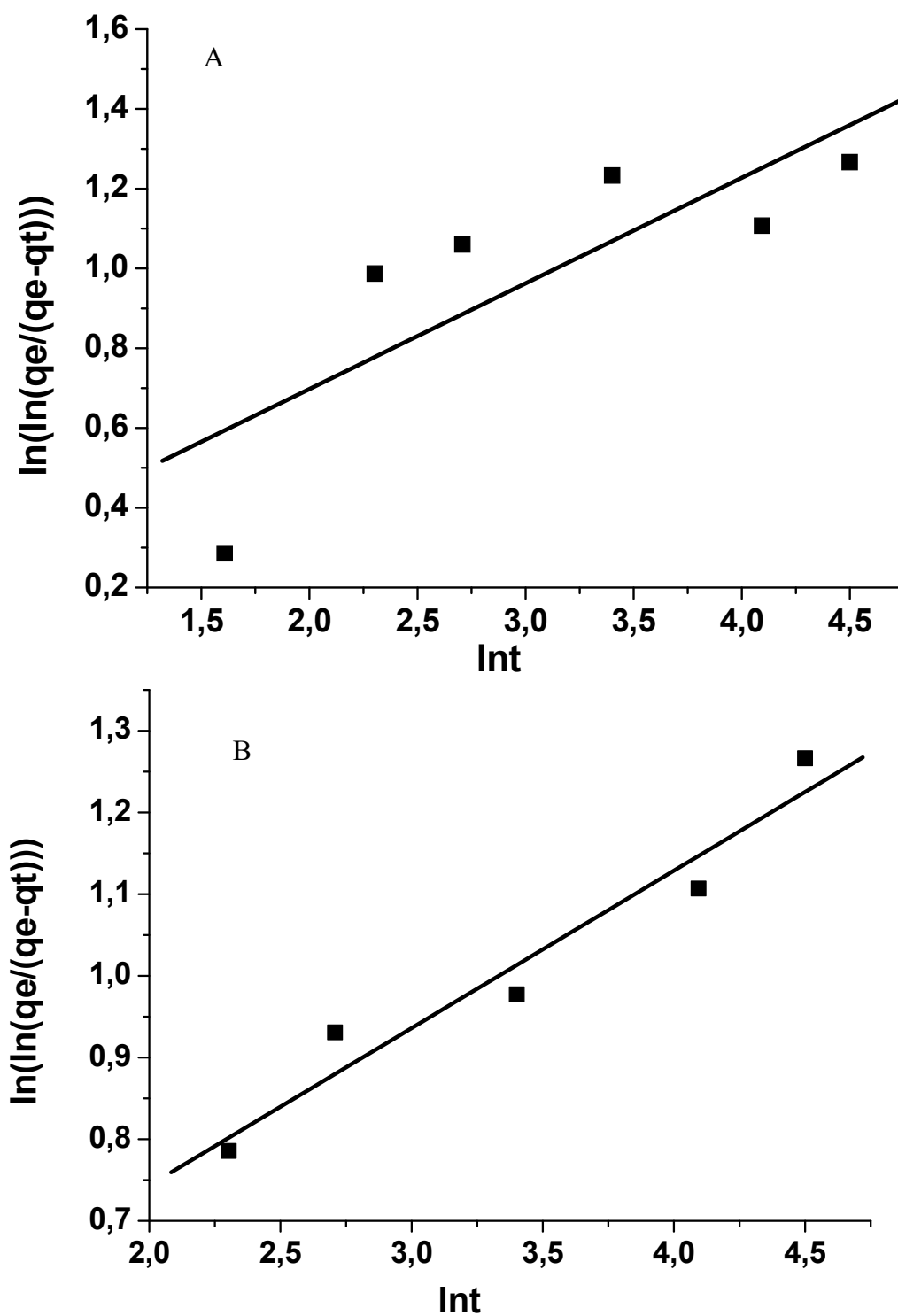


Figura 58: Gráficos referentes à aplicação do modelo de ordem variável para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) nas membranas de quitosana modificadas com APTES (CH/Add/APTES): (A) 30°C e (B) 37°C.

O fator n no modelo de ordem variável está relacionado com as mudanças mecânicas dos processos de sorção, pois a ordem cinética somente muda quando o mecanismo de sorção é alterado.

Tabela 08: Dados dos parâmetros cinéticos de ordem variável relacionados à sorção da proteína (BSA) nas membranas de quitosana.

Adsorvente	Temperatura (°C)	Parâmetros cinéticos		
		n	$k_n \text{ min}^{-1}$	R^2
CH/CIT	25	0,30	1,48	0,96
	30	0,26	5,22	0,86
	37	0,14	0,0002	0,95
	37	1,49	0,017	0,99
CH/TPP	25	0,15	264,91	0,98
	30	0,29	2,61	0,92
	37	0,34	0,31	0,98
CH/Add/APTES	25	0,27	6,74	0,93
	30	0,26	1,89	0,81
	37	0,19	6,41	0,97

Assim, foi observado que os valores de n pelo modelo da ordem variável são menores que 1,00 (unidade), indicando que processos de difusão da proteína pode ocorrer para o interior dos materiais estudados, exceto para a membrana CH/CIT a 37°C, onde no segundo segmento da reta, observou-se um valor de n maior que 1,00, o que pode indicar que o processo de sorção se dá, em maior extensão, na superfície do adsorvente. Os valores das constantes de sorção de ordem variável (k_n)

apresentaram-se entre 0,0002 e 264,91 min⁻¹ e os valores das constantes n apresentaram-se entre 0,142 e 1,492 min⁻¹.

Os valores da constante K_n foram bem diferentes entre as temperaturas e membranas. Assim a velocidade de sorção varia de acordo com o tipo de membrana utilizada e com a temperatura. Diferente do que foi observado por Dotto e colaboradores, em um estudo cinético de sorção do corante tartrazina sobre a quitina e a quitosana. Nesse trabalho observaram-se valores de K_n maiores para a quitina em relação à quitosana, mostrando que a velocidade de sorção na quitina é mais rápida que na quitosana [113].

Para avaliar os ajustes matemáticos dos modelos cinéticos utilizados nesse trabalho foram utilizadas duas equações, o desvio padrão adaptado e o chi-quadrado, que são apresentados nas equações 20 e 21.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum[(q_{t,e} - q_{t,m})/q_{t,e}]^2}{n - 1}} \quad \text{eq. 20}$$

$$\chi^2 = \sum \left(\frac{(q_{t,e} - q_{t,m})^2}{q_{t,m}} \right) \quad \text{eq. 21}$$

Onde:

q_{t,e} e q_{t,m} são as quantidades adsorvidas da espécie em estudo em um dado tempo experimental e calculado, respectivamente.

A equação de chi-quadrado (χ²) baseia-se na soma dos quadrados das diferenças entre os dados experimentais e os calculados. Se os dados experimentais e calculados são similares, o χ² será pequeno (tipicamente menor que 0,01), e se os

dados são diferentes, χ^2 será grande. Foram calculados o desvio padrão e o chi-quadrado para os modelos de pseudo segunda ordem e de ordem variável para as temperaturas e membranas estudadas (Tabela 09).

Tabela 09: Dados obtidos dos desvios padrão e dos chi-quadrados (χ^2) para os modelos de pseudo segunda ordem e de ordem variável.

2° Ordem						
	SD			$\chi^2/10^{-7}$		
	25°C	30°C	37°C	25°C	30°C	37°C
CH/TPP	0,2	0,1	0,07	5	1	0,2
CH/CIT	0,05	2	0,2	0,7	8	2
CH/APTES	0,1	0,03	0,03	1	0,05	0,04
	Ordem Variável					
	25°C	30°C	37°C	25°C	30°C	37°C
CH/TPP	0,009	0,01	0,03	0,006	0,01	0,03
CH/CIT	0,02	0,02	0,4	0,08	0,02	2
CH/APTES	0,02	0,06	0,01	0,02	0,09	0,005

Como é possível observar na Tabela 09, os desvios padrão e os chi-quadrados são pequenos, indicando uma ótima concordância entre os valores experimentais e calculados. Estes resultados de desvio padrão e chi-quadrado mostraram que o modelo de ordem variada apresentou a melhor correlação entre os valores experimentais e teóricos, sendo assim o modelo que melhor ajusta os resultados obtidos.

5.8.3.4. Modelo de Morris-Weber

Geralmente, vários mecanismos podem influenciar a cinética de sorção, incluindo difusão externa do adsorbato, difusão de camada limite e difusão intrapartícula do adsorbato [108]. Assim, com o objetivo de avaliar o processo de difusão através da membrana e de difusão intrapartícula, que podem ser importantes no controle da velocidade de sorção, foi utilizado o modelo de Morris-Weber [105]. Este modelo permite identificar a presença de difusão intrapartícula.

A equação de Morris-Weber é descrita na equação 19:

$$q_t = K_{dif} t^{1/2} + C \quad \text{eq. 19}$$

Onde:

K_{dif} é a constante cinética de difusão intrapartícula.

C é a constante relacionada com a magnitude da camada de resistência à difusão.

q_t é a quantidade adsorvida de proteína em determinado tempo.

q_e é a quantidade de proteína adsorvida no equilíbrio.

Foram traçados os gráficos q_t *versus* $t^{1/2}$ para cada temperatura e membrana estudadas e a partir dos coeficientes angular e linear foi possível obter os valores dos parâmetros cinéticos k_{dif} e C . Os gráficos para o modelo de Morris-Weber são apresentados nas Figuras a seguir. A Tabela 10 apresenta os valores de K_{dif} e C obtidos para cada temperatura e membrana estudadas. Foram traçados os gráficos q_t *versus* $t^{1/2}$ para cada temperatura estudada e a partir dos coeficientes angular e linear foi possível obter os valores dos parâmetros cinéticos k_{dif} e C .

Nas Figuras 59 e 60 são apresentados os gráficos referentes a aplicação do modelo de Morris-Weber para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) na membrana de quitosana reticulada com citrato (CH/CIT), a 25°C, 30°C e 37°C.

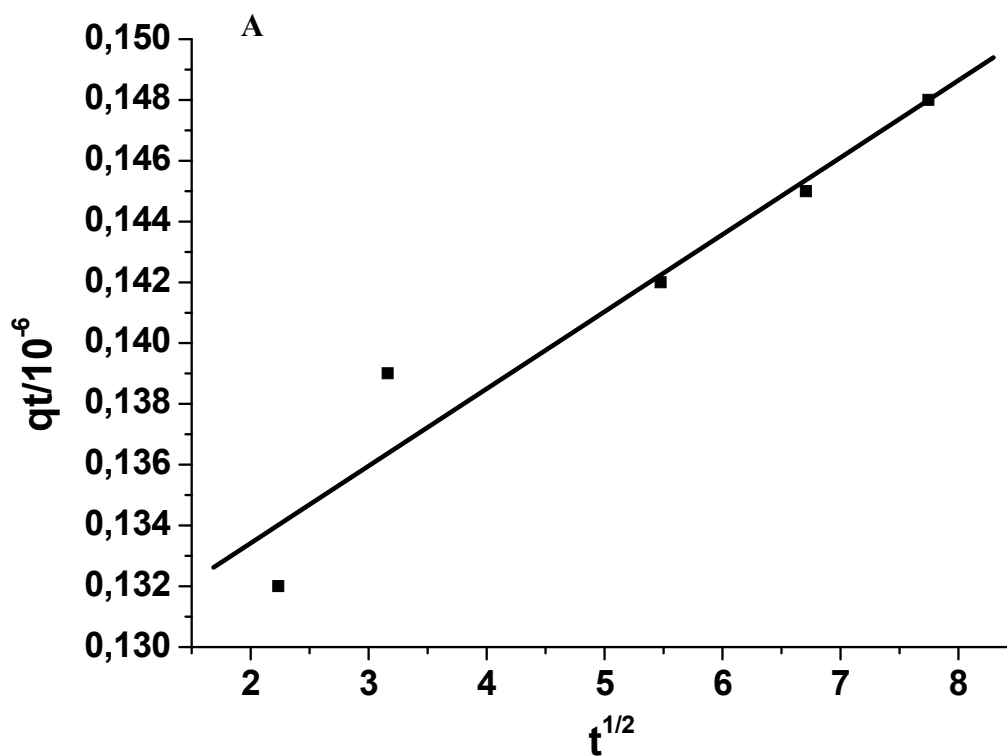


Figura 59: Gráficos referentes ao modelo de Morris-Weber para a membrana de quitosana reticulada com citrato (CH/CIT), 25°C.

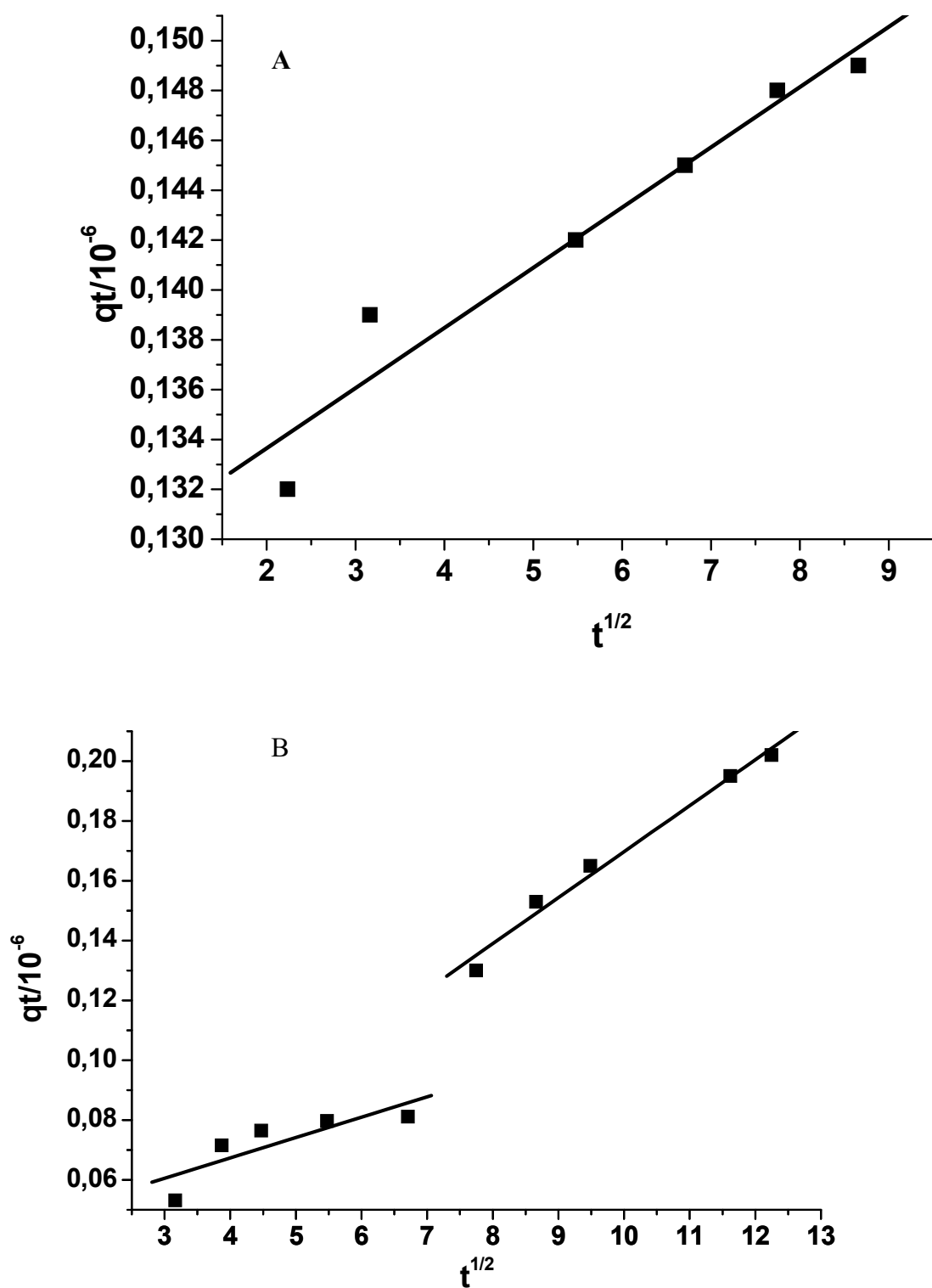


Figura 60: Gráficos referentes ao modelo de Morris-Weber para a membrana de quitosana reticulada com citrato (CH/CIT): (A) 30°C e (B) 37°C.

Nas Figuras 61 e 62 são apresentados os gráficos referentes a aplicação do modelo de Morris-Weber para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) na membrana de quitosana reticulada com tripolifosfato (CH/TPP), a 25°C, 30°C e 37°C.

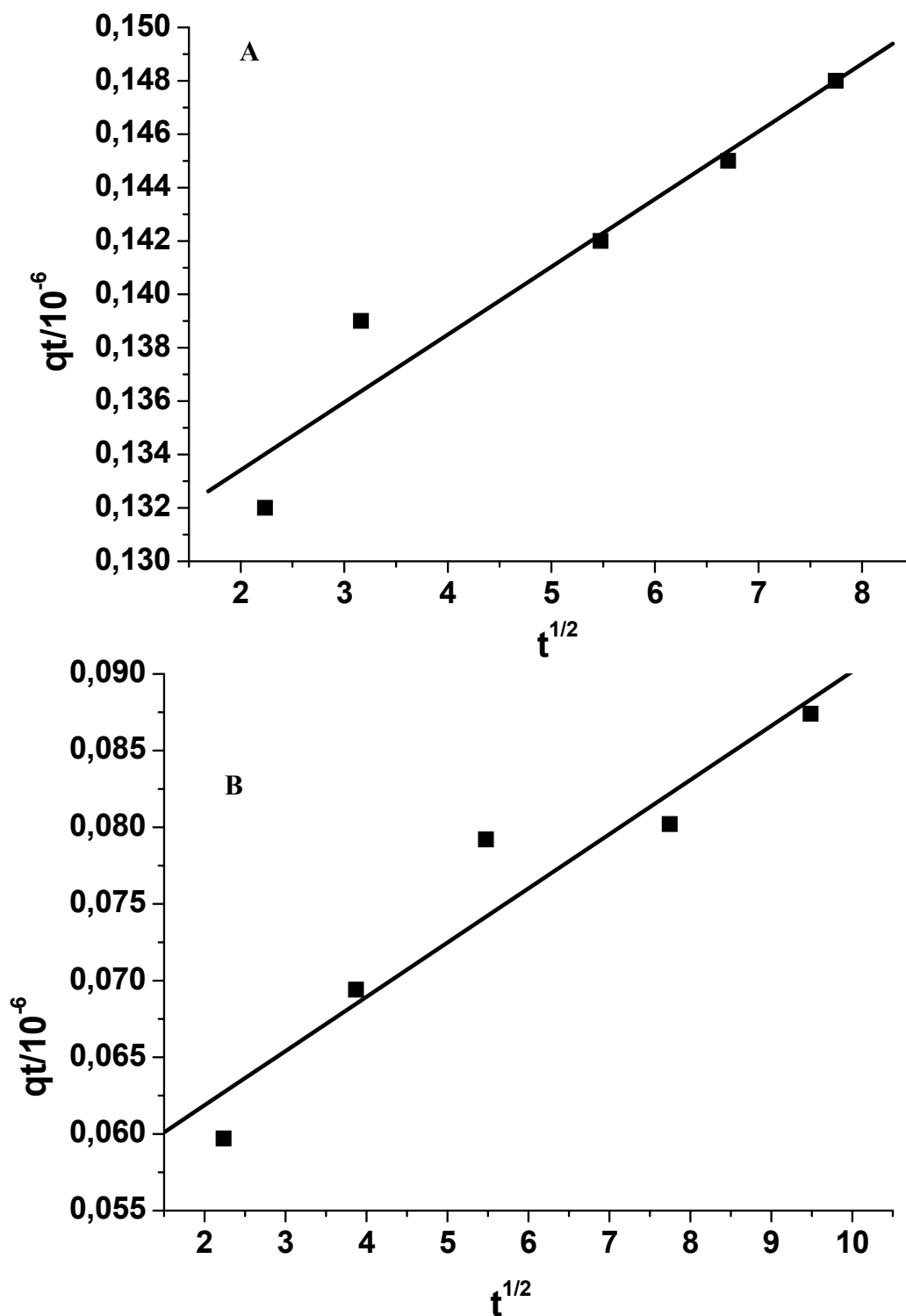


Figura 61: Gráficos referentes ao modelo de Morris-Weber para a membrana de quitosana reticulada com tripolifosfato (CH/TPP): (A) 25°C e (B) 30°C.

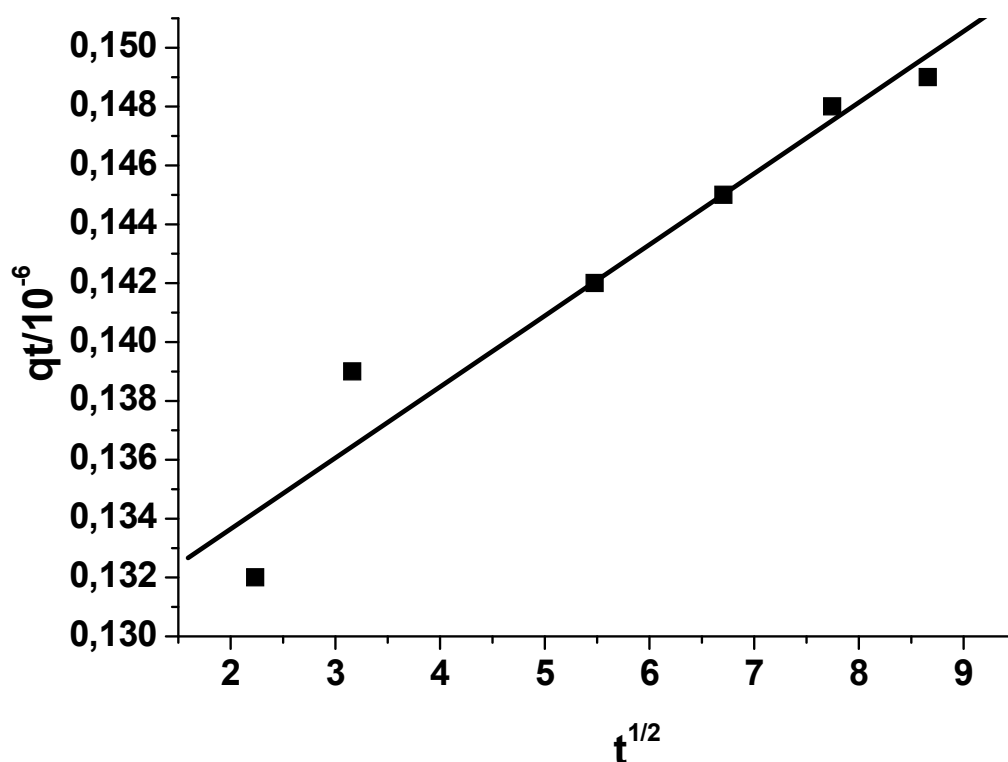


Figura 62: Gráficos referentes ao modelo de Morris-Weber para a membrana de quitosana reticulada com tripolifosfato (CH/TPP), 37°C.

Nas Figuras 63 e 64 são apresentados os gráficos referentes a aplicação do modelo de Morris-Weber para a sorção da albumina do soro bovino (BSA) na membrana de quitosana modificada com APTES (CH/Add/APTES): a 25°C, 30°C e 37°C.

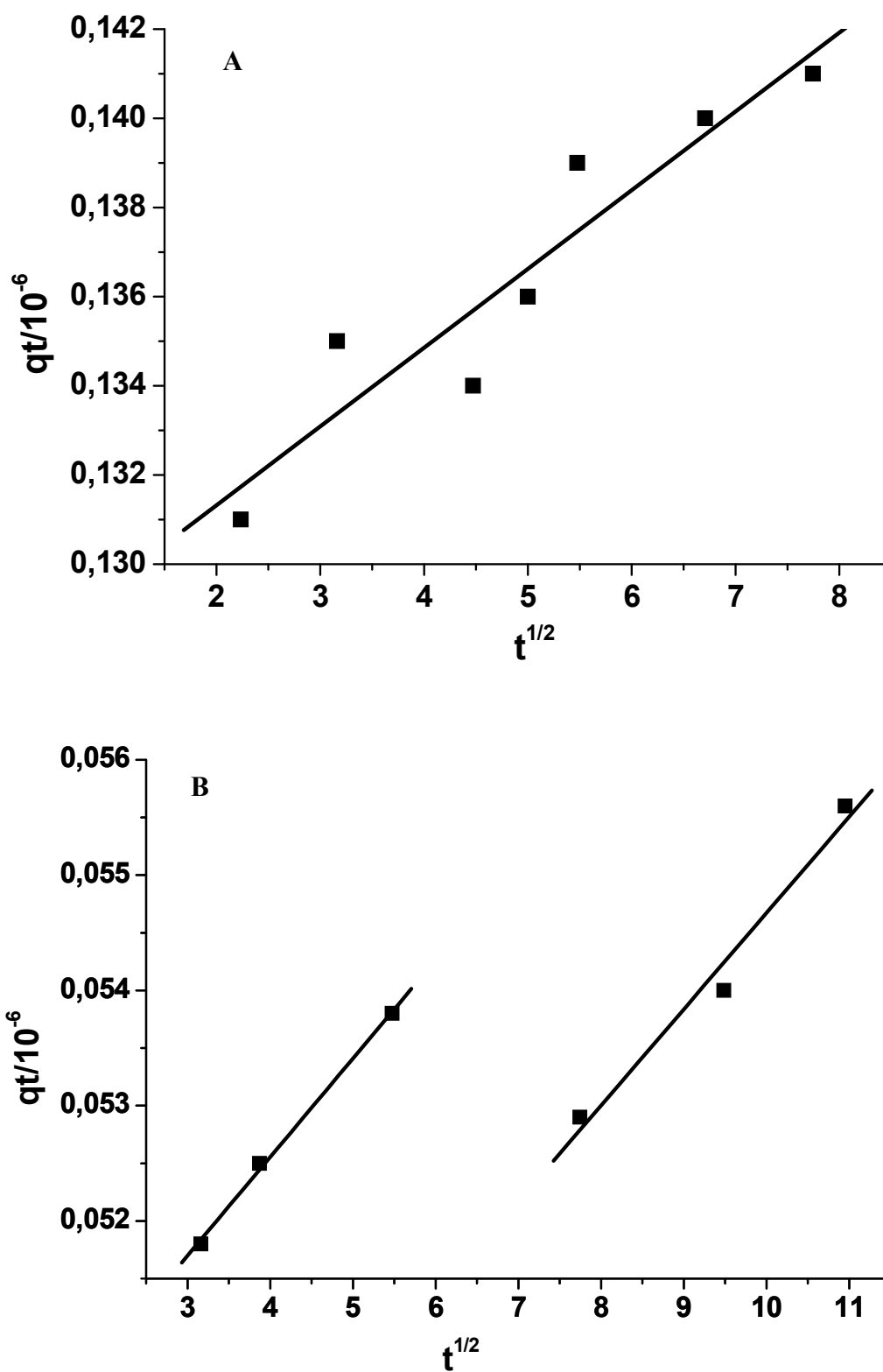


Figura 63: Gráficos referentes ao modelo de Morris-Weber para a membrana de quitosana modificada com APTES (CH/Add/APTES): (A) 25°C e (B) 30°C

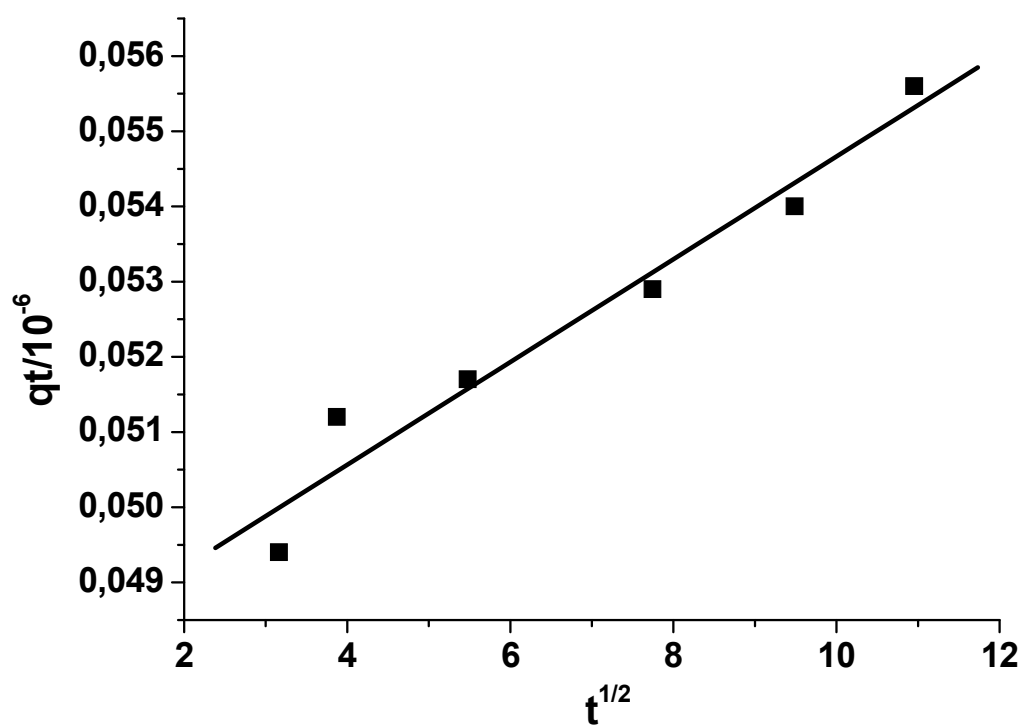


Figura 64: Gráfico referente ao modelo de Morris-Weber para a membrana de quitosana modificada com APTES (CH/Add/APTES), 37°C.

Tabela 10: Dados dos parâmetros cinéticos do modelo de Morris-Weber, difusão intrapartícula.

Adsorvente	Temperaturas (°C)	$k_{dif}/10^{-8}$ (mol.g⁻¹.min^{-1/2})	C/10⁻⁶	R²
CH/Add/APTES	25	1,77	1,28	0,94
	30	0,85	0,49	0,99
	30	0,83	0,46	0,99
	37	0,68	0,48	0,98
CH/TPP	25	2,54	1,28	0,96
	30	2,42	1,29	0,97
	37	3,54	0,55	0,96
CH/CIT	25	6,51	3,36	0,94
	30	1,44	1,18	0,95
	37	6,81	0,40	0,83
	37	15,4	0,16	0,99

Foi observado que os valores de C estão próximos de zero, na ordem de 10^{-6} , sugerindo que o mecanismo de interação preponderante é a difusão intrapartícula, porém esse mecanismo pode não ser o único existente. Nas temperaturas de 30 °C e 37°C, para as membranas CH/Add/APTES e CH/TPP, respectivamente foram observados dois mecanismos de difusão da proteína na membrana.

Os valores das constantes cinéticas de difusão intrapartícula diminuem com o aumento da temperatura no caso da membrana CH/Add/APTES. Já para as membranas CH/TPP e CH/CIT não foi observada uma tendência nos valores das

constantes. Nessas membranas, os menores valores dessa constante foram observados a 30°C.

6. Conclusão

Neste trabalho foram sintetizadas e caracterizadas membranas de quitosana modificadas. As caracterizações das membranas mostraram diferenças entre elas, assim confirmando sua modificação.

Foi observado que o processo de adsorção da proteína albumina de soro bovino ocorreu nas três membranas de quitosana estudadas. Alguns modelos cinéticos foram utilizados para avaliar os dados obtidos, sendo os modelos de pseudo de segunda ordem e de ordem variada foram os que melhores descreveram o processo de adsorção. Contudo, pelos dados estatísticos obtidos (desvio padrão e chi-quadrado), o modelo de ordem cinética variável foi o que melhor descreveu os processos de sorção, apresentando os menores valores de desvio-padrão e chi-quadrado. O modelo de Morris-Weber sugeriu que o mecanismo de interação preponderante é a difusão intrapartícula, porém esse mecanismo pode não ser o único existente para todas as membranas. Nas temperaturas de 30°C e 37°C, para as membranas CH/Add/APTES e CH/TPP, respectivamente, foram observados dois mecanismos de difusão da proteína na membrana.

A partir desse trabalho, nota-se que os materiais preparados e estudados apresentam bons potenciais para serem utilizados em processos no futuro, os quais requeiram interação com proteínas.

7. Perspectivas para continuação do trabalho

- Realizar teste de biocompatibilidade para verificar a possibilidade de uso farmacêutico da membrana.
- Determinar os dados termodinâmicos para os processos de sorção.
- Realizar os experimentos de sorção em outras temperaturas.

8. Referências

- [1] KAUR, P., CHOUDHARY, A., THAKUR, R., "Synthesis of Chitosan-Silver Nanocomposites and their Antibacterial Activity," *International Journal of Scientific & Engineering Research*, v. 4, n. 4, pp. 869–872, 2013.
- [2] MUZZARELLI, R. A. A., "Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids," *Carbohydrate Polymers*, v. 77, n. 1, pp. 1–9, 2009.
- [3] HU, C., DENG, Y., HU, H., *et al*, "Adsorption and intercalation of low and medium molar mass chitosans on/in the sodium montmorillonite," *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 92, pp. 1191–1196, 2016.
- [4] FONSECA-SANTOS, B., CHORILLI, M., "An overview of carboxymethyl derivatives of chitosan: Their use as biomaterials and drug delivery systems," *Materials Science and Engineering C*, v. 77, pp. 1349–1362, 2016.
- [5] VOGLER, E. A., "Protein adsorption in three dimensions," *Biomaterials*, vol. 33, n. 5, pp.1201–1237, 2012.
- [6] SCHÖTTLER, S. *et al.*, "Protein adsorption is required for stealth effect of poly(ethylene glycol)- and poly(phosphoester)- coated nanocarriers," *Nature Nanotechnology*, v. 11, n. 4, pp. 372–377, 2016.
- [7] KIM, J., QIAN, W., AL-SAIGH, Z. Y., "Measurements of water sorption enthalpy on polymer surfaces and its effect on protein adsorption," *Surface Science*, v. 605, n. 3–4, pp. 419–423, 2011.
- [8] SEN GUPTA, S., BHATTACHARYYA, K. G., "Kinetics of adsorption of metal ions on inorganic materials: A review," *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 162, n. 1–2, pp. 39–58, 2011.

- [9] QIU, H., LV, L., PAN, B., *et al*, “Critical review in adsorption kinetic models,” *Journal of Zhejiang University SCIENCE A*, v. 10, n. 5, pp. 716–724, 2009.
- [10] HO, Y. S., MCKAY, G., “Pseudo-second order model for sorption processes,” *Process Biochemistry*, v. 34, n. 5, pp. 451–465, 1999.
- [11] HO, Y. S., “Citation review of Lagergren kinetic rate equation on adsorption reactions,” *Scientometrics*, v. 59, n. 1, pp. 171–177, 2004.
- [12] POOTS, V. J. P., MCKAY, G., HEALY, J. J., “The removal of acid dye from effluent using natural adsorbents. I. Peat,” *Water Research*, v. 10, n. 12, pp. 1061–1066, 1976.
- [13] HO, Y. S., NG, J. C. Y., MCKAY, G., “Kinetics of pollutant sorption by biosorbents: Review,” *Separation and Purification Methods*, v. 29, n. 2, pp. 189–232, 2000.
- [14] MUZZARELLI, R. A. A., BOUDRANT, J., MEYER, D., *et al*, “Current views on fungal chitin/chitosan, hulman chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial,” *Carbohydrate Polymers*, v. 87, n. 2, pp. 995–1012, 2012.
- [15] DREWNOWSKA, O., TUREK, B., CARSTANJEN, B., “Chitosan-a promising biomaterial in veterinary medicine,” *Polish Journal of Veterinary Sciences*, v. 16, n. 4, pp. 843–848, 2013.
- [16] B. BOCCHINI, “<http://imirante.com/brasil/noticias/2015/01/11/pesquisadores-brasileiros-desenvolvem-plastico-filme-comestivel.shtml>,” 2015.
- [17] CAMPANA-FILHO, S. P., SIGNINI, R., “Efeito de Aditivos na Desacetilação de Quitina,” *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 11, n. 4, pp. 169–173, 2001.

- [18] SILVA, R. C., ANDRADE JR, M. A. S., CESTARI, A. R., "Adsorção de Cr(VI) em esferas reticuladas de quitosana – novas correlações cinéticas e termodinâmicas utilizando microcalorimetria isotérmica contínua," *Química Nova*, v. 33, n. 4, pp. 880–884, 2010.
- [19] CESTARI, A. R., VIEIRA, E. F. S., SILVA, R. C., *et al*, "Direct determinations of energetic parameters at chitosan/Cr(VI) interfaces by means of immersion heat-conduction microcalorimetry," *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 352, n. 2, pp. 491–497, 2010.
- [20] BALÁZS, N., SIPOS, P., "Limitations of pH-potentiometric titration for the determination of the degree of deacetylation of chitosan," *Carbohydrate Research*, v. 342, n. 1, pp. 124–130, 2007.
- [21] DIMZON, I. K. D., KNEPPER, T. P., "Degree of deacetylation of chitosan by infrared spectroscopy and partial least squares," *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 72, pp. 939–945, 2015.
- [22] DOS SANTOS, Z. M., CARONI, L. P. F., PEREIRA, M. R., *et al*, "Determination of deacetylation degree of chitosan: a comparison between conductometric titration and CHN elemental analysis," *Carbohydrate Research*, v. 344, n. 18, pp. 2591–2595, 2009.
- [23] JIANG, X., CHEN, L., ZHONG, W., "A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan," *Carbohydrate Polymers*, v. 54, n. 4, pp. 457–463, 2003.
- [24] HOVEN, V. P., TANGPASUTHADOL, V., ANGKITPAIBOON, Y., *et al*, "Surface-charged chitosan: Preparation and protein adsorption," *Carbohydrate Polymers*, v. 68, n. 1, pp. 44–53, 2007.

- [25] PARK, J. W., CHOI, K-H, PARK, K. K., "Acid-base equilibria and related properties of chitosan," *Bulletin Korean Chemical Society*, v. 4, n. 2, pp. 68–72, 1983.
- [26] METAXA, A.-F., EFTHIMIADOU, E. K., KORDAS, G., "Synthesis of colloidal delivery vehicles based on modified polysaccharides for biomedical applications," *Colloid and Interface Science Communications*, v. 13, pp. 14–18, 2016.
- [27] SALEHI, E., DARAEI, P., SHAMSABADI, A. A., "A review on chitosan-based adsorptive membranes," *Carbohydrate Polymers*, v. 152, pp. 419–432, 2016.
- [28] MOHAMMADTAGHU, R. M. V., "Application of chitosan and its derivatives as adsorbents for dye removal from water and wastewater," *Carbohydrate Polymers*, v. 113, pp. 115–130, 2014.
- [29] LI, X., NAN, K., CHEN, H., XU, Y., "Preparation and characterization of chitosan nanopores membranes for the transport of drugs," *International Journal of Pharmaceutics*, v. 420, n. 2, pp. 371–377, 2011.
- [30] FULGÊNCIO, G. O., VIANA, F. A. B., RIBEIRO, R. R., *et al.*, "New Mucoadhesive Chitosan Film for Ophthalmic Drug Delivery of Timolol Maleate: In Vivo Evaluation," *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, v. 28, n. 4, pp. 350–358, 2012.
- [31] JOSUÉ, A., LARANJEIRA, M. C. M., FÁVERE, V. T., *et al.*, "Liberação controlada da eosina impregnada em microesferas de copolímero de quitosana e poli(ácido acrílico)," *POLÍMEROS*, v. 10, n. 3, pp. 116–121, 2000.
- [32] KIM, U., RO, Y., HO, T., *et al.*, "Protein adsorption of dialdehyde cellulose-crosslinked chitosan with high amino group contents," *Carbohydrate Polymers*,

v. 163, pp. 34–42, 2017.

- [33] YAHYAEI, M., MEHRNEJAD, F., NADERI-MANESH, H., et al, "Protein adsorption onto polysaccharides: Comparison of chitosan and chitin polymers," *Carbohydrate Polymers*, v. 191, n. March, pp. 191–197, 2018.
- [34] YE, N., XIE, Y., SHI, P., et al, "Synthesis of magnetite/graphene oxide/chitosan composite and its application for protein adsorption," *Materials Science and Engineering: C*, v. 45, pp. 8–14, 2014.
- [35] PŘICHYSTALOVÁ, H. et al., "Synthesis, characterization and antibacterial activity of new fluorescent chitosan derivatives," *International Journal of Biological Macromolecules.*, v. 65, pp. 234–240, 2014.
- [36] LÓPEZ-PÉREZ, P. M., MARQUES, A. P., DA SILVA, R. M. P., et al., "Effect of chitosan membrane surface modification via plasma induced polymerization on the adhesion of osteoblast-like cells," *Journal of Materials Chemistry*, v. 17, n. 38, p. 4064, 2007.
- [37] KAMIYA, Y., YAMAZAKI, K., OGINO, T., "Protein adsorption to graphene surfaces controlled by chemical modification of the substrate surfaces," *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 431, pp. 77–81, 2014.
- [38] BAUER, F., SAUERLAND, V., ERNST, H., et al, "Preparation of scratch- and abrasion-resistant polymeric nanocomposites by monomer grafting onto nanoparticles, 4a: Application of MALDI-TOF mass spectrometry to the characterization of surface modified nanoparticles," *Macromolecular Chemistry and Physics*, v. 204, n. 3, pp. 375–383, 2003.

- [39] PIRK, S. et al., "Chitosan-silane sol-gel hybrid thin films with controllable layer thickness and morphology," *Carbohydrate Polymers*, v. 93, n. 1, pp. 285–290, 2013.
- [40] AISSAOUI, N., BERGAOUI, L., LANDOULSI, J., et al, "Silane Layers on Silicon Surfaces: Mechanism of Interaction, Stability, and Influence on Protein Adsorption," *Langmuir*, v. 28, n. 1, pp. 656–665, 2012.
- [41] SARDON, H., IRUSTA, L., FERNÁNDEZ-BERRIDI, M. J., et al, "Synthesis of room temperature self-curable waterborne hybrid polyurethanes functionalized with (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES)," *Polymer*, v. 51, n. 22, pp. 5051–5057, 2010.
- [42] CHRISTOPH, S., FERNANDES, F. M., CORADIN, T., "Immobilization of Proteins in Biopolymer-Silica Hybrid Materials: Functional Properties and Applications," *Current Organic Chemistry*, v. 19, n. 17, p. 1669–1676., 2015.
- [43] WANG, G. H., ZHANG, L. M., "A biofriendly silica gel for in situ protein entrapment: Biopolymer-assisted formation and its kinetic mechanism," *Journal of Physical Chemistry B*, v. 113, n. 9, pp. 2688–2694, 2009.
- [44] MA, J., ZHANG, M., LU, L., et al, "Intensifying esterification reaction between lactic acid and ethanol by pervaporation dehydration using chitosan-TEOS hybrid membranes," *Chemical Engineering Journal*, v. 155, n. 3, pp. 800–809, 2009.
- [45] PARK, S. B., YOU, J. O., PARK, H. Y., et al, "A novel pH-sensitive membrane from chitosan - TEOS IPN; preparation and its drug permeation characteristics," *Biomaterials*, v. 22, n. 4, pp. 323–330, 2001.
- [46] LIU, Y. L., SU, Y. H., LAI, J. Y., "In situ crosslinking of chitosan and formation of chitosan-silica hybrid membranes with using γ -glycidoxypopyltrimethoxysilane as a crosslinking agent," *Polymer*, v. 45, n. 20, pp. 6831–6837, 2004.

- [47] HONARY, S., HOSEINZADEH, B., SHALCHIAN, P., "The effect of polymer molecular weight on citrate crosslinked chitosan films for site-specific delivery of a non-polar drug," *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 9, n. June, pp. 525–531, 2010.
- [48] GHOSH, P. et al., "Covalent cross-links in polyampholytic chitosan fibers Enhances bone regeneration in a rabbit model," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, v. 125, pp. 160–169, 2015.
- [49] KORNBERG, A., RAO, N. N., AULT-RICHÉ, D., "Inorganic polyphosphate a molecule of many functions," *Annu. Rev. Biochem.*, v. 68, pp. 89–125, 1999.
- [50] KULAEV, I., KULAKOVSKAYA, T., "Polyphosphate and Phosphate Pump," *Energy Source*, pp. 709–734, 2000.
- [51] NGAH, W. S. W., FATINATHAN, S., "Adsorption characterization of Pb(II) and Cu(II) ions onto chitosan-tripolyphosphate beads: Kinetic, equilibrium and thermodynamic studies," *Journal of Environmental Management*, v. 91, n. 4, pp. 958–969, 2010.
- [52] ANTONIOU, J., LIU, F., MAJEED, H., *et al*, "Physicochemical and morphological properties of size-controlled chitosan – tripolyphosphate nanoparticles," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 465, pp. 137–146, 2015.
- [53] MA, S., CHEN, Z., QIAO, F., *et al*, "Guided bone regeneration with tripolyphosphate cross-linked asymmetric chitosan membrane," *Journal of Dentistry*, v. 42, n. 12, pp. 1603–1612, 2014.

- [54] SARKAR, S. D., FARRUGIA, B. L., DARGAVILLE, T. R., *et al*, "Physico-chemical/biological properties of tripolyphosphate cross-linked chitosan based nanofibers," *Materials Science and Engineering: C*, v. 33, n. 3, pp. 1446–1454, 2013.
- [55] CHEN, F., ZHANG, Z. R., HUANG, Y., "Evaluation and modification of N-trimethyl chitosan chloride nanoparticles as protein carriers," *International Journal of Pharmaceutics*, v. 336, n. 1, pp. 166–173, 2007.
- [56] BHAKTA, S. A., EVANS, E., BENAVIDEZ, T. E., *et al*, "Protein adsorption onto nanomaterials for the development of biosensors and analytical devices: A review," *Analytica Chimica Acta*, v. 872, pp. 7–25, 2015.
- [57] H. & F. CHAMPE, *Bioquímica Ilustrada*, 3° edição. Porto Alegre, 2006.
- [58] NOBLE, L., GRAY, A. I., SADIQ, L., *et al*, "A non-covalently cross-linked chitosan-based hydrogel," *International Journal of Pharmaceutics*, v. 192, n. 2, pp. 173–182, 1999.
- [59] MAHDAVINIA, G. R., ETEMADI, H., "Surface modification of iron oxide nanoparticles with κ-carrageenan/carboxymethyl chitosan for effective adsorption of bovine serum albumin," *Arabian Journal of Chemistry*, 2015.
- [60] CHINNATHAMBI, S., KARTHIKEYAN, S., VELMURUGAN, D., *et al*, "Effect of Moderate UVC Irradiation on Bovine Serum Albumin and Complex with Antimetabolite 5-Fluorouracil: Fluorescence Spectroscopic and Molecular Modelling Studies," *International Journal of Spectroscopy*, v. 2015, pp. 1–12, 2015.
- [61] BAKI, E., NALAN, O., "Human Serum Albumin (HSA) Adsorption with Chitosan," *Journal of Applied Polymer Science*, v. 86, pp. 3035–3039, 2002.
- [62] BALAN, V., VERESTIUC, L., "Strategies to improve chitosan hemocompatibility: A review," *European Polymer Journal*, v. 53, n. 1, pp. 171–188, 2014.

- [63] KOPPOLU, B. P., SMITH, S. G., RAVINDRANATHAN, S., *et al*, "Controlling chitosan-based encapsulation for protein and vaccine delivery," *Biomaterials*, v. 35, n. 14, pp. 4382–4389, 2014.
- [64] JULIA, M., MAHL, C. R. A., BEPPU, M. M., *et al*, "Synthesis and characterization of chitosan membranes functionalized with amino acids and copper for adsorption of endoglucanase," *Powder Technology*, v. 315, pp. 250–257, 2017.
- [65] KIM, U. J., LEE, Y. R., KANG, T. H., *et al*, "Protein adsorption of dialdehyde cellulose-crosslinked chitosan with high amino group contents," *Carbohydrate Polymers*, v. 163, pp. 34–42, 2017.
- [66] ZHAO, Y., MA, L., ZENG, R., *et al*, "Preparation, characterization and protein sorption of photo-crosslinked cell membrane-mimicking chitosan-based hydrogels," *Carbohydrate Polymers*, v. 151, pp. 237–244, 2016.
- [67] ZHANG, D.-H., *et al*, "Effects of different spacer arms on Cibacron Blue modification and protein affinity adsorption on magnetic microspheres," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 133, pp. 136–143, 2016.
- [68] Wagener, V., Boccaccini, A. R., Virtanen, S., "Protein-adsorption and Ca-phosphate formation on chitosan-bioactive glass composite coatings," *Applied Surface Science*, v. 416, pp. 454–460, 2017.
- [69] ENAYATPOUR, B., RAJABI, M., YARI, M., *et al*, "Adsorption/desorption study of proteins onto multi-walled carbon nanotubes and amino multi-walled carbon nanotubes surfaces as adsorbents," *Journal of Molecular Liquids*, v. 231, pp. 566–571, 2017.
- [70] SARKAR, D., CHATTORAJ, D. K., "Activation Parameters for Kinetics of Protein Adsorption at Silica-Water Interface," *Journal of Colloid Interface Science*, v. 157, n. 1, pp. 219–226, Apr. 1993.

- [71] PIERÓG, M., GIERSEWSKA-DRÓŻYŃSKA, M., OSTROWSKA-CZUBENKO, J.,
“Effect of ionic crosslinking agents on swelling behavior of chitosan hydrogel
membranes,” *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its.*, v. XIV,
pp. 75–82, 2009.
- [72] MODRZEJEWSKA, Z., “Characterization of Water State in Chitosan Hydrogel
Membranes,” *Polish Chitin Society*, v. XI, pp. 49–60, 2006.
- [73] MA, J., SAHAI, Y., BUCHHEIT, R. G., “Evaluation of multivalent phosphate cross-
linked chitosan biopolymer membrane for direct borohydride fuel cells,” *Journal
of Power Sources*, v. 202, pp. 18–27, 2012.
- [74] TAN, S. C., KHOR, E., TAN, T. K., *et al*, “The degree of deacetylation of chitosan:
Advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of determination,”
Talanta, v. 45, n. 4, pp. 713–719, 1998.
- [75] GÖKTEPE, F., ÇELİK, S. Ü., BOZKURT, A., “Preparation and the proton
conductivity of chitosan/poly(vinyl phosphonic acid) complex polymer
electrolytes,” *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 354, n. 30, pp. 3637–3642,
2008.
- [76] FLOATE, S., HOSSEINI, M., ARSHADI M. R., *et al*, “An in-situ infrared
spectroscopic study of the adsorption of citrate on Au(111) electrodes,” *Journal
of Electroanalytical Chemistry*, v. 542, pp. 67–74, 2003.
- [77] CHEN, J. H., LIU, Q. L., ZHANG, X. H., *et al*, “Pervaporation and characterization
of chitosan membranes cross-linked by 3-aminopropyltriethoxysilane,” *Journal
of Membrane Science*, v. 292, pp. 125–132, 2007.

- [78] SILVA, S. S., OLIVEIRA, J. M., BENESCH, J., "Hybrid biodegradable membranes of silane-treated chitosan/soy protein for biomedical applications," *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, pp. 1 – 13, 2013.
- [79] HE, X., DU, M., LI, H., *et al*, "Removal of direct dyes from aqueous solution by oxidized starch cross-linked chitosan/silica hybrid membrane," *International journal of biological macromolecules*, 2015.
- [80] TRUJILLO, S., PÉREZ-ROMÁN, E., KYRITSIS, A., *et al*, "Organic-inorganic bonding in chitosan-silica hybrid networks. Physical properties.," *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*, v. 53, pp. 1391–1400, 2015.
- [81] VAKILI, M., RAFATULLAH, M., SALAMATINIA, B., *et al*, "Elimination of reactive blue 4 from aqueous solutions using 3-aminopropyl triethoxysilane modified chitosan beads," *Carbohydrate Polymers*, v. 132, pp. 89–96, 2015.
- [82] JAWORSKA, M., SAKURAI, K., GAUDON, P., *et al*, "Influence of chitosan characteristics on polymer properties. I: Crystallographic properties," *Polymer International*, v. 52, n. 2, pp. 198–205, 2003.
- [83] FOCHER, B., BELTRAME, P. L., NAGGI, A., *et al*, "Alkaline N-deacetylation of chitin enhanced by flash treatments. Reaction kinetics and structure modifications," *Carbohydrate Polymers*, v. 12, n. 4, pp. 405–418, 1990.
- [84] SILVA, S. S. *et al*., "Functional nanostructured chitosan–siloxane hybrids," *Journal of Materials Chemistry*, v. 15, n. 35–36, p. 3952, 2005.
- [85] TUAL, C., ESPUCHE, E., ESCOUBES, M., *et al*, "Transport properties of chitosan membranes: Influence of crosslinking," *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*, v. 38, n. 11, pp. 1521–1529, 2000.

- [86] RITTHIDEJ, G. C., PHAECHAMUD, T., KOIZUMI, T., "Moist heat treatment on physicochemical change of chitosan salt films," *International Journal of Pharmaceutics*, v. 232, pp. 11–22, 2002.
- [87] LUDWICZAK, S., MUCHA, M., "Modeling of water sorption isotherms of chitosan blends," *Carbohydrate Polymers*, v. 79, n. 1, pp. 34–39, 2010.
- [88] GOCHO, H., SHIMIZU, H., TANIOKA, A., *et al*, "Effect of polymer chain end on sorption isotherm of water by chitosan," *Carbohydrate Polymers*, v. 41, n. 1, pp. 87–90, 2000.
- [89] PANDIS, C., MADEIRA, S., MATOS, J., *et al*, "Chitosan-silica hybrid porous membranes," *Materials Science and Engineering: C*, v. 42, pp. 553–561, 2014.
- [90] AL-SAGHEER, F., MUSLIM, S., "Thermal and mechanical properties of chitosan/SiO₂ hybrid composites," *Journal of Nanomaterials*, v. 2010, 2010.
- [91] SILVA, G. S., OLIVEIRA, P. C., GIORDANI, D. S., *et al*, "Chitosan/Siloxane Hybrid Polymer: Synthesis, Characterization and Performance as a Support for Immobilizing Enzyme," *Journal of Brazilian Chemistry Society*, v. 22, n. 8, pp. 1407–1417, 2011.
- [92] Kittur, F. S., Prashanth, K. V. H., Sankar, K. U. *et al*, "Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry," *Carbohydrate Polymers*, v. 49, n. 2, pp. 185–193, 2002.
- [93] NETO, C. G. T., GIACOMETTI, J. A., JOB, A. E., *et al*, "Thermal Analysis of Chitosan Based Networks," *Carbohydrate Polymers*, v. 62, pp. 97–103, 2005.
- [94] SALAM, A., PAWLAK, J. J., VENDITTI, R. A., *et al*, "Synthesis and characterization of starch citrate-chitosan foam with superior water and saline absorbance properties," *Biomacromolecules*, v. 11, n. 6, pp. 1453–1459, 2010.

- [95] ZHANG, J., ZHANG, Z., SONG, Y., *et al*, "Bovine serum albumin (BSA) adsorption with Cibacron Blue F3GA attached chitosan microspheres," *Reactive and Functional Polymers*, v. 66, n. 9, pp. 916–923, 2006.
- [96] WANG, Z., YAN, Y., QIAO, L., "Protein adsorption on implant metals with various deformed surfaces," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, v. 156, pp. 62–70, 2017.
- [97] CHANG, S.-H., CHIAN, C.-H., "Plasma surface modification effects on biodegradability and protein adsorption properties of chitosan films," *Applied Surface Science*, v. 282, pp. 735–740, 2013.
- [98] DEPAN, D., MISRA, R. D. K., "The interplay between nanostructured carbon grafted chitosan scaffolds and protein adsorption on the cellular response of osteoblasts: Structure-function property relationship," *Acta Biomaterialia*, v. 9, n. 4, pp. 6084–6094, 2013.
- [99] S. T. Ohnishi and J. K. Barr, "A simplified method of quantitating protein using the biuret and phenol reagents," *Analytical Biochemistry*, v. 86, n. 1, pp. 193–200, 1978.
- [100] Zaia, D. A. M., Thaïs, C., Zaia, B. V., "Determinação de Proteínas Totais Via Espectrofotometria: Vantagens e Desvantagens dos Métodos Existentes," *Química Nova*, v. 21, n. 6, pp. 787–793, 1998.
- [101] Wang, Z., Yue, T., Yuan, Y., *et al*, "Kinetics of adsorption of bovine serum albumin on magnetic carboxymethyl chitosan nanoparticles," *International journal of biological macromolecules*, v. 58, pp. 57–65, 2013.
- [102] NGAH, W. S. W., GHANI, S. AB, KAMARI, A., "Adsorption behaviour of Fe(II) and Fe(III) ions in aqueous solution on chitosan and cross-linked chitosan beads," *Bioresource Technology*, v. 96, n. 4, pp. 443–450, 2005.

- [103] HO, G., MCKAY, Y. S., "The Kinetics of sorption of basic dyes from aqueous solution by Sphagnum moss peat," *Canadian J. Chem. Eng.*, v. 76, p. 822, 1998.
- [104] Yang, J. M., Tsai, R. Z., Hsu, C. C., "Protein adsorption on polyanion/polycation layer-by-layer assembled polyelectrolyte films," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, v. 142, pp. 98–104, 2016.
- [105] HO, Y. S., MCKAY, G., "Sorption of dye from aqueous solution by peat," *Chemical Engineering Journal*, v. 70, n. 2, pp. 115–124, 1998.
- [106] CESTARI, A. R., VIEIRA, E. F. S., VIEIRA, G. S., *et al*, "The removal of anionic dyes from aqueous solutions in the presence of anionic surfactant using aminopropylsilica-A kinetic study," *Journal of Hazardous Materials*, v. 138, n. 1, pp. 133–141, 2006.
- [107] SAHNOUN, S., BOUTAHALA, M., "Adsorption removal of tartrazine by chitosan/polyaniline composite: Kinetics and equilibrium studies," *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 114, n. 2017, pp. 1345–1353, 2018.
- [108] YAO, Y., XU, F., CHEN, M., *et al*, "Adsorption behavior of methylene blue on carbon nanotubes," *Bioresource Technology*, v. 101, n. 9, pp. 3040–3046, 2010.
- [109] LALHMUNSIAMA, LALCHHINGPUII, NAUTIYAL, B.P., *et al*, "Silane grafted chitosan for the efficient remediation of aquatic environment contaminated with arsenic(V)," *Journal of Colloid Interface Science*, v. 467, pp. 203–212, 2016.
- [110] CHEN, S., YUE, Q., GAO, B., *et al*, "Equilibrium and kinetic adsorption study of the adsorptive removal of Cr(VI) using modified wheat residue," *Journal of Colloid Interface Science*, v. 349, n. 1, pp. 256–264, 2010.

- [111] EESHWARASINGHE, D., LOGANATHAN, P., KALARUBAN, M., *et al*,
“Removing polycyclic aromatic hydrocarbons from water using granular
activated carbon: kinetic and equilibrium adsorption studies,” *Environmental
Science and Pollution Research*, v. 25, pp. 13511–13524, 2018.
- [112] CESTARI, A. R., VIEIRA, E. F. S., ALVES, F. J., *et al*., “A novel and efficient
epoxy/chitosan cement slurry for use in severe acidic environments of oil wells-
Structural characterization and kinetic modeling,” *Journal of Hazardous
Materials*, v. 213–214, pp. 109–116, 2012.
- [113] DOTTO, G. L., VIEIRA, M. L. G., PINTO, L. A. A., “Kinetics and mechanism of
tartrazine adsorption onto chitin and chitosan,” *Industrial and Engineering
Chemistry Research*, v. 51, n. 19, pp. 6862–6868, 2012.

Anexo I

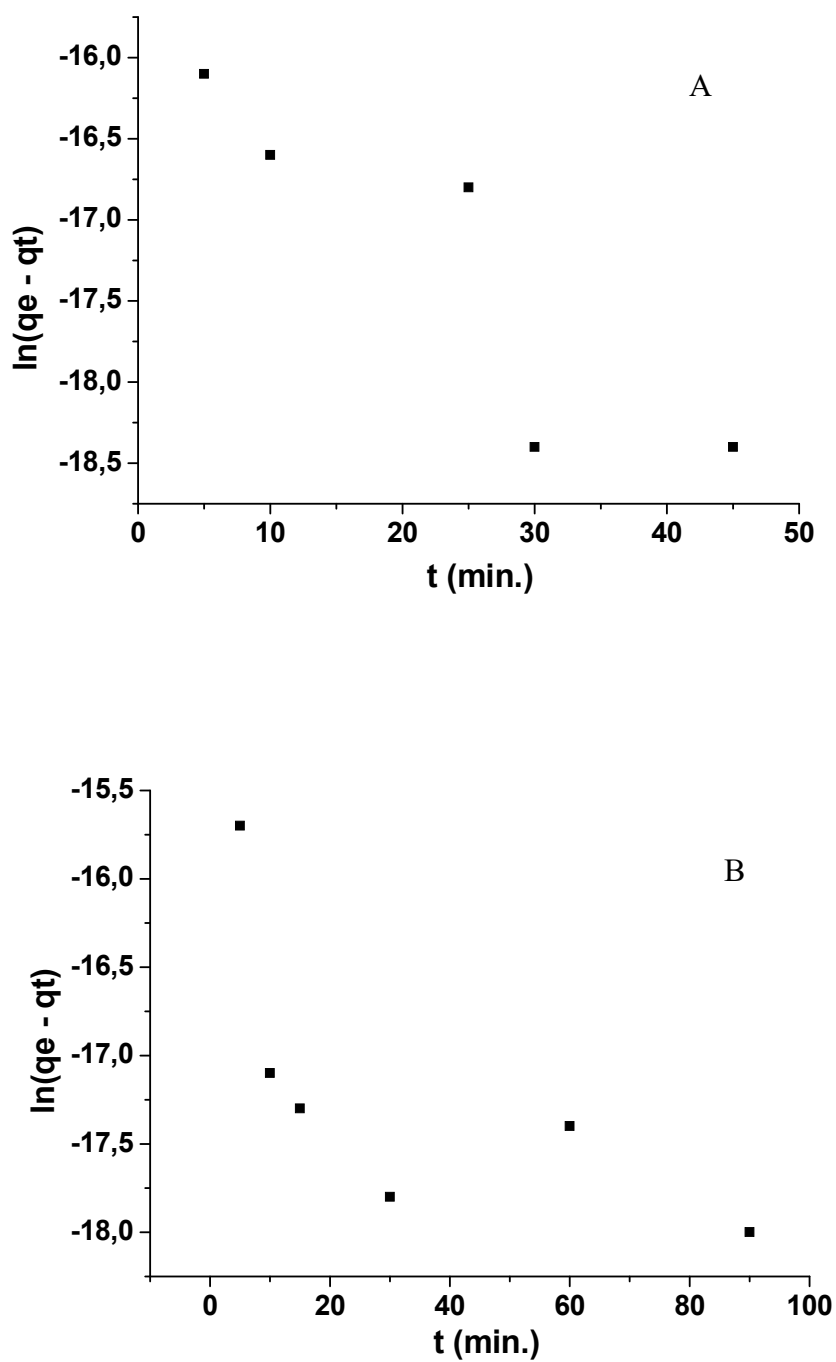


Figura 65: Gráficos referentes ao modelo de pseudo primeira ordem para a membrana de quitosana modificada com APTES (CH/Add/APTES): (A) 25°C e (B) 30°C.

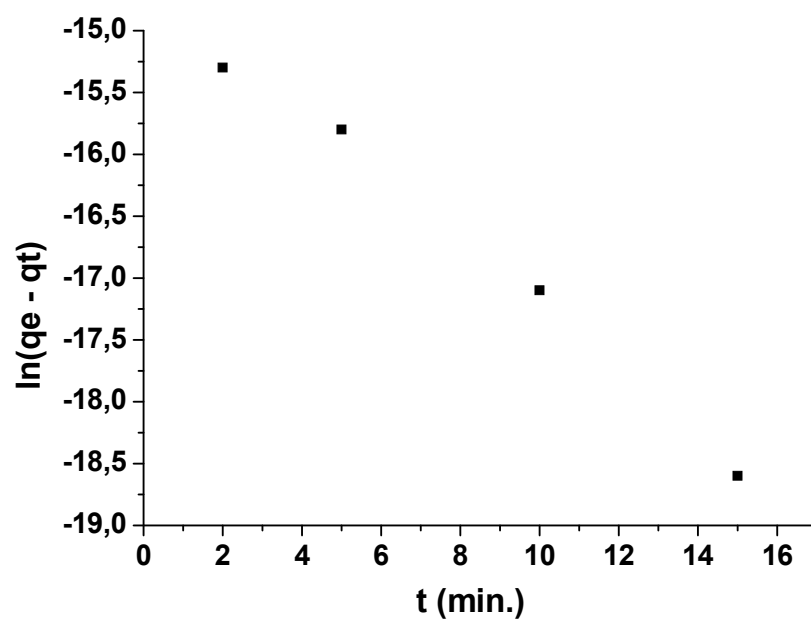


Figura 66: Gráficos referentes ao modelo de pseudo primeira ordem para a membrana de quitosana modificada com APTES (CH/Add/APTES), a 37°C.

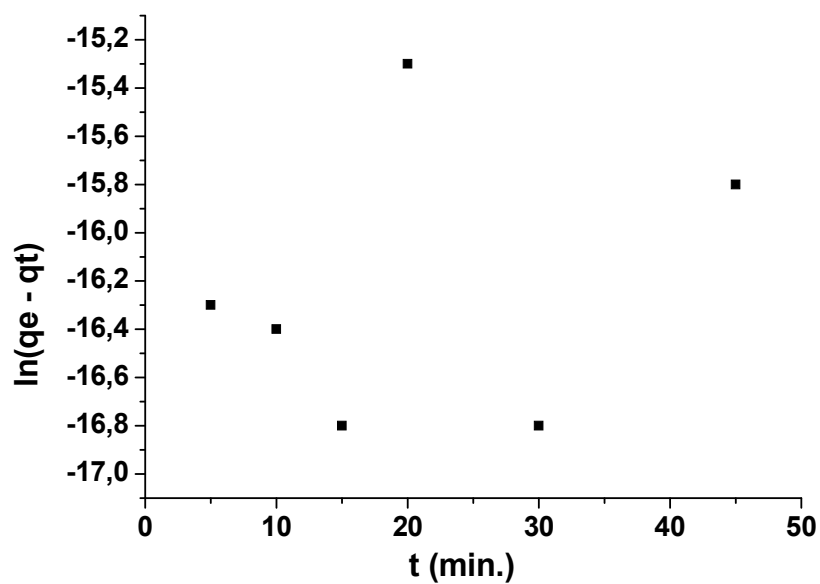


Figura 67: Gráficos referentes ao modelo de pseudo primeira ordem para a membrana de quitosana reticulada com tripolifosfato (CH/TPP), 25°C.

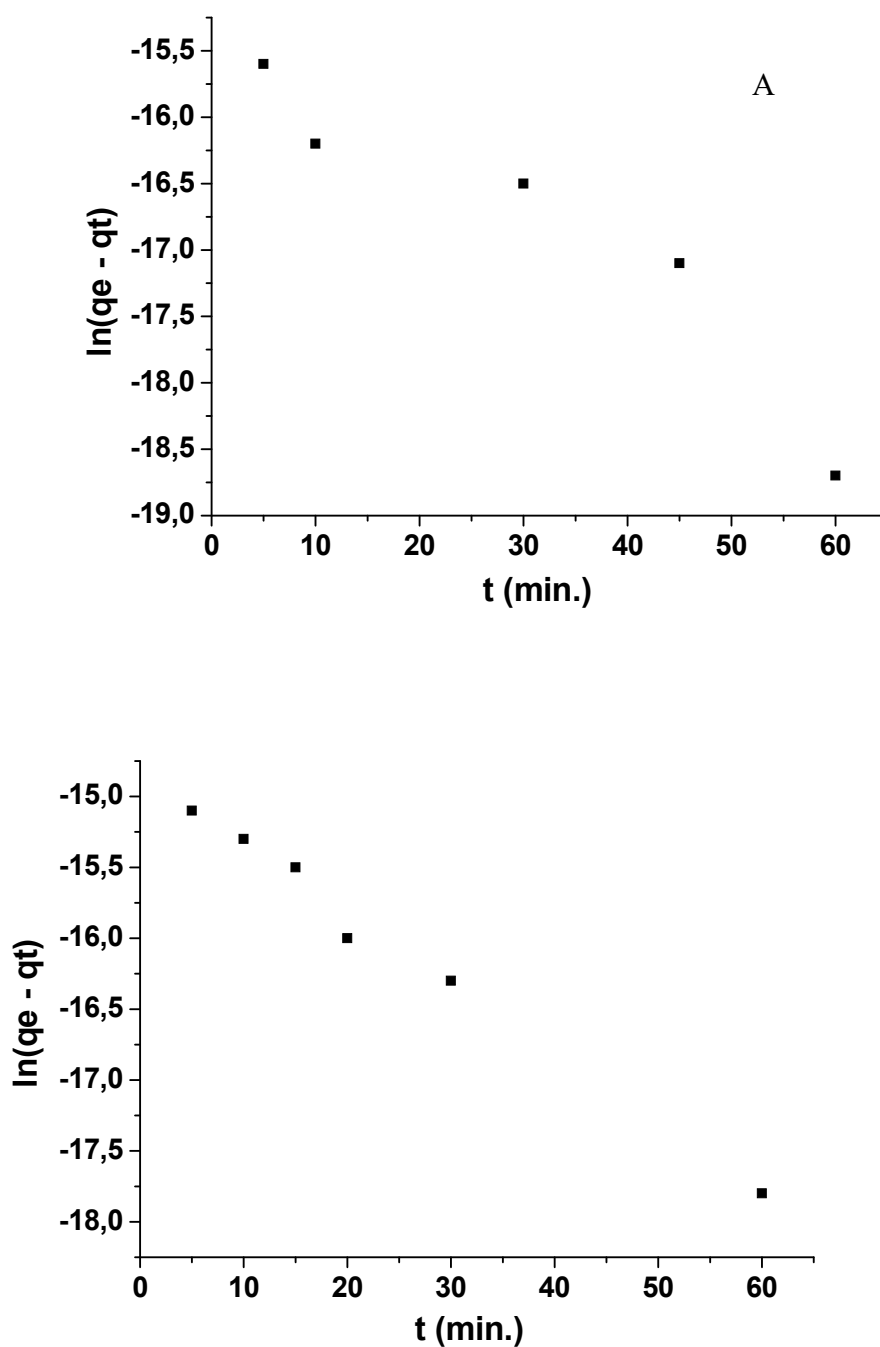


Figura 68: Gráficos referentes ao modelo de pseudo primeira ordem para a membrana de quitosana reticulada com tripolifosfato (CH/TPP): (A) 30°C e (B) 37°C.

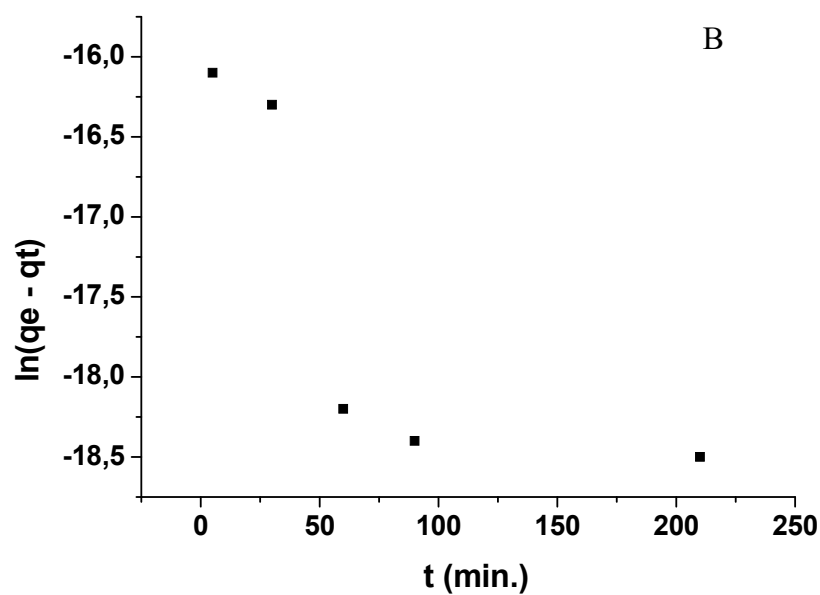
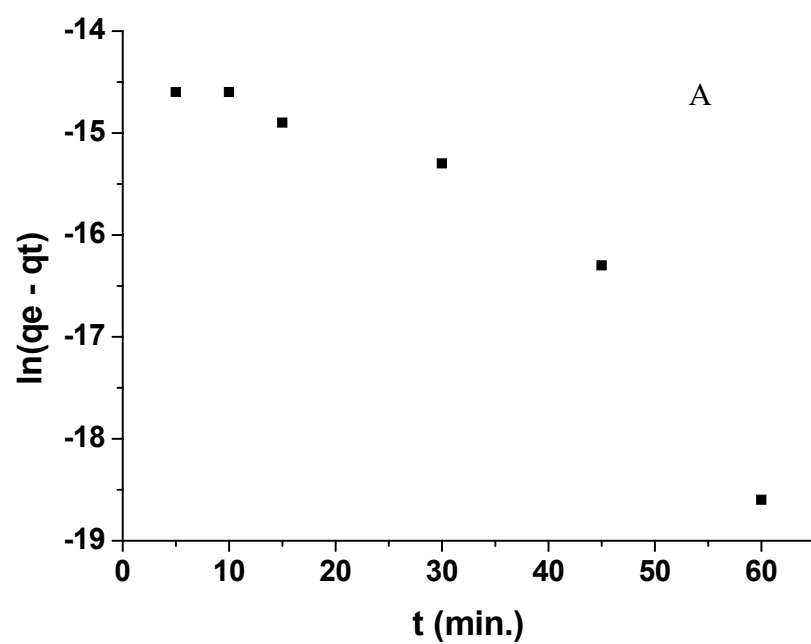


Figura 69: Gráficos referentes ao modelo de pseudo primeira ordem para a membrana de quitosana reticulada com citrato (CH/CIT): (A) 25°C e (B) 30°C.

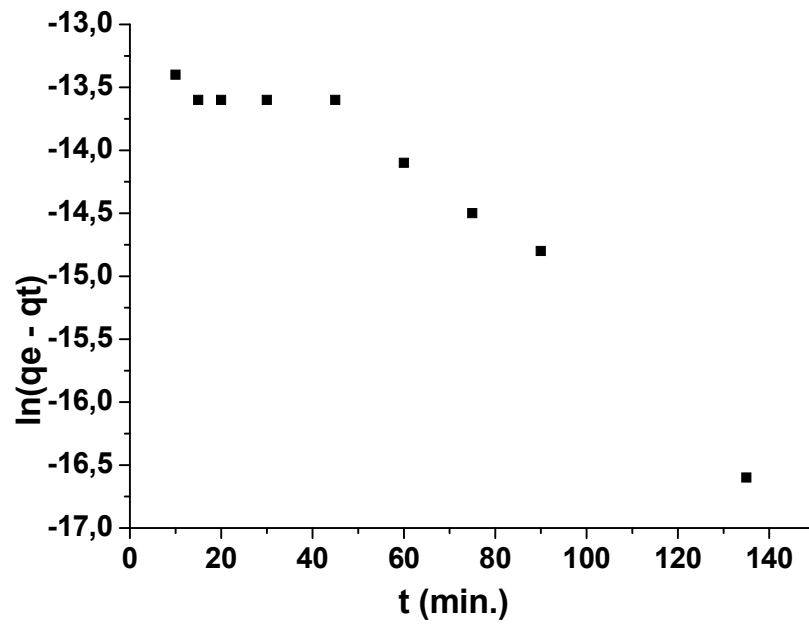


Figura 70: Gráficos referentes ao modelo de pseudo primeira ordem para a membrana de quitosana reticulada com citrato (CH/CIT): (A) 37°C.