

## ATUAÇÃO DA QUITOSANA COMO ADSORVENTE DE ÍONS COBRE NA PRESENÇA DE $\beta$ -AMILÓIDE OU HISTIDINA

C.R.A.Mahl<sup>1</sup>; M.M.Beppu<sup>1</sup>

1-Departamento de Engenharia de Materiais e Bioprocessos -Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas  
Av. Albert Einstein, 500 - CEP 13083-852 - Campinas - SP - Brasil  
Telefone: (19) 3521-3900 / FAX: (19) 3521-3910  
Email: [cramahleq@gmail.com](mailto:cramahleq@gmail.com); [beppu@feq.unicamp.br](mailto:beppu@feq.unicamp.br)

**RESUMO:** Neste trabalho, verificou-se a remoção de íons cobre utilizando-se quitosana, na presença de  $\beta$ -amilóide ( $\beta$ A) ou histidina. Isotermas de adsorção foram realizadas e constatou-se que a histidina compete com a quitosana pelos íons cobre, levando a uma diminuição na capacidade de adsorção. Em contrapartida, observa-se uma diminuição não tão brusca da capacidade de adsorção, mostrando que mesmo com a competição, a quitosana continua adsorvendo cobre. Com a aplicação dos modelos isotérmicos, foi possível prever que a adsorção ocorre em monocamadas e também em sítios heterogêneos e que não existe somente um grupamento responsável pela quelação dos íons cobre. Para finalizar, uma isoterma de adsorção empregando-se a proteína  $\beta$ A foi obtida e os resultados foram semelhantes aos obtidos com a presença de histidina.

**PALAVRAS-CHAVE:** quitosana, cobre, histidina, amiloide, Doença de Alzheimer.

**ABSTRACT:** In this work, we verified the chelating action of chitosan in the removal of copper ions in the presence of amyloid -  $\beta$  ( $A\beta$ ) or histidine. Equilibrium studies involving adsorption isotherms were carried out, and it was observed that histidine competes with chitosan for the copper ions, leading to a decrease in the adsorption capacity. On the other hand, there is no sharp decrease of the adsorption capacity showing that even with a competition taking place, chitosan remains adsorbing copper. By applying the isothermal models, it was possible to predict that an adsorption monolayer occurs and that there is not only one group responsible for chelation of copper ions. Finally, the adsorption isotherm employing  $\beta$ A protein was similar to those obtained with histidine.

**KEYWORDS:** chitosan, copper, histidine, amyloid, Alzheimer's Disease.



## 1. INTRODUÇÃO

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

A DA é uma doença degenerativa progressiva do cérebro e caracteriza-se pela perturbação de múltiplas funções cognitivas, incluindo memória, atenção e aprendizado. Além disso, ocorrem reduções nas concentrações de enzimas envolvidas nas transduções de sinais. Entre as enzimas que têm sua concentração reduzida com o envelhecimento, estão aquelas responsáveis por seqüestrar os radicais livres e regular a homeostase dos íons metálicos.

A produção excessiva de radicais livres leva a formação de espécies reativas de oxigênio como  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$  e  $OH$ , que provocam lesões no tecido cerebral (Smith *et al.*, 1996; Castellani *et al.*, 2004). Estudos feitos recentemente constataram que este processo inflamatório, causado pelos radicais livres, pode estar associado à iniciação de doenças degenerativas, como Alzheimer e Parkinson.

Além da contribuição para a formação de radicais livres, os íons metálicos têm sido associados aos depósitos protéicos característicos de todas as doenças degenerativas, potencializando a formação das placas amilóides (que contribuem ainda mais para o aumento do estresse oxidativo). A geração de espécies reativas de oxigênio tem sido apontada como conseqüência da coordenação do peptídeo  $\beta$  – amilóide ( $\beta A$ ) a íons cobre (Seshadri *et al.*, 2002). Segundo Smith *et al.* (2007), cobre foi encontrado em altas concentrações nas placas amilóides (~ 400  $\mu M$ ) comparado com o cérebro normal que possui uma concentração de 0,2 – 1,7  $\mu M$ . O peptídeo  $\beta A$  se liga ao cobre com uma alta afinidade e reduz de  $Cu^{2+}$  para  $Cu^+$  através do recrutamento de redutores biológicos como colesterol, ácido ascórbico ou dopamina. O resultado é a geração catalítica de espécies reativas de oxigênio e também a agregação da  $\beta A$  (Opazo *et al.*, 2002; Hureau; Faller, 2009).

Estudos recentes indicam que resíduos de histidina estão envolvidos na coordenação do  $Cu^{2+}$ . Estes resíduos são: His-6, His-13 e His-14

presentes na composição da  $\beta A$ . Através de análises de RMN  $^1H$ , pode-se observar que His-13 é fundamental na ligação com o íon cobre, e que His-6 e His-14 também estão implicados nesta ligação (Syme *et al.*, 2004).

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

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

A quitosana provém da desacetilação da quitina, que é considerado o segundo polímero mais abundante na natureza. Além disso, é biodegradável, hidrofílica, atóxica, biocompatível e altamente versátil, o que nos permite mudar facilmente suas propriedades físicas e químicas e possui uma excelente capacidade de remoção de íons metálicos. Devido aos grupos hidroxil, um grande número de grupos funcionais, alta reatividade destes grupos e a flexibilidade da cadeia polimérica a quitosana possui uma ótima capacidade adsorvente. (Crini, 2005; Guibal, 2004).

O objetivo do presente trabalho foi estudar a ação quelante da quitosana, atuando na remoção dos íons cobre, na presença de  $\beta$ -amilóide ou de histidina.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Preparação das esferas porosas de quitosana

Uma solução de 2,5% em massa foi preparada através da dissolução da quitosana (Sigma, 85% de desacetilação, E.U.A.) em uma solução acética com concentração de 3% em massa. A solução foi mantida em agitação mecânica (Fisatom, 713D, Brasil) à 3000 rpm, por uma semana e em seguida, filtrada a vácuo para retirada de impurezas. Após isso foi estocada a 4° C, para posterior uso na



obtenção das esferas de quitosana (Beppu, 1999).

A obtenção das esferas de quitosana, ocorreu através do gotejamento da solução de quitosana à vazão constante, em uma solução de NaOH 1 mol/L, sob agitação regular. As esferas permaneceram em repouso por 24 horas na solução de NaOH 1 mol/L e posteriormente foram lavadas com água destilada até atingirem um pH neutro, e então acondicionadas em água milli-Q.

## 2.2 Equilíbrio de íons cobre em esferas de quitosana na presença de histidina

Inicialmente, foram estudados os fenômenos de adsorção envolvendo somente o sistema Quitosana + Cobre (Qui-Cu(II)), ou seja, esferas de quitosana previamente preparadas foram utilizadas para atuar na adsorção de íons cobre. Para obtenção dos dados de equilíbrio, colocou-se uma massa de 0,3 g de esferas de quitosana em uma série de tubos falcon contendo 25 ml de solução de cobre em diferentes concentrações. O sal utilizado para realização dos experimentos foi o  $\text{CuNO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (Vetec, Brasil), e a concentração das soluções variaram de 5 mg/L a 300 mg/L. O método utilizado para obtenção dos dados foi o estático. Os experimentos foram realizados a temperatura de 25 °C empregando um banho termostático (Dubnoff, NT 232, Brasil) com agitação de 150 rpm. O pH foi fixado em 5,0, valor escolhido, com base na especificação metálica do íon cobre, realizada antes dos ensaios de adsorção.

Conhecido o comportamento do sistema Qui-Cu(II), foram então iniciados os experimentos empregando 100  $\mu\text{M}$  de histidina (Synth, Brasil). Neste sistema, chamado de Qui-His-Cu(II), esferas de quitosana eram colocadas em uma solução de histidina (100  $\mu\text{mol/L}$ ) por 24 horas. Após isso, as esferas de quitosana foram filtradas e colocadas nas soluções contendo o íon cobre. O método para obtenção dos dados de equilíbrio foi o mesmo descrito anteriormente.

Após os sistemas atingirem o tempo de equilíbrio de 100h, foram retiradas alíquotas de cada solução para determinação de sua concentração através de um espectrômetro de absorção atômica Perkin Elmer Analyst 300 com chama oxidante de ar-acetileno, localizado na Faculdade de Engenharia Civil (FEC), UNICAMP. A quantidade de íons cobre adsorvida foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$Q(\text{capacidade de adsorção}) = \frac{(C_0 - C_e)V}{m} \quad (1)$$

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

## 2.3 Equilíbrio de íons cobre em esferas de quitosana na presença de $\beta$ -amilóide.

O peptídeo utilizado na realização deste experimento foi o  $\beta\text{A42}$  (American Peptide Company, E.U.A), e a sua obtenção se deu pela preparação de um filme peptídico. Este filme foi obtido através da dissolução do mesmo em 1,1,1,3,3,3 - hexafluoro -2 - propanol (HFIP) (Aldrich Chemistry, 99%, E.U.A) para obter-se uma solução de 1mM de  $\beta\text{A42}$ , peptídeo utilizado neste experimento. A solução contendo o peptídeo e o HFIP foi então dividida igualmente em seis alíquotas de 35  $\mu\text{L}$  e para evaporação do HFIP foi deixada em uma capela por 90 min e centrifugada sob vácuo para total evaporação do HFIP, após este procedimento o filme foi estocado a -80°C (Stine et al., 2003).

Soluções de cobre contendo diferentes concentrações foram colocadas em eppendorfs contendo o peptídeo  $\beta\text{A42}$ , e foram deixados por 2 horas até que alcançassem o equilíbrio. Após isso, uma massa de 0,01 g de esferas de quitosana foi colocada em contato com as soluções contendo o peptídeo e a solução de Cobre. O pH da solução foi fixado em 5,0 e durante o ensaio não foi ajustado. A concentração das soluções variaram de 5 mg/L a 300 mg/L. O experimento foi realizado a uma temperatura de 25°C, controlado por uma estufa, sem agitação.

Para determinação da concentração de íons cobre e a quantidade de cobre adsorvida, o procedimento seguiu conforme citado no item 2.2

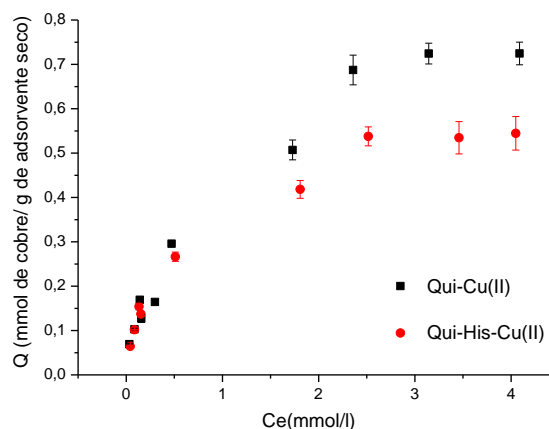
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 3.1 Equilíbrio de íons cobre em esferas de quitosana na presença de histidina

Os resultados das isotermas de adsorção claramente indicam que com adição de histidina, a capacidade de adsorção das esferas de quitosana decresce. Segundo um estudo realizado por Marti *et al.*, (2004), sobre as interações da histidina com o íon metálico cobre, aponta-se que o cobre realiza ligações covalentes, com átomos de nitrogênio do grupo  $\text{NH}_2$  e/ou átomos de oxigênio do grupo  $\text{COO}^-$ , presentes na estrutura da histidina. Outro estudo também revela que dentre os aminoácidos existentes, a histidina é um dos ligantes mais fortes que se coordenam com metais, e exerce um papel importante na ligação de íons metálicos com proteínas. A histidina possui três ligantes com potencial para capturar íons metálicos, sendo eles, oxigênio carboxilato ( $\text{O}_{\text{carboxil}}$ ), nitrogênio do grupo imida do imidazol ( $\text{N}_{\text{im}}$ ) e o nitrogênio do amino ( $\text{N}_{\text{am}}$ ) (Deschamps, 2005). Com esta informação, pode-se concluir que a histidina possa estar competindo com a quitosana pelos íons cobre, pois em sua estrutura se encontram grupos funcionais com grande potencial para captura de cobre. Ainda assim, a capacidade máxima de adsorção da quitosana não mostrou um drástico decréscimo, mostrando que mesmo na presença de histidina, a quitosana se mostra como um poderoso quelante de metais e a adsorção continua a ocorrer neste biopolímero.

Foram utilizados os modelos de Langmuir e Freundlich a fim de se conhecer o comportamento de cada sistema. Os ajustes foram realizados pelo *software* Origin<sup>®</sup> e utilizou-se o método de regressão não linear. A Tabela 1 mostra os parâmetros obtidos para cada sistema.

Pode-se concluir que os dois modelos tanto de Langmuir quanto o de Freundlich, forneceram boas correlações, e se mostraram adequados aos dados de equilíbrio. O modelo de Langmuir assume que o soluto é adsorvido em um número finito de sítios e que a adsorção ocorre em monocamadas onde não existe interação entre as moléculas adsorvidas (Nghah; Fatinathan, 2008). O modelo de Freundlich é baseado em uma equação empírica e a adsorção do soluto geralmente ocorre em sítios ativos com níveis de energia heterogêneos em uma superfície heterogênea (Sen Gupta; Bhattacharyya, 2011). Isso indica que talvez a adsorção não esteja ocorrendo só na monocamada, e que além dos grupos amino que geralmente são responsáveis pela quelação dos íons metálicos cobre, podem existir outros grupos fazendo parte da adsorção.



**Figura 1.** Isotermas de adsorção referente aos sistemas: Qui-Cu(II) e Qui-His-Cu(II).

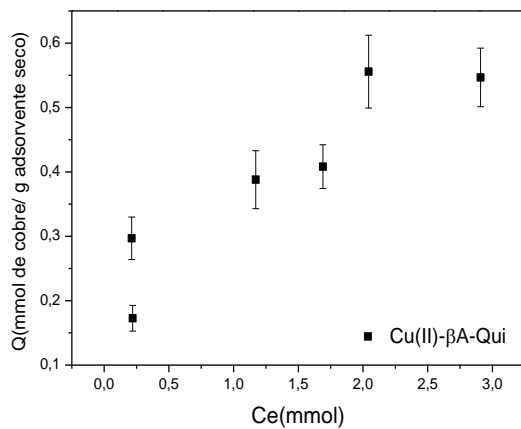
**Tabela 1.** Parâmetros obtidos pelo ajuste dos dados de equilíbrio através dos modelos de Langmuir e Freundlich.

	Qui-Cu(II)	Qui-His-Cu(II)
<b>Langmuir</b>		
$Q_{\text{máx}}$	$0,93 \pm 0,07$	$0,61 \pm 0,03$
$B$	$0,96 \pm 0,21$	$1,84 \pm 0,35$
$R^2$	0,97	0,98
<b>Freundlich</b>		
$k_f$	$0,154 \pm 0,02$	$0,066 \pm 0,01$
$N$	$0,497 \pm 0,04$	$0,409 \pm 0,03$
$R^2$	0,97	0,98

### 3.2 Equilíbrio de íons cobre em esferas de quitosana na presença de $\beta$ -amilóide.

Depois de concluídos e analisados os experimentos relacionados com a histidina, decidiu-se por fazer uma isoterma com o peptídeo  $\beta\text{A}$  visando observar o comportamento da adsorção. A isoterma pode ser vista na Figura 2.





**Figura 2.** Isoterma de adsorção do sistema Cu(II)-βA-Qui.

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

Comparando-se os resultados obtidos da isoterma envolvendo a histidina com a isoterma envolvendo o peptídeo βA, também pode-se dizer que não existe muita diferença em relação à capacidade de adsorção das esferas de quitosana. Os resultados se assemelharam bastante, sendo a capacidade máxima de adsorção para o sistema Cu(II)-His-Qui de 0,54 mmol de Cu(II)/ g de adsorvente, enquanto que para o sistema Cu(II)-βA-Qui foi de 0,55 mmol de Cu(II)/ g de adsorvente. Através de um levantamento da porcentagem de histidina que existe no peptídeo βA empregada neste experimento, concluiu-se que somente 5% dos 100μM de βA adicionados são efetivamente histidina. Entretanto, a metodologia utilizada nos experimentos não nos permite separar o cobre livre em solução, daquele ligado com His ou βA. O que pode-se concluir com este resultado, é que a quitosana tem a mesma tendência em adsorver cobre tanto em presença de His ou βA, nas condições estudadas neste trabalho.

Vale ressaltar que existe a possibilidade da formação de dímeros e oligômeros nas condições empregadas neste experimento, ou seja, o peptídeo βA pode ter desenvolvido sua forma agregada, infelizmente não foi possível a caracterização destas amostras pra levantar tais informações.

## 4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos por este trabalho pode-se entender melhor como ocorre a interação quitosana-cobre-histidina e concluir que na presença de histidina, ocorre uma competição pelos íons cobre entre quitosana e histidina, comprovado pelos resultados de equilíbrio realizados. Essa competição leva a uma diminuição na capacidade de adsorção da quitosana, apesar disso, ainda pode-se considera-lá um efetivo adsorvente. O mesmo foi observado quando empregada a proteína βA. A quitosana se mostrou um poderoso agente quelante de íons cobre, mesmo na presença de competidores como a βA e histidina.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEPPU, M.M. **Estudo da calcificação “in vitro” da quitosana.** 1999. 137 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.
- CASTELLANI, R. J. *et al.* Contribution of redox-active iron and copper to oxidative damage in Alzheimer disease. **Ageing Res Rev**, v. 3, n. 3, p. 319-26, Jul 2004.
- CRINI, G. Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. **Progress in Polymer Science**, v. 30, n. 1, p. 38-70, Jan 2005.
- DESCHAMPS, P. *et al.* The saga of copper(II)-L-histidine. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 249, n. 9-10, p. 895-909, May 2005.
- GUIBAL, E. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review. **Separation and Purification Technology**, v. 38, n. 1, p. 43-74, Jul 15 2004.
- HUREAU, C.; FALLER, P. Aβ-mediated ROS production by Cu ions: structural insights, mechanisms and relevance to Alzheimer's disease. **Biochimie**, v. 91, n. 10, p. 1212-7, Oct 2009.
- MARTI, E. M. *et al.* Interaction of S-histidine, an amino acid, with copper and gold surfaces, a comparison based on RAIRS analyses. **Colloids and Surfaces a-Physicochemical and**

**Engineering Aspects**, v. 249, n. 1-3, p. 85-89, Nov 2004.

NGAH, W. S. W.; FATINATHAN, S. Adsorption of Cu(II) ions in aqueous solution using chitosan beads, chitosan-GLA beads and chitosan-alginate beads. **Chemical Engineering Journal**, v. 143, n. 1-3, p. 62-72, Sep 2008.

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

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

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

SMITH, D. P. *et al.* Concentration Dependent Cu<sup>2+</sup> Induced Aggregation and Dityrosine Formation of the Alzheimer's Disease Amyloid- $\beta$  Peptide. **Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 2881-2891, 2007.

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

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

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

Os autores agradecem ao LABSAN/FEC/UNICAMP pelas análises de absorção atômica e também ao LAFAME/IQ/UNICAMP pelo auxílio com a  $\beta$ -amilóide.

Pelo suporte financeiro concedido pela FAPESP, CNPQ e CAPES.

## 6. AGRADECIMENTOS