

AGATHA MERILIN DE OLIVEIRA LOPES

**LIBERAÇÃO CONTROLADA DE COMPLEXO DE COBRE (II) COM EDTA DE
MATRIZES DE QUITOSANA E DE ÁGAR**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Agroquímica, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

L8641
2015
Lopes, Agatha Merilin de Oliveira, 1990-
Liberção controlada de complexo de cobre (II) com EDTA de
matrizes de quitosana e de ágar / Agatha Merilin de Oliveira Lopes. -
Viçosa, MG, 2015.
xiv, 76f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: André Fernando de Oliveira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.61-76.

1. Cobre. 2. Biopolímeros. 3. Ligante (Química). 4. Quitosana. 5.
Ágar. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Química.
Programa de Pós-graduação em Agroquímica. II. Título.

CDD 22. ed. 669.3

AGATHA MERILIN DE OLIVEIRA LOPES

**LIBERAÇÃO CONTROLADA DE COMPLEXO DE COBRE (II) COM EDTA DE
MATRIZES DE QUITOSANA E DE ÁGAR**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Agroquímica, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 26 de Fevereiro de 2015.

José Humberto de Queiroz

Carlos Roberto Bellato

Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz
(Coorientadora)

Antônio Augusto Neves
(Coorientador)

André Fernando de Oliveira
(Orientador)

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Maria José e Elair, e ao Adriadson;
por todo amor e dedicação.*

“Muitas pessoas tem a ideia errada sobre o que constitui a verdadeira felicidade. Ela não é alcançada por autogratificação mas por fidelidade a um propósito que valha a pena.”

(Hellen Keller)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora, por dar a perseverança, a esperança e a fé diante dos problemas encontrados.

À minha mãe, por todo seu esforço e amor; ao meu pai, pelo seu apoio e carinho; aos meus queridos sobrinhos e irmãos, companheiros pra toda a vida.

Ao Adriadson, pela amizade, amor e paciência. Por sempre acreditar em mim e permanecer ao meu lado.

Aos amigos pela presença e convivência em todas as etapas da minha caminhada, em especial a Valquíria e a Yara, pela ajuda no momento difícil, à Camila, por fazer eu acreditar e ao Marciano por todo apoio.

Ao Prof. André Fernando, pela orientação e a oportunidade, à Prof. Maria Eliana e o Prof. Antônio Augusto pela coorientação, pelos ensinamentos e receptividade.

Aos amigos do LAQUA pela boa convivência, em especial ao Luiz Felipe e Francielle, por serem meus irmãos quando mais precisei, e à Nivia, Bethânia, Cyntia, pela amizade; e ao Dudu, pela suporte e disponibilidade.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial o Departamento de Química, pela estrutura para poder realizar este curso e este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1. Introdução.....	1
2. Justificativa	7
3. Objetivos.....	8
CAPÍTULO 2. LIBERAÇÃO CONTROLADA DE Cu(II)-EDTA A PARTIR DA MATRIZ ÁGAR	9
1. Introdução.....	9
2. Materiais e métodos.....	13
2.1. Soluções.....	13
2.1.1. <i>Solução complexo de Cu (II)-EDTA</i>	13
2.1.2. <i>Solução Tampão Acetato 0,001 mol L⁻¹</i>	14
2.1.3. <i>Solução Tampão TRIS 0,001 mol L⁻¹</i>	14
2.2. <i>Pellets de ágar</i>	14
2.3. Liberação controlada do complexo complexo de cobre (II)-EDTA a partir de pellets de ágar	15
2.4. Determinação de cobre por Espectrofotometria de Absorção Atômica ..	15
2.5. Tratamento dos Dados	16
3. Resultados e discussão	16
3.1. Determinação de complexo Cu (II)-EDTA por espectrofotometria de absorção atômica	16

3.2. Estudo da liberação de complexo Cu (II)-EDTA a partir da matriz ágar .	17
4. Conclusão	25
CAPÍTULO 3. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE RETICULAÇÃO DE QUITOSANA	26
1. Introdução	26
2. Materiais e métodos.....	30
2.1. Soluções.....	30
2.1.1. <i>Solução ácido acético</i>	30
2.1.2. <i>Solução hidróxido de sódio</i>	30
2.1.3. <i>Solução ácido clorídrico</i>	30
2.1.4. <i>Soluções de glutaraldeído</i>	31
2.2. Esferas de quitosana	31
2.3. Reticulação das esferas de quitosana com glutaraldeído	31
2.4. Determinação do grau de reticulação por titulação potenciométrica	31
2.5. Determinação semiquantitativa do grau de reticulação por FT-IR.....	32
3. Resultados e discussão	32
3.1. Titulação Potenciométrica	32
3.2. Determinação de glutaraldeído.....	36
3.3. Método semiquantitativo por espectrofotometria no infravermelho	41
4. Conclusão	46
CAPÍTULO 4. LIBERAÇÃO CONTROLADA DE Cu(II)-EDTA A PARTIR DA MATRIZ QUITOSANA	47
1. Introdução	47
2. Materiais e Métodos.....	49
2.1. Soluções.....	49
2.1.1. <i>Solução complexo de cobre (II)-EDTA</i>	49
2.1.2. <i>Solução Tampão Acetato 0,001 mol L⁻¹</i>	49

2.1.3. Solução Tampão TRIS 0,001 mol L ⁻¹	50
2.2. Liberação controlada do complexo a partir de esferas de quitosana.....	50
3. Resultados e discussão	50
3.1. Liberação controlada de Cu (II)-EDTA a partir da matriz quitosana	50
4. Conclusão.....	57
CAPÍTULO 5. CONCLUSÃO GERAL E SUGESTÕES PARA ETAPAS	
FUTURAS	59
CONCLUSÃO GERAL	59
SUGESTÕES PARA ETAPAS FUTURAS	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do EDTA na forma totalmente protonada	4
Figura 2. Estrutura do complexo Cu (II)-EDTA.....	5
Figura 3. Diagrama de distribuição de espécies para EDTA (A), destacando a forma logarítmica da fração de equilíbrio (B).....	5
Figura 4. Estrutura química da ágar: constituído principalmente por agarose e a agaropectina.....	13
Figura 5. Curvas analíticas para Cu (II), Cu (II) _{acidificado} e Cu (II)-EDTA para comparação da comportamento da análise por FAAS	16
Figura 6. <i>Pellets</i> de ágar com arestas de 10 mm com teor de ágar 3% (m/m).17	
Figura 7. Curvas de liberação de Cu (II)-EDTA a partir da matriz ágar. Ajuste dos modelos cinéticos: (A) pseudo primeira-ordem; (B) difusão intrapartícula; (C) Noyes-Whitney; (D) forma linearizada pseudo-segunda ordem.....	19
Figura 8. Principais padrões observados em Gráfico dos Resíduos (a) falta de ajuste do modelo, (b) presença de <i>outlier</i> , (c) presença de heterocedastidade, (d) falta de ajuste do modelo (e) comportamento adequado (homocedastidade e distribuição normal) (adaptado de RIBEIRO <i>et al.</i> , 2008).	20
Figura 9. Comparação dos resíduos entre os modelos cinéticos para o experimento 3.....	21
Figura 10. Gráficos de Resíduo do modelo cinético de Noyes-Whitney para os experimentos do planejamento fatorial 2 ³	22
Figura 11. Gráfico de Pareto de efeitos e significâncias para o planejamento fatorial 2 ³ para liberação de Cu (II)-EDTA a partir da matriz ágar relacionado à concentração de equilíbrio, C _{eq} do modelo de Noyes-Whitney	22
Figura 12. Gráfico de Pareto de efeitos e significâncias para o planejamento fatorial 2 ³ para liberação de Cu (II)-EDTA a partir da matriz ágar relacionado à constante cinética (k).	24
Figura 13. Estrutura química da quitosana (BEPPU <i>et al.</i> , 1999).....	27
Figura 14. Reticulação entre duas cadeias de quitosana usando glutaraldeído (VIEIRA, 2008).	29

Figura 15. Curva de titulação de $100,0 \pm 0,5$ mg de quitosana com NaOH $8,8$ mmol L ⁻¹ . Esferas de quitosana (A) sem reticulação e (B) com reticulação por glutaraldeído $31,5$ mmol L ⁻¹	33
Figura 16. Determinação do ponto de equivalência pelo método da 1° derivada com ajuste de Lorentz para: (A) quitosana não reticulada e (B), com quitosana reticulada com concentração de glutaraldeído de 63 mmol L ⁻¹	33
Figura 17. Grau de reticulação das esferas de quitosana determinado por titulação potenciométrica em função da concentração de glutaraldeído adicionado.....	35
Figura 18. Aspecto das esferas úmidas de quitosana (A) não reticulada e reticulada em concentrações de glutaraldeído: (B) $12,6$ mmol L ⁻¹ e (C) 630 mmol L ⁻¹	36
Figura 19. Espectros de absorção molecular no UV-visível de soluções de glutaraldeído. A seta mostra o sentido do aumento da concentração de glutaraldeído.....	37
Figura 20. Curva analítica para o glutaraldeído obtida em 234 nm.	37
Figura 21. Curva analítica para o glutaraldeído obtida em 298 nm.	38
Figura 22. Grau de reticulação das esferas de quitosana baseado no consumo de glutaraldeído.....	40
Figura 23. Espectros de FT-IR de transmitância de quitosana com diferentes graus de reticulação.	41
Figura 24. Comportamento da Absorbância corrigida no FT-IR para quitosana, com diferentes graus de reticulação, em função do número de onda, usando o número de onda $853,7$ cm ⁻¹ como referência.....	43
Figura 25. Comportamento da sensibilidade analítica para cada número de onda	44
Figura 26. Comportamento da função N9 para cada número de onda.....	45
Figura 27. Curva analítica do grau de reticulação pelo método semi-quantitativo FT-IR no número de onda	46
Figura 28. Diagrama esquemático da diferença entre os processos de absorção e de adsorção.....	47
Figura 29. Exemplos de perfis de liberação do complexo Cu(II)-EDTA a partir de quitosana Experimentos.....	52

Figura 30. Curva hipotética do perfil observado para a liberação do complexo	54
Figura 31. Gráfico de Pareto de efeitos e significâncias das variáveis estudadas no planejamento fatorial 2^4 sobre o <i>lag-time</i> da liberação controlada do complexo Cu (II)-EDTA a partir da matriz quitosana.	55
Figura 32. Gráfico de Pareto de efeitos e significâncias para o planejamento fatorial 2^4 para liberação de Cu (II)-EDTA a partir da matriz quitosana relacionado ao <i>tempo equilíbrio</i>	56
Figura 33. Gráfico de Pareto de efeitos e significâncias para o planejamento fatorial 2^4 para liberação de Cu (II)-EDTA a partir da matriz quitosana relacionado à capacidade máxima de liberação.	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros instrumentais utilizados na análise para determinação de Cu (II) por FAAS.....	15
Tabela 2. Parâmetros das curvas analíticas obtidas para soluções de Cu (II), de Cu(II) em meio ácido e de complexo Cu(II)-EDTA	17
Tabela 3. Matriz do planejamento fatorial 2^3 com ponto central em triplicata aplicada a liberação de Cu (II)-EDTA a partir da matriz ágar	18
Tabela 4. Fatores variados em 2 níveis no planejamento fatorial 2^3 com ponto central em triplicata aplicada a liberação de Cu (II)-EDTA a partir da matriz ágar	18
Tabela 5. Concentrações de saturação referente a liberação de Cu (II)-EDTA a partir da matriz ágar	23
Tabela 6. Valores de k e tempo de meia-vida para os ensaios de liberação de Cu (II)-EDTA a partir da matriz ágar.....	25
Tabela 7. Volumes de equivalência (V_1 e V_2) na titulação potenciométrica de $100,0 \pm 0,5$ mg de esferas de quitosana com NaOH $8,8 \text{ mmol L}^{-1}$, obtido pelo modelo de Lorentz, a diferença nos volumes de equivalência (ΔV) e a dosagem de grupos aminos livres ($-NH_2$) por massa de quitosana.	34
Tabela 8. Absorbância e concentração de glutaraldeído antes (C_a) e após (C_p) a reticulação de 4 g de esferas de quitosana.....	39
Tabela 9. Condições experimentais do Planejamento 2^4 para estudo da liberação de Cu (II)-EDTA a partir da matriz quitosana	51

LISTA DE ABREVIATURAS

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

FAAS – Espectrofotometria de absorção atômica com chama

FT-IR – Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier

LOD – limite de detecção

LOQ – limite de quantificação

UV/Vis- espectro eletromagnético da região das radiações ultravioleta e visível

RESUMO

LOPES, Agatha Merilin de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Liberação controlada de complexo de cobre (II) com EDTA de matrizes de quitosana e de ágar.** Orientador: André Fernando de Oliveira. Coorientadores: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz e Antônio Augusto Neves.

A liberação controlada do complexo de cobre (II) com EDTA em matrizes poliméricas é desejável pois permite a manutenção da concentração desse metal em uma faixa ótima por tempo prolongado, a partir de uma única aplicação. Isso possibilita a absorção mais eficiente desse metal por plantas (sem os problemas do excesso de ligante no meio). No presente trabalho foi realizado um estudo da liberação controlada do complexo $[\text{CuEDTA}]^{2-}$, em matrizes de ágar e de quitosana. A matriz contendo 1% de ágar, com arestas dos pellets de 5 mm em solução, sem o ajuste de força iônica, apresentou uma liberação de 97% em processo difusional explicado pelo modelo de Noyes-Whitney, que foi selecionado por análise dos resíduos. Através do planejamento fatorial 2^3 com ponto central, determinou que há uma influência significativa do teor de ágar sobre a concentração de saturação e do tamanho do pellets de ágar sobre à cinética de liberação e não há influência da força iônica. Na liberação de Cu (II)-EDTA a partir de matriz de quitosana foi determinado o grau médio de reticulação por titulação potenciométrica e pelo consumo de glutaraldeído determinado por espectrofotometria molecular. Além disso foi proposto um método semi-quantitativo por infravermelho (FT-IR), sendo a concentração de glutaraldeído de 630 mmol L^{-1} capaz de bloquear cerca de 80% dos grupos aminos disponíveis na quitosana. Foi verificada a influência do pH na adsorção e em solução, grau de reticulação e a força iônica externa sobre a liberação de Cu (II)-EDTA a partir da matriz quitosana através de um planejamento fatorial 2^4 com ponto central. A concentração de saturação foi significativamente influenciada pelo pH da solução e da adsorção, força iônica na solução, além da interação entre o grau de reticulação da quitosana e pH de adsorção e entre a força iônica e o pH de solução.

ABSTRACT

LOPES, Agatha Merilin de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2015. **Controlled release of copper (II) complex with EDTA from matrices chitosan and agar.** Adviser: André Fernando de Oliveira. Co-advisers: Maria Eliana Ribeiro Lopes de Queiroz and Antônio Augusto Neves.

The release of copper (II) complex with EDTA in polymeric matrices is desirable because it can allow the concentration's maintenance of this metal in an optimum range for a long time from a single application, enabling more efficient absorption of this metal by plants, without the problems of excess ligands in the system. In this present work, the Controlled release of copper (II) complex $[\text{CuEDTA}]^{2-}$ was studied in matrices of agar and chitosan. The matrix containing 1% of agar with pellets edges of 5 mm in solution, without the presence of ionic strength, showed 97% of release in diffusional process, explained in the Noyes-Whitney model that was selected by analysis of the waste. Through 2^3 factorial design with center point, it was determined that there is a significant influence of the agar content on the saturation concentration and the size of the pellets agar on the kinetics of release and there is no influence of ionic strength. In the Cu (II)-EDTA release from chitosan matrix, the average degree of reticulation was determined by potentiometric titration and the consumer glutaraldehyde was determined by molecular spectrophotometry, and it was proposed a semi-quantitative method using infrared (FT-IR). The glutaraldehyde concentration was 630 mmol L^{-1} . This concentration is capable to block about 80% of the available amino groups in chitosan. It was also verified the influence of pH on the adsorption and in solution, the degree of reticulation and the external ionic strength on the release of Cu (II)-EDTA from the chitosan matrix through a 2^4 factorial design with central point. The concentration of saturation was significantly influenced by the pH of the solution and the adsorption, by ionic strength in solution, and by the interaction between the degree of reticulation of chitosan and pH of adsorption and the ionic strength and pH release.

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO GERAL

1. Introdução

Os metais, principalmente aqueles de transição, são bons eletrófilos, formando complexos com ligantes que apresentam grupos nucleófilos, tais como carboxilatos e grupos amínicos, que, por sua vez atuam como pontos de coordenação.

Os metais podem estar na planta até uma concentração limite, a partir da qual a planta tem seus processos metabólicos prejudicados, podendo levá-la à morte. Diferente do que ocorre com a matéria orgânica, os metais não se decompõem se acumulam em níveis tróficos ameaçando a saúde de plantas e animais (SHENG *et al.*, 2004). Quando os metais essenciais (nutrientes e micronutrientes) se encontram abaixo de uma faixa de concentração ótima, caracteriza-se uma deficiência do metal na planta, que pode influenciar nos processos metabólicos. Acima da concentração limite esse metal torna-se tóxico.

Aproximadamente 1% do corpo de um ser humano adulto é composto de micronutrientes, entre esses estão os elementos traços que correspondem a quantidades menores que 0,01% da composição corporal (COZZOLINO, 1997; LIMA *et al.*, 2006).

O cobre é considerado um metal pesado (BAIRD, 1999, ainda que seja um termo em desuso atualmente), sendo reconhecido como micronutriente essencial desde 1928 quando foi comprovado sua importância, quando junto ao ferro, na prevenção da anemia (HART *et al.*, 1928). A importância biológica, funcional e estrutural do cobre em animais e humanos está relacionada com as funções metabólicas de enzimas cobre-dependentes - cuproenzimas, como por exemplo: citocromo c oxidase, superóxido dismutase citosólica, lisil oxidase, tirosinase, ceruloplasmina e dopamina β -hidroxilase (PEDROSA & COZZOLINO, 1999). A ceruloplasmina, por exemplo, é uma proteína que age na complexação de ferro (III) antes de sua incorporação na hemoglobina (HARRIS, 1994). Assim, na carência de cobre, a ceruloplasmina tem sua atividade significativamente diminuída, levando à anemia (HILL, 1970).

A influência mútua entre cobre e zinco é estudada devido à utilidade no tratamento de pacientes com doença de Wilson, pois o excesso de zinco diminui

a absorção do cobre (BREWER, 1990). O zinco também faz parte da estrutura das metaloenzimas, operando como cofator enzimático. Estas metaloenzimas estão envolvidas em diversas funções metabólicas (CHACÓN *et al.*, 1998). O excesso de zinco aumenta a síntese da metalotioneína, uma proteína que se liga a minerais, protegendo o organismo dos possíveis efeitos tóxicos dos mesmos (COUSINS, 1994.). A metalotioneína forma complexo mais estáveis com cádmio e cobre e menos com zinco, regulando a absorção de zinco ao nível do enterócito (COZZOLINO, 1997).

Os seres humanos são normalmente expostos ao cobre ao ingerir água e alimentos ou através do contato da pele com compostos contendo cobre (MOHAMMADIA *et al.*, 2009). Em grandes quantidades o cobre pode ser prejudicial, causando irritação do nariz e garganta, náuseas, vômitos, diarreia, danos ao fígado e rins (YAMINI *et al.*, 2004), além de levar a fraqueza, letargia, anorexia e lesão do trato gastrointestinal. Essa toxicidade em seres humanos é devido à afinidade do cobre com grupo tiol de muitas proteínas e enzimas, sendo associado a doenças como epilepsia, melanoma e artrite reumatoide, bem como à perda de paladar (SARGENTELLI, 1996). O teor máximo de cobre no qual há risco para a saúde humana e para o meio ambiente varia muito e depende da legislação de cada país (SEIDEL *et al.*, 2009).

De acordo com Decreto-Lei n.º 306/2007 do Ministério do Ambiente para a qualidade da água potável, o limite para o teor de cobre na água potável é de 2 ppm (BRASIL, 2007). A Agência Americana de Proteção ao Meio Ambiente (US Environmental Protection Agency) define a concentração máxima de cobre na água potável como 1,3 mg L⁻¹ (GUINESI *et al.*, 2007). As Dietary Reference Intakes (DRI) na mais recente revisão dos valores de recomendação de nutrientes e energia, adotados pelos Estados Unidos da América e Canadá, estabeleceu uma recomendação diária ideal para o cobre de 1,0 a 1,6 mg dia⁻¹ (PADOVANI *et al.*, 2006), sendo tolerável até 10 mg dia⁻¹ (ANDRADE *et al.*, 2004).

Nas plantas o cobre é um metal essencial envolvido em muitos processos fisiológicos, podendo existir como Cu (I) e Cu (II), fazendo parte da estrutura das proteínas reguladoras, participando do transporte fotossintético de elétrons, na

respiração mitocondrial, nas respostas ao estresse oxidativo, no metabolismo da parede celular e na sinalização hormonal (RAVEN *et al.*, 1999).

Apesar de ser classificado como micronutriente para as plantas (SODRÉ *et al.*, 2001) altas concentrações de cobre podem apresentar caráter tóxico (PEZZAROSSA *et al.*, 1990), causando clorose e necrose, nanismo, descoloração das folhas e inibição do crescimento da raiz (YRUELA, 2005), além de causar a deficiência de outros nutrientes essenciais através de interações antagônicas (KABATA-PENDIAS & PENDIAS, 1992).

A alface (*Latua sativa*), por exemplo, é altamente sensível às condições de baixos níveis de cobre disponível (HAVLIN *et al.*, 1999; PUGA *et al.*, 2010), suas folhas ficam compridas e com as bordas cloróticas, o crescimento é diminuído ocorrendo má-formação da cabeça (FERREIRA *et al.*, 2001). Já o excesso afeta vários processos bioquímicos e ocasiona distúrbios do metabolismo, resultando em inibição do crescimento, ou desenvolvimento anormal (FERNANDES & HENRIQUES, 1991). Para o cultivo hidropônico, a recomendação de cobre na solução nutritiva para hortaliças folhosas é de 20 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (FURLANI, 1998).

No solo, o cobre pode estar complexado com a fração orgânica e a inorgânica; podendo haver uma grande variedade de espécies químicas com esse metal, assim como compostos pouco solúveis. Assim, usualmente, a concentração na solução do solo é determinada pelo equilíbrio de precipitação do composto menos solúvel presente no sistema (SILVEIRA *et al.*, 1999). Atividades industriais, agrícolas e a disposição de rejeitos domésticos contribuem para a liberação de metais, como cobre, no meio ambiente (SPINELLI *et al.*, 2005). A retenção do cobre(II) também pode ocorrer por processos de adsorção envolvendo troca-iônica ou complexação (com a matéria orgânica e óxidos ou minerais presente no solo. A biodisponibilidade, portanto, é influenciada, além das condições para retenção do cobre (II) na fase sólida, também das condições da solução do solo, tais como o pH ou a presença de ligantes solúveis (CASALI, 2008; NOWACK, 2002).

A concentração média de cobre geralmente presente no solo é de 20 $\mu\text{g g}^{-1}$ com variações na faixa de 6 a 80 $\mu\text{g g}^{-1}$ (TAVARES & CARVALHO, 1992). Acima

do limite máximo da faixa de 60 a 125 $\mu\text{g g}^{-1}$ no solo e de 20 a 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ nas plantas são consideradas críticas (KABATA-PENDIAS & PENDIAS, 1992).

O uso de quelantes sintéticos para melhorar a absorção de metais pela planta é conhecido a muitas décadas, porém concentrações elevadas destes no meio pode apresentar efeitos deletérios (BRADY, 1979).

O ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) pode solubilizar metais, aumentando sua mobilidade no ambiente por facilitar sua solubilização. O EDTA é o representante mais conhecido e estudado entre os ligantes polidentados, sendo um ligante hexadentado, com 2 grupos amínicos e 4 grupos carboxílicos (Figura 1).

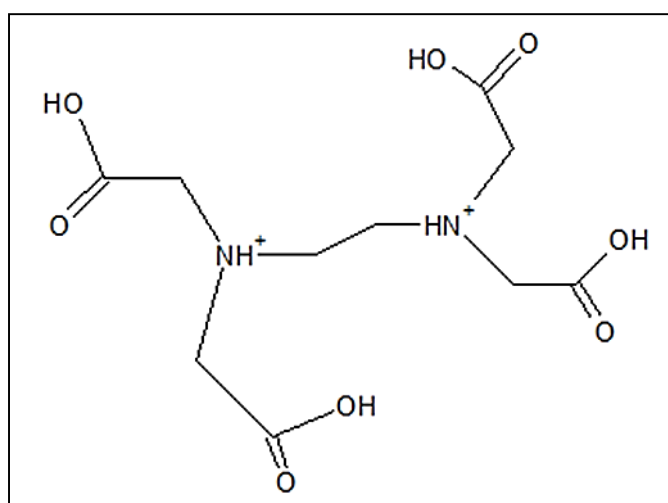


Figura 1. Estrutura química do EDTA na forma totalmente protonada ($\text{H}_6\text{EDTA}^{2+}$)

A forma completamente desprotonada (EDTA^{4-}) que age com ligante polidentado e, devido a presença dos grupos carboxilatos e aminas e ao efeito quelante, forma complexos muito estáveis com todos metais, a exceção dos metais alcalinos. A estrutura espacial do complexo de cobre(II) com EDTA é apresentada na Figura 2.

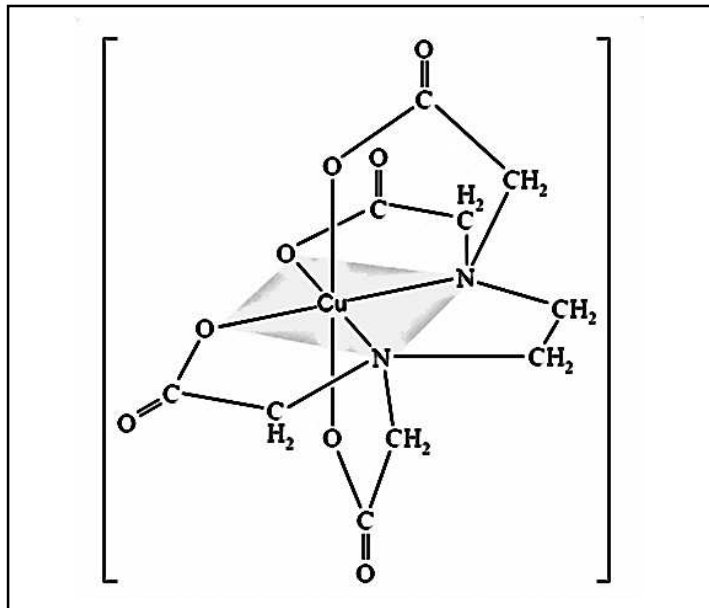


Figura 2. Estrutura do complexo Cu-EDTA (SKOOG *et al.*, 1996, MODIFICADA).

O EDTA apresenta comportamento ácido-base de Bronsted (sendo o grupo mais ácido considerado forte ($pK_1 < 1$), e apresenta até pK_6 (igual a 10,34). Ainda que o $EDTA^{4-}$ (descrita pela fração de equilíbrio α_6) predomine em soluções com pH acima de 10,34 ($\alpha_6 > 0,5$), mesmo em frações de equilíbrio menores no meio, em valores de pH abaixo de 10,34, a espécie totalmente protonada ainda forma complexos bastante estáveis com diversos metais. (OLIVEIRA, 2009).

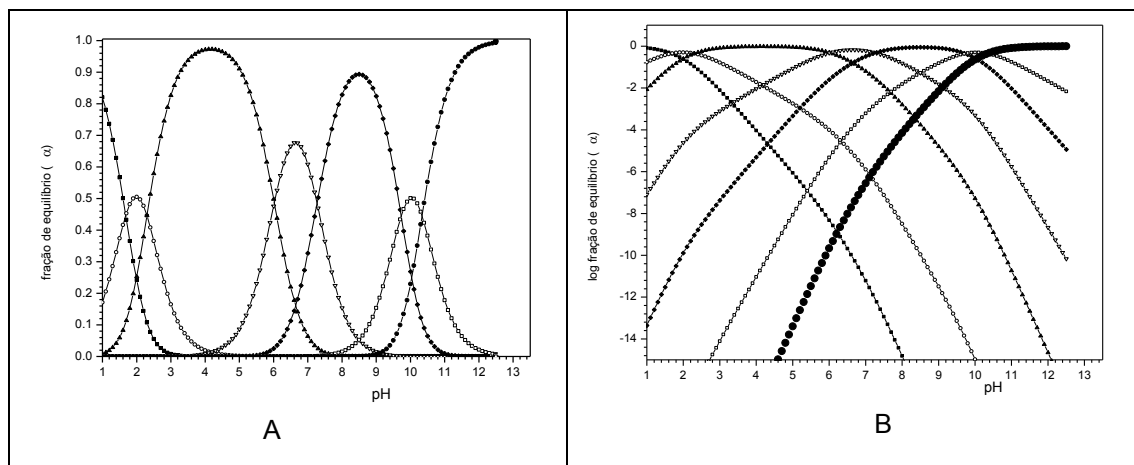


Figura 3. Diagrama de distribuição de espécies para EDTA (A), destacando a forma logarítmica da fração de equilíbrio (B). (■) α_0 , (○) α_1 , (▲) α_2 , (▽) α_3 , (◆) α_4 , (●) α_5 , (□) α_6 .

A adsorção de metais por plantas utilizando-se complexos de EDTA tem sido bastante estudada, como, Rodrigues *et al.* (1997), que observou que a correção da deficiência de zinco em feijoeiro por aplicação foliar foi mais efetiva com aplicação do zinco na forma complexada. Mattos Jr. *et al.* (2010) mostraram que houve toxicidade do cobre para mudas de limão cravo e que o excesso de cobre reduziu a absorção de manganês pelas mudas de tangerina *Sunki* quando foram utilizadas doses do complexo de Cu(II)-EDTA maiores que 5 mg L^{-1} . A aplicação de cobre complexado também aumentou significativamente o teor do metal disponível no solo e na planta. (SILVA *et al.* 2014)

A liberação controlada de insumos agrícolas a partir de veículos biodegradáveis se destaca no campo de pesquisa voltada para o agronegócio (ISIKLAN, 2007). O principal benefício do sistema de liberação controlada é aumentar a eficiência funcional de insumos sintetizados quimicamente (nutrientes, herbicidas, inseticidas e parasiticidas) ou de natureza biológica (microrganismos com atividade específica contra uma praga-alvo), diminuindo custos, bem como aumentando a segurança no manuseio desses produtos, reduzindo riscos de toxidez para o homem (AOUADA *et al.*, 2008).

A utilização de sistemas matriciais, constituídos por diversos tipos de polímeros, é uma opção interessante de liberação modificada devido as vantagens inerentes a estes sistemas, como versatilidade, eficácia, baixo custo e produção que recorre a equipamentos e técnicas convencionais (LOPES *et al.*, 2005). O revestimento pelo polímero, como na encapsulação, aumenta a barreira de contenção do composto de interesse, diminuindo sua difusão e assim a taxa de liberação (HARUSH-FRENKEL *et al.*, 2007). Um exemplo é a quitosana, um biopolímero derivado da quitina, possui a habilidade de interagir quimicamente com metais de transição devido à presença de grupos amino da unidade 2-amino-2-desoxi-D-glicose (VALENTINI *et al.*, 2000; CORONA-RIVERA *et al.*, 2007)

Quanto às propriedades físico-químicas, a quitosana é insolúvel em água, bases e solventes orgânicos, sendo completamente solúvel em soluções de alguns ácidos orgânicos, como ácido acético em valores de pH menores que 6, devido à protonação dos grupos aminos, tornando a estrutura catiônica. Alguns ácidos inorgânicos diluídos, tais como ácido nítrico e clorídrico, necessitam de

um longo tempo de agitação e aquecimento para solubilizar a quitosana (JANEGITZ *et al.*, 2007).

A quitosana em sua forma original não é adequada para um uso mais prático, devido à baixa resistência mecânica e reatividade dos grupos aminos. A reticulação da estrutura polimérica gerando ligações cruzadas entre as cadeias lineares do polímero (*crosslinking*) desenvolvendo uma rede tridimensional torna a quitosana quimicamente mais inerte e resistente ao meio ácido (quando as ligações cruzadas são realizadas com os grupos aminos), além de melhorar algumas características físicas da como a porosidade e resistência mecânica (BEPPU *et al.*, 1999; WANG & CHEN, 2014; ATIA, 2005). Por exemplo, pode ser realizada reticulação com aldeídos atacando grupos os aminos, formando iminas (reação de *Schiff*), (GONSALVES *et al.*, 2011).

2. Justificativa

O desenvolvimento de formulações que permitam a liberação controlada de substâncias químicas em sítios específicos, visando maior eficácia e diminuição de efeitos tóxicos, tem recebido grande atenção nos últimos anos (JACOBOWSKI *et al.*, 2013). A ideia principal envolvida é o controle da quantidade de composto liberada e o prolongamento do tempo em que essa concentração ótima é mantida no meio. Além do uso farmacêutico, a liberação de nutrientes e pesticidas também tem sido aplicada na agricultura, como por exemplo, na liberação de amônio e potássio (AOUADA *et al.*, 2008).

A quitosana e o ágar têm características interessantes para o uso como matriz polimérica para liberação de nutrientes para plantas. Sendo que esses nutrientes tem a adsorção mais eficaz na forma complexos polidentados (quelatos), pois eles são geralmente bastante solúveis e aniônicos, e diferente dos sais simples, dissociam-se muito pouco em solução, permitindo que o micronutriente permaneça disponível para planta inibindo a adsorção no solo por troca catiônica (LANA *et al.*, 2014).

3. Objetivos

Objetivo geral

Estudo da liberação controlada do complexo de cobre (II)-EDTA empregando as matrizes poliméricas ágar e quitosana.

Objetivos específicos

- Estudo da liberação do complexo de cobre (II)-EDTA a partir da matriz ágar;
- Avaliar a influência das variáveis força iônica, teor de ágar e tamanho dos *pellets* na liberação do complexo de cobre (II)-EDTA utilizando-se de planejamento fatorial;
- Estudo da liberação do complexo de cobre (II)-EDTA a partir da matriz quitosana;
- Desenvolvimento de método para determinação do grau de reticulação da quitosana por infravermelho e comparação com o método da titulação potenciométrica e por consumo de glutaraldeído;
- Avaliar o efeito do grau de reticulação da quitosana no processo de adsorção e na liberação controlada de complexo cobre(II)-EDTA utilizando-se de planejamento fatorial.

CAPÍTULO 2. LIBERAÇÃO CONTROLADA DE Cu(II)-EDTA A PARTIR DA MATRIZ ÁGAR

1. Introdução

Sistemas de liberação controlada são aqueles que liberaram a espécie química de interesse gradualmente, mantendo a concentração no meio que a recebe em níveis desejados, por período de tempo prolongado (COSTA & LOBO, 1999.). O objetivo dessas matrizes é manter a concentração da substância ativa em uma faixa ótima por tempo prolongado a partir de uma única aplicação. A faixa de concentração da substância ativa é aquela acima da concentração que é ineficaz e abaixo da concentração em que substância ativa é tóxica (superdosagem) (AOUADA *et al.*, 2008). Usualmente a concentração se mantém dentro de uma faixa adequada devido similaridade entre a taxa de liberação e a taxa de degradação ou de absorção da espécie.

Esses sistemas permitem que novas adições da substância sejam realizadas como menor frequência, comparadas aos sistemas convencionais e assim reduzam as oscilações na concentração. No caso da administração de um medicamento, busca-se manter a concentração terapêutica no sangue, evitando níveis subterapêuticos ou tóxicos (PEZZINI *et al.*, 2007). A formulação ótima depende de vários fatores, tais como as propriedades físico-químicas da droga e a natureza da matriz (BAYOMI *et al.*, 1998; FREIBERG & ZHU, 2004).

Nos sistemas de liberação controlada, a matriz pode ser definida como o sistema que controla a liberação de substâncias ativas, com as moléculas dispersas ou dissolvidas num suporte resistente à desintegração durante um tempo mínimo (LOPES *et al.*, 2005).

Na indústria alimentícia, sistemas de liberação controlada são parte de uma categoria que traz novos conceitos de embalagem de alimentos conhecidos como 'materiais de embalagem ativa'. Esses são baseados na incorporação de substâncias antimicrobianas na estrutura da embalagem de alimentos, a fim de controlar o crescimento de micro-organismos indesejáveis na superfície dos alimentícios (TURBIANI *et al.*, 2011), atendendo assim ao atual perfil de consumidor, que procura por alimentos livres de conservantes. Como o antimicrobiano é liberado da embalagem ao longo do tempo, a cinética de

crescimento microbiano e a atividade antimicrobiana na superfície do produto podem ser equilibradas, garantindo a segurança durante a distribuição dos alimentos (SOARES *et al.*, 2009).

A liberação controlada também sido utilizada com herbicidas usados atualmente, pois exibem diversos problemas relacionados a estabilidade química, além da potencial contaminação ambiental, tais como a transferência para os sistemas aquáticos através da lixiviação (MANOLIKAR & SAWANT, 2003; SILVA *et al.*, 2010). Outra aplicação da liberação controlada é a liberação de feromônios de insetos têm sido amplamente empregados o monitoramento ou captura de insetos prejudiciais à lavoura. Nesse casos podem ser utilizados elementos porosos nos quais os compostos são embebidos e adequadamente acomodados em armadilhas ou em recipientes de liberação unidirecional (TAKAHASHI & ASSIS, 2008).

Para examinar o mecanismo que controla o processo de adsorção/dessorção, como transferência de matéria na solução e interações químicas, vários modelos cinéticos têm sido propostos. Quando é observado um bom ajuste de um modelo aos dados cinéticos, infere-se que o mecanismo envolvido pode ser explicado por esse modelo (SPINELLI *et al.*, 2005). Os modelos cinéticos auxiliam na compreensão do comportamento de sistemas de liberação controlada, na simulação do efeito de algumas variáveis e a diminuição do número de experimentos em outros estudos (LYRA *et al.*, 2007).

Dentre os modelos cinéticos usualmente utilizados para explicar o comportamento dos sistemas de liberação controlada podem ser citados: pseudo primeira-ordem, pseudo segunda-ordem, difusão intrapartícula, modelo de Elovich, modelo de Noyes-Whitney, relação Adam-Bohart-Thomas e equação de Ritchie (GAUTAMQ *et al.*, 2014). Com a evolução da computação, vários softwares podem ser usados para se ajustar aos modelos de regressão não-linear aos dados experimentais, fornecendo estimativas mais confiáveis dos parâmetros dos modelos do que o uso dos modelos cinéticos da forma linearizada (FARIAS *et al.*, 2009). O uso de modelos de regressão não-lineares tem sido utilizado, por exemplo, por Martins *et al.* (2015) no estudo cinético da adsorção de tetraciclina utilizando carvão ativado produzido a partir cascas de nozes de macadâmia; por Pezoti Jr *et al.* (2014) em adsorção de azul de metileno

em carvão ativado produzido a partir da casca de buriti e por Ozdemir *et al.* (2011) na adsorção de Cr (VI) em carvão ativado.

A equação de pseudo primeira-ordem na forma diferencial é apresentada pela Equação 1.

$$\frac{dC_t}{dt} = k_1(C_e - C_t) \quad \text{Eq. (1)}$$

Onde k_1 é a constante de velocidade de pseudo primeira-ordem.

O modelo na forma integrada (no intervalo de tempo de 0 a t , e de concentração adsorvida, de 0 a C_t) é apresentada na Equação 2.

$$C_t = C_e (1 - e^{-k_1 t}) \quad \text{Eq. (2)}$$

O modelo cinético de pseudo segunda-ordem descreve o processo de dessorção como uma quimiossorção, ou seja, formação de ligação covalente ou iônica entre o adsorvente e o adsorvato (VARGAS *et al.*, 2011). A equação na forma diferencial de pseudo segunda-ordem pode ser expressa pela Equação 3.

$$\frac{dC_t}{dt} = k_2(C_e - C_t)^2 \quad \text{Eq. (3)}$$

onde k_2 é a constante de velocidade de segunda ordem. A forma integrada, nos mesmos intervalos que a equação de pseudo primeira-ordem pode ser expressa na forma apresentada na Equação 4.

$$C_t = \frac{k_2 C_e^2 t}{1 + k_2 C_e t} \quad \text{Eq. (4)}$$

O modelo de difusão intrapartícula (Eq.5) considera que a adsorção é cineticamente controlada dentro da partícula por processo de difusão. O processo ocorre em etapas; inicialmente há a migração do adsorvato da solução para a superfície do adsorvente; depois a difusão do adsorvato através dos poros

do material e a finalmente a adsorção do adsorvato na camada interna da superfície do adsorvente (WANG *et al.*; 2009).

$$C_t = f t^{1/2} \quad \text{Eq. (5)}$$

A equação de Noyes-Whitney (Eq. 6) é análoga à lei de Fick, que caracteriza a velocidade de difusão de um sólido por uma membrana (PIETROLUONGO, 2005). A cinética de liberação é descrita por modelos similares à cinética de dissolução.

$$C_t = C_e e^{-k_1 t} \quad \text{Eq. (6)}$$

Onde k_1 é o constante cinética, que é função do coeficiente de difusão e área superficial (MANADAS *et al.*, 2002; MARQUES, 2011).

O ágar (ou ágar-ágar) foi descoberto no Japão em 1658 e é o mais antigo ficocolóide (polissacarídeos extraídos de algas), e seu uso na microbiologia ocorre desde 1912 na Europa e sua produção e utilização em meados da década de 30 nos Estados Unidos (ARMISÉN, 1991). É produzido e armazenado em uma estrutura denominada agarócito, presente em algumas macroalgas vermelhas, principalmente das ordens Gracilariales e Gelidiales como as mais exploradas mundialmente (ALISTE, 2006; BORAL & BOHIDAR, 2009; GONZÁLEZ-LEIJA *et al.*, 2009).

O ágar é empregado na área como suporte de meio de cultura em microbiologia (por possuir uma alta resistência ao ataque de micro-organismos), na produção de alimentos, em cosméticos e na produção de fármacos, dentre outros usos. Também é muito empregado em orquidários, onde os géis são utilizados como substrato para o desenvolvimento de plântulas (OLIVEIRA *et al.*, 1992).

Pode-se definir o ágar como uma mistura complexa de polissacarídeos, onde destaca-se em sua estrutura química (Figura 7), junto ao polímero neutro agarose, a agarpectina, que é um polissacarídeo sulfatado composto de agarose e percentuais variados de éster sulfato e outros substituintes. Sendo que o ágar destinado a fins alimentícios tem como indicativo de qualidade o baixo

teor de sulfatos (SANTOS, 2011; GÓMEZ-MASCARAQUE *et al.*, 2014). O ágar é extraído de macroalgas da divisão Rhodophyta, principalmente das ordens Gelidiales (*Gelidium* spp., *Pterocliadiella* spp. e *Gelidiella* spp.) e Gracilariales (*Gracilaria* spp. e *Hydropuntia* spp.) (PEREIRA-PACHECO *et al.*, 2007).

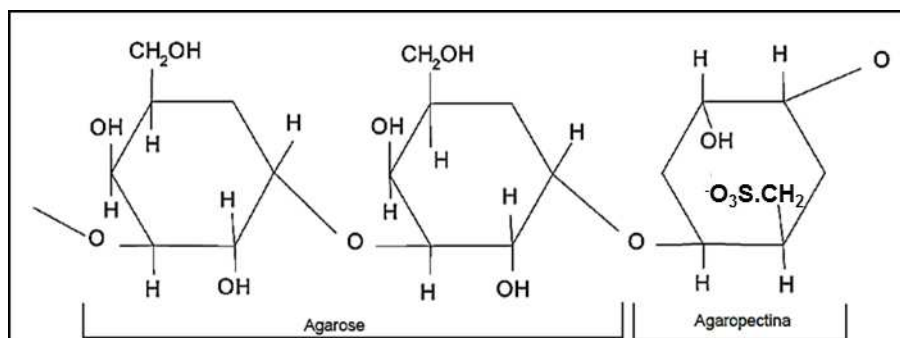


Figura 4. Estrutura química da ágar: constituído principalmente por agarose e a agarpectina (SANTOS, 2001)

A agarose é um polímero capaz de formar gel, com características vantajosas, como hidrofiliçidade e macroporosidade (ZHAO *et al.*, 2014). Permite que duas estruturas moleculares se unam formando hélices duplas em cadeia com conformação helicoidal, formando uma rede tridimensional capaz de aprisionar um considerável número de moléculas de água nas fissuras. (SAITO, 1997; BUILDERS *et al.*, 2008).

2. Materiais e métodos

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico (p.A.) e não foram submetidos a nenhuma etapa prévia de purificação.

2.1. Soluções

Todas as soluções foram preparadas em água destilada. Foram utilizadas micropipetas de volume variável de 100 µL a 10 mL (LabMate Soft).

2.1.1. Solução do complexo de Cu (II)-EDTA

O íon complexo de cobre (II) e EDTA foi preparado pela mistura direta na relação molar de 1:1 de sulfato de cobre pentahidratado (CuSO₄.5H₂O, Impex) e do sal dissódico de EDTA (Na₂H₂EDTA, Vetec) com a solução estoque 63,5 mg

Cu L⁻¹. As demais soluções com diferentes concentrações foram preparadas por diluição.

2.1.2. Solução Tampão Acetato 0,001 mol L⁻¹

Foram diluídos 58 µL de ácido acético em 900 mL de água destilada, ajustando-se o pH com NaOH 0,1 mol L⁻¹, para pH 4 e 5,8. O volume foi completado para 1000 mL.

Para o estudo simultâneo do pH e força iônica houve a diluição de 58,5 g de cloreto de sódio em 1000 mL de solução tampão, ocorrendo posterior ajuste de pH. Esses procedimentos foram realizados mais de uma vez, ocorrendo a mistura das soluções em béquer de 5 L.

2.1.3. Solução Tampão TRIS 0,001 mol L⁻¹

Foram diluídos 0,1210 g de Tris(hidroximetil)aminometano em 900 mL de água destilada, o pH foi ajustado para 7,5 com HCl 0,1 mol L⁻¹ e o volume completado para 1000 mL. Para o estudo simultâneo do pH e força iônica houve a diluição de 58,5 g de cloreto de sódio em 1 L de solução tampão, ocorrendo posterior ajuste de pH. Esses procedimentos foram realizados mais de uma vez, ocorrendo a mistura das soluções em béquer de 5 L.

2.2. Pellets de ágar

Em balões volumétricos contendo 100 mL de soluções de complexo de cobre (II)-EDTA 63 mg Cu L⁻¹ foram retirados e descartados, com auxílio de uma micropipeta de 1 mL, os volumes de 1, 3 e 5 mL. Os volumes restantes de 99 mL, 97 mL e 95 mL foram transferidos para um béquer de 500 mL, juntamente com, respectivamente, 1,0; 3,0 e 5,0 g de ágar, pesados em balança analítica (Shimadzu AUY220). As misturas foram agitadas e aquecidas (agitador magnético Nova Ética 114) até homogeneização, obtendo-se matrizes poliméricas com 1, 3 e 5% de ágar. Ainda quente e com aspecto viscoso, a mistura foi transferida para formas de acrílico e resfriadas a 4°C em geladeira, até se tornarem firmes. Os *pellets* foram então cortados com o auxílio de um estilete e um paquímetro digital (Mitotoyo), no formato de cubos com arestas de

5, 10 e 15 mm, sendo os mesmos mantidos a 4° C até o uso, sem exceder o período de 3 dias entre a produção e o uso.

2.3. Liberação controlada do complexo complexo de Cu (II)-EDTA a partir de pellets de ágar

A liberação de complexo de Cu (II)-EDTA a partir dos pellets de ágar com concentração de 0,063 mg Cu g⁻¹ ocorreu em um recipiente de polietileno de 270 mL com tampa contendo 250 mL de solução (força iônica ajustada para 0; 0,5 e 1 mol L⁻¹ com NaCl (Dinâmica) sob agitação em mesa agitadora (Tecnal TE 420) com a presença de 9 g de *pellets* de ágar. O tempo foi marcado (com auxílio de um cronômetro) a partir do momento da colocação dos *pellets* na solução, sendo que alíquotas de 5 mL foram retirados com auxílio de uma micropipeta de 10 mL nos tempos 0, 5, 10, 20, 45, 75, 120 a 240 minutos; sendo realizada análise em FAAS.

2.4. Determinação de cobre por Espectrofotometria de Absorção Atômica

O cobre foi determinado com um espectrômetro de absorção atômica (VARIAN, modelo SpectrAA-40FS), com uma lâmpada mono-elementar de cátodo oco de cobre. Na Tabela 1 são apresentados os parâmetros instrumentais selecionados para análise de cobre por FAAS.

Tabela 1. Parâmetros instrumentais utilizados na análise para determinação de Cu por FAAS

Método	Cu (chama)
Comprimento de onda	324,8 nm
Abertura da fenda	0,5 nm
Correção de <i>Background</i>	Desligada
Tempo de leitura	15 s
Tempo de pré-leitura	3s
Tipo de chama	Ar-acetileno
Fluxo de ar	13,5 L min ⁻¹
Fluxo de acetileno	2,00 L min ⁻¹

2.5. Tratamento dos Dados

Os resultados foram tratados com auxílio dos softwares Microsoft Excel 2013, OriginLab Origin 8.0 e StatSoft Inc Statistica 8.0.

3. Resultados e discussão

3.1. Determinação de complexo Cu (II)-EDTA por espectrofotometria de absorção atômica

Com o objetivo de avaliar a determinação de cobre por espectrofotometria de absorção atômica na forma complexo com EDTA sem uma etapa prévia de mineralização, a sensibilidade analítica de curvas analíticas de soluções contendo o complexo foi comparada àquela de soluções de cobre (II) livre em meio de ácido nítrico 0,014 mol L⁻¹.

A Figura 5 apresenta a curva analítica obtida para as soluções de Cu (II), em meio ácido, sem adição de ácido forte e do complexo Cu (II)-EDTA.

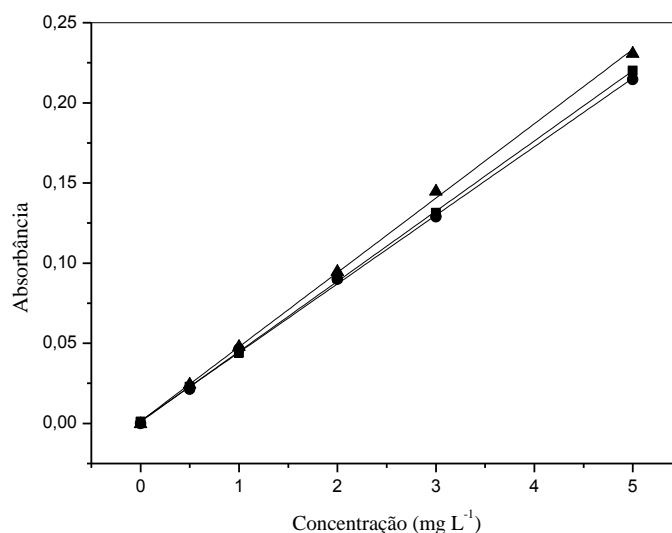


Figura 5. Curvas analíticas para Cu (II), Cu(II)_{acidificado} e Cu (II)-EDTA para comparação da comportamento da análise por FAAS (■Cu-EDTA, ●Cu(II), ▲Cu(II)_{acidificado})

Algumas figuras de mérito das curvas analíticas obtidas estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Figuras de Mérito das curvas analíticas obtidas para soluções de Cu(II), de Cu(II) em meio ácido e de complexo Cu(II)-EDTA

	Cu (II)	Cu (II) _{Acidificado}	Cu (II)-EDTA
Sensibilidade /(L/mg)	0,0428 ± 0,0005	0,0464 ± 0,0006	0,0438 ± 0,0003
Branco	0,0015±0,0014	0,0014±0,0016	0,0011±0,0003
R ²	0,9998	0,9992	0,9994
LOD /(mg L ⁻¹)	0,060	0,115	0,105
LOQ /(mg L ⁻¹)	0,183	0,350	0,318

Para todas as curvas analíticas, os valores do Branco não apresentam diferença significativa em relação ao zero, a 95% de confiança (teste t-Student).

Considerando a solução de cobre (II) em meio ácido como o procedimento de referência, as inclinações foram comparadas através de testes t-Student (ZUND & MEIER, 2000). Não foi observada diferença significativa entre as sensibilidades, de maneira que as soluções de complexos podem ser analisadas diretamente, sem a necessidade de mineralização e podem ser utilizadas soluções padrão de cobre em meio ácido, não acidificado ou em meio complexado, pois as respostas analíticas do cobre (II) são similares.

3.2. Estudo da liberação de complexo Cu (II)-EDTA a partir da matriz ágar

Na Figura 6 são apresentados exemplos dos *pellets* utilizados.



Figura 6. Pellets de ágar com arestas de 10 mm com teor de ágar 3% (m/m).

A importância de força iônica na solução onde houve a liberação do complexo, dos tamanhos dos pellets e dos seus teores de ágar no processo de liberação controlada foi avaliada através de um planejamento fatorial 2³ com ponto central. Nas Tabela 3 e Tabela 4 são apresentados os experimentos com os níveis codificados, e os valores das variáveis, respectivamente.

Tabela 3. Matriz do planejamento fatorial 2³ com ponto central em triplicata aplicada a liberação de Cu (II)-EDTA a partir da matriz ágar

Ensaio	Teor de ágar	Tamanho dos pellets	Força Iônica Externa
1	-	-	-
2	-	-	+
3	-	+	-
4	-	+	+
5	+	-	-
6	+	-	+
7	+	+	-
8	+	+	+
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

Tabela 4. Valores das variáveis utilizadas no planejamento fatorial 2³ da liberação de Cu (II)-EDTA a partir da matriz ágar

Níveis	Teor de ágar- ágar /%	Tamanho dos pellets /mm	Força Iônica Externa /(mol/L)
Superior (+)	5	15	1
Inferior (-)	1	5	0
Central (0)	3	10	0,5

O planejamento dos experimentos foi avaliado considerando as constantes dos modelos cinéticos. Para isso foi realizado ajustes dos modelos não-lineares de pseudo primeira-ordem, difusão intra-partícula, Noyes-Whitney e pseudo segunda-ordem (Figura 7).

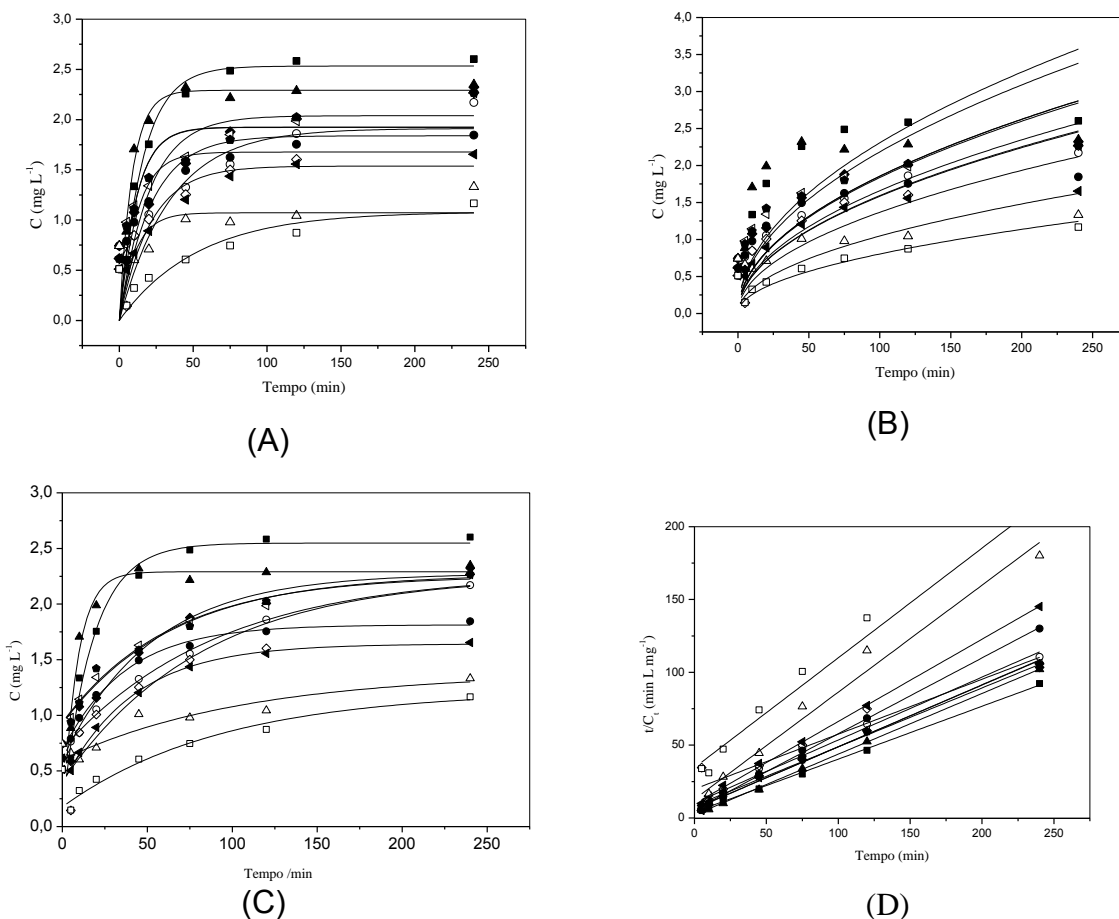


Figura 7. Curvas de liberação de Cu (II)-EDTA a partir da matriz ágar. Ajuste dos modelos cinéticos: (A) pseudo primeira-ordem; (B) difusão intrapartícula; (C) Noyes-Whitney; (D) forma linearizada pseudo segunda-ordem. Experimentos: (■) 1, (▲) 2, (○) 3, (◇) 4, (◄) 5, (●) 6, (□) 7, (△) 8, (◆) 9, (◁) 10, (◆) 11.

Para decidir qual modelo cinético explica melhor os dados experimentais, foi utilizada a análise do gráfico dos resíduos dos modelos de regressão (DRAPER & SMITH, 1980).

Os resíduos (r_i) representam uma parte dos valores dos dados que não é explicada pelo modelo de regressão e compreendem tanto a variabilidade

natural, os erros experimentais como a falta de ajuste do modelo aos dados experimentais.

Os modelos de regressão simples são obtidos considerando-se que os resíduos devem apresentar uma distribuição normal com média zero e variância constante (homocedasticidade) (DRAPER & SMITH, 1980; ZUND & MEYER, 1993; RIBEIRO *et al.*, 2008). A Figura 8 ilustra os diferentes tipos de resíduos após o ajuste de um modelo de regressão (linear ou não-linear). A Figura 8a apresenta um exemplo típico de falta de ajuste do modelo, enquanto que nas Figuras 8b e 8d, exemplo de presença de *outlier* (pontos que não pertencem à população estudada, ou erros “grosseiros” não identificados durante o procedimento experimental e coleta de dados). Na Figura 8e pode-se observar um gráfico de resíduo “adequado” ou bem-comportado, ou seja, com bom ajuste do modelo. Verifica-se que nuvem de resíduos é bem distribuída ao redor do zero. A dispersão observada está associada à variabilidade dos dados (incluindo os erros aleatórios experimentais). A Figura 8c mostra um caso de heterocedasticidade, ou seja, a variância não é constante entre os diferentes níveis da variável independente, exigindo o uso de modelos de regressão mais sofisticados (por exemplo, modelo de regressão ponderado).

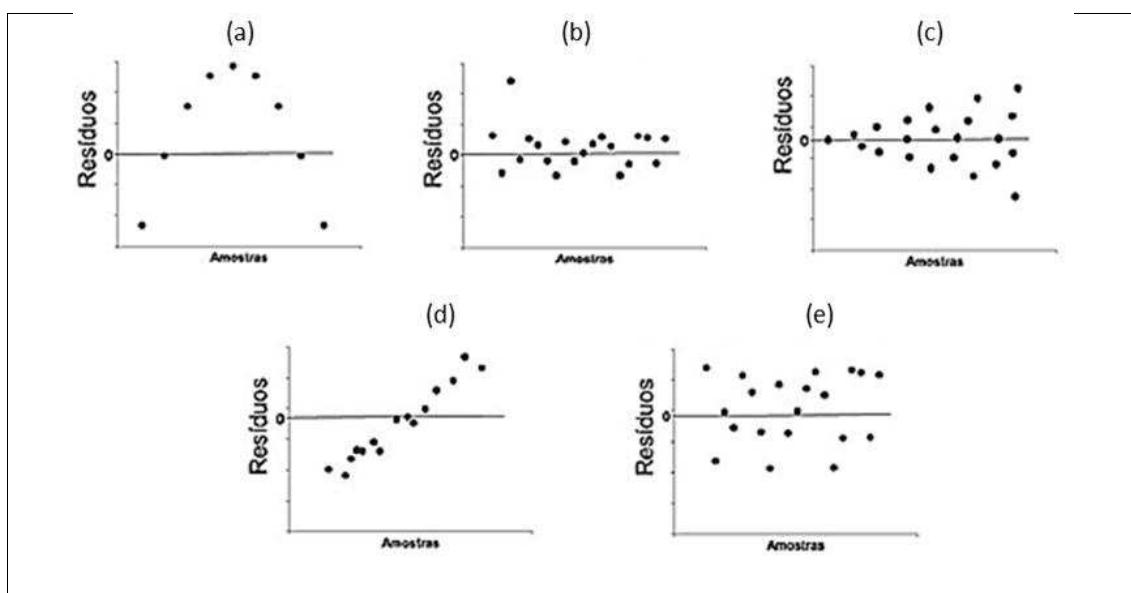


Figura 8. Principais padrões observados em Gráfico dos Resíduos (a) falta de ajuste do modelo, (b) presença de *outlier*, (c) presença de heterocedasticidade, (d) falta de ajuste do modelo (e) comportamento adequado (homocedasticidade e distribuição normal) (adaptado de RIBEIRO *et al.*, 2008).

O modelo cinético de Noyes-Whitney foi selecionado por apresentar uma menor variação dos resíduos e assim, apresentou um melhor ajuste (Equação 6). Na Figura 9 como exemplo da análise, são apresentados os diferentes resíduos dos quatro modelos cinéticos aplicados para o experimento 3. Em ensaios de liberação controlada são esperadas faltas de ajuste no início da liberação pois podem estar relacionados a outro comportamento, ou seja, a dissolução direta do analito na superfície dos pellets e portanto, não são explicados pelo mesmo modelo que explica o comportamento da liberação controlada.

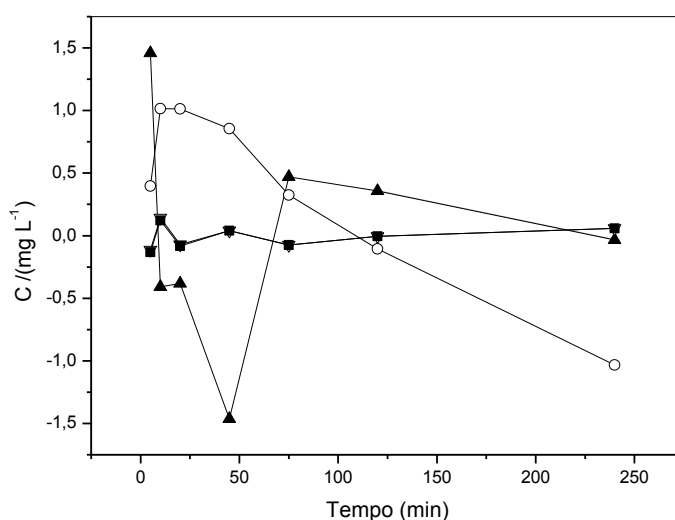


Figura 9. Comparação dos resíduos entre os modelos cinéticos para o experimento 3. (○) Difusão intra-partícula, (◼) Noyes-Whitney, (▲) Pseudo segunda-ordem.

O ajuste do modelo de *Noyes-Whitney* aos dados experimentais sugere que o complexo difunde-se da matriz polimérica para o meio aquoso sem nenhum tipo de interação com a matriz polimérica, como é esperado, uma vez que o ágar apresenta uma superfície neutra (agarose) ou aniônica, que não favorecem a interação com o complexo Cu (II)-EDTA, que é aniônico. Na Figura 10 são apresentados os resíduos observados para esse modelo para os experimentos de 1 a 11.

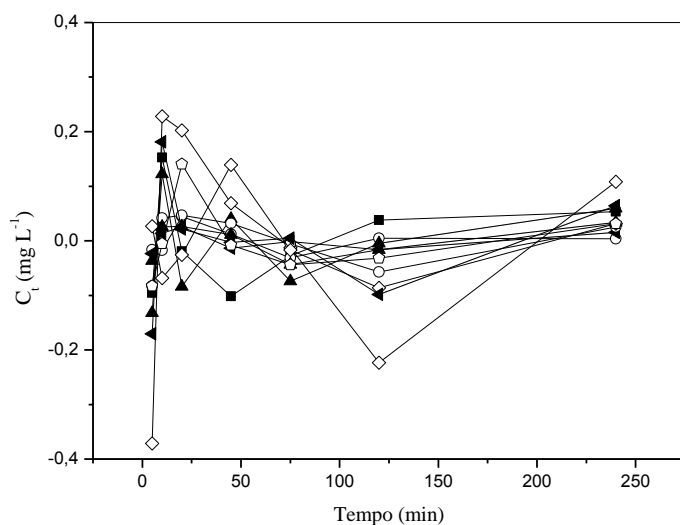


Figura 10. Gráficos de Resíduo do modelo cinético de Noyes-Whitney para os experimentos do planejamento fatorial 2^3 . Experimentos (■) 1, (▲) 2, (○) 3, (◇) 4, (◀) 5, (●) 6, (□) 7, (△) 8, (◆) 9, (◁) 10, (◆) 11

A partir da seleção do modelo cinético, as respostas do planejamento fatorial 2^3 foram os parâmetros do modelo de *Noyes-Whitney*, ou seja, a constante de velocidade k_1 e a concentração no equilíbrio, C_{eq} (ou concentração máxima). Na Figura 11 é apresentado o Gráfico de Pareto com os efeitos que influenciaram a concentração no equilíbrio do complexo.

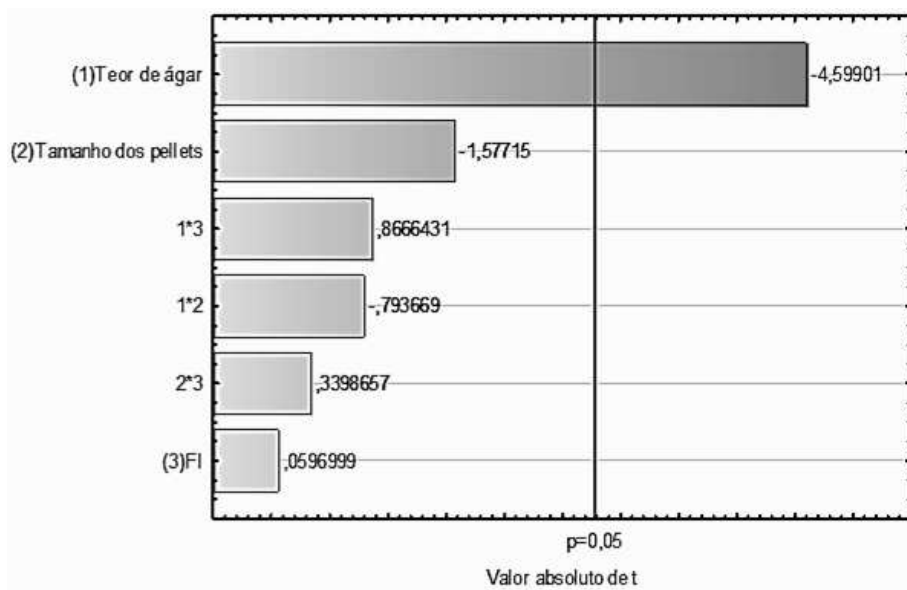


Figura 11. Gráfico de Pareto dos efeitos o planejamento fatorial 2^3 para liberação de Cu-EDTA a partir da matriz ágar sobre a concentração de equilíbrio.

Apenas o teor de ágar no *pellet* influenciou significativamente a concentração de equilíbrio (95% de confiança), aumentando com a diminuição do teor de ágar. O fato possivelmente está relacionado com o bloqueio de alguns poros por onde o complexo de Cu (II)-EDTA difunde dentro dos pellets, aprisionando-o. Como exemplo dessa relação, a concentração de equilíbrio variou, para *pellets* com 1% ágar para 5% de ágar, de cerca de 2,4 mg Cu L⁻¹ (liberação de cerca de 95% da quantidade total de complexo nos pellets) para cerca de 1,4 mg Cu L⁻¹ (cerca de 66% de liberação). A Tabela 5 mostra a concentração de equilíbrio e a porcentagem de liberação para todos as condições experimentais.

Tabela 5. Concentrações de saturação referente a liberação de Cu (II)-EDTA a partir da matriz ágar

Teor de ágar /%	Arestas dos pellets / mm	Força iônica externa / (mol L ⁻¹)	Concentração de saturação / (mg L ⁻¹)	Liberação /%
1	5	0	2,55	97,5
1	5	1	2,28	90,2
1	15	0	2,33	80,6
1	15	1	2,26	87,0
5	5	0	1,64	62,7
5	5	1	1,81	68,4
5	15	0	1,22	43,9
5	15	1	1,38	49,4
3	10	0,5	2,27	88,1
3	10	0,5	2,25	86,2
3	10	0,5	2,28	85,8

A constante de velocidade, k_1 , por outro lado, foi influenciada apenas pelo tamanho dos *pellets* (Figura 12), aumentando com a diminuição do tamanhos dos *pellets*. Como essa constante está relacionada com a constante de difusão e com a área superficial, o aumento da área (com a diminuição das arestas dos pellets, mantendo-se a massa total de pellets constantes), favorece o aumento

da constante e portanto a liberação mais rápida do complexo para a solução externa.

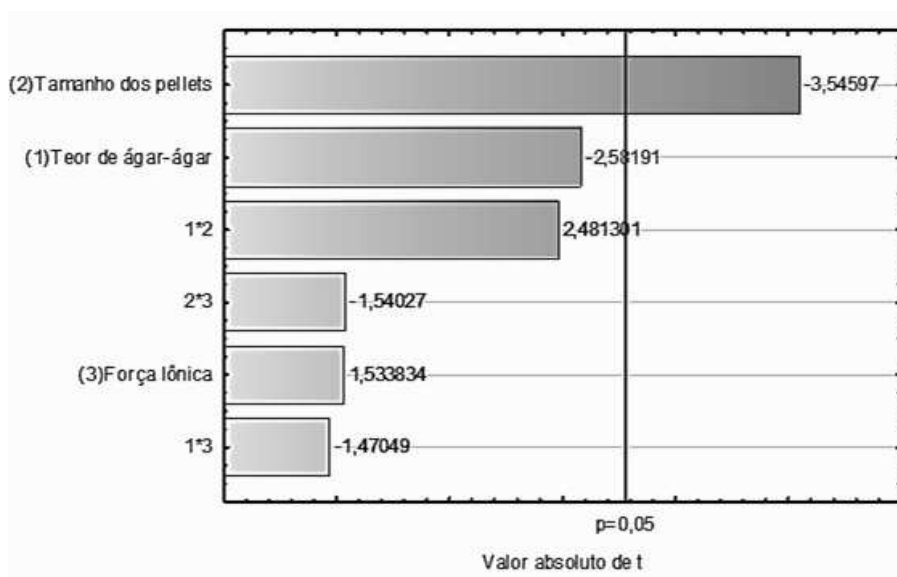


Figura 12. Gráfico de Pareto de efeitos e significâncias para o planejamento fatorial 2³ para liberação de Cu (II)-EDTA a partir da matriz ágar relacionado à constante cinética (k).

A constante cinética k_1 variou de 0,0567 e 0,0242 mg L⁻¹ min⁻¹ para pellets com arestas de 5 mm para 0,0110 e 0,0107 mg L⁻¹ min⁻¹ pellets com arestas de 15 mm, para teor de ágar de 1 e 5%, respectivamente.

O tempo de meia-vida, que é o tempo necessário para liberação da metade da concentração de saturação foi calculado de acordo com Equação 7. Esse parâmetro variou desde valores abaixo de 28 min para pellets de 5 mm para cerca de 103 min, para pellets de 15 mm.

$$r = \frac{dc}{dt} = \frac{d[A - (A - B)e^{-kt}]}{dt} = -(a - b)e^{-kt} \quad \text{Eq. (7)}$$

$$t_{1/2} = -\frac{1}{k} \ln \left(\frac{0,5}{(a - b)} \right)$$

e, portanto, proporcional ao tamanho do *pellet*. A Tabela 6 mostra os valores da constante cinética k e tempo de meia-vida para todos os experimentos. O tempo de meio-vida, sendo assim, será inversamente proporcional ao fator k

Tabela 6. Valores de k e tempo de meia-vida para os ensaios de liberação de Cu (II)-EDTA a partir da matriz ágar

Teor de ágar /(%m/v)	Arestas dos pellets /mm	Força iônica externa /(mol L ⁻¹)	k /(mg min ⁻¹)	Tempo de meia-vida/min
1	5	0	0,0566	27,7
1	5	1	0,1443	10,5
1	15	0	0,0110	105,0
1	15	1	0,0121	108,7
5	5	0	0,0242	38,2
5	5	1	0,0273	30,0
5	15	0	0,0107	69,0
5	15	1	0,0094	47,5
3	10	0,5	0,0159	75,8
3	10	0,5	0,0153	63,4
3	10	0,5	0,0190	52,3

4. Conclusão

O comportamento de liberação de Cu (II)-EDTA a partir da matriz ágar foi bem representado pelo modelo cinético difusional de Noyes-Whitney. Onde a concentração no equilíbrio foi influenciada pelo teor de ágar e a constante cinética influenciada pelo tamanho dos *pellets*, sendo que o processo apresentou uma liberação máxima de 97% e não foi influenciada pela força iônica da solução.

CAPÍTULO 3. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE RETICULAÇÃO DE QUITOSANA

1. Introdução

Biopolímeros isolados de organismos marinhos são uma classe relativamente recente de adsorventes de baixo custo e benignos ao meio ambiente. Dentre esses, o principal é a quitosana, obtida a partir da quitina, um carboidrato polimérico semelhante a celulose, com a hidroxila na posição C-2 substituída por um grupo acetamido (VALENTINI *et al.*, 2000).

A quitina está presente no exoesqueleto de crustáceos, como caranguejos, siris, lagostas e camarões, sendo uma fonte importante de biomassa nas regiões litorâneas (TAJIK *et al.*, 2008). Ela também existe em insetos, fungos, cogumelos e minhocas (FRANCHETTI & MARCONATO, 2006); e é o segundo polissacarídeo mais abundante na Terra, depois apenas da celulose (WEI *et al.*, 2008).

Embora haja um grande potencial na produção pelo beneficiamento a partir de subprodutos da industrialização de vários crustáceos que ocorre em grande volume no litoral brasileiro, a quitina continua a ser um recurso subutilizado. A quitina não tem interesse industrial devido a sua solubilização em quase todos solventes comuns (PILLAI *et al.*, 2009; GONÇALVES JÚNIOR *et al.*, 2010) e a pela dificuldade em utilizar-se de modificações químicas na sua molécula devido à estrutura altamente cristalina, com fortes interações por ligações de hidrogênio intra e intermoleculares (SHIGEMASA *et al.*, 1999).

A desacetilação alcalina da quitina, produz a quitosana (SPINELLI *et al.*, 2005). Durante esse processo, alguns grupamentos acetamido são transformados em grupos amino ao longo da cadeia polimérica (MARQUES NETO, 2010). Ainda que a desacetilação também ocorra em meio ácido, a forma básica apresenta maior rendimento da desacetilação e a menor formação de subprodutos, sendo, então, o processo mais utilizada (SPINELLI, 2005).

Os grupos funcionais hidroxila presentes no monômero possibilita várias reações, como O-acetilação (RINAUDO, 2006) enquanto que a presença de grupos aminos na quitosana (Figura 13) é responsável pela grande versatilidade

da quitosana, pois possibilita várias modificações químicas (WEI *et al*, 2008; OYRTON *et al*, 1999). Devido ao comportamento ácido-base de Bronsted desse grupo (com pKa médio próximo a 6,5), a forma química protonada é catiônica, e assim a quitosana é classificada como um polieletrólito catiônico, um tipo de polímero pouco encontrado nos polissacarídeos naturais (WANG & CHEN; 2014).

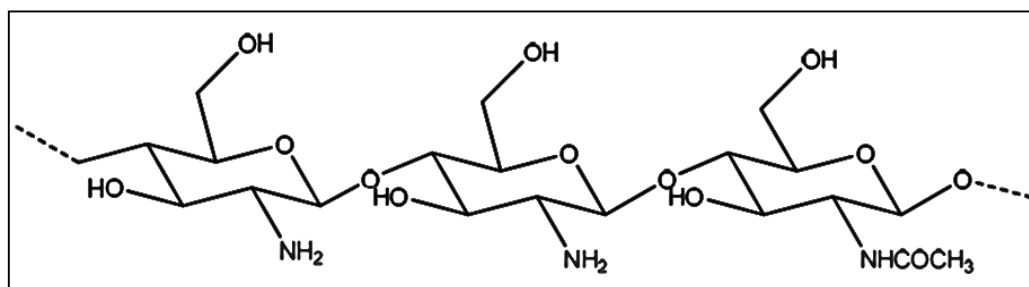


Figura 13. Estrutura química da quitosana (BEPPU *et al.*, 1999).

A presença dos grupos aminos protonados e não-protonados aumentam a capacidade e a seletividade de adsorção (LIU *et al.*, 2002; JUSTI, 2006; ZHOU *et al*, 2010; SPINELLI *et al.*, 2005), por processos de troca-iônica ou de complexação, respectivamente. De uma forma geral, a quitosana possui uma grande capacidade de fixar moléculas, tais como os pesticidas, proteínas, metais de transição e outros compostos naturais (RHSXI *et al*, 2002).

A quitosana não é tóxica para seres humanos e tem sido propostas inúmeras aplicações em vários campos, incluindo biomédicos, farmacêuticos e microbiológicos (WANG & CHEN, 2014). Propriedades como biocompatibilidade, biodegradabilidade, viscosidade, dentre outros, permite seu uso em várias aplicações como matriz polimérica (FELT, 1999; ZHOUA *et al.*, 2009; WEI *et al.*, 2008; WANG & CHEN, 2014). Também tem sido sendo utilizado como membranas de diálise e anticoagulantes de sangue e em programas de perda de peso (FRANCHETTI & MARCONATO, 2006; COSTA JR *et al.*, 2009; GENTA *et al.*, 1998; JAMEELA & JAYAKRISHNAN, 1995).

Além disso, os processos de adsorção utilizando adsorventes naturais é uma forma promissora, economicamente viável e apresenta bons resultados, oferecendo uma alternativa de aproveitamento destes materiais e reduzindo o impacto ambiental de seu descarte (LUCENA *et al.*, 2012).

Uma forma de utilização para quitosana é na forma de grânulos ou microesferas, devido à área superficial, resistência mecânica e porosidade (VARMA *et al.*, 2004). A preparação de microesferas é uma estratégia para aumentar a capacidade de adsorção da quitosana, uma vez que as microesferas possuem uma área superficial cerca de 100 vezes maior do que a quitosana em flocos, além de apresentar cinéticas de adsorção mais rápidas (AZEVEDO *et al.*, 2007). Essas micropartículas são amplamente utilizadas em liberação de drogas, principalmente quando é do interesse uma liberação prolongada do fármaco (KYOKO *et al.*, 2005; SHU *et al.*, 2001; VASCONCELLOS *et al.*, 2011). O uso também é motivado pelo fato de que os grupos amino da quitosana são facilmente degradada em produtos não-tóxicos por enzimas (BAYOMI *et al.*, 1998; GUPTA & JABRAIL, 2006), tornando-a um polímero inerte como a celulose ou amido.

A utilização de ligação cruzada em polímeros (*crosslinking*) é um dos métodos mais comuns e bem-sucedidos para adequar as propriedades desses polímeros a necessidades específicas. Reticulantes são moléculas de massa molar muito menor que o da cadeia principal polimérica e possuem, no mínimo, dois grupos funcionais reativos que possibilita a formação das ligações cruzadas entre as cadeias (KLUG *et al.*, 1998; WU *et al.*, 2004).

Na quitosana, a reticulação pode ser realizada com diferentes compostos através dos grupos funcionais presentes em sua estrutura, tais como o glutaraldeído (VASCONCELLOS *et al.*, 2011), glioxal (YANG *et al.*, 2005) e citrato (SHU *et al.*, 2001) através dos grupos aminos; e epicloridrina (TORRES *et al.*, 2005) e carbodiimida (OLIVEIRA & VIEIRA, 2006) através dos grupos hidroxilas. O glutaraldeído e o glioxal, por apresentarem dois grupos aldeídos, fazem a reticulação pela formação de bases de *Schiff*, por uma reação simples e barata e conveniente para ligantes sensíveis a pH alcalino (BEPPU *et al.*, 2007). Além disso, a formação de ligação covalente entre o grupo amino da quitosana e o grupo aldeído terminal do glutaraldeído é irreversível e resiste a extremos de pH e temperatura (GONSALVES *et al.*, 2011).

Na Figura 14 é apresentado um trecho de duas cadeias; de quitosana reticuladas pelo glutaraldeído. (ATIA, 2005; BERGER *et al.*, 2004; BEPPU *et al.*, 1999; GENTA *et al.*, 1998).

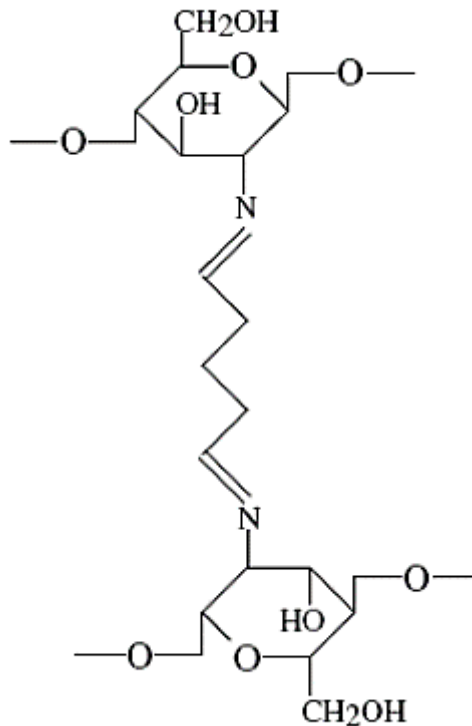


Figura 14. Reticulação entre duas cadeias de quitosana usando glutaraldeído. (VIEIRA, 2008).

É muito importante o controle da reticulação, pois, como já descrito, várias propriedades da quitosana são função do seu grau de reticulação, como por exemplo, resistência mecânica, porosidade, capacidade de troca iônica ou de complexação, etc.

Existem diversas metodologias empregadas para se determinar o número de grupos aminos disponíveis, como RMN (JANEGITZ *et al.*, 2007; ALVARENGA *et al.*, 2010), titulação condutométrica (GINANI *et al.*, 1999, LAUS *et al.*, 2006; GONÇALVES Jr. *et al.*, 2010), titulação turbidimétrica (SHU *et al.*, 2001), titulação potenciométrica (GUPTA & JABRAIL, 2007; VALENTINI *et al.*, 2000, VIEIRA & BEPPU, 2006), consumo de glutaraldeído (JUANG *et al.*, 2007). O uso da espectroscopia no infravermelho (MONTEIRO JR. & AIROLDI, 1999) tem sido feita apenas como método qualitativo para observar a formação de ligações cruzadas.

Assim, o objetivo dessa etapa do trabalho foi o desenvolvimento de um método quantitativo para determinação do grau de reticulação a partir da espectrofotometria no infravermelho médio, usando a estratégia proposta por

SANTOS, 2006. Para comparação, o grau de reticulação também foi determinado por titulação potenciométrica (JANEGITZ et al., 2007), e pelo consumo de glutaraldeído (JUANG et al., 2007).

2. Materiais e métodos

2.1. Soluções

Todas as soluções foram preparadas em água destilada. Foram utilizadas micropipetas de volume variável de 100 μL a 10 mL (LabMate Soft).

2.1.1. Solução ácido acético

As soluções estoque de ácido acético 5% (v/v) foram preparadas a partir do ácido acético glacial (Isofar) e padronizadas com NaOH (Sigma) previamente padronizado. As soluções foram armazenadas em frasco de vidro âmbar.

2.1.2. Solução hidróxido de sódio

A solução estoque de NaOH (Sigma) $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada a partir da dissolução de 0,1 g de NaOH em água, completando-se o volume para 250 mL. A solução estoque de NaOH 1 mol L^{-1} foi preparada a partir da dissolução de 40 g de NaOH em água, completando-se o volume para 1000 mL.

As soluções foi padronizadas com ftalato ácido de potássio (Vetec). O ftalato ácido de potássio foi previamente seco a 105°C por 2 h e mantido em dessecador até o momento de uso. A solução de hidróxido de sódio foi armazenada em frasco de plástico e mantida a temperatura ambiente.

2.1.3. Solução ácido clorídrico

A solução estoque de HCl (Sigma 36,5 %) $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada a partir da dissolução de 0,42 mL de HCl em água, completando-se o volume para 250 mL. A solução foi padronizada com hidróxido de sódio (previamente padronizado ftalato ácido de potássio). A solução de ácido clorídrico foi armazenada em frasco de plástico e mantida a temperatura ambiente.

2.1.4. Soluções de glutaraldeído

As soluções de glutaraldeído (Aldrich 25%) de 12,6; 31,5; 63; 315 e 630 mmol L⁻¹ foram preparada a partir da dissolução de 6,3.10⁻²; 0,13; 0,25; 1,26; 2,52 mL de glutaraldeído em água, completando-se o volume para 100 mL. As demais concentrações foram feitas pela diluição da solução de 630 mmol L⁻¹.

2.2. Esferas de quitosana

As esferas de quitosana foram preparadas conforme a descrito por MARQUES NETO *et al.* (2013) a partir de uma solução de quitosana 4% (m/v). Sendo assim, 10 g de quitosana comercial (Aldrich) foram dissolvidos em 240 ml de ácido acético (Isofar, 18 mol L⁻¹) 5 % (v/v). O gel formado ficou em repouso por 48 horas a 4°C. Após este período a mistura foi gotejada, com auxílio de uma bomba peristáltica (Ismatec, IPC8), na vazão de 0,5 mL min⁻¹ sobre 500 mL de solução de NaOH (Vetec) 1 mol L⁻¹ sob agitação, ocorrendo a formação das esferas. As esferas permaneceram em contato por 30 minutos com a solução de NaOH após o gotejamento. Decorrido este tempo as esferas foram lavadas com água destilada até a água de lavagem apresentar um valor de pH de aproximadamente 7,0; medido com auxílio de pHmetro (Digimed).

2.3. Reticulação das esferas de quitosana com glutaraldeído

O processo de reticulação foi realizado com 100 mL de solução de glutaraldeído em concentrações de 12,6; 31,5; 63; 315 e 630 mmol L⁻¹, na presença de quitosana úmida (referente a 4 g de quitosana seca) mantida em agitação mecânica em frascos de polietileno de 250 mL a 200 rpm por 1 hora. As esferas produzidas foram lavadas com água destiladas e levadas a estuda a 60° C por 5 horas.

2.4. Determinação do grau de reticulação por titulação potenciométrica

A determinação do grau de reticulação foi realizada através de titulação potenciométrica, empregando um pHmetro (Digimed/ DN20). O pHmetro com eletrodo combinado de vidro (utilizando KCl 3,0 mol L⁻¹ como ponte salina) foi

calibrado semanalmente com soluções padrão de pH (Digimed) em valores de 4,0 e de 7,0.

Adicionou-se 50 mL de solução de HCl ($0,02 \text{ mol L}^{-1}$) a 100 mg de quitosana seca e triturada (com auxílio de pistilo e graal de ágata), deixando em repouso por 48 horas. Em seguida, titulou-se com auxílio de micropipetas de 10 e 1 mL a solução resultante com NaOH ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) padronizado, com intervalo de tempo de 2 minutos (BEPPU *et al.*, 2007).

1.1. Determinação do grau de reticulação baseado no consumo de glutaraldeído

Foi obtido um espectro de absorção para a solução de glutaraldeído, na faixa de comprimento de onda de 200-700 nm, utilizando um espectrofotômetro *diode array* Agilent 8453. Alíquotas de solução de glutaraldeído foram analisadas antes e após a reticulação das esferas de quitosana em um espectrofotômetro de feixe duplo (Cirrus 80ST, Femto), para determinação do consumo de glutaraldeído.

2.5. Determinação semiquantitativa do grau de reticulação por FT-IR

Para produção das pastilhas de massa aproximada de 200 mg, foram pesadas 2 mg de quitosana e misturada a 198 mg de KBr, sendo o processo realizado o mais rápido possível. O KBr foi mantido no dessecador até o uso. A espessura das pastilhas foi determinada com auxílio de um paquímetro digital (Mitoyo). Para as medidas espectrofotométricas no infravermelho, utilizou-se o espectrofotômetro de infravermelho Varian 660 – IR, no modo de transmissão, na região de $400 \text{ a } 4000 \text{ cm}^{-1}$, com 16 varreduras e resolução 4 cm^{-1} .

3. Resultados e discussão

3.1. Titulação Potenciométrica

A adição um número de mols conhecido de ácido clorídrico à solução contendo as esferas de quitosana trituradas permitiu a protonação total dos grupos amínicos da quitosana, após 48 horas de repouso. Assim, na curva de titulação potenciométrica, o primeiro volume de equivalência se refere ao número

de mols de prótons livres e a diferença de volume entre o primeiro e segundo ponto de inflexão é proporcional ao número de prótons dos grupos amínicos consumidos da quitosana.

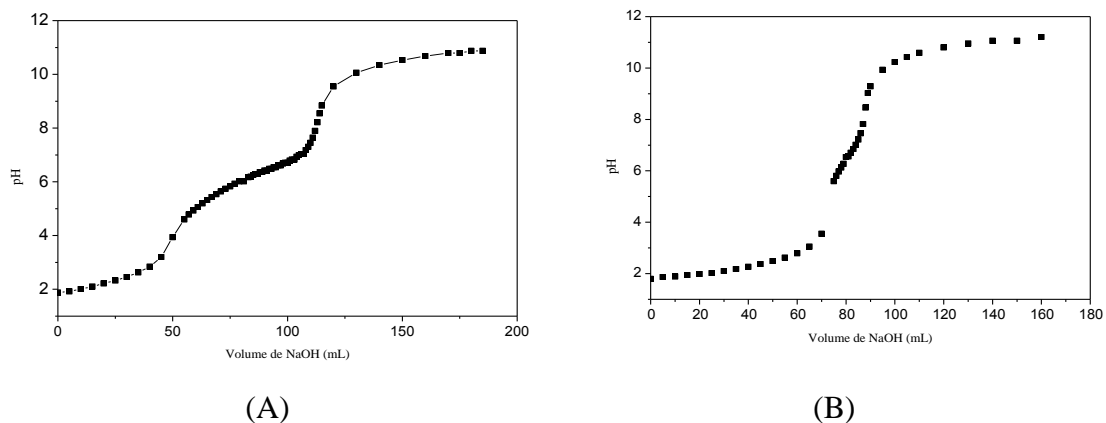


Figura 15. Curva de titulação de $100,0 \pm 0,5$ mg de quitosana com NaOH $8,8 \text{ mmol L}^{-1}$. Esferas de quitosana (A) sem reticulação e (B) com reticulação por glutaraldeído $31,5 \text{ mmol L}^{-1}$.

Para obter os pontos de equivalência, foi aplicado um modelo de regressão não-linear de Lorentz após aplicar a primeira derivada numérica da curva de titulação, conforme mostrado na Figura 16. Foi utilizado o valor central do pico de Lorentz, estimado pelo modelo (OLIVEIRA *et al.*, 2015; LELES, 1992). Esse procedimento auxilia na determinação mais precisa do volume de equivalência.

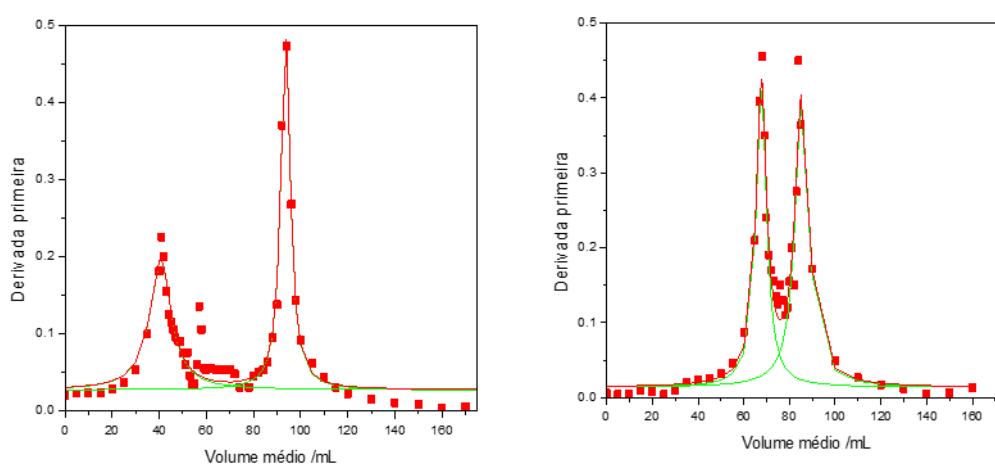


Figura 16. Determinação do ponto de equivalência pelo método da 1^o derivada com ajuste de Lorentz para: (A) quitosana não reticulada e (B), com quitosana reticulada com concentração de glutaraldeído de 63 mmol L^{-1}

A Tabela 7 mostra os volumes de NaOH do primeiro e segundo pontos de equivalência, obtidos para as titulações de quitosana reticuladas com diferentes concentrações de glutaraldeído.

Tabela 7. Volumes de equivalência (V_1 e V_2) na titulação potenciométrica de $100,0 \pm 0,5$ mg de esferas de quitosana com NaOH $8,8 \text{ mmol L}^{-1}$, obtido pelo modelo de Lorentz, a diferença nos volumes do 1° e 2° pontos de equivalência (ΔV) e a dosagem de grupos aminos livres ($-\text{NH}_2$) por massa de quitosana.

Concentração de Glutaraldeído / mmol L^{-1}	V_1 /mL	V_2 /mL	ΔV /mL	Dosagem - NH_2 /(mmol/g)
0	50,6	113,1	62,5	5,50
12,6	78,5	102,0	23,5	2,07
31,5	72,7	87,8	17,7	1,56
63	67,7	85,4	15,1	1,33
315	76,8	90,3	13,5	1,19
630	66,4	80,4	14,0	1,23

É esperado que, quanto maior o grau de reticulação da esfera de quitosana menor será o volume de NaOH consumido, isso ocorre devido a formação das bases *Schiff* na presença de glutaraldeído, formando pontes entre as cadeias de quitosana, bloqueando os grupos aminos protonáveis.

Além disso, a quitosana não reticulada contém grupos amídicos (aminas acetiladas) residuais do processo de desacetilação da quitina. Considerando que a quitosana totalmente desacetilada seria formada apenas por monômeros contendo um grupo amino (sendo a massa molar do monômero igual a $161,16 \text{ g mol}^{-1}$), haveriam $6,20 \text{ mmol}$ de grupos aminos por grama de quitosana totalmente desacetilada e portanto, a partir do número de mols de amina na quitosana não-reticulada, determinada pela titulação potenciométrica (Tabela 2), o seu grau de desacetilação (GD) é igual a 88,6%. Costa Jr. *et al.* (2008) encontrou o valor de 76% para o GD utilizando do mesmo procedimento.

Uma vez que o grau médio de reticulação (GR) é definido como o número de grupos amino em relação as bases de *Schiff* da cadeia polimérica formadas com a reticulação, seu valor foi calculado a partir da Equação 11, que considera

a relação entre o número de mols de grupos amino determinados na quitosana reticulada e na não-reticulada, e que representa o número de mol máximo de grupos aminos livres.

$$GR = \frac{(\Delta V^{NR} - \Delta V^R)}{\Delta V^{NR}} \cdot 100 \quad Eq. (8)$$

Onde ΔV^{NR} e ΔV^R é o volume de NaOH gasto entre a primeira e a segunda inflexão da curva de titulação para, respectivamente, as esferas de quitosana não reticulada e reticulada em determinada concentração de glutaraldeído.

Na Figura 17 são apresentados o grau de reticulação das esferas em função da concentração de glutaraldeído utilizando para a reação de *Schiff*. Pode-se observar que o grau de reticulação aumenta gradualmente até estabilizar em cerca de 80% de reticulação, a partir da concentração 63,0 mol L⁻¹.

Este resultado sugere que há impedimentos estéricos para a formação de mais ligações cruzadas nas esferas. Baseado na estequiometria entre o glutaraldeído e os grupos aminos da quitosana, e no número de mols de grupos aminos na quitosana não-reticulada (Tabela 2) seriam necessários 2,75 mmol de glutaraldeído para cada grama de quitosana, e portanto, a concentração de glutaraldeído em 100 mL de solução necessária para reticular 4g de quitosana seria igual a 110 mmol L⁻¹.

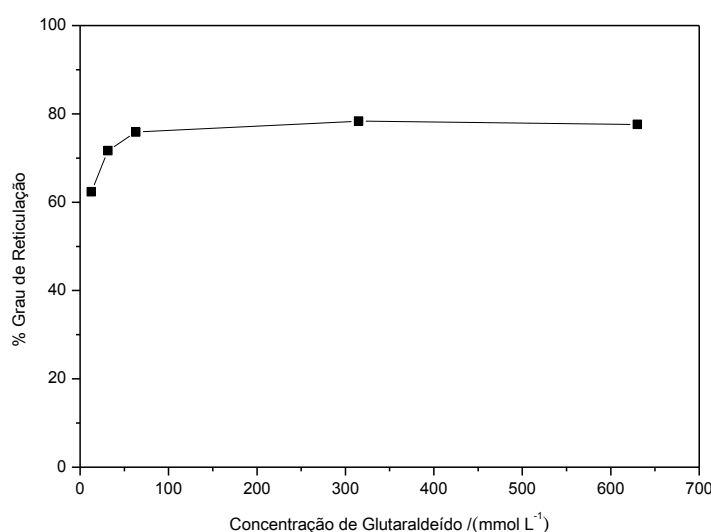


Figura 17. Grau de reticulação das esferas de quitosana determinado por titulação potenciométrica em função da concentração de glutaraldeído adicionado.

O aspecto das esferas de quitosana, não reticuladas e reticuladas com glutaraldeído 12,6 e 630 mmol L⁻¹, vistas a olho nu são apresentadas na Figura 18.



(A)

(B)

(C)

Figura 18. Aspecto das esferas úmidas de quitosana. (A) não reticulada e reticulada em concentrações de glutaraldeído: (B) 12,6 mmol L⁻¹ e (C) 630 mmol L⁻¹.

A cor de substâncias orgânicas é atribuída às ligações insaturadas, sendo a estrutura química da molécula que determina a cor de um composto. (LINS, 2012). A variação da cor, evidencia a modificação estrutural acontecida com a reticulação, onde as esferas apresentam uma coloração amarronzada, com o aumento do grau de reticulação.

3.2. Determinação de glutaraldeído

A fim de confirmar o grau de reticulação da quitosana, foi determinada a concentração do glutaraldeído antes e após a reticulação da quitosana. Para tanto, foi utilizado um método espectrofotométrico direto, uma vez que o glutaraldeído apresenta absorvidade molar suficiente.

Os espectros de absorção nas regiões do ultravioleta e do visível (UV-Vis) das soluções de glutaraldeído em concentrações de 1 a 100 mmol L⁻¹, são apresentados na Figura 19, sendo o pH mantido em cerca de 3,8.

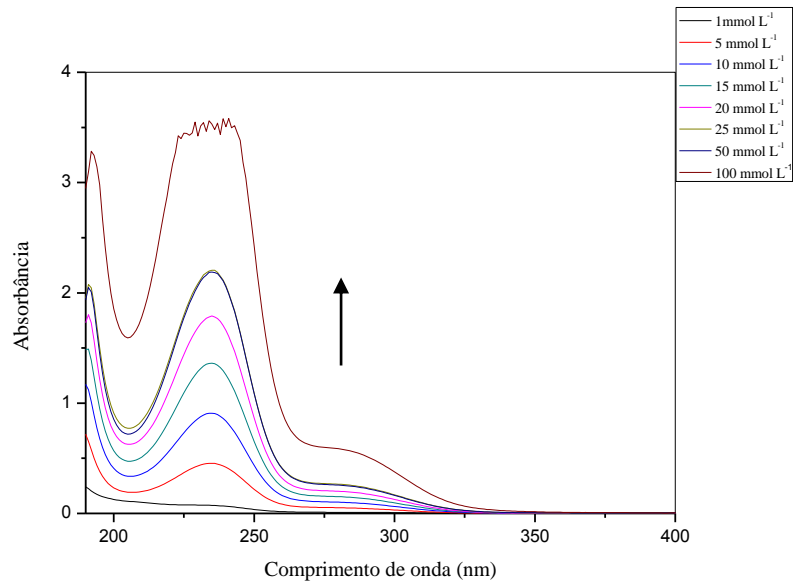


Figura 19. Espectros de absorção molecular no UV-visível de soluções de glutaraldeído. A seta mostra o sentido do aumento da concentração de glutaraldeído.

O comprimento de onda de máxima absorbância para o glutaraldeído foi 234 nm. Esse valor também foi obtido por JUANG *et al.* (2002), ao verificar a reticulação de glutaraldeído no equilíbrio em esferas de quitosana. As curvas analíticas foram construídas em dois comprimentos de onda, em 234 e 298 nm.

A curva analítica para o glutaraldeído, obtida em 234 nm para a faixa de concentração até 25 mmol L⁻¹ é apresentada na Figura 20.

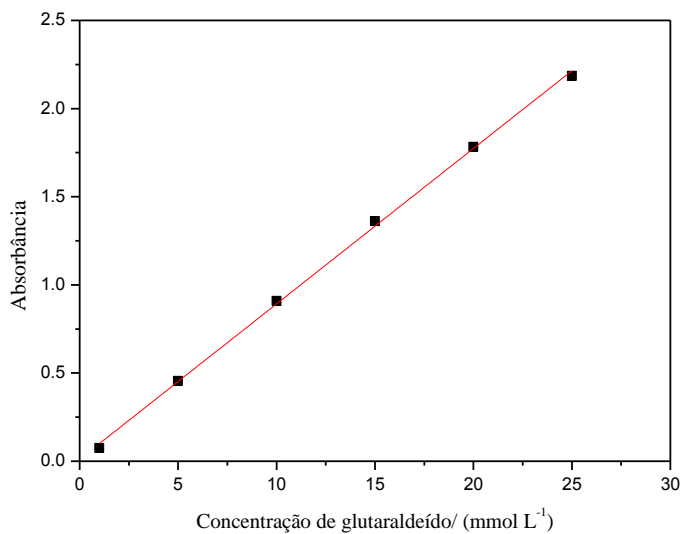


Figura 20. Curva analítica para o glutaraldeído obtida em 234 nm.

O modelo de regressão linear obtido para a curva analítica em 234 nm é apresentado na Equação 9. O coeficiente de determinação (R^2) obtido foi 0,9990 e o desvio padrão do resíduo igual a 0,025.

$$\hat{A} = (0,011 \pm 0,019) + (0,0881 \pm 0,0012).c/(\text{mmol L}^{-1}) \quad \text{Eq. (9)}$$

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram calculados a partir do estimativa do desvio padrão do branco (s_b) e da sensibilidade (S), obtidos pelo modelo de regressão linear (Eq. 9).

$$LD = 3,3 \frac{S_B}{S}$$

$$LD = 10 \frac{S_B}{S}$$

Os valores obtidos foram 0,70 e 2,10 mmol L^{-1} , respectivamente. Dessa maneira, a curva analítica nesse comprimento de onda apresentou uma faixa analítica de 2,1 a 25 mmol L^{-1} .

Entretanto, houve a necessidade de troca de equipamento, com isso foi utilizado o comprimento de onda de 298 nm, utilizando o espectrofotômetro Cirrus Femto. A curva analítica no comprimento de onda de 298 nm (Figura 21).

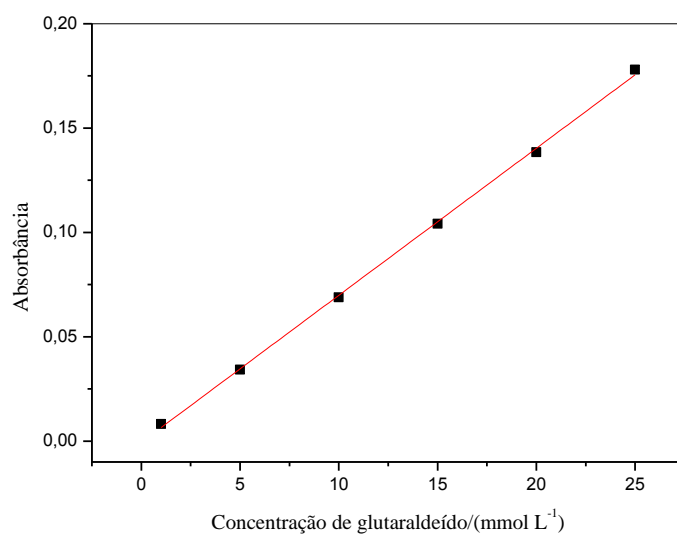


Figura 21. Curva analítica para o glutaraldeído obtida em 298 nm.

O modelo de regressão linear obtido para a curva analítica em 234 nm é apresentado na Equação 10. O coeficiente de determinação (R^2) obtido foi 0,9982 e o desvio padrão dos resíduos igual a 0,011.

$$\hat{A} = (-0,011 \pm 0,0054) + (0,0081 \pm 0,00013).c/(\text{mmol L}^{-1}) \quad \text{Eq. (10)}$$

Os valores de LOD e LOQ foram iguais a 2,0 mmol L⁻¹ e 6,6 mmol L⁻¹, respectivamente e a faixa analítica foi de 6,6 mmol L⁻¹ a 25 mmol L⁻¹.

Segundo GUPTA & JABRAIL (2006) a reticulação da quitosana é dependente do pH sendo a reação de formação das bases de *Schiff* favorecida em pH levemente ácido ou neutro, para evitar a protonação da amina presente na estrutura da quitosana. Os valores da absorvância e da concentração anterior e posterior a reticulação, bem como os valores do pH da solução de glutaraldeído na concentração de 12,6 a 630 mmol L⁻¹ são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8. Absorvância e concentração de glutaraldeído antes (C_a) e após (C_p) a reticulação de 4 g de esferas de quitosana

C glutaraldeído /(mmol L ⁻¹)	pH	C (antes) /(mmol L ⁻¹)	C (depois) /(mmol L ⁻¹)	%GR
12,6	4,5	9,2	2,2	6,4
31,5	4,2	24,9	19,3	5,1
63	3,9	59,1	48,4	9,7
315	3,4	467,5	338,2	118
630	3,3	719,8	491,3	208

Para o cálculo do grau de reticulação médio (GR) foi utilizada a Equação 11:

$$GR = \frac{(C_f - C_i).V.2}{n_{teórico}} \quad \text{Eq. (11)}$$

Onde GR é o grau de reticulação, C_f é a concentração final de glutaraldeído após a reticulação, C_i a concentração inicial de glutaraldeído antes da reticulação, V é

o volume da solução de glutaraldeído usado na reticulação e $n_{teórico}$ é o número de mols de glutaraldeído que reagiria se a condição estequiométrica fosse atingida e foi calculado a partir do número de mols de grupos amínicos presentes na quitosana, obtido pela titulação da quitosana não reticulada (Equação 12).

$$n_{teórico} = \frac{\Delta V^{NR} \cdot C_{NaOH}}{m_{titulação}} \cdot m_{reticulação} \quad Eq. (12)$$

A Figura 22 mostra os diferentes graus de reticulação das esferas de quitosana de acordo com a concentração de glutaraldeído. Observa-se que acima de 63 mmol L⁻¹ de glutaraldeído no meio, o consumo de glutaraldeído foi muito superior ao valor teórico necessário para a reticulação total da quitosana, sugerindo ou sua degradação ou adsorção na quitosana. Dessa maneira, o uso da concentração residual de glutaraldeído não foi adequado para a avaliação da reticulação da quitosana.

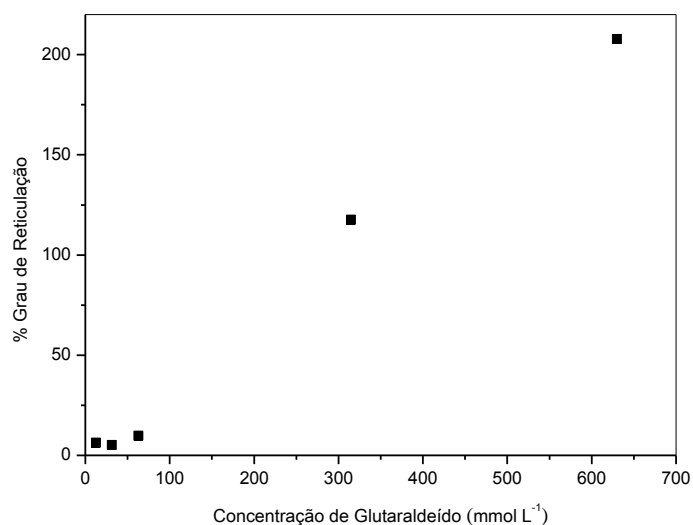


Figura 22. Grau de reticulação das esferas de quitosana baseado no consumo de glutaraldeído.

TORRES *et al.* (2005) ressalta que com um alto grau de reticulação as moléculas bifuncionais do glutaraldeído não têm necessariamente ambos os grupos aldeídicos ligados à quitosana e aldeídos podem estar disponíveis na matriz final reticulada.

3.3. Método semiquantitativo por espectrofotometria no infravermelho

Foi estudada a possibilidade de determinar o grau de reticulação nas esferas de quitosana utilizando a espectrofotometria FT-IR. Em tese, isso é possível, devido à Lei de Beer-Lambert-Bouger (ou Lei de Beer). Entretanto essa técnica tem sido aplicada apenas para identificar a presença de grupos funcionais (SANTOS. 2007).

Na Figura 23 são apresentados os espectros puros de absorção no FT-IR de massas de quitosana reticuladas com diferentes quantidades de glutaraldeído e dispersas em brometo de potássio, ou seja, sem nenhum tratamento matemático além daquele usualmente realizado durante a coleta dos espectros no instrumento analítico.

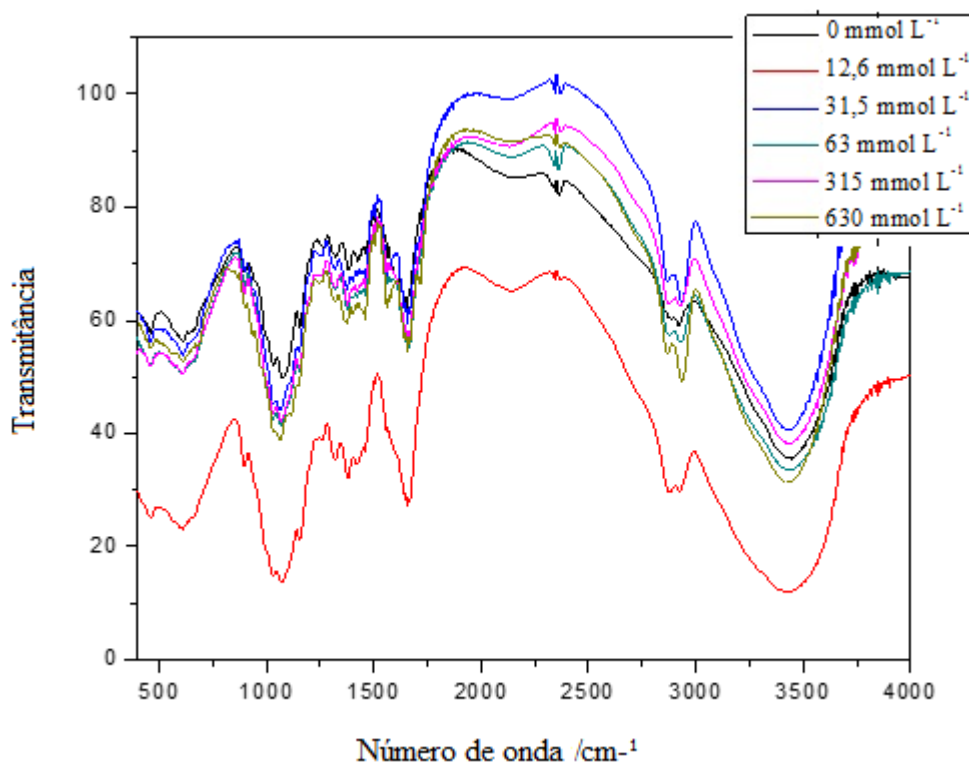


Figura 23. Espectros de FT-IR de transmitância de quitosana com diferentes graus de reticulação.

Observa-se uma grande variação na linha de base, dificultando observar os comprimentos de onda em que tenha havido variação na absorção devido à variação no grau de reticulação da quitosana.

Considerando que, em cada número de onda possa ser considerada a aditividade da absorvância, assim como a Lei de Beer, pode-se considerar a Equação 13 válida.

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda}cbf + (B_{\lambda} + L_{\lambda}) \quad \text{Eq. (13)}$$

onde ε_{λ} é absorvância molar em um dado comprimento de onda (λ), b , o caminho óptico, que, neste método é a espessura da pastilha, medida com paquímetro e c , a concentração de grupos presentes na quitosana reticulada e f , um fator de diluição, que considera a razão entre as massas de quitosana e de brometo de potássio utilizados no preparo das pastilhas. O termo B_{λ} se refere ao branco devido a absorção de outras ligações naquele comprimento de onda, enquanto que L_{λ} se refere à elevação da linha de base devido a fatores vinculados ao instrumento analítico.

Entretanto, no caso da espectrofotometria inversa, ou seja, quando há a diminuição da concentração de um grupo absorvedor da radiação, a Equação 19 pode ser reescrita (Eq. 14),

$$\begin{aligned} A_{\lambda} &= \varepsilon_{\lambda}(c_o - rc)bf + (B_{\lambda} + L_{\lambda}) \Rightarrow \\ A &= (-\varepsilon_{\lambda}rbf)c + (B'_{\lambda} + L_{\lambda}) \end{aligned} \quad \text{Eq. (14)}$$

onde c_o é a concentração inicial do grupo absorvedor e r , a razão molar entre a concentração de glutaraldeído e o grupo absorvedor de radiação. Observar-se que a equação geral se mantém, porém a sensibilidade analítica é negativa para o caso da espectrofotometria inversa.

Assim, a partir da Equação 14, obteve-se uma absorvância corrigida (A_{λ}^{corr}), que expressa a absorvância molar e a concentração (Eq. 15).

$$\begin{aligned} A_{\lambda} &= 2 - \log(\%T) \\ A_{\lambda}^{corr} &= \frac{A_{\lambda} - L_{\lambda}}{bf} = \varepsilon_{\lambda}c + \frac{B_{\lambda}}{bf} \end{aligned} \quad \text{Eq. (15)}$$

Os valores da linha base (L_λ) foram arbitrariamente selecionados, considerando-se principalmente os vales observados nos espectros. Na Figura 24 é apresentado a família de espectros para a linha base corrigida (L_λ) utilizando-se a absorbância no número de onda igual a $853,7\text{ cm}^{-1}$.

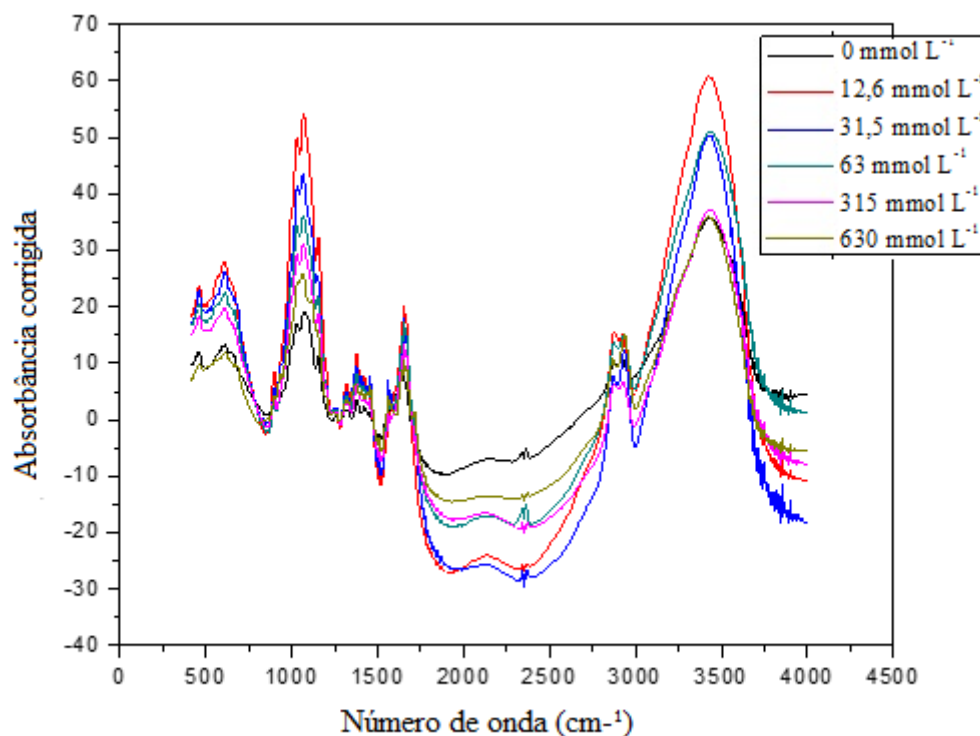


Figura 24. Comportamento da Absorbância corrigida no FT-IR para quitosana, com diferentes graus de reticulação, em função do número de onda, usando o número de onda $853,7\text{ cm}^{-1}$ como referência.

Através da Figura 24 observar-se a diminuição da intensidade da banda da amina alifática na região de 1100 cm^{-1} , indicando uma ligação com glutaraldeído, formando uma imina, que é caracterizada pelo pico em 1655 cm^{-1} , assim como é visto em TORRES *et al.* (2005) na caracterização de quitosana modificada quimicamente com glutaraldeído. O alargamento na banda de 3200 a 3600 cm^{-1} é atribuída ao estiramento do OH (hidroxila) (COSTA JR *et al.*, 2008).

Para avaliar o número de onda mais adequado para a determinação do grau de reticulação, foi aplicado um modelo de regressão linear da absortividade corrigida e o grau de reticulação, obtendo-se assim uma curva analítica para cada número de onda. O comportamento da sensibilidade analítica é apresentado na Figura 25. A existência de sensibilidade analítica negativa indica

a diminuição da presença de um grupo químico a medida que aumenta a concentração de um reagente qualquer, portanto, uma espectrofotometria inversa. A reticulação química da quitosana com o glutaraldeído ocorre entre o nitrogênio do grupo amino (-NH₂) com o carbono do aldeído, o qual desloca o oxigênio do aldeído levando a perda da molécula de água formando assim a ligação C=N, base de *Schiff* (ROKHADE *et al*, 2007).

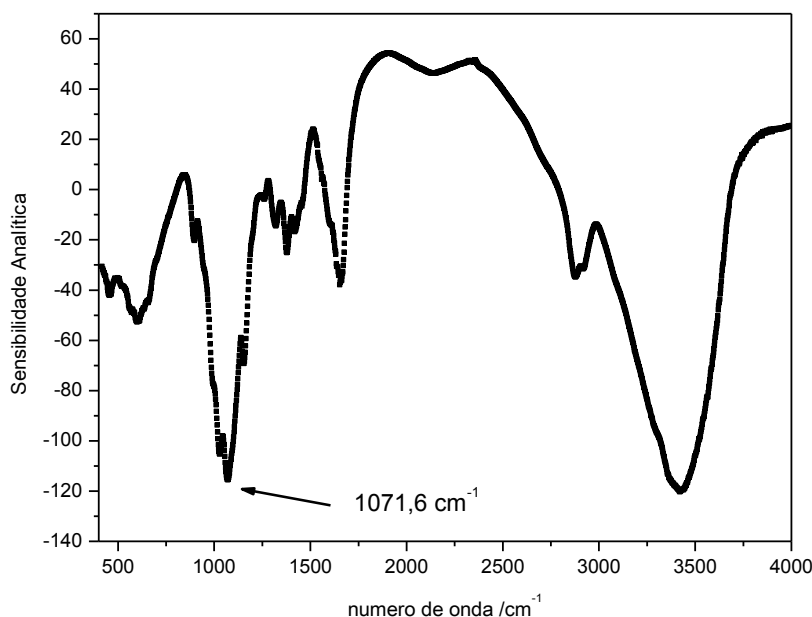


Figura 25. Comportamento da sensibilidade analítica para cada número de onda

Os valores absolutos mais elevados de sensibilidade analítica são, *a priori*, mais convenientes para o desenvolvimento de um método analítico. Entretanto, a qualidade do ajuste do modelo de regressão pode ser considerado ainda mais importante. Para a avaliação da qualidade do ajuste do modelo considerando todos os números de onda, foi considerado e também o maior valor para a função N9 (Equação 16).

$$N9 = -\log(1 - R^2) \quad \text{Eq. (16)}$$

A função N9 permite avaliar melhor o número de onda onde há melhor ajuste do modelo linear. Como os valores de R² considerados adequados estão acima de 0,9, é usual descrevê-los em relação ao “número de noves” existentes

no R^2 . Assim, para R^2 igual a 0,99, há dois noves, em 0,9999, quatro noves, etc. A função N9 fornece o “número de noves” do coeficiente de determinação. É importante lembrar que o desvio padrão dos resíduos também permitiria a avaliar esse parâmetro adequadamente.

Ainda que a maior sensibilidade analítica seja observada em $1071,6 \text{ cm}^{-1}$ (N9 igual a 2,48, ou seja, R^2 igual a 0,996), em 1085 cm^{-1} há o maior número de noves (função N9 igual a 3,41, ou seja R^2 igual a 0,9996), como se vê na Figura 26. Vale lembrar que as aminas alifáticas apresentam pico inverso na região de 1070 a 1100 cm^{-1} (BEPPU *et al.*, 1999)

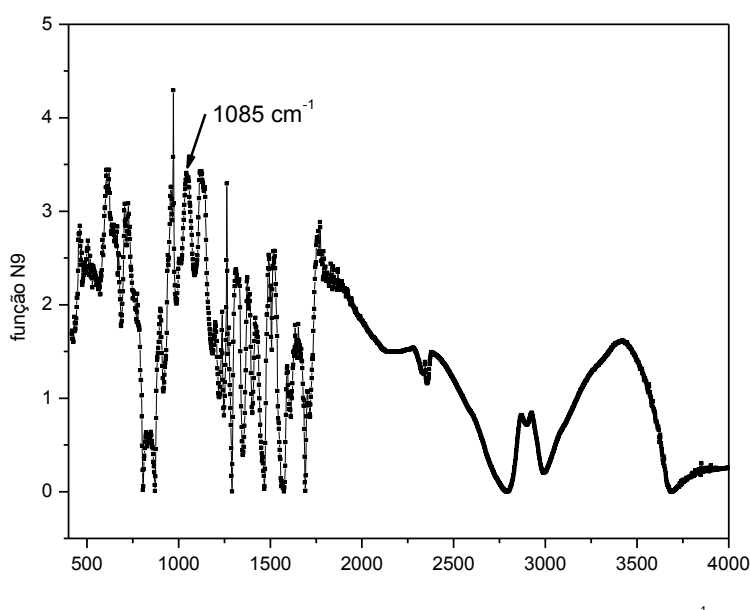


Figura 26. Comportamento da função N9 para cada número de onda

Na Figura 27 são apresentadas as curvas analíticas para os dois números de onda. Pode-se observar o melhor ajuste em 1085 cm^{-1} pelos gráficos de resíduos apresentados no inserto da Figura 27. O modelo de regressão da curva analítica é apresentado na Equação 17.

$$\hat{A}^{corr} = (105,6 \pm 1,2) - (0,99 \pm 0,018). \%GR \quad \text{Eq(17)}$$

O desvio padrão dos resíduos foi igual a 1,0%, o LOD, igual a 3,2% de reticulação e LOQ igual a 10,4% de reticulação. Assim, a faixa analítica deve estar entre 10,4% e 80,0%.

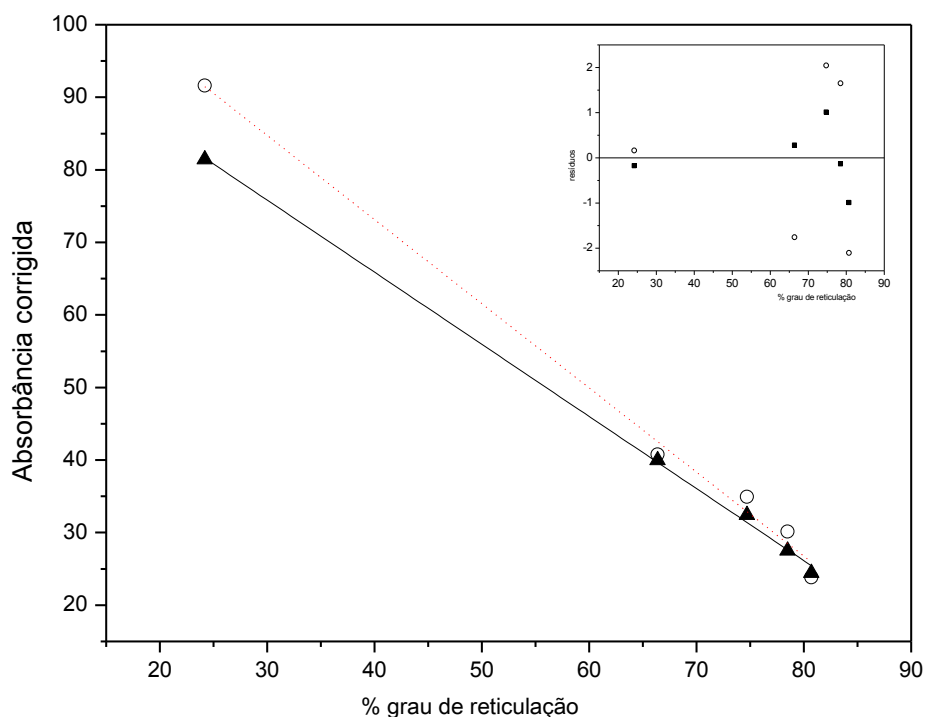


Figura 27. Curva analítica do grau de reticulação pelo método semiquantitativo FT-IR no número de onda (▲) 1085 cm⁻¹ e (○) 1078 cm⁻¹.

Com o procedimento, foi possível obter um método quantitativo para a determinação do grau de reticulação da quitosana, sendo muito prático, uma vez que esse valor é obtido a partir da medida de absorbância no FT-IR a partir de uma pastilha de brometo de potássio contendo a amostra.

4. Conclusão

Foi proposto um método para determinação do grau de reticulação pelo método quantitativo por infravermelho (FT-IR). O método apresentou uma curva analítica linear entre 10,8 e 80% de reticulação, com um desvio padrão relativo de 1% de reticulação.

A quantificação direta de glutaraldeído residual não apresentou correlação com o método potenciométrico, podendo estar havendo também a adsorção do glutaraldeído na matriz de quitosana, ou mesmo sua degradação.

O grau médio de reticulação das esferas de quitosana para concentrações de concentração de glutaraldeído de superiores a 63,0 mmol L⁻¹ foi possível bloquear mais de 80% dos grupos aminos disponíveis na quitosana.

CAPÍTULO 4. LIBERAÇÃO CONTROLADA DE Cu(II)-EDTA A PARTIR DA MATRIZ QUITOSANA

1. Introdução

A adsorção é uma interação que envolve o contato de um soluto presente em uma fase líquida ou gasosa (adsorvato) com a superfície de uma fase sólida (adsorvente), com o objetivo de reter (usualmente de maneira seletiva) uma ou mais espécies de adsorvatos (VIEIRA *et al.*, 1999). De uma forma geral os mecanismos de interação adsorvato/adsorvente pode ser químicos ou físicos (VOLESKY, 2001). A energia da interação adsorvato/adsorvente alta indica uma quimiossorção, prevalecendo mecanismos como complexação e formação de ligações covalentes. Por outro lado, energia de ligação menor indica interações intermoleculares, tais como interação eletrostática ou força de van der Waals (JORDÃO *et al.*, 2000). A adsorção se difere da absorção, pois na absorção acontece um acúmulo da substância absorvida em todo o volume do adsorvente enquanto que na adsorção o fenômeno ocorre na superfície do adsorvente (PINO, 2005) (Figura 28)

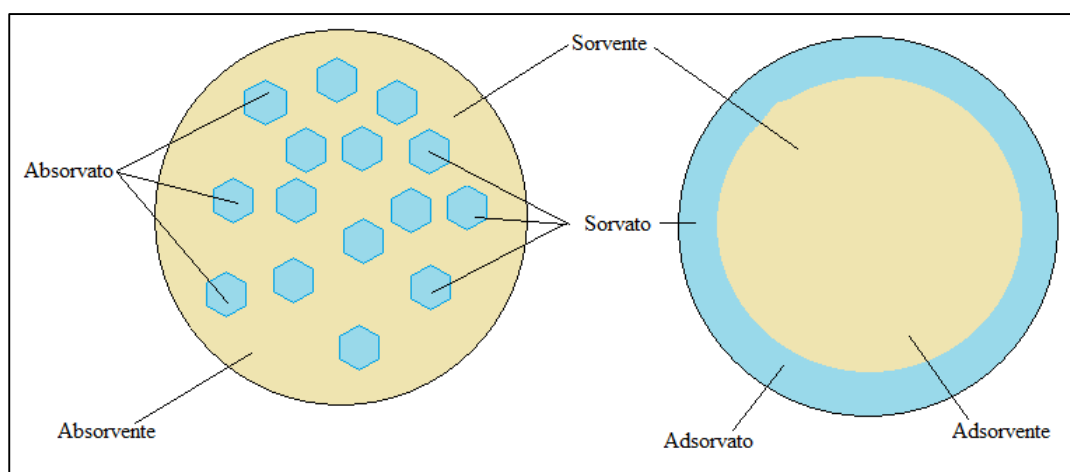


Figura 28. Diagrama esquemático da diferença entre os processos de absorção e de adsorção.

Devido ao alto custo de adsorventes como carvão ativado, há um empenho em encontrar materiais de baixo custo, que estejam disponíveis em grandes quantidades e nas proximidades do local em que será aplicado, que

possua a capacidade de interagir com o adsorvato em solução aquosa (BRASIL *et al.*, 2007). Assim o uso de adsorventes naturais é considerado uma alternativa promissora ao uso de adsorventes sintéticos (BAILEY *et al.*, 1999). Por exemplo, Zimmermann *et al.* (2010) trabalhou com adsorção de Cr (VI) utilizando quitosana reticulada com Fe; Cetinus *et al.* (2009) adsorveu Cu (II) em esferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído, enquanto LAUS *et al.* (2006) utilizou esferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato na adsorção de Fe (III) e Mn(II).

Os processos de adsorção e dessorção são influenciados por diversos fatores tais como temperatura, pH, força iônica, concentração inicial do adsorvato, massa do adsorvente e área superficial do adsorvente (BAILEY *et al.*, 1999). Sendo assim, o estudo do efeito desses fatores no processo de adsorção é importante para uma melhor compreensão do mecanismo de remoção da substância de interesse por um adsorvente. A taxa de remoção do adsorvato da solução depende da transferência de matéria e da velocidade que o sistema atinge o equilíbrio (AKSU & KUTSAL, 1998; SINHA *et al.*, 2004).

Um outro fator importante é que o material que compõe as partículas produza metabólitos não-tóxicos e seja degradado facilmente, favorecendo o uso de formulações obtidas a partir de polímeros biodegradáveis. Eles têm sido extensivamente aplicados nas indústrias alimentícia e farmacêutica para a liberação de substâncias ativas, como nutrientes, fármacos, aromas, dentre outros (SILVA *et al.*, 2010).

Embora o termo 'encapsulação' tenha sido usado como sinônimo para a formação de microcápsulas quanto de microesferas (DEPYPERE *et al.*, 2003), a microencapsulação é uma tecnologia de empacotamento com finas coberturas poliméricas aplicáveis em sólidos, gotículas de líquidos ou material gasoso, formando pequenas partículas denominadas microcápsulas, que podem liberar seu conteúdo sob velocidade e condições específicas (REBELLO, 2009). As microesferas diferem das microcápsulas por apresentarem a mesma estrutura interna e na superfície, o que não acontece na encapsulação. As esferas podem ser divididas em dois grupos: aquelas nas quais o núcleo é nitidamente concentrado na região central, circundado por um filme definido e contínuo do material

de parede (ARSHADY, 1993), e aquelas nas quais o núcleo é uniformemente disperso em uma matriz (REBELLO, 2009).

Em nutrição de plantas, uma técnica alternativa de fertilização consiste no emprego de adubos com liberação controlada, principalmente para fontes de nitrogênio, atingindo o sistema radicial das plantas mais lentamente (BOCKMAN & OLFS, 1998). Essa característica pode garantir a manutenção de um sincronismo entre a liberação de nutrientes ao longo do tempo e as necessidades nutricionais, favorecendo o crescimento e desenvolvimento das plantas (SERRANO *et al.*, 2006).

A reticulação da matriz polimérica pode auxiliar no controle da liberação controlada (SHU *et al.*, 2001). A reticulação tem sido realizada com diversos reagentes, tais como poli(ácido acrílico) (JOSUÉ *et al.*, 2000), epicloridrina (OLIVEIRA & VIEIRA, 2006), glioxal (YANG *et al.*, 2005), tripolifosfato (LAUS *et al.*, 2006) e glutaraldeído (JAMEELA & JAYAKRISHNAN, 1995; JUANG *et al.*, 2002; MARQUES NETO *et al.*, 2013; LINS *et al.*, 2014).

2. Materiais e Métodos

2.1. Soluções

Todas as soluções foram preparadas em água destilada. Foram utilizadas micropipetas de volume variável de 100 µL a 10 mL (LabMate Soft).

2.1.1. Solução complexo de Cu (II)-EDTA

O íon complexo de cobre (II) e EDTA foi preparado pela mistura direta na relação molar de 1:1 de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Impex) e do sal dissódico de EDTA ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$, Vetec) com a solução estoque 63,5 mg Cu L^{-1} . As demais soluções com diferentes concentrações foram preparadas por diluição.

2.1.2. Solução Tampão Acetato 0,001 mol L⁻¹

Foram diluídos 58 µL de ácido acético em 900 mL de água destilada, ajustando-se o pH com NaOH 0,1 mol L^{-1} , para pH 4 e 5,8. O volume foi completado para 1000 mL.

Para o estudo simultâneo do pH e força iônica houve a diluição de 58,5 g de cloreto de sódio em 1000 mL de solução tampão, ocorrendo posterior ajuste de pH. Esses procedimentos foram realizados mais de uma vez, ocorrendo a mistura das soluções em béquer de 5 L.

2.1.3. Solução Tampão TRIS 0,001 mol L⁻¹

Foram diluídos 0,1210 g de Tris(hidroximetil)aminometano em 900 mL de água destilada, o pH foi ajustado para 7,5 com HCl 0,1 mol L⁻¹ e o volume completado para 1000 mL. Para o estudo simultâneo do pH e força iônica houve a diluição de 58,5 g de cloreto de sódio em 1 L de solução tampão, ocorrendo posterior ajuste de pH. Esses procedimentos foram realizados mais de uma vez, ocorrendo a mistura das soluções em béquer de 5 L.

2.2. Liberação controlada Cu (II)-EDTA a partir de esferas de quitosana

O estudo da liberação do complexo foi realizado com a suspensão de 100 mg de esferas de quitosana (produzidas no item 2.2) em recipiente plástico com 100 mL de solução tamponada em pH 4; 5,8 e 7,5 com força iônica 5, 75 e 150 mmol L⁻¹ sob agitação mecânica de 200 rpm em mesa agitadora (Tecnal TE 420). Alíquotas de 3 mL foram retiradas nos tempos 3, 24, 48, 60, 72 e 96 horas para o estudo cinético e determinação do tempo de equilíbrio.

3. Resultados e discussão

3.1. Liberação controlada de Cu (II)-EDTA a partir da matriz quitosana

A influência de diversos parâmetros sobre a liberação controlada do Cu (II)-EDTA a partir da matriz da quitosana foi estudada com um planejamento fatorial 2⁴, com ponto central, para as variáveis força iônica e pH da solução, grau de reticulação das esferas de quitosana e pH de adsorção. As condições experimentais estão descritas na Tabela 9.

Tabela 9. Condições experimentais do Planejamento 2⁴ para estudo da liberação de Cu (II)-EDTA a partir da matriz quitosana

Experimentos	Reticulação /(mmol L ⁻¹)	pH Adsorção	Força Iônica Externa /(mmol L ⁻¹)	pH Externo
1	3,15	4	5	4,0
2	3,15	4	5	7,5
3	3,15	4	150	4,0
4	3,15	4	150	7,5
5	3,15	4	75	5,8
6	3,15	7,5	5	4,0
7	3,15	7,5	5	7,5
8	3,15	7,5	150	4,0
9	3,15	7,5	150	7,5
10	3,15	7,5	75	5,8
11	31,5	4	5	4,0
12	31,5	4	5	7,5
13	31,5	4	150	4,0
14	31,5	4	150	7,5
15	31,5	4	75	5,8
16	31,5	7,5	5	4,0
17	31,5	7,5	5	7,5
18	31,5	7,5	150	4,0
19	31,5	7,5	150	7,5
20	31,5	7,5	75	5,8
21	12,6	5,8	5	4,0

22	12,6	5,8	5	7,5
23	12,6	5,8	150	4,0
24	12,6	5,8	150	7,5
25	12,6	5,8	75	5,8

Na Figura 29 são apresentados alguns perfis de liberação do complexo a partir da quitosana. O valor inicial está associado à uma quantidade de complexo não-adsorvido ou adsorvido na superfície externa, apresentando uma cinética mais rápida que o complexo adsorvido. Esse período inicial é também chamado de “burst” (ZIMMERMANN *et al.*, 2010)

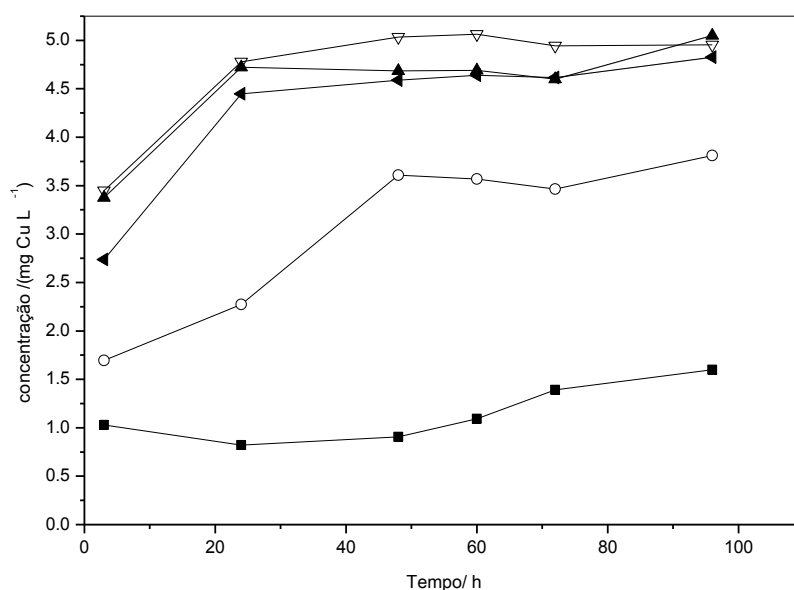


Figura 29. Exemplos de perfis de liberação do complexo Cu (II)-EDTA a partir de quitosana
Experimentos (■)1 (○)2 (▲) 3 (▽) 4 (◄)5

Pode-se também observar que em alguns experimentos, há um intervalo de tempo onde não há liberação aparente da espécie de interesse, chamado tempo de retardo (ou *lag-time*) (LEITE, 2004). O perfil de liberação apresenta um padrão sigmoide, caracterizado por um tempo de retardamento seguido por uma liberação relativamente rápida da substância (ZHANG *et al.*, 2003). Na verdade, esse período surge devido às baixas concentrações no tempos de iniciais de

liberação, comparadas ao LOQ do método de determinação da concentração de cobre (II) na solução.

Dessa maneira, foi feito um ajuste empírico de uma função sigmóide de Boltzmann (Equação 19), que permite modelar o intervalo de tempo inicial (*lag-time*) e a concentração no equilíbrio, C_{eq} , além de fornecer um parâmetro associado à constante de velocidade, o fator p .

$$y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{(x_0 - x)p}} \quad Eq. (19)$$

Onde os termos A_1 , A_2 , x_0 e p são parâmetros ajustáveis pelo modelo de regressão não-linear (obtido pelo OriginLab Origin 8.0). O termo A_2 é uma estimativa da concentração no equilíbrio.

Para estimar o *lag-time* (t_{lag}) e o tempo para atingir o equilíbrio (t_{eq}) foi considerada a extrapolação de reta que passa pela região de aumento da concentração de complexo no meio. O *lag-time* se refere ao ponto de cruzamento com patamar inferior (A_1) e o tempo de equilíbrio, o cruzamento com o patamar superior (A_2). Na Figura 30 é apresentada uma curva hipotética e as retas utilizadas para o cálculo do t_{lag} e t_{eq} .

$$t_{lag} = x_0 + \frac{0.5}{S}$$

$$t_{eq} = x_0 - \frac{0.5}{S}$$

Onde:

$$S = \frac{(0.8 - 0.2)}{(x_{0,8} - x_{0,2})}$$

$$x_i = p \cdot \log\left(\frac{1 - \alpha_1}{\alpha_1}\right) - x_0$$

onde α_1 é igual 0,2 para $x_{0,2}$ e 0,8 para $x_{0,8}$

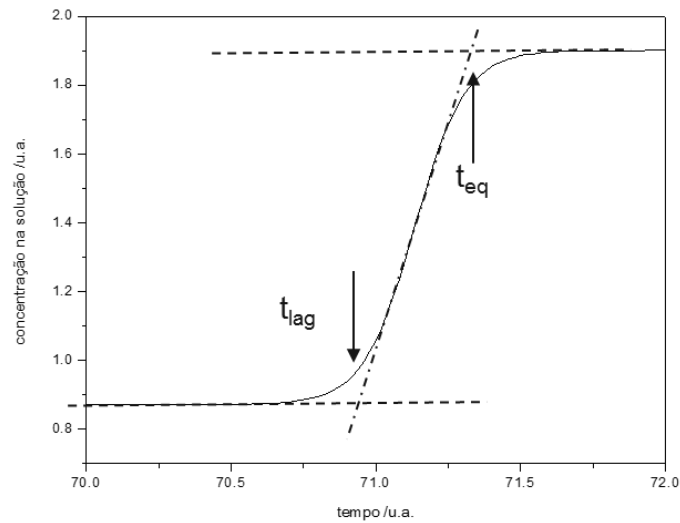


Figura 30. Curva hipotética do perfil observado para a liberação do complexo

O planejamento fatorial foi avaliado usando o *lag-time* como resposta. Quanto maior o valor desse parâmetro, menor a velocidade de liberação do complexo. Pelo Gráfico de Pareto (Figura 31), o pH e a força iônica da solução influenciam significativamente (a 95% de confiança), inclusive com um termo de interação entre ambos. A diminuição desses parâmetros aumenta o *lag-time*.

Esse resultado sugere a troca iônica como processo de imobilização do complexo na superfície, pois com a diminuição do pH, aumenta a quantidade de cargas da quitosana, que age como um trocador aniônico fraco. Além disso, o aumento da força iônica, ou seja, aumento da concentração de eletrólitos na solução, permite a troca-iônica do complexo ligado à quitosana pelo cloreto. Ainda que esses sejam processos de equilíbrio, o sistema deve ser controlado pela difusão dos prótons e cloretos à superfície da quitosana e do complexo para a solução.

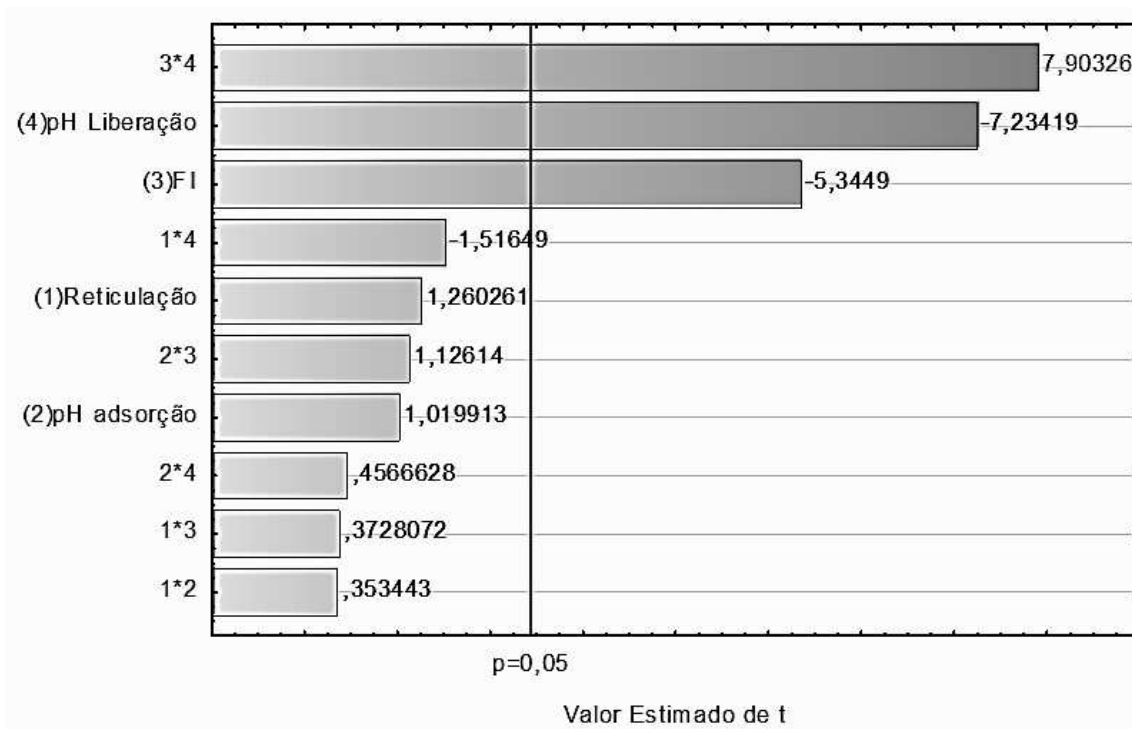


Figura 31. Gráfico de Pareto de efeitos e significâncias das variáveis estudadas no planejamento fatorial 2^4 sobre o *lag-time* da liberação controlada do complexo Cu (II)-EDTA a partir da matriz quitosana.

Não foram encontrados trabalhos na literatura envolvendo liberação de micronutrientes para plantas, contudo estudos que envolve liberação controlada de medicamentos a partir de matrizes poliméricas tem apresentado *lag-time*. Argin *et al.* (2014) estudou o uso do compósito quitosana-xantana para liberação controlada de bactérias probióticas em condições gastrointestinais simuladas (pH ácido) e observou um *lag-time* de 72 horas em água deionizada e de 8 horas para fluido intestinal simulado, destacando a importância do estudo do pH para o entendimento do fato ocorrido. Nunthanid *et al.* (2008) estudou o efeito do pH na liberação de fármacos a partir de compósitos de HPMC (Hidroxipropil Metilcelulose) e quitosana-acetato, e observou o aumento do *lag-time* com o aumento do pH relacionando o ocorrido com a solubilidade da quitosana.

O tempo de equilíbrio como resposta do planejamento fatorial não foi significativamente influenciado, ao nível de 95% de confiança, por nenhuma das variáveis estudadas (Figura 32)

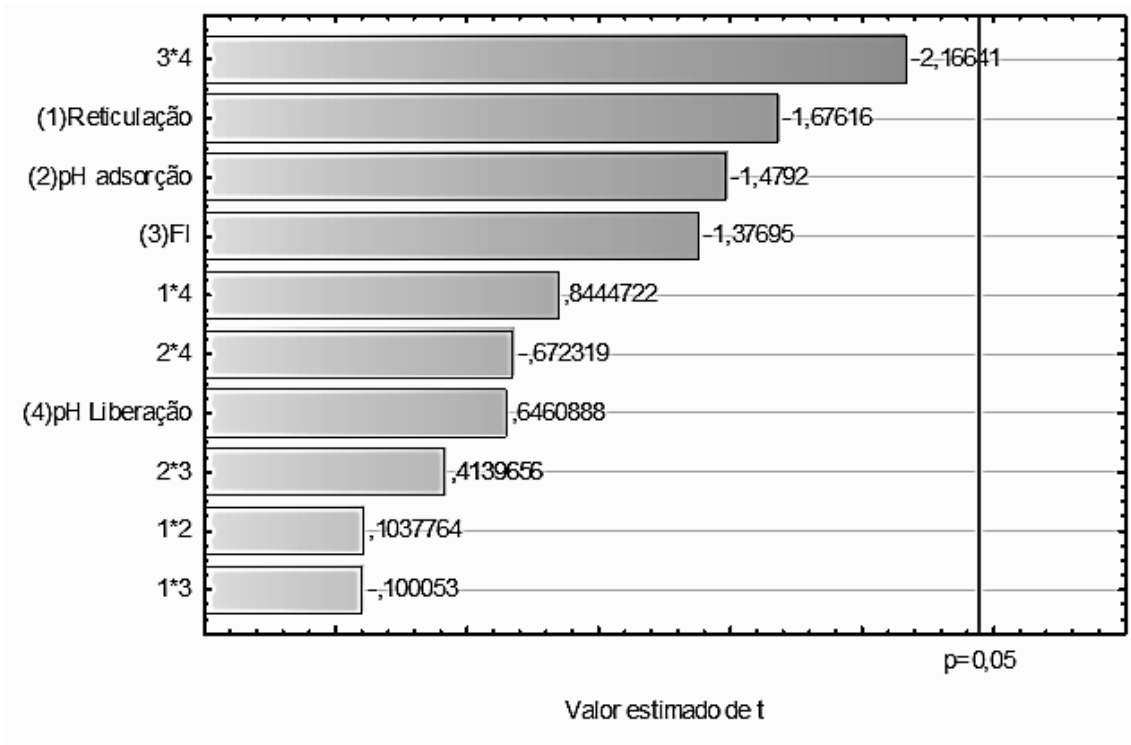


Figura 32. Gráfico de Pareto de efeitos e significâncias para o planejamento fatorial 2^4 para liberação de Cu (II)-EDTA a partir da matriz quitosana relacionado ao *tempo equilíbrio*.

Ao considerar a concentração no equilíbrio como resposta do planejamento fatorial, pode-se observar a influência principalmente do pH de adsorção, mas também da força iônica e do pH do meio (Figura 33). Além disso, foram observados os efeitos sinérgico entre o pH de adsorção e o grau de reticulação da quitosana e antagônico entre o pH e força iônica do meio. Esse efeito antagônico entre o pH e a força iônica diminuiu os efeitos principais desses parâmetros.

Esse planejamento mostrou a importância do pH no processo de adsorção, pois, com a diminuição do pH, há uma maior protonação dos grupos amino, favorecendo o comportamento de trocador aniônico fraco da quitosana e assim, permitindo a retenção de uma quantidade maior de complexo nas esferas.

O efeito observado do pH e da força iônica do meio corrobora o comportamento observado em relação ao *lag-time*. Com o aumento do pH do meio, diminui a quantidade de grupos catiônicos na quitosana, liberando uma quantidade equivalente de complexo. Além disso, o aumento da concentração

de cloreto no meio permite uma maior troca iônica com os complexos ainda ligados à quitosana.

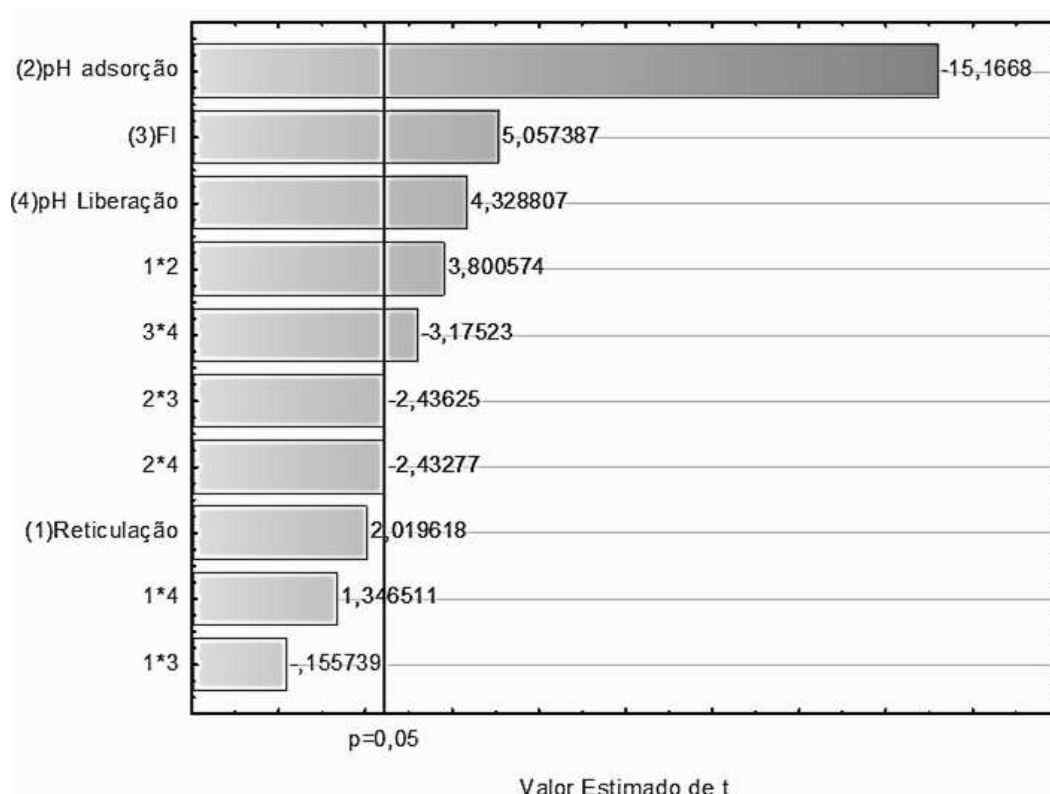


Figura 33. Gráfico de Pareto de efeitos e significâncias para o planejamento fatorial 24 para liberação de Cu (II)-EDTA a partir da matriz quitosana relacionado à capacidade máxima de liberação.

A relação entre o pH de adsorção e a reticulação sugere que a diminuição da reticulação também favorece a maior adsorção, pois mantém um número maior de grupos aminos, que só serão importantes na retenção do complexo se forem protonados. Como ocorrido em Juang *et al.* (2001), onde houve uma diminuição da capacidade de adsorção de cobre (II) em esferas de quitosana a medida que aumentou o grau de reticulação com glutaraldeído.

4. Conclusão

A liberação do complexo Cu (II)-EDTA a partir da matriz quitosana apresentou um *lag-time*, que foi influenciado pelo pH e a força iônica da solução, e a interação entre ambos. A saturação do meio foi influenciada pela força iônica

externa, o pH durante a adsorção do complexo e o pH durante a sua liberação, bem como a interação entre o grau de reticulação da quitosana e pH de adsorção e também a interação da força iônica e o pH de liberação.

CAPÍTULO 5. CONCLUSÃO GERAL E SUGESTÕES PARA ETAPAS FUTURAS

CONCLUSÃO GERAL

Foi realizado o estudo da liberação do complexo de cobre (II)-EDTA a partir da matriz ágar; avaliando a influência das variáveis força iônica, teor de ágar e tamanho dos *pellets* na liberação do complexo de cobre (II)-EDTA utilizando-se de planejamento fatorial. O modelo cinético que explicou a liberação do complexo foi aquele de Noyes-Whitney, sugerindo um processo difusional.

A concentração no equilíbrio foi influenciada pelo teor de ágar nos pellets e a constante cinética influenciada pelo tamanho dos mesmos, sendo que o processo apresentou uma liberação máxima de 97% e não foi influenciada pela força iônica da solução.

Foi proposto um método para determinação do grau de reticulação da quitosana no infravermelho médio com faixa analítica de 11% a 80%. Observou-se também que a determinação do glutaraldeído residual não apresenta correlação com o grau de reticulação podendo haver adsorção desse reagente sobre a quitosana ou sua degradação.

A liberação do complexo de cobre (II)-EDTA a partir da matriz quitosana foi estudada com auxílio de um planejamento fatorial 2^4 . Observou-se um *lag-time*, que foi influenciado pelo pH e a força iônica da solução enquanto que a concentração de equilíbrio do complexo foi influenciada pela força iônica externa, pelo pH durante a adsorção do complexo e o pH durante a sua liberação, bem como a interação entre o grau de reticulação da quitosana e pH de adsorção e também a interação da força iônica e o pH de liberação.

Com base nos resultados encontrados, conclui-se que as matrizes poliméricas ágar e quitosana apresentam potencial na aplicação da liberação controlada do complexo de Cu(II)-EDTA.

SUGESTÕES PARA ETAPAS FUTURAS

Para efetiva utilidade na aplicação em nutrição de plantas necessita ainda de mais estudos que possibilitem verificar o emprego das matrizes poliméricas ágar e quitosana para disponibilizar cobre na quantidade necessária para planta. Com isso, destaca-se:

- Avaliar o comportamento do glutaraldeído residual na quitosana, visando verificar a possível adsorção e seu efeito sobre a adsorção dos adsorbatos de interesse.
- Avaliação da exatidão e repetibilidade do método de determinação de grau de reticulação por espectrofotometria no infravermelho médio.
- Estudo das estruturas das matrizes poliméricas com auxílio da microscopia de varredura de elétrons visando explicar as alterações na liberação ao modificar o teor de ágar dos *pellets* e o grau de reticulação nas esferas de quitosana.
- Estudo cinético e de equilíbrio da adsorção de Cu-EDTA na matriz quitosana a compreender mecanismo de adsorção.
- Aplicação das matrizes poliméricas contendo Cu-EDTA em ensaios de crescimento de alface em hidroponia, visando verificar a absorção de cobre pela planta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKSU, Z.; KUTSAL, T. Determinations of kinetic parameters in the biosorption of copper(II) on *Cladophora* sp., in a packed bed column reactor. **Process Biochemistry**, v.33, n.1, p.7-13, 1998.

ALISTE, A.J. Uso de substâncias antioxidantes na resposta a radiação dos hidrocolóides carragenanas, agaranas e alginatos utilizados na indústria alimentícia. Tese de Doutorado. Tecnologia Nuclear - Aplicação. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

ALVARENGA, E.S., OLIVEIRA, C.P.; BELLATO, C.R. An approach to understanding the deacetylation degree of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v.80, p.1155–1160, 2010.

AOUADA, F. A.; MOURA, M. R.; MENEZES, E.A.; NOGUEIRA, A. R. A.; MATTOSO, L. H. C. Síntese de hidrogéis e cinética de liberação de amônio e potássio. **R. Bras. Ci. Solo**, p. 1643-1649, 2008.

ARGIN, S.; KOFINAS, P.; LO, Y. M. The cell release kinetics and the swelling behavior of physically crosslinked xanthan-chitosan hydrogels in simulated gastrointestinal conditions. **Food Hydrocolloids**, v.40, p.138-144, 2014.

ARMISÉN, R. Agar and agarose biotechnological applications. **Hydrobiologia**, v. 221, p.157–166, 1991.

ARSHADY, R. Microcapsules for food. **Journal of Microencapsulation**, v. 10, n.4, p. 413-435, 1993

ATIA, A. Studies on the interaction of mercury (II) and uranyl (II) with modified chitosan resins. **Hydrometallurgy**, v. 80, p. 13–22, 2005.

ATKINS, P. W.; **Physical Chemistry**; Oxford University Press; Oxford, 1994.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; FOOK, M. V. L.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.2.3, p. 27-34, 2007.

BACCAN, N.; ANDRADE, J. C.; GODINHO, O. E. S.; BARONE J. S.; **Química Analítica Quantitativa Elementar**. 2a edição. Editora da UNICAMP, Campinas, 1985.

BAILEY, E.S.; OLIN, T.J.; BRICKA; R.M.; ADRIAN, D. D. A review of potentially low-cost sorbents for Heavy metals. **Water Res.**,v. 33, n. 11, p. 2469-2479, 1999.

BAIRD, C. **Environmental Chemistry**; W. H. Freeman & Co.; New York, 1999

BAYOMI, M.A.; AL-SUWAYEH S.A.; EL-HELW, A.M.; MESNAD, A.F. Preparation of casein–chitosan microspheres containing diltiazem hydrochloride by an aqueous coacervation technique. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v.73, p.187–192; 1998.

BEPPU, M.M., ARRUDA, E. J. E SANTANA, C. C. Síntese e Caracterização de Estruturas Densas e Porosas de Quitosana. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, p.163-169, 1999.

BEPPU, M.M.; VIEIRA, R.S.; AIMOLI, C.G.; SANTANA, C.C. Crosslinking of chitosan membranes using glutaraldehyde: Effect on ion permeability and water absorption. **Journal of Membrane Science**, v. 301, p.126–130, 2007.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O.; GURNY, R. Structure and biomedical applications. **European Journal Pharmaceutics Biopharmaceutics**, v. 57, p. 35-52, 2004.

BOCKMAN, O.C.; OLFS, H.W. Fertilizers, agronomy and N₂O. **Nutr. Cycl. Agroecosyst.**, v.52, p.165-170, 1998.

BORAL, S.; BOHIDAR, H.B. Hierarchical structures in agar hydrogels. **Polymer**, v. 50, p. 5585-5588. 2009

BRASIL, J.L.; VAGHETTI, J.C.P.; ROYER, B.; SANTOS JÚNIOR, A.A.; SIMON, N.M.; PAVAN, F.A.; DIAS, S.L.P.; LIMA, E.C. Planejamento estatístico de experimentos como uma ferramenta para otimização das condições de bioissorção de Cu(II) em batelada utilizando-se casca de nozes pecã como bioissorvente. **Quim. Nova**, v.30, n.3, p.548-553, 2007.

BREWER, G.J.; YUZBASIYAN-GURITAN, V., DOH-YELL, L. Use of zinc-copper metabolic interactions in the treatment of Wilson's Disease. **Journal of the American College of Nutrition**, v.9, n.5, p.487-591, 1990.

BUILDERS, P.F.; KUNLE, O.O.; ADIKWU, M.U. Preparation and characterization of mucinated agarose: A mucin-agarose physical crosslink. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 356, p. 174-180, 2008.

CASALI, C.A.; MOTERLE, D.F.; RHEINHEIMER, D. S.; BRUNETTO G.; CORCINI, A. L. M.; KAMINSKI, J.; MELO, G. W.B. Formas e desorção de cobre em solos cultivados com videira na serra gaúcha do Rio Grande do Sul. **R. Bras. Ci. Solo**, v.32, p.1479-1487, 2008.

CETINUS, S.A.; SAHIN, E.; SARAYDIN, D. Preparation of Cu(II) adsorbed chitosan beads for catalase immobilization. **Food Chemistry**, n.114, p.962-969, 2009.

CHACÓN, R.; CORDERO, M. R. E.; INFANTE, R.B.; FAJARDO, M.; HEVIA, P. Composición corporal y concentración de cinc y cobre plasmático en niños sanos y desnutridos. **Arch Venez Pueric Pediatr.**, v. 61, n. 4, p. 165-69, 1998.

CORONA-RIVERA, A.; URBINO-CANO, P.; BOBADILHA-MORALES, L.; VARGAS-LARES, J.J.; RAMÍREZ-HERRERA, M.A.; MENDOZA-MAGANA, M.L.; TROYO-SANROMÁN, R.; DÍAZ-ESQUIVEL, P.; CORONA-RIVERA, J.R. Protective in vivo effect of curcumin on copper genotoxicity evaluated by comet and micronucleus assays. **J. Appl. Genet.**, v.48, p.389-396, 2007.

COSTA JR, E. S.; MANSUR, H. S. preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. **Quim. Nova**, v.31, n.6, p.1460-1466, 2008.

COSTA JR, E. S.; PEREIRA, M.M.; MANSUR, H.S. Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PVA and chemically crosslinked, **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v.20, p.553-561, 2009.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Formas farmacêuticas de liberação modificada. **Rev. Port. Farm.**, v.49, n.4, p.181-190, 1999.

COUSINS, R.J. Metal elements and gene expression. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v.14, p.449-469, 1994.

COZZOLINO, S. M. F. Biodisponibilidade de minerais. **Rev. Nutr.**, v.10, n.2, p. 87-98, 1997.

DEPYPERE, F.; DEWETTINCK, K.; RONSSE, F; PIETER, J. Food powder microencapsulation: principles, problems and opportunities. **Applied Biotechnology Food Science Policy**, v.1, n.2, p.75-94, 2003

DRAPER, N. R.; SMITH, H. **Applied Regression Analysis**. John Wiley & Sons: New York, 1981.

FARIAS, D. R.; OLIVEIRA, F. H. T.; SANTOS, D.; ARRUDA, J. A.; HOFFMANN, R.B.; NOVAIS, R. F. Fósforo em solos representativos do estado da Paraíba. I - isotermas de adsorção e medidas do Fator capacidade de fósforo. **R. Bras. Ci. Solo**, v.33, p.623-632, 2009.

FERNANDES, J.C.; HENRIQUES, F.S. Biochemical, physiological and structural effects of excess copper in plants. **The Botanical Review**, v.57, p.246-273, 1991

FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C. Polímeros biodegradáveis – uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Quim. Nova**, v.29, n.4, p.811-816, 2006.

FREIBERG, S.; ZHU, X.X. Review Polymer microspheres for controlled drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, v.282, p.1–18, 2004.

GAUTAMQ R. K.; MUDHOO, A.; LOFRANO, G.; CHATTOPADHYAYA M. C. Biomass-derived biosorbents for metal ions sequestration: Adsorbent 3 modification and activation methods and adsorbent regeneration,; **Journal of Chemical Engineering Ambiental**, v.2, p.239-259, 2014.

GENTA, I.; COSTANTINI, M.; ASTI, A.; CONTI, B.; MONTANARI, L. Influence of glutaraldehyde on drug release and mucoadhesive properties of chitosan microspheres. **Carbohydrate Polymers**, v.36, p.81-88, 1998.

GINANI, M.F.; NAVARRO, M.V.; NASCIMENTO, E.G.; OLIVEIRA, U.O.B. Estudo da influência da natureza de reticulantes e aditivos orgânicos sobre o

comportamento de géis de quitosana. **Química Nova**, v.22, n.6, p.801-804, 1999.

GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G.; MÉNDEZ, J. A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, M.; VÁZQUEZ, B.; ROMÁN, J. S. Oxidized dextrans as alternative crosslinking agents for polysaccharides: Application to hydrogels of agarose–chitosan. **Acta Biomaterialia**, v.10, n.2, p.798-811, 2014.

GONÇALVES JUNIOR, A.C.; NACKE, H.; FÁVERE, V. T.; GOMES, G. D. Comparação entre um trocador aniônico de sal de amônio quaternário de quitosana e um trocador comercial na extração de fósforo disponível em solos. **Quim. Nova**, v.33, n.5, p.1047-1052, 2010.

GONSALVES, A.A.; E ARAÚJO, C.R.M.; SOARES, N. A.; GOULART, M.O.F.; ABREU, F. C. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Quim. Nova**, v.34, n.7, p.1215-1223, 2011.

GONZÁLEZ-LEIJA, J.A.; HERNÁNDEZ-GARIBAY, E.; PACHECO-RUÍZ, I.; GUARDADO-PUENTES, J.; ESPINOZA-AVALOS, J.; LÓPEZ-VIVAS, J. M.; BAUTISTA-ALCANTAR, J. Optimization of the yield and quality of agar from *Gracilariopsis lemaneiformis* (Gracilariales) from the Gulf of California using an alkaline treatment. **Journal of Applied Phycology**, v.21, p.331-326, 2009.

GUINESI, L. S.; ESTEVES, A. A.; CAVALHEIRO, E. T. G. Adsorção de íons cobre(II) pela quitosana usando coluna em sistema sob fluxo hidrodinâmico. **Quim. Nova**, v.30, n. 4, p.809-814, 2007.

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

GUPTA, K. C.; JABRAIL, F. H. Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres for controlled release of centchroman. *Carbohydrate Research* v. 342, p.2244–2252, 2007.

GUPTA, K. C.; JABRAIL, F.H. Glutaraldehyde and glyoxal cross-linked chitosan microspheres for controlled delivery of centchroman. **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 744–756, 2006.

HARRIS, E.D. Iron-copper interactions: some new revelations. **Nutr Rev.**, v.52, n.9, p.311-15, 1994.

HART, E.B., STENBOCK, H., WADDELL, J., ELVEHJEM, C.A. Iron in nutrition. VII. Copper as a supplement to iron for hemoglobin building in the rat. **Journal of Biological Chemistry**, v.77, p.797-812, 1928.

HARUSH-FRENKEL, O.; DEBOTTON, N.; BENITA, S.; ALTSCHULER, Y. Targeting of nanoparticles to the clathrin – mediated endocytic pathway. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.353, p.26-32, 2007.

HAVLIN, J. L.; BEATON, J. D.; TISDALE, S. L.; NELSON, W. L. **Soil fertility and fertilizers: an introduction to nutrient management**. 6. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1999.

HILL, C.H.; MATRONE, G. Chemical parameters in the study of in vivo and in vitro interactions of transition elements. **Fed Proc.**, v.29, n.4, p.1474-1481, 1970.

ISIKLAN, N. Controlled release study of carbaryl insecticide from calcium alginate and nickel alginate hydrogel beads. **J. Appl. Polym. Sci.**, v.105, p. 718-725, 2007.

JACOBOWSKI, A.C.; ZOBIOLE, N.N.; PADILHA, P.M.; MORENO, S.E.; ARRUDA, E.J. Efeito Mutagênico do Edetato de Cobre ([Cu(EDTA)]⁻²) Livre e Nanoencapsulado em Camundongos e Peixes. **Environ. Contam.**, v.8, n.1, p.13-19, 2013.

JAMEELA, S.R.; JAYAKRISHNAN, A. Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres as a long acting biodegradable drug delivery vehicle: studies on the *in tit.*o release of mitoxantrone and *in viva* degradation of microspheres in rat muscle. **Biomaterials**, v.16, p.769-775, 1995.

JANEGITZ, B. C.; LOURENÇÃO, B.; LUPETTI K. O.; FATIBELLO-FILHO, O. Desenvolvimento de um método empregando quitosana para remoção de íons metálicos de águas residuárias. **Química Nova**, v.30, n.4, p.879-884, 2007.

JORDÃO, C.P.; ALVES N.M.; PEREIRA, J.L.; BELLATO, C.R.; ALVAREZ, V.H. Adsorção de íons Cu²⁺ em latossolo vermelho-amarelo húmico. **Química Nova**, v.23, n.1, p.5-11, 2000.

JOSUÉ, A.; LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T.; KIMURA, I. Y. Liberação Controlada da Eosina Impregnada em Microesferas de Copolímero de Quitosana e Poli(ácido acrílico). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.10, n.3, p.116-121, 2000.

JUANG, R.S.; WU, F.C.; TSENG, R.L. Solute adsorption and enzyme immobilization on chitosan beads prepared from shrimp shell wastes. **Bioresource Technology**, v.80, p.187-193, 2001.

JUANG, R.S.; WU, F.C.; TSENG, R.L. Use of chemically modified chitosan beads for sorption and enzyme immobilization. **Advances in Environmental Research**, v.6, p.171-177, 2002.

JUSTI, K. C. Imobilização de agentes complexantes no biopolímero quitosana equilíbrio de adsorção de íons metálicos em solução aquosa. Tese de doutorado. Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H.; **Trace Elements in Soils and Plants**; CRC Press; Boca Raton, 1992.

KLUG, M.; SANCHES, M. N. M.; LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. Análise das isotermas de adsorção de Cu(II), Cd(II), Ni(II) E Zn(II) pela n-(3,4-dihidroxibenzil) quitosana empregando o método da regressão não linear. **Química nova**, v. 21, n.4, 1998.

LANA, R.M.Q.; SILVA, A.A.; NICCHIO, B.; LANA, A.M.Q. **Acta Iguazu**, v.3, n.1, p. 156-168, 2014

LAUS, R.; LARANJEIRA, M.C.M.; MARTINS, A.O.; FÁVERE V.T.; PEDROSA, R.C.; BENASSI, J.C.; GEREMIAS, R. Microesferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato utilizadas para remoção da acidez, ferro(III) e manganês(II) de águas contaminadas pela mineração de carvão. **Quim. Nova**, v.29, n.1, p.34-39, 2006.

LEITE, H. M. E. Formulação e caracterização de matrizes de polihidroxibutirato para liberação controlada de fármacos. Dissertação de Mestrado. Engenharia e Ciências dos Materiais. Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2004.

LELES, M.I.G. Caracterização dos Metais Titânio e Tungstênio Como Sensores Potenciométricos. Dissertação de Mestrado. Química. Instituto de Química de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos, 1992.

LIMA, A.J.B.; CARDOSO, M.G.; GUERREIRO, M. C.; PIMENTEL, F. A. Emprego do carvão ativado para remoção de cobre em cachaça. **Quim. Nova**, v. 29, n. 2, p.247-250, 2006.

LINS, L.C. Micropartículas compostas de phb/cetoprofeno recobertas com quitosana reticulada: obtenção e estudo da liberação controlada do fármaco. Dissertação de Mestrado. Ciência e Engenharia de Materiais. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

LINS, L.C.; BAZZO, G.C.; BARRETO, P.L.M.; PIRES, A.T.N. Composite PHB/Chitosan Microparticles Obtained by Spray Drying: Effect of Chitosan Concentration and Crosslinking Agents on Drug Release. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.25, n.8, p.1462-1471, 2014.

LIU, X.D.; TOKURA, S.; HARUKI, M.; NISHI, N.; SAKAIRI, N. Surface modification of nonporous glass beads with chitosan and their adsorption property for transition metal ions. **Carbohydrate Polymers**, v.49, p.103-108, 2002.

LOPES, C. M.; COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**; v.41, n.2, 2005.

LUCENA, G. L.; SILVA, A. G.; HONÓRIO, L. M. C.; SANTOS, V. D. Cinética de adsorção de cobre (II) utilizando bioadsorventes. **Scientia plena**, v.8, n.9, 2012.

LYRA, M. A.M.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; BRASILEIRO, M.T.; La ROCA, M. F.; BARRAZA, J. A.; VIANA, O. S.; ROLIM-NETO, P. J. Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.26, n.5, p.784-793, 2007.

MANADAS, R.; PINA, M.E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, n.4, 2002.

MANOLIKAR, M. K.; SAWANT, M. R. Study of solubility of isoproturon by its complexation with beta-cyclodextrin. **Chemosphere**, v.51, p.811-816, 2003.

MARQUES NETO, J.O.; BELLATO, C. R.; MILAGRES, J. L.; PESSOA, K. D.; ALVARENGA, E. S. Preparation and evaluation of chitosan beads immobilized with Iron(III) for the removal of As(III) and As(V) from water. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.24, p.121-132, 2013.

MARQUES, S. C. C. Liberação de ibuprofeno de hidrogéis de PVA contendo porfirinas. Dissertação de Mestrado. Química. Universidade de Coimbra, Coimbra, 2011.

MARTINS, A.C.; PEZOTI, O.; CAZETTA, A.L.; BEDIN, K.C.; YAMAZAKI, D.A.S.; BANDOCH, G.F.G.; ASEFA, T.; VISENTAINER, J.V.; ALMEIDA, V.C. Removal of tetracycline by NaOH-activated carbon produced from macadamia nut shells: Kinetic and equilibrium studies. **Chemical Engineering Journal**, v.260, p.291-299, 2015.

MATTOS Jr; D.; RAMOS, U. M.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, P. R. Nitrogênio e cobre na produção de mudas de citros em diferentes porta-enxertos. **Bragantia**, v.69, n.1, p.135-147, 2010.

MEYER, P. C.; ZUND, R. E. **Statistical methods in analytical chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 1993.

MONTEIRO JR, O. A.C.; AIROLDI, C. Some studies of crosslinking chitosan–glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 26, p.119–128, 1999.

NOWACK, B. Environmental chemistry of aminopolycarboxylate chelating agents. **Environ. Sci. Tech.**, v.36, p.4009-4016, 2002.

OLIVEIRA, A. F. **Equilíbrios em solução aquosa: orientados à aplicação: sistemas ácido-base de Bronsted e outros equilíbrios**. Campinas, SP: Editora Átomo, 2009.

OLIVEIRA, I.R.W.Z.; VIEIRA, I.C. Construção e Aplicação de Biossensores Usando Diferentes Procedimentos de Imobilização da Peroxidase de Vegetal em Matriz de Quitosana. **Química Nova**, v.29, n.5, p.932-939, 2006.

OLIVEIRA, N. S.; OLIVEIRA, A. F.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. Desenvolvimento de método não titulométrico para determinação de acidez em vinagre. **Quim. Nova**, 2015, *submetido*.

OZDEMIR, E.; DURANOGLU, D. BEKER, U. AVCI, A. O. Process optimization for Cr(VI) adsorption onto activated carbons by experimental design. **Chemical Engineering Journal**, v.172, p.207– 218, 2011.

PEDROSA, L.F.C.; COZZOLINO, S.M.F. Alterações metabólicas e funcionais do cobre em diabetes mellitus. **Revista de Nutrição**, v.12, n.3, p.213-224, 1999.

PEZOTI JÚNIOR., O.; CAZETTA, A.L.; SOUZA, I.P.A.F.; BEDIN, K.C.; MARTINS, A.C.; SILVA, T.L.; ALMEIDA, V.C. Adsorption studies of methylene blue onto ZnCl₂-activated carbon produced from buriti shells (*Mauritia flexuosa* L.). **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v.20, p.4401–4407, 2014.

PEZZAROSSA, B.; MALORGIO, F.; LUBRANO, L.; TOGNONI, F.; PETRUZZELLI, G. Phosphate fertilizer as a source of heavy metals in protected cultivation. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.21, p.737-751, 1990.

PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada; **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n.4, 2007.

PIETROLUONGO, M. Estudo de uma Inequivalência Terapêutica entre Duas Suspensões de Carbamazepina e Desenvolvimento de Método de Dissolução Biorrelevante. Dissertação de Mestrado. Vigilância Sanitária. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

PILLAI, C.K.S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science**, v.34, p.641–678, 2009.

PINO, G.A.H. Biossorção de Metais Pesados Utilizando Pó da Casca de Coco Verde (*Cocos nucifera*). Dissertação Mestrado. Engenharia Metalúrgica. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

PUGA, A. P.; PRADO, R. M.; CORREIA, M. A. R; ALMEIDA, T.B. Omissão de macronutrientes no crescimento e no estado nutricional da chicória cultivada em solução nutritiva. **Revista Agrarian**, v.3, n.7, p.56-62, 2010.

RAVEN, J.A; EVANS M.C.W, LORB, R.E. The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂-evolving organisms. **Photosynth. Res.**, v.60, p.111-149, 1999.

REBELLO, F. F. P. Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Revista Agrogeoambiental**, p.134-144, 2009.

RHSXI, M.; DESBRIÈRES, J.; TOLAIMATE, A.; RINAUDO, M.; VOTTERO, P.; ALAGUI, A. Contribution to the study of the complexation of copper by chitosan and oligomers. **Polymer**, v.43, p.1267-1276, 2002.

RIBEIRO, F.A.L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S.C.; SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R.P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Quim. Nova**, v.31, n.1, p.164-171, 2008.

RINAUDO M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Prog Polym Sci**, v.31, p.603–32, 2006.

RODRIGUES, L. A.; SOUZA A. P.; MARTINEZ, H. E.P.; PEREIRA, P. R. G.; FONTES, P. C. R. Absorção e translocação de zinco em feijoeiro aplicado via foliar. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v.9, n.2, p.111-115, 1997.

ROKHADE, A. P.; SHELKE, N. B.; PATIL, S. A.; AMINABHAVI, T. M. Novel interpenetrating polymer network microspheres of chitosan and methylcellulose

for controlled release of theophylline. **Carbohydr. Polym.**, v.69, p.678-687, 2007.

SAITO, R. M. M. Extração e propriedades físicas e químicas do colóide de uma alga brasileira (*Gracilariopsis tenuifrons* - *Rhodophyta*). Dissertação de Mestrado. Farmácia. Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 1997.

SANTOS, M. F. P. Desenvolvimento e Validação de Métodos de Espectroscopia no Infravermelho Próximo e Médio para Caracterização de Lamas de ETAR para Uso Agrícola. Dissertação Mestrado. Engenharia Biológica. Universidade Técnica De Lisboa, Lisboa, 2007.

SARGENTELLI, V.; MAURO, A.E.; MASSABNI, A.C. Aspecto do metabolismo de cobre no homem. **Quim. Nova**, v.19, p.290-293, 1996.

SEIDEL, E. P.; COSTA, A. C. S.; LANA, M.C. Fitodisponibilidade de cobre e produção de matéria seca por plantas de milho em resposta à aplicação de dejetos de suínos. **Revista Brasileira Ciência Solo**, v.33, p.1871-1878, 2009.

SHENG, P. X.; TING, Y. P.; CHEN, J. P.; HONG, L. Sorption of lead, copper, cadmium, zinc, and nickel by marine algal biomass: characterization of biosorptive capacity and investigation of mechanisms. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.275, p.131–141, 2004

SHIGEMASA, Y.; USUI, H.; MORIMOTO, M.; SAIMOTO, H.; OKAMOTO, Y. ; MINAMI, S.; SASHINA, H. Chemical modification of chitin and chitosan 1: preparation of partially deacetylated chitin derivatives via a ring-opening reaction with cyclic acid anhydrides in lithium chloride/*N,N*-dimethylacetamide. **Carbohydr. Polym.**, v.39, p.237-243, 1999.

SHU, X.Z.; .ZHU, K.J.; SONG, W. Novel pH-sensitive citrate cross-linked chitosan film for drug controlled release. **International Journal of Pharmaceutics**, v.212, p.19–28, 2001.

SILVA, M.S.; COCENZA, D. S.; MELO, N. F. S.; GRILLO, R.; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F. Nanopartículas de alginato como sistema de liberação para o herbicida clomazone; **Quim. Nova**, v.33, n.9, p.1868-1873, 2010.

SILVA, A.A.; COUTO JUNIOR, P.A.; LANA, A.M.Q.; LANA, R.M.Q. Teores de micronutrientes no solo e foliar com aplicação de fontes quelatadas e sulfatadas em feijão. **Eng. Agrícola**, 34, n.1, p.28-37, 2014.

SILVEIRA, M. L. A.; ALLEONI, L. R. F.; CASAGRANDE, J. C.; CAMARGO, O. A. Energia livre da reação de adsorção de cobre em latossolos ácidos. **Scientia Agrícola**, v.56, n.4, p.1117-1122, 1999.

SINHA, V. R.; BANSAL, K.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; TREHAN, A. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v.278, p.1-23, 2004.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F.J. **Fundamentos de Química Analítica**, 7ª edição, Saunders College Publishing, New York, 1996.

SOARES, N. F. F.; SILVA, W. A.; PIRES, A. C. S.; CAMILLOTO, G. P.; SILVA, P. S. Novos desenvolvimentos e aplicações em embalagens de alimentos. **Revista Ceres**, v.56, p.370-378, 2009.

SODRÉ, F. F.; LENZI, E.; COSTA, A. C. S. Utilização de modelos físico-químicos de adsorção no estudo do comportamento do cobre em solos argilosos **Quim. Nova**, v.24, n.3, p.324-330, 2001.

SPINELLI, V. A. Preparação do sal de amônio quaternário de quitosana reticulada, caracterização e estudos cinéticos de equilíbrio dos oxianions de cromo (VI), molibdênio (VI) e silênio (VI). Tese (Doutorado), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

SPINELLI, V. A.; LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. Cinética e Equilíbrio de Adsorção dos Oxianions Cr (VI), Mo (VI) e Se (VI) pelo Sal de Amônio Quaternário de Quitosana. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.15, n.3, p.218-223, 2005.

TAJIK, H.; MORADI, M.; ROHANI, S. M. R.; ERFANI, A. M.; JALALI F. S. S. Preparation of chitosan from brine shrimp (*Artemia urmiana*) cyst shells and effects of different chemical processing sequences on the physicochemical and functional properties of the product. **Molecules**, v.13, n.6, p.1263-1274, 2008.

TAKAHASHI, R. M.; ASSIS, O. B. G. Obtenção de vidros porosos para uso como dispositivo de liberação de feromônios. **Cerâmica**, v.54, p.462-465, 2008.

TAVARES, T. M.; CARVALHO, F. M. Avaliação da exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: exemplos do Recôncavo Baiano. **Química Nova**, v.15, n.2, p.147-154, 1992.

TORRES, M. A.; VIEIRA, R.S.; BEPPU M. M.; SANTANA, C.C. Produção e Caracterização de Microesferas de Quitosana Modificadas Quimicamente **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.15, n.4, p. 306-312, 2005.

TURBIANI, F. R. B.; KIECKBUSCH, T. G.; GIMENES, M. L. Liberação de Benzoato de Cálcio de Filmes de Alginato de Sódio Reticulados com Íons Cálcio. **Polímeros**, v.21, n.3, p.175-181, 2011.

VALENTINI, A.; LARANJEIRA, M. C. M.; FIORI, S.; FÁVERE, V. T.; KLUG, M. Processo alternativo para remoção de cobre (ii) e níquel (ii) de soluções aquosas utilizando cápsulas de quitosana - álcool polivinílico. **Química nova**, v.23, n.1, 2000.

VARGAS, A.M.M.; CAZETTA, A.L.; KUNITA, M.H.; SILVA, T.L.; ALMEIDA. V.C. Adsorption of methylene blue on activated carbon produced from flamboyant pods (*Delonix regia*): Study of adsorption isotherms and kinetic models. **Chemical Engineering Journal**, v.168, p.722-730, 2011.

VARMA, A.J.; DESHPANDE, S.V.; KENNEDY, J.F. Metal complexation by chitosan and its derivatives: a review. **Carbohydrate Polymers**, v.55, p.77-93, 2004.

VASCONCELLOS, F. C.; GOULART, G.A.S.; BEPPU, M. M. Production and characterization of chitosan microparticles containing papain for controlled release applications. **Powder Technology**, v.205, p.65-70, 2011.

VIEIRA, R. S. Adsorção competitiva de íons de cobre e mercúrio em membranas de quitosana natural e reticulada. Tese de Doutorado. Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

VIEIRA, R.S.; BEPPU, M. M. Dynamic and static adsorption and desorption of Hg(II) ions on chitosan membranes and spheres. **Water Research**, v.40, p.1726–1734, 2006.

VIEIRA, E.M.; PRADO, A.G.S.; LANDGRAF, M. D.; REZENDE, M.O.O. Estudo da adsorção/dessorção do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D) em solo na ausência e presença de matéria orgânica. **Química Nova**, v.22, n.3, p.305-30, 1999.

VOGEL, A. I. **Química Analítica Qualitativa**, 1905. 5ª edição. Revista por Gyula Svehla – São Paulo: Mestre Jou, 1981.

VOLESKY, B. Detoxification of Metal-Bearing Effluents: Biosorption for the Next Century. **Hydrometallurgy**, v.59, p.203-216, 2001.

WANG, J; CHEN, C. Chitosan-based biosorbents: Modification and application for biosorption of heavy metals and radionuclides. **Bioresource Technology**, v.60, p. 129-141, 2014.

WANG, X.S.; LI, Z.Z.; TAO, S.R. Removal of chromium (VI) from aqueous solution using walnut hull. **Journal of Environmental Management**, v.90, p.721-729, 2009.

WEI, W.; LAN, Y.; GANG, H.; WANG, L.Y.; WU, J.; SU, Z.G.; MA, G.H.. Monodisperse chitosan microspheres with interesting structures for protein drug delivery. **Advanced Materials**, v.20, p.2292–2296, 2008.

WU, X., HUANG, S., ZHANG, J., ZHUO, R. Preparation and characterization of novel physically crosslinked hydrogels composed of poly (ring alcohol) and amine-terminated polyamidoamine dendrimer macromol. **Bio. Sci.**, v.4, p. 71–75, 2004.

YANG, Q.; DOU, F.; LIANGA, B.; SHEN, Q. Studies of cross-linking reaction on chitosan fiber with glyoxal. **Carbohydrate Polymers**, v.59, p.205–210, 2005.

YRUELA, I. Copper in plants. **Braz. J. Plant Physiol.**, v.17, n.1, p.145-157, 2005.

ZHANG, Y.; ZHANG, Z.; WU, F. A novel pulsed-release system based on swelling and osmotic pumping mechanism. **Journal of Controlled Release**, v.89, p.47–55, 2003.

ZHAO, X.; WU, J.; GONG, F.L.; CUI, J.M.; JANSON, J.C.; MA, G. H.; SU, Z.G.. Preparation of Uniform and Large Sized Agarose Microspheres by an Improved Membrane Emulsification Technique. **Powder Technology**, v.243, p.444-452, 2014.

ZHOU, L.; LIU, Z.; LIU, J.; HUANG, Q.. Adsorption of Hg(II) from aqueous solution by ethylenediamine-modified magnetic crosslinking chitosan microspheres. **Desalination**, v.258, p.41–47, 2010.

ZHOU, L.; WANG, Z. L.; HUANG, Q. Characteristics of equilibrium, kinetics studies for adsorption of Hg(II), Cu(II), and Ni(II) ions by thiourea-modified magnetic chitosan microspheres. **Journal of Hazardous Materials**, v.161, p.995–1002, 2009.

ZIMMERMANN, A. C.; MECABÔ, A.; FAGUNDES, T.; RODRIGUES, C.A. Adsorption of Cr(VI) using Fe-crosslinked chitosan complex (Ch-Fe). **Journal of Hazardous Materials**, v.179, p.192–196, 2010.