ELIZABETH PINHEIRO GOMES AREAS

ADSORÇÃO DE CARBOXIMETILCELULOSE EM HIDROXILAPATITA

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Departamento de Bioquímica do
Instituto de Química da Universidade
de São Paulo.

Orientador:

PROF. DR. FERNANDO GALEMBECK

SÃO PAULO

1979

Ao Zê e ao André

A meus pais e irmão

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fernando Galembeck, pela orientação segura deste trabalho e em especial pela amizade, incentivo e constante assistência com que sempre pudemos contar nesses anos de nossa formação.

Ao Instituto de Química, pela possibilidade oferecida para a realização deste estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro.

À Prof. Dra. Shirley Schreier e aos pesquisadores e funcionários de seu laboratório, pela efetiva ajuda na obtenção dos espectros de ressonância paramagnética de elétron.

A todos os amigos do laboratório, pela colaboração, amizade e alegre companheirismo.

À minha família, pelo permanente apoio, estímulo e interesse.

Ao José Alfredo, pelos desenhos, pelas sugestões e críticas e por sua infinita paciência e compreensão.

A todos os que, de alguma forma, possam ter contribuído para a realização deste trabalho.

I N D I C E

	pág.
1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Considerações gerais	1
1.2 - Adsorção de polímeros em superfícies - Histórico	5
1.3 - O sistema - características de seus componentes	16
1.4 - Objetivos da pesquisa	19
2 - MATERIAIS E MÉTODOS	21
2.1 - Materiais	21
2.1.1 - Substâncias	21
2.1.2 - Equipamento	22
2.2 - Métodos	24
2.2.1 - Marcação dos polieletrólitos com marcador de spin	24
2.2.1.1 - Empregando-se brometo de cianogenio como acoplador	24
2.2.1.1.1 - Fundamentos ...	24
2.2.1.1.2 - Técnica de marcação	25
2.2.1.2 - Empregando-se carbodiimida como acoplador	26
2.2.1.2.1 - Fundamentos ...	26
2.2.1.2.2 - Técnica de marcação	26
2.2.2 - Procedimentos de purificação	27
2.2.2.1 - Diálise	27
2.2.2.2 - Filtração em gel	28
2.2.2.3 - Tratamento com resina de troca catiônica	28
2.2.2.4 - Estocagem	29

	pág.
2.2.3 - Ensaaios de adsorção	29
2.2.4 - Caracterização dos sistemas	31
2.2.4.1 - Medidas viscométricas	31
2.2.4.2 - Medidas condutimétricas ..	33
2.2.5 - Espectroscopia de ressonância para - magnética de elétron (EPR)	35
2.2.5.1 - Fundamentos	35
2.2.5.2 - Emprego do método	37
3 - RESULTADOS	39
3.1 - Caracterização dos sistemas	39
3.1.1 - Verificação da possível ocorrência de alterações de massa molecular no material marcado. Medidas viscomé- tricas	39
3.1.2 - Verificação da possível ocorrência de liberação de íons pela fase sólida . Medidas condutimétricas	43
3.2 - Marcação e purificação do material poliméri- co	47
3.3 - Estudos de adsorção	50
3.3.1 - Espectros de ressonância paramagnéti- ca de elétron	50
3.3.2 - Isotermas de adsorção	55
3.3.3 - Comportamento das isotermas de adsor- ção	58
3.3.4 - Tempo de equilíbrio	64
3.3.5 - Cinética de adsorção	64
3.3.6 - Efeito da concentração de SCMC em so- lução sobre a estabilidade de suspen- são de HAP	64
3.3.7 - Efeito da concentração de SCMC em so- lução sobre o volume de sedimentação de HAP	69

	pág.
3.3.8 - Susceptibilidade da SCMC adsorvida à ação enzimática	69
3.3.8.1 - Verificação da ocorrência de adsorção da celulase na HAP	69
3.3.8.2 - Determinação da quantidade de SCMC adsorvida	72
3.3.8.3 - Verificação da ocorrência de redissolução da SCMC adsorvida	73
3.3.8.4 - Verificação da ação da ce- lulase sobre a SCMC adsor- vida	73
3.3.8.5 - Verificação da conformação do polímero adsorvido após ação da celulase	73
3.3.8.6 - Verificação da susceptibi- lidade da SCMC em solução ao ataque enzimático	74
4 - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	76
5 - RESUMO	95
ABSTRACT	97
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Considerações Gerais

O interesse pela investigação de fenômenos de adsorção em interfaces tem se renovado através dos anos não só pelo permanente e rico campo de especulação teórica em que se constitui o assunto, como também pelo seu crescente envolvimento com questões de relevância sobretudo nas áreas técnica e biológica.

Um particular interesse pelo estudo da adsorção de polímeros tem sido observado nas publicações mais recentes. Esses trabalhos vem sendo revistos na literatura com frequência⁽⁶⁵⁾⁽⁷⁸⁾⁽⁸²⁾. Tais estudos tem levado a consideráveis avanços na análise teórica do problema e à extensão desse conhecimento aos mais diversos setores da ciência aplicada. A adsorção de polímeros apresenta características próprias, particularmente distintas daquelas observadas na adsorção de compostos monoméricos. Assim, além das considerações usuais em adsorção tais como interações superfície-adsorbato, adsorbato-solvente e solvente-superfície, surgem aqui como ponto de especial interesse os aspectos referentes à conformação da molécula adsorvida. Este aspecto do problema aparece como ponto relevante já em trabalhos de 1951, com JENCKEL e RUMBACH⁽⁴⁴⁾. Esses autores observaram que a adsorbância (massa de adsorbato por unidade de massa de adsorvente) de um polímero corresponde

ria a uma camada com espessura de dez moléculas se todos os segmentos da cadeia adsorvida estivessem ligados à superfície. Eles apresentaram um modelo no qual cada molécula polimérica encontra-se ligada em "trens" ("trains") separados por "alças"("loops") que se projetam para o interior da solução. Esta disposição tornaria possível a adsorção em monocamada, com valores de adsorção consideravelmente maiores que os observados para adsorção em monocamada de moléculas monoméricas. É interessante notar que mesmo no estado adsorvido uma macromolécula, graças a seus muitos graus de liberdade, ainda possui bastante mobilidade, sendo assim passível de sofrer deformações e dobramentos dentro da camada de adsorção. Além disso, sua própria natureza permite a ocorrência de múltiplas ligações com o substrato, devidas à existência de grande número de átomos na cadeia. Esses aspectos, entre outros, conferem ao fenômeno características bastante peculiares.

De modo particular, a adsorção de polieletrólitos ou macromoléculas carregadas em superfícies constitui tema ainda mais complexo, com características significativamente distintas do comportamento usual de polímeros neutros; polieletrólitos não tendem a ser adsorvidos por qualquer superfície, as isotermas de adsorção não são sempre de alta afinidade e pode ocorrer adsorção a superfícies de mesmo sinal⁽²⁵⁾. A essa classe de polímeros pertence a totalidade do material macromolecular de sistemas vivos.

O fenômeno de adsorção ocorre como uma consequência da atividade de superfície, a qual por sua vez surge sempre como decorrência da energia livre da interface. A variação de energia livre no processo de adsorção é uma resultante de con-

tribuições entrópicas e entálpicas de cada um dos três componentes do sistema: superfície, solvente e adsorbato. Se a resultante dessas contribuições levar a uma diminuição da energia livre do sistema no processo de adsorção, esta será viável. Cabe ressaltar que a entropia de uma molécula no estado adsorvido é sempre menor que aquela da molécula em solução, já que restrições estéricas são no primeiro caso mais intensas e efetivas. Uma vez iniciada a adsorção, o processo se desenvolve até o ponto em que as forças interadsorbato passam a determinar o curso do fenômeno. Segundo EIRICH⁽²¹⁾, duas possibilidades vão então surgir:

- a) se as partículas do adsorbato na superfície se atraem umas às outras, a sua condensação fornece um termo adicional de energia livre e desse modo o processo de adsorção continua, sendo levado através de uma transição de fase bidimensional à formação de uma camada superficial densa e condensada ou à formação de multicamadas e eventualmente a crescimento epitático e precipitação do adsorbato;
- b) se as moléculas de adsorbato na superfície são rígidas e se repelem, a energia livre declina levando a monocamadas saturadas que correspondem aos patamares nas isotermas.

As isotermas de FREUNDLICH e LANGMUIR⁽¹⁾⁽²⁾, respectivamente, são as formulações da primeira e da segunda alternativas, com a linha divisória representada pela extensão da lei

de HENRY⁽⁷⁾ que descreve a situação em baixas coberturas onde a velocidade e extensão da adsorção não são afetadas pela interferência do adsorbato. Dentro desse contexto, conforme acentua EIRICH⁽²¹⁾, a isoterma BET (BRUNAUER, EMMETT e TELLER)⁽¹⁶⁾ pode ser encarada como um tipo FREUNDLICH mais sofisticado e a equação de FOWLER⁽⁶⁾ como uma modificação da isoterma de LANGMUIR.

Um aspecto cuja importância cabe ressaltar é a modificação introduzida pela adsorção de polímeros na DLVO (DERJAGUIN, LANDAU, VERWEY e OBERBEEK) que trata da estabilidade de dispersões coloidais. Segundo essa teoria tal estabilidade pode ser descrita como a soma de contribuições repulsivas e atrativas na interação total entre partículas. A presença de uma camada adsorvida de polímero pode afetar a estrutura da dupla camada elétrica ao redor da partícula coloidal carregada e portanto modificar o termo de repulsão elétrica. Além disso, as forças de atração de longo alcance - London e van der Waals - entre partículas pode também se alterar. A camada adsorvida pode ainda produzir termos adicionais repulsivos ou atrativos que não aparecem na ausência dessa camada adsorvida. Este assunto foi revisto por VINCENT recentemente⁽⁸²⁾.

Os estudos de adsorção em interfaces constituem passo fundamental na tentativa de se compreenderem as funções de polímeros em geral como floculantes e estabilizadores de soluções coloidais⁽⁸²⁾. Fornecem ainda um suporte para a elucidação de problemas de adesão e coesão⁽⁷⁸⁾. Os conhecimentos adquiridos nesses estudos tem também permitido uma maior compreensão de fenômenos relevantes em Biologia e Medicina. NORDE⁽⁶¹⁾ destaca um grande número de trabalhos publicados em que se dis-

cute o papel das interfaces em diversos processos tais como agregação e crescimento celular, transferência de energia em fotossíntese, atividade enzimática, digestibilidade de gorduras, trombogênese, fosforilação oxidativa, entre tantos outros. O emprego de enzimas ligadas a matrizes sólidas vem se tornando cada vez mais economicamente eficiente em vários processos industriais e clínicos. Em testes sorológicos, imunoproteínas adsorvidas em partículas sólidas são usadas com a finalidade de se melhorar a observação do fenômeno de aglutinação após a adição de anticorpos adequados. Em todas essas aplicações o papel dos processos de adsorção é fundamental. Deve-se ainda ressaltar a notável diversidade e importância dos papéis que desempenham as interfaces biológicas, sobretudo a interface sólido-líquido, em sistemas vivos mais complexos e a relevância das interações entre macromoléculas naturais nessas superfícies.

1.2 - Adsorção de polímeros em superfícies - Histórico

Apesar dos fenômenos de adsorção de polímeros em interfaces serem de reconhecida importância em vários setores da técnica e da ciência, sendo utilizados empiricamente há séculos, foi somente nos últimos trinta anos que esforços consideráveis foram dedicados a esse campo do conhecimento.

Diferentes tratamentos foram desenvolvidos para a abordagem teórica do assunto. Nenhum deles no entanto tem sido aceito com exclusividade devido sobretudo ao fato da verificação experimental quantitativa ser extremamente difícil nesse

tipo de sistema. De fato, os resultados experimentais que tem sido obtidos apresentam em geral comportamentos que não se enquadram na sua totalidade dentro das expectativas teóricas de apenas um dentre os vários tratamentos publicados. Grande parte da teoria desenvolvida nesses anos ocupa-se de interações fracas, na verdade praticamente desprezíveis, entre as moléculas poliméricas adsorvidas. A detecção dessas interações necessitaria de soluções extremamente diluídas e sob tais condições torna-se particularmente difícil a obtenção de medidas precisas. A extensão desses tratamentos teóricos a concentrações de superfície e solução mais altas em alguns casos tem levado a previsões de necessidade de tempos de equilíbrio muito longos, tornando novamente a verificação experimental difícil. Segundo PATAT⁽⁶⁵⁾, essas dificuldades, bem como o grande número de parâmetros envolvidos nas equações teóricas das isotermas de adsorção, constituem a razão da não concordância absoluta dos resultados experimentais com as previsões dos modelos teóricos. Além disso, como frisa EIRICH⁽²¹⁾, na maioria dos sistemas os aspectos específicos e particulares são bastante dominantes para se adequarem aos moldes gerais das teorias existentes sobre adsorção física de macromoléculas.

Em 1951 JENCKEL e RUMBACH⁽⁴⁴⁾ propuseram o primeiro modelo de adsorção de polímeros em superfícies. Segundo esses autores a adsorção dar-se-ia pela ligação de segmentos à superfície e projeção das outras regiões da cadeia para o seio da solução. FRISCH, SIMHA e EIRICH em 1953⁽³¹⁾⁽⁷⁴⁾ utilizaram a idéia proposta neste modelo para um tratamento mecânico-estatístico do mesmo. Este estudo foi revisto quatro anos mais tarde por FRISCH e SIMHA⁽³⁰⁾ e correções nele efetuadas permi

tiram a formulação de uma teoria quantitativa de equilíbrio de adsorção de polímero e a derivação de uma isoterma de adsorção. Este tratamento foi estendido por FRISCH e SIMHA⁽²⁹⁾ ao tratamento da adsorção do solvente, interferência na cadeia próxima à superfície e adsorção em multicamada e por FRISCH⁽²⁸⁾ aos casos limites de forças atrativas muito fracas e muito fortes.

O modelo de FRISCH, SIMHA e EIRICH (F.S.E.) baseia-se no conceito de movimentação aleatória de moléculas e admite que as cadeias poliméricas adsorvidas sejam caracterizadas por uma distribuição gaussiana de distâncias ponta a ponta. A superfície é encarada como uma parede refletora. O modelo supõe uma superfície do adsorvente muitas vezes maior em tamanho do que o polímero, uma localização aleatória dos segmentos e nenhuma interação mútua entre cadeias. O tratamento admite ainda estarem os polímeros em solução diluída e faz uso de um modelo de rede na superfície e na solução empregando uma análise estatística no estudo de mudanças na configuração molecular. A equação fundamental deste modelo pode ser expressa por

$$p = 2\alpha / (\pi ft)^{1/2} - O(1/t) \quad \text{Equação 1.1}$$

onde:

p = probabilidade média entre todos os segmentos de polímero (t) de que um segmento adsorva na superfície.

α = probabilidade de um segmento ser adsorvido em contacto com a superfície ($\alpha \leq 1$)

f = parâmetro referente ao ângulo entre sucessivas ligações do polímero bem como à flexibilidade da cadeia.

O = ordem de grandeza de $1/t$.

A isoterma de adsorção segundo este modelo assume a forma:

$$\frac{\theta [1 - (2/s) (1 - 1/t \theta)]}{v [1 - \theta]^v} \approx Kc \quad \text{Equação 1.2}$$

para cadeias ligadas à superfície pelas duas pontas e sem adsorção do solvente.

θ = fração real da superfície coberta pelos segmentos de polímero

s = parâmetro de rede que mede o número de vizinhos mais próximos a um segmento numa camada

K = constante de afinidade. É função de vários parâmetros entre os quais temperatura, número total de segmentos, peso molecular, volume livre por molécula de polímero sólido, energia de adsorção e densidade

v = número de segmentos adsorvidos à superfície, de um total de t

c = concentração do polímero em solução

A dependência da adsorção com a temperatura é determinada por vários fatores competitivos e pode ser expressa pela relação (para $s \gg 1$):

$$\frac{1 + (v-1)\theta}{\theta(1-\theta)} \frac{d\theta}{dT} = \ln(1-\theta) \frac{dv}{dT} + \frac{d \ln(Kv)}{dT} \quad \text{Equação 1.3}$$

Em resumo, essa teoria prediz uma isoterma para macromoléculas flexíveis que difere consideravelmente do tipo de isoterma de LANGMUIR. O número de segmentos ligados por cadeia é proporcional à raiz quadrada do número total de segmentos. Este modelo prevê ainda um número relativamente pequeno de segmentos ligados à superfície, excetuando-se o caso em que as forças atrativas sejam muito fortes. Com o aumento do peso

molecular tem-se uma adsorção preferencial exceto para situações em que as interferências de cadeias próximas à superfície sejam consideráveis. O coeficiente de temperatura pode ser positivo ou negativo, segundo a contribuição de vários fatores competitivos.

HIGUCHI, em 1961⁽⁴²⁾, apoiou-se no modelo F.S.E. para desenvolver equações que descrevessem a distribuição de densidade de segmentos como função de forças de curto alcance entre o polímero e os sítios ativos de superfície. A formulação de sua teoria é expressa por:

$$P(0) = (1/t) \int_1^t W(0)dt \quad \text{Equação 1.4}$$

$P(0)$ = fração de segmentos ancorados

t = número total de segmentos

W = função de distribuição ponta a ponta numa região $z = 0$

O autor definiu ainda o parâmetro K que se relaciona com a fração de sítios de superfície cobertos θ :

$$K = \alpha_0 K_0 (1-\theta) \quad \text{Equação 1.5}$$

α_0 = coeficiente de acomodação que descreve a probabilidade de um contacto bem sucedido entre um sítio ativo na superfície e um segmento

$$K_0 = \exp (\epsilon/kT) \quad \text{Equação 1.6}$$

onde ϵ = energia líquida atrativa superfície-segmento.

Para ϵ pequeno e $\alpha_0 \approx 1$ então

$$K \approx \exp(\epsilon/kT) \quad \text{Equação 1.7}$$

ou menos.

Essa teoria prevê grandes mudanças na fração de contactos para mudanças relativamente pequenas em energia. Para pequenos valores de ϵ tem-se relativamente poucas ligações por cadeia, enquanto para valores próximos de $4 kT$ praticamente toda a cadeia estará ligada à superfície.

GILLILAND E GUTOFF em 1960⁽³³⁾ apresentaram um tratamento baseado num modelo semelhante ao F.S.E. Esses autores trataram a adsorção de polímeros de soluções diluídas em temperatura e igualando energias livres de moléculas adsorvidas e dissolvidas. Altos calores de adsorção favorecem a adsorção preferencial de espécies de alto peso molecular, embora seja possível a adsorção de espécies tanto de alto como de baixo peso molecular. As equações dessa teoria indicam que em baixos valores de adsorbância a quantidade adsorvida deve ser proporcional à concentração da solução, atingindo assintoticamente um máximo em altas concentrações.

FORSMAN e HUGHES⁽²⁶⁾ desenvolveram em 1963 um modelo mecânico estatístico e outro termodinâmico no tratamento teórico do fenômeno de adsorção de polímeros. Do primeiro modelo pode-se deduzir, para soluções diluídas e superfícies pouco populosas, isto é, na fase inicial da isoterma de adsorção, que a adsorção deve aumentar com a raiz quadrada do peso molecular; deve diminuir com o aumento da temperatura; na temperatura θ , com pequenas interações polímero-superfície, é diretamente pro

porcional ao peso molecular. Pelo segundo modelo, a dependência com o peso molecular está na razão direta de sua raiz quadrada, confirmando previsões do primeiro modelo. Prevê-se ainda aqui uma inclinação inicial da isoterma que aumenta rapidamente com o peso molecular; o achatamento da curva é também tanto mais rápido quanto maior o peso molecular. Esses autores consideram que a força causadora da adsorção de polímeros é a energia de interação polímero-superfície, a qual é compensada por efeitos entrópicos que se opõem à adsorção. Quanto maior a energia de interação, mais chatas serão as espirais do polímero e maior a diminuição de entropia. Segundo este modelo, para cobertura baixa de superfície e baixas concentrações a isoterma deve ser do tipo de LANGMUIR. À medida que a concentração da solução aumenta, as espirais de polímero adsorvido vão se interpenetrar, diminuindo ainda mais a entropia e provocando um achatamento rápido das isotermas com o aumento da concentração da solução. Para pequenas energias de interação, o comportamento segundo LANGMUIR pode prevalecer em altas concentrações. Essa região de LANGMUIR apresentaria um aumento da adsorção com o peso molecular e uma diminuição da mesma com o aumento da temperatura. Na região do patamar no entanto a expectativa é de uma pequena dependência com o peso molecular e um aumento da adsorbância com a temperatura. Isto seria consequência do fato, segundo os autores referidos, das espirais do polímero adsorvido encontrarem-se mais estendidas perpendicularmente à superfície quando em temperaturas mais altas, estabelecendo menor número de contactos na interface, o que permitiria que mais moléculas poliméricas ocupassem sítios disponíveis.

Com SILBERBERG em 1962⁽⁷²⁾⁽⁷³⁾, o problema da adsor-

ção de polímeros recebeu um tratamento teórico diferente. Este autor criticou o tratamento de F.S.E. no que ele considerou o ponto fraco fundamental da teoria, ou seja, a forma da molécula foi determinada com energia de atração zero e essa forma não foi considerada como uma variável no tratamento termodinâmico de equilíbrio entre a superfície e a solução. Sua teoria baseia-se fundamentalmente no conceito de movimentação aleatória das moléculas poliméricas, sujeitas no entanto a três tipos básicos de restrição, a saber:

- a) Restrição no retorno do polímero à superfície. Esta restrição é imposta por características superficiais no que se refere à área não disponível à adsorção. Assim, é definida uma distância mínima entre as extremidades da alça de adsorção, necessária para que a adsorção seja viável.
- b) Restrição decorrente da existência de sítios não adsorventes na superfície.
- c) Restrição decorrente da não adsortibilidade de alguns segmentos da cadeia polimérica.

Várias conclusões podem ser tiradas do tratamento de SILBERBEG. Pelo seu modelo, os tamanhos das "alças" e a extensão dos segmentos em "trens" ao longo da superfície são independentes do peso molecular. Esta conclusão é conflitante com a teoria de F.S.E., a qual prevê grandes alças proporcionalmente à raiz quadrada do peso molecular. Segundo SILBERBEG, para uma molécula flexível as alças são pequenas e se todos os

sítios de superfície e segmentos de polímeros estiverem disponíveis à adsorção, a molécula polimérica estará bem próxima à superfície. A cerca de kT mais de 70% dos segmentos deverão estar em contacto com a superfície. A molécula adsorvida é essencialmente bidimensional, com uma concentração de segmentos que é máxima na superfície e diminui rapidamente ao se afastar dela. Restrições estéricas aumentam o tamanho das alças e as necessidades de energia. No entanto, de um modo geral, os requisitos energéticos para adsorção não são muito grandes, mesmo para casos estericamente desfavoráveis. A relação "trens"/"alças" (p) apresenta-se grande mesmo para pequenas energias de adsorção de modo que a adsorção só não ocorre em situações extremamente desfavoráveis. Este tratamento prevê ainda uma cobertura de superfície muito alta. A adsorção aumenta com a energia de adsorção e com o inverso da temperatura. A dependência da energia de adsorção, no entanto, não é muito grande uma vez que após cerca de $2 kT$ mudanças adicionais na adsorção são muito pequenas. Ainda segundo SILBERBERG, não existe patamar para adsorção de polímeros de baixos pesos moleculares, apenas para materiais de pesos moleculares maiores. No entanto, se a faixa de concentração for pequena ocorrerão patamares aparentes para todos os pesos moleculares. Em soluções diluídas de material polimérico de alto peso molecular, a forma da isoterma e a quantidade adsorvida são independentes da fração de volume de equilíbrio das moléculas poliméricas em solução, bem como de seu peso molecular.

Cabe destacar ainda uma outra contribuição relevante ao tratamento teórico do problema que foi proposta independentemente por HOEVE⁽⁴³⁾ e ROE⁽⁶⁸⁾ em 1965. Eles introduziram um tratamento estatístico ao problema, utilizando uma distribui-

ção gaussiana para os tamanhos das alças, contrariamente a SILBERBERG que as admitia uniformes, bem como aos segmentos adsorvidos. Eles prevem, em desacordo a SILBERBERG, para moléculas flexíveis de polímeros, grandes alças correspondentes a energias de adsorção bem baixas e pequenas alças e maiores valores de p à medida que a energia aumenta. Supõem ainda, para a macromolécula isolada, uma distribuição de tamanhos de alças, novamente em desacordo a SILBERBERG.

HESSELINK, em trabalhos publicados em 1969⁽³⁷⁾, 1971⁽³⁸⁾ e 1975⁽⁴⁰⁾ trouxe valiosa contribuição à análise teórica de aspectos de particular interesse. Ele estudou a distribuição da densidade de segmentos não adsorvidos (alças e caudas) de uma macromolécula adsorvida numa superfície, sujeita à restrição imposta pela aproximação de uma segunda interface. Para homopolímeros muito longos são previstas pequenas alças em grande número e uma insignificante contribuição de caudas. Nesse caso o decaimento da densidade é exponencial com a distância à superfície. Para macromoléculas mais curtas a formação de alças é desfavorável e a principal contribuição à distribuição de densidade de segmentos não adsorvidos é dada pelos segmentos em cauda; aqui a distribuição de densidade perde seu caráter exponencial e o que se prevê é que a distribuição de densidade aumente com a distância à interface, passe por um máximo e caia novamente. A equação que descreve essa distribuição de densidade na situação em que a principal contribuição é dada por segmentos em cauda é expressa por:

$$p(x) = 2\beta [e^{-\beta x} - e^{-2\beta x}] \quad \text{Equação 1.8}$$

$$\beta = (3/\langle l^2 \rangle)^{1/2} \quad \text{Equação 1.9}$$

onde:

$p(x)$ = distribuição de densidade normalizada para os segmentos em cauda, na macromolécula adsorvida

l = comprimento do segmento

$\langle i \rangle$ = número médio de segmentos por cauda

HESSELINK estudou a influência da aproximação de uma segunda interface no que se refere à restrição imposta à conformação da molécula adsorvida. O efeito da segunda interface é comprimir a curva de densidade e aumentar o seu máximo. À aproximação da segunda interface, a energia livre configuracional aumenta continuamente para uma cauda e uma alça, mas para uma ponte passa por um valor mínimo. Esta característica é de particular interesse na investigação de fenômenos de estabilização e floculação de dispersões envolvendo macromoléculas adsorvidas. HESSELINK derivou ainda equações que descrevem mais particularmente a adsorção de polímeros carregados (polieletrólitos), tendo previsto uma adsorção de saturação não dependente de peso molecular, uma fase fortemente adsorvida em valores de adsorção abaixo de 90% de saturação e uma fase adsorvida muito mais solta na saturação⁽³⁹⁾. Publicou ainda, com VRIJ e OVERBEEK⁽⁴¹⁾ resultados de estudos referentes à estabilização de dispersões mediada por macromoléculas adsorvidas.

Em resumo, é possível perceber-se a diversidade de tratamentos teóricos conflitantes sobre o fenômeno de adsorção de polímeros em superfícies. No entanto, cabe assinalar que os vários modelos apresentam-se concordantes no que se refere a alguns aspectos do assunto. Assim, em todos os tratamentos a forma da isoterma de adsorção mostra um aumento agudo ini-

cial em regiões de baixa cobertura; em altos valores de energia os diversos modelos são também concordantes ao considerar que a molécula polimérica apresenta-se achatada e que a relação p assume valores elevados.

1.3 - O sistema - características de seus componentes

A adsorção de polieletrólitos na interface sólido-líquido é o objeto de investigação do presente estudo.

Escolheu-se como fase sólida do sistema a hidroxiapatita (HAP), um mineral de fosfato de cálcio com características superficiais particularmente interessantes. É o mineral constituinte do tecido ósseo e do esmalte do dente, encontrando-se também presente nos vários processos de calcificação de sistemas vivos. Sua ocorrência em tais tecidos apresenta aspectos ainda não completamente esclarecidos, relativos em especial à existência da espécie em solução nos fluídos corporais em concentrações acima do produto de solubilidade⁽⁶⁰⁾; concentrações de supersaturação são assim verificadas no plasma, muito embora a precipitação do sal só se dê nas circunvizinhanças da matriz cristalina. A ocorrência de supersaturação parece indicar uma dificuldade de formação de núcleos de cristalização estáveis⁽⁶⁰⁾. Tem sido considerada a possibilidade da formação do osso ocorrer não propriamente por precipitação do mineral mas por um crescimento epitático de seus cristais sobre fibras de colágeno que possuam, sob certas circunstâncias, características de disposição de tamanho de grupos carregados semelhantes

ãs da rede cristalina do mineral⁽⁶⁰⁾. Desse modo, a interação da hidroxiapatita com material macromolecular constitui tema de relevante interesse.

A hidroxiapatita foi ainda observada como material petrificante da madeira⁽¹⁹⁾. Sua distribuição geológica é ampla, ocorrendo em rochas de vários tipos e idades, sobretudo nas cristalinas metamórficas⁽¹⁹⁾. Na forma de diminutos cristais microscópicos tem uma distribuição quase universal como mineral acessório na formação de rochas⁽¹⁹⁾. Em estudos de Prebiótica encontram-se referências⁽²⁴⁾⁽⁴⁹⁾ sobre seu possível papel na primitiva formação de biopolímeros sobre a Terra; sua superfície teria a propriedade, análoga à de outras interfaces⁽⁶⁴⁾, de permitir a concentração de compostos monoméricos tornando possível sua condensação a polímeros através de fenômenos de adsorção.

A hidroxiapatita caracteriza-se pelas pequenas dimensões de seus cristais o que lhes confere uma grande área superficial com propriedades adsorptivas e de troca iônica⁽⁵³⁾. Como decorrência desses atributos seu emprego como suporte cromatográfico é de grande importância, sobretudo em processos bioquímicos, na separação de proteínas⁽¹²⁾ e de ácidos nucleicos⁽¹⁰⁾. Estudos sobre o assunto revelam uma acentuada afinidade de hidroxiapatita por DNA de dupla fita⁽⁵⁶⁾ e um aumento na temperatura de denaturação do mesmo quando na forma adsorvida⁽⁵⁵⁾. RNA de dupla fita, híbridos RNA-DNA e proteínas adsorvem comparativamente em menor grau⁽⁵⁶⁾.

Estudos cristalográficos classificam a hidroxiapatita, segundo os autores, como pertencentes ao sistema hexagonal⁽⁵⁰⁾, hexagonal-tripiramidal⁽¹⁹⁾ e hexagonal-monoclínico⁽²²⁾, conforme publicações mais recentes. O hábito cristalino é prismático.

co e tabular, podendo ainda apresentar-se reniforme, globular, com estrutura fibrosa ou imperfeitamente colunar⁽¹⁹⁾. São encontradas referências à ocorrência do cristal sob a forma de agulhas⁽³⁾⁽⁴⁷⁾. Sua estrutura apresenta-se de granular a compacta. Possui baixa birrefringência, é opticamente levôgira e assume na natureza cores variadas⁽¹⁹⁾. Pertence ao grupo das apatitas, cuja fórmula geral é:

onde R = Ca, Pb

A hidroxiapatita apresenta a fórmula:

A fase líquida do sistema de que se ocupa este trabalho consistiu em soluções aquosas de sal sódico de carboximetilcelulose (SCMC), de diversos pesos moleculares. A SCMC é um derivado hidrossolúvel⁽⁵⁾ do mais abundante polieletrólito natural, a celulose. Sua fórmula estrutural é a seguinte:

O grau de substituição é variável e modifica propriedades físico-químicas do polieletrólito em solução.

É obtida principalmente pela reação da celulose com o ácido cloroacético, em meio alcalino⁽⁵⁾.

O seu emprego tecnológico é amplo, incluindo-se entre suas funções as de estabilizador de suspensões⁽¹³⁾, coagulante⁽³⁵⁾, espessante⁽⁵⁹⁾, crioprotetor⁽⁸⁰⁾, agente de flotação⁽⁸⁴⁾, adsorvente⁽¹⁰⁾⁽¹²⁾⁽⁵²⁾. Seu uso desse modo estende-se à tecnologia de adesivos⁽⁴⁶⁾, tintas⁽⁵⁹⁾, alimentos⁽³²⁾, cosméticos⁽⁴⁾, medicamentos⁽⁸⁵⁾, tratamento de águas⁽⁵⁸⁾. Seu emprego é ainda referido como suporte em cromatografia (na forma insolúvel)⁽¹⁰⁾⁽¹²⁾⁽⁵²⁾, imobilização de enzimas⁽⁷⁹⁾, em condicionamento de solos⁽³⁵⁾⁽⁴⁸⁾⁽⁸⁴⁾. Encontra-se também presente como constituinte de filtros de cigarros⁽⁵⁴⁾, contrastes para radiografias⁽⁷⁰⁾, preparações oftálmicas⁽⁵¹⁾, entre os inúmeros e variados usos que a literatura registra. Parte considerável das publicações a respeito da aplicação deste polieletrólito encontra-se sob a forma de patentes.

1.4 - Objetivos da pesquisa

Considerando-se a inexistência na literatura de estudos referentes ao fenômeno de adsorção no sistema HAP/SCMC, estabeleceu-se como objetivo deste trabalho a caracterização do

fenômeno referido no sistema em questão, em alguns de seus aspectos de interesse, a saber:

- a) Estabelecimento das isotermas de adsorção em condições experimentais diversas e análise teórica do comportamento observado.
- b) Estudos conformacionais do polieletrólito adsorvido e de sua susceptibilidade à ação enzimática.
- c) Estudos cinéticos do fenômeno de adsorção.
- d) Estudos de eventuais efeitos estabilizantes da SCMC.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - Materiais

2.1.1 - Substâncias

Adsorvente: - Foi empregada hidroxiapatita (HAP), hidroxo fosfato de cálcio de fórmula $(\text{CaOH})\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_3$, preparada segundo BERNARDI⁽¹¹⁾. Área superficial determinada por adsorção de N_2 (BET) = $92,6 \text{ m}^2/\text{g}$ (Unilever Research, Port Sunlight Laboratory, Inglaterra).

Adsorbato: - Foram empregados sais sódicos de carboximetilcelulose (Celanese Courlose - SCMC) de diversos pesos moleculares, como polieletrólitos em solução.

Polieletrólito		PM (Peso molecular médio)	Grau de substituição (86)
SCMC	F ₇₅	80 000	0,31
SCMC	F ₄₀	60 000	0,30
SCMC	F ₄	10 000	0,28

Na marcação dos polieletrólitos foram usados:

- a) Marcador de spin: 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidinoxí (Aldrich Chemical Company)

- b) Ativadores: diciclohexilcarbodiimida (The British Drug Houses, Ltd.); brometo de cianogênio (Fluka AG Buchs SG)

Os demais reagentes empregados foram de grau analítico.

Utilizou-se água recentemente bidestilada em aparelho de vidro.

2.1.2 - Equipamento

As medidas de viscosidade foram feitas em viscosímetro de Ubbelohde, que permite a efetuação das diluições dentro do próprio instrumento.

As pesagens foram realizadas em balança analítica Ainsworth 21 N e em microbalança Cahn Electrobalance Mod-M-10.

As medidas condutimétricas foram efetuadas com uma ponte de Wheatstone L & N 4760 e galvanômetro A.C., L & N 2370,

empregando-se cela condutimétrica de 30 ml da L & N.

Os espectros de ressonância paramagnética de elétron foram obtidos num espectrômetro Varian Mod E-4.

Determinações de pH foram efetuadas em potenciômetro Corning Mod 12.

Determinações espectrofotométricas foram feitas em espectrofotômetro Beckman Mod 1098.

As centrifugações foram realizadas num centrifugador Excelsa 2 Fanem Mod 205 N.

Na preparação dos sistemas de adsorção empregou-se um homogeneizador com haste de teflon Thomas nº B 55206.

Foi utilizada fibra ótica para acoplamento ao espectrofotômetro na obtenção de dados de turbidez de sistemas em sedimentação; tal recurso permitiu que as leituras fossem feitas sem que se perturbassem os sistemas em estudo.

Na purificação das soluções de polímero empregaram-se:

a) Membranas de diálise:

Visking (celulose)

- em sacos de 30 cm x 2,5 cm, da Sigma
- em folhas, recortadas para montagem em cela de diálise

b) Sephadex G-25 (Pharmacia Fine Chemicals)

c) Resina de troca iônica (catiônica) Merck tipo I (forma ácida)

2.2 - Métodos

2.2.1 - Marcação dos polieletrólitos com marcador de spin

Visando-se conseguir meios de detecção dos polímeros, procedeu-se à marcação dos mesmos com o marcador de spin (4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidinoxí) utilizando-se métodos que empregaram como acopladores carbodiimida e brometo de cianogênio (17).

2.2.1.1 - Empregando-se brometo de cianogênio como acoplador

2.2.1.1.1 - Fundamentos

Este método envolve a ativação de hidroxilas vizinhas do polissacarídeo pelo brometo de cianogênio, seguida do acoplamento do polímero ativo com os grupamentos NH_2 do marcador de spin, em meio alcalino a 4°C (66).

R = resíduo de marcador de spin

POL = cadeia polimérica

2.2.1.1.2 - Técnica de marcação

Preparou-se solução a 2% de carboximetilcelulose (SCMC) em NaCl 0,1 M e NaHCO₃ 0,05 M. A seguir efetuou-se diálise contra a mesma solução de sal por dois dias e contra água por uma semana, filtrando-se depois o material em funil de vidro sinterizado. O filtrado foi transferido para um bequer e mantido sob agitação. Tamponou-se o meio com bórax (2,7g/150 ml de solução) e ajustou-se o pH a 10,2 com NaOH 1M, seguido de adição de 2,5 ml de brometo de cianogênio (0,5g/5ml) a 4°C, mantendo-se o pH constante e a solução sob agitação por 10 minutos. Após esse tempo adicionou-se o marcador de spin (0,097g/10ml). A solução foi mantida sob agitação durante aproximadamente 24 horas à temperatura ambiente, após o que foi submeti-

da aos processos de purificação descritos em 2.2.2.

2.2.1.2 - Empregando-se carbodiimida como aco- plador.

2.2.1.2.1 - Fundamentos

Este método envolve a ativação do grupo OH de uma carboxila do polissacarídeo pela carbodiimida, seguida do acoplamento do polímero ativo com grupos NH_2 do marcador de spin⁽⁶⁶⁾.

R'' = resíduo do marcador de spin
POL = cadeia polimérica

2.2.1.2.2 - Técnica de marcação

Preparou-se solução cerca de 0,5% de carboximetilcelulose (SCMC) em água, adicionando-se eventualmente NaOH para facilitar a dissolução. Centrifugou-se por cerca de 20 minutos a 3500 rpm, desprezando-se a pequena porção sedimentada. A essa solução foram adicionados, sob agitação, 0,02g de diciclo

hexilcarbodiimida dissolvida em dioxano, tendo-se feito a adição do acoplador à solução lentamente. A seguir foi acrescentado 0,02g do marcador de spin. O sistema foi deixado sob agitação por 5 dias. Após esse tempo, colocou-se em diálise contra água, tendo-se adicionado previamente à solução do polímero NaCl até 0,5 M para prevenir eventual interação de moléculas livres de marcador com o polieletrólito, o que poderia tornar ineficiente a diálise. O processo de diálise prolongou-se por 5 dias, com trocas diárias de água. A seguir liofilizou-se a solução.

2.2.2 - Procedimentos de purificação

A utilização do material polimérico marcado nos diversos ensaios experimentais inclusos neste trabalho exigiu que se empregassem preparações isentas de marcador livre. Essa necessidade conduziu a uma etapa prévia de purificação das preparações, que passamos a relatar a seguir.

2.2.2.1 - Diálise

Separações por diálise foram efetuadas durante a purificação do material polimérico. Foram realizadas em:

- a) Sacos de diálise (celulose-Visking)
- b) Celas de diálise (contendo membranas de celulose) cons-

truidas de modo a fornecer uma maior relação área/volume, com a finalidade de tornar o processo mais eficiente. Esta técnica foi empregada apenas para fins analíticos.

- c) Membranas de polissulfona, dispostas em feixe, as quais também garantem maior eficiência num tempo mais curto. A técnica foi empregada com a finalidade de se testar a eficiência do processo convencional de diálise que vinha sendo empregado.

As membranas celulósicas de diálise foram submetidas previamente a tratamento com EDTA para garantir a eliminação de eventuais resíduos de seu processamento, especialmente íons de metais pesados.

2.2.2.2 - Filtração em gel

Foram efetuadas filtrações do material polimérico marcado em Sephadex G-25.

Empregaram-se colunas de 35 cm x 1,5 cm e 30 cm x 3,2 cm, previamente calibradas com azocaseína e ácido glutâmico, para a filtração, respectivamente, de soluções de SCMC F₄ marcada e SCMC F₇₅ marcada (anteriormente submetidas a diálise), utilizando-se como eluente NaCl 0,05 M.

2.2.2.3 - Tratamento com resina de troca catiônica

A resina empregada foi a tipo I da Merck (forma áci-

da). O procedimento de purificação adotado consistiu na mistura das soluções dialisadas dos polímeros com a resina numa relação aproximada de volumes 1/10 (resina/solução) por um tempo de cerca de 1 hora, separação por decantação e filtração a vácuo. A resina foi lavada e mantida em contacto com solução 2 M de NaCl por cerca de 12 horas antes de ser usada.

2.2.2.4 - Estocagem

O material polimérico após submetido aos processos de marcação e purificação foi liofilizado e estocado em frascos de vidro. As soluções empregadas nos diversos experimentos foram preparadas apenas por ocasião dos ensaios, a partir do material liofilizado.

2.2.3 - Ensaios de adsorção

Para a obtenção de isothermas, o procedimento experimental consistiu na mistura e homogeneização de 5,0 ml de solução de SCMC em tampão, em diversas concentrações, com 0,05 g de HAP. As soluções de polímero foram preparadas por pesagem. Após a homogeneização (5 minutos, com homogeneizador de haste de teflon), o material foi posto em banho termostaticado nas temperaturas de 0°C, 25°C, 55°C, por 3 horas. Decorrido este tempo, os sedimentos foram separados dos sobrenadantes por centrifugação a cerca de 3500 r.p.m. por 10 minutos, lavados por quatro vezes com o tampão e dissolvidos em EDTA 0,25 M, pH =

= 6,3. A determinação da quantidade de SCMC adsorvida na hidroxiapatita (HAP) foi feita por espectroscopia de ressonância paramagnética de elétron (EPR) desses sedimentos dissolvidos.

Na verificação do tempo de equilíbrio para o fenômeno de adsorção utilizou-se o sistema SCMC F₇₅ marcada, de concentração 0,0030g/g solução em tampão acetato 0,1 M pH 6,3 (5,0 ml), em presença de HAP (0,05g) a 25°C e acompanhou-se a variação na quantidade de polímero adsorvido com o tempo, por EPR dos sedimentos dissolvidos em EDTA 0,25 M pH 6,3.

No estudo da conformação da carboximetilcelulose adsorvida foram obtidos espectros em EPR dos sedimentos dos sistemas de adsorção (SCMC F₇₅/HAP e SCMC F₄/HAP), separados por centrifugação das suspensões a 3500 r.p.m. por 10 minutos. Foram também obtidos espectros em meios de alta viscosidade, com a finalidade de se conseguir a decomposição dos espectros dos sedimentos.

Nos estudos sobre a estabilidade de HAP em presença de SCMC foram efetuadas medidas espectrofotométricas (590 nm) em função do tempo, para observação da variação de turbidez dos sistemas:

- HAP (0,05g) + tampão acetato 0,1M pH 6,3 (5,0 ml)
- HAP (0,05g) + SCMC F₄ 0,0008 g/g solução em tampão acetato 0,1 M pH 6,3 (5,0 ml).

O efeito da concentração de SCMC sobre a estabilidade de suspensões de HAP foi estudado através de medidas espectrofotométricas (590 nm) no sistema SCMC F₄ (5,0 ml)/HAP(0,05g),

4 horas após se terem agitado os tubos.

O efeito da concentração de SCMC sobre o volume de sedimentação de HAP foi estudado no sistema SCMC F_4 (5,0 ml) / HAP (0,05 g), após o equilíbrio de adsorção, pela separação dos sedimentos a 3500 r.p.m. por 10 minutos, lavagem com tampão e ressuspensão em tampão acetato 0,1 M pH 6,3; tomaram-se alíquotas de 1,0 ml as quais foram transferidas para seringas de 1 cc graduadas, fechadas numa ponta. O material foi deixado em repouso por 1 dia, após o que efetuaram-se as leituras dos volumes de sedimentação.

2.2.4 - Caracterização dos sistemas

A intenção aqui foi a de se verificar a possível ocorrência de modificações de comportamento das soluções poliméricas, induzidas pelos processos de marcação, bem como a eventual influência da presença do polímero nas características da fase sólida dos sistemas de ensaio. Essas duas possibilidades foram verificadas, respectivamente, através da efetuação de medidas viscométricas nas soluções de SCMC marcada e não marcada e de medidas condutimétricas em suspensões de HAP, na presença e ausência de SCMC.

2.2.4.1 - Medidas viscométricas

A realização dessas medidas teve como finalidade a caracterização do estado do material polimérico no que se refe

re a possíveis alterações de massa molecular induzidas pelo marcador. Em outras palavras, é possível com tais medidas detectar-se a ocorrência de ligações cruzadas entre as moléculas de polímero ou de degradação das cadeias em consequência da marcação, fato que levaria o polímero a se comportar como se possuísse outra massa molecular, modificando portanto sua viscosidade. Tal fenômeno, se significativo, tornaria tal material inadequado a estudos de adsorção, já que a conformação e a massa molecular dos polímeros estariam sendo alteradas.

Para uma dada temperatura, a relação entre as viscosidades de dois líquidos é dada pela expressão:

$$\frac{t_1}{t_2} = \frac{\eta_1/\rho_1}{\eta_2/\rho_2} \quad \text{Equação 2.1}$$

onde:

η_1 = viscosidade do líquido 1

η_2 = viscosidade do líquido 2

t_1 = tempo de escoamento do líquido 1

t_2 = tempo de escoamento do líquido 2

ρ_1 = densidade do líquido 1

ρ_2 = densidade do líquido 2

Foi escolhido como líquido de referência a água. As medidas foram todas feitas em banho termostatizado a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, utilizando-se um viscosímetro de Ubbelohde.

Os dados experimentais de viscosidade consistiram na medida dos tempos de escoamento do líquido de referência (água), do solvente usado (NaCl 0,05 M) e das soluções de polieletrólitos em diferentes concentrações.

Os demais termos da expressão foram procurados em Tabela⁽⁸³⁾ e são os seguintes:

η_1 = viscosidade da água a 25°C = 0,8904 cp

ρ_1 = densidade da água a 25°C

ρ_2 = densidade da solução de SCMC a 25°C

A respeito dos valores de densidade, cabe mencionar que consideramos a densidade da solução do polieletrólito em sal (NaCl 0,05 M) igual à do próprio solvente nessa concentração. Tal aproximação é bastante razoável para material de alto peso molecular em baixas concentrações, como é o nosso caso. Foi encontrado em Tabela⁽⁸³⁾ o valor da relação $\rho_1/\rho_2(20^\circ\text{C}) = 1,0020$. Esse valor foi empregado nos cálculos visto que não se espera diferença significativa entre este valor e o da relação entre as densidades a 25°C, temperatura do experimento.

O cálculo da viscosidade específica foi feito empregando-se a relação:

$$\eta_{\text{esp}} = \frac{\eta_{\text{solut}} - \eta_{\text{solvente}}}{\eta_{\text{solvente}}} \quad \text{Equação 2.2}$$

Na tentativa de se determinar a viscosidade intrínseca colocou-se em gráfico $\eta_{\text{esp}}/\text{concentração} \times \text{concentração}$, extrapolando-se a curva para concentração igual a zero.

2.2.4.2 - Medidas condutimétricas

Com a finalidade de se verificar a possível ocorrência de liberação de íons (Ca^{2+} , PO_4^{3-}) pela HAP, eventualmente

induzida pela SCMC, efetuaram-se determinações condutimétricas em suspensões de HAP, na presença e ausência do polieletrólito. As suspensões foram submetidas a agitação durante os experimentos. As determinações foram feitas em banho termostaticado a $25,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Foram efetuadas as seguintes medidas:

a) Determinação da constante da cela

$$k = R \cdot \kappa \quad \text{Equação 2.3}$$

onde:

k = constante da cela (ohm^{-1})

R = resistência em ohm

κ = condutividade específica da solução de KCl 0,02 N a $25^{\circ}\text{C} = 0,002768 \text{ ohm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (20).

b) Determinação da condutividade da água a 25°C

c) Medidas condutimétricas dos sistemas:

- HAP (0,3g) + H_2O (30 ml), a 25°C
- HAP (0,3g) + solução de SCMC F_4 marcada, na concentração de 0,0005g/g de solução (30 ml), em água, a 25°C
- HAP (0,3g) + solução de SCMC F_4 marcada, na concentração de 0,002g/g de solução (30 ml), em água, a 25°C

d) Determinação da condutividade das soluções:

- SCMC F_4 marcada 0,0005g/g solução, em água, a 25°C
- SCMC F_4 marcada 0,002g/g solução, em água, a 25°C

2.2.5 - Espectroscopia de ressonância paramagnética de elétron (EPR).

2.2.5.1 - Fundamentos

O emprego deste método foi de fundamental importância na execução deste trabalho, pelo que julgamos adequada a inclusão aqui de algumas breves considerações a respeito. Informações detalhadas sobre os princípios da técnica e sua aplicação são disponíveis na literatura⁽⁸⁾⁽⁷¹⁾.

A ressonância paramagnética de elétron tem sido empregada⁽²⁷⁾⁽⁶⁷⁾ em estudos conformacionais de polímeros sintéticos adsorvidos em superfícies sólidas. De fato, o método constitui-se em instrumento de grande utilidade nesse tipo de abordagem, vindo assim de encontro aos nossos objetivos. Depende, entretanto, da existência de regiões paramagnéticas nos sistemas em investigação e por esta razão seu uso até 1965 restringiu-se a sistemas que apresentassem propriedades magnéticas intrínsecas, dos quais se exclue grande parte dos sistemas de interesse biológico. Nessa época surge o método do marcador de spin⁽⁷⁶⁾ o qual introduz a idéia de se efetuarem marcações covalentes ou mesmo intercalação física de compostos paramagnéticos em componentes de sistemas não paramagnéticos. Desse modo o método, antes restrito à investigação de sistemas que possuísem as características referidas amplia-se, englobando novas áreas de interesse científico.

O requisito fundamental da aplicação do método exige que a marcação efetuada não altere significativamente as propriedades do composto ou sistema em questão, uma vez que se

pretenda extrapolar para os componentes não marcados os resultados obtidos com os sistemas marcados. Assim a técnica, embora constitua um recurso poderoso em diversas áreas da investigação científica, deve ser utilizada com cuidado e critério a fim de que a interpretação dos resultados obtidos possa ser confiável.

O emprego do método requer a existência de pelo menos 1 elétron desemparelhado em um componente do sistema em estudo. Elétrons com essa característica apresentam dois níveis de energia permitidos que correspondem a componentes de momento magnético do elétron paralelo ou antiparalelo ao campo externo. Na presença de núcleos de momento magnético diferente de zero, cada um dos dois níveis de energia referidos subdivide-se como consequência de interações entre o elétron e os momentos nucleares. As transições permitidas entre esses subníveis são aquelas que mudam o estado de spin do elétron sem alterar o do núcleo ao qual ele está acoplado. Tais transições são induzidas quando se fornece ao sistema radiação eletromagnética na região de microondas. A linha espectral desdobra-se em $2I + 1$ linhas onde I é o spin do núcleo em magnetons de Bohr. A separação entre essas linhas é conhecida como desdobramento hiperfino. Para o nitrogênio (^{14}N) $I = 1$, portanto o desdobramento hiperfino fornecerá três linhas, quando houver acoplamento de spin eletrônico com núcleos de ^{14}N .

O sinal obtido no espectrômetro corresponde à primeira derivada do espectro de adsorção. Assim, determinações precisas de intensidade do sinal podem ser obtidas através da determinação da área sob as curvas de absorção, ou seja, por uma dupla integração das linhas do espectro derivado.

Diversos fatores podem causar modificações de forma

e largura das linhas. Para paramagnetos que giram rápida e isotropicamente as linhas em EPR apresentam-se em geral gaussianas ou lorentzianas. Quando a frequência de reorientação diminui (tempo de correlação alto) é possível observar-se alargamento das linhas espectrais. Essas mudanças estão relacionadas com as anisotropias dos tensores g (razão entre o momento magnético e o momento angular) e T (desdobramento hiperfino). O movimento rotacional rápido e isotrópico da molécula resulta na perda da anisotropia dos parâmetros referidos. Essa velocidade rotacional está na dependência da viscosidade do meio, mais propriamente da microviscosidade do ambiente que circunda o marcador de spin. Quando a viscosidade for suficiente para imobilizá-lo observa-se o espectro do pó, que é uma condição limite na qual contribuições de todas as orientações possíveis do marcador de spin em relação ao campo magnético estarão presentes. A espectroscopia de ressonância paramagnética fornece também informações sobre a polaridade do meio através dos parâmetros g isotrópico e desdobramento hiperfino isotrópico. A forma e largura das linhas pode ainda ser afetada por interação spin-spin (por troca ou dipolo-dipolo) como decorrência de altas concentrações do marcador de spin ou mesmo de presença de marcador em sítios muito próximos.

2.2.5.2 - Emprego do método

Os dados de intensidade do sinal foram obtidos da altura do pico central. Embora não se possa considerar essa medida uma indicação absoluta da intensidade, em espécies de mesma mobilidade esse procedimento é perfeitamente adequado, como foi constatado nas curvas de calibração.

Os espectros obtidos para soluções de SCMC contendo marcador livre ou não covalentemente ligado foram corrigidos no sentido de se eliminar qualquer contribuição espectral não proveniente de espécies poliméricas. Essa correção foi feita a partir da integração dupla das curvas derivadas dos espectros do marcador livre e do polímero isento de marcador livre ou não covalentemente ligado. Com esses dados e conhecendo-se a relação entre alturas de pico em campo alto e campo médio (h_{-1}/h_0) para os dois casos referidos (0,96 e 0,35 respectivamente) foi possível determinar-se a contribuição relativa das duas espécies na intensidade dos espectros das preparações impuras.

Os espectros de soluções de SCMC foram obtidos em celas padrão de EPR para soluções aquosas.

Os espectros dos sedimentos foram obtidos em capilares de vidro, especialmente adaptados às características do espectrômetro.

As medidas foram feitas à temperatura ambiente.

3 - RESULTADOS

3.1 - Caracterização dos sistemas

3.1.1 - Verificação da possível ocorrência de alterações de massa molecular no material marcado. Medidas viscométricas

As soluções de SCMC estudadas apresentaram o comportamento que se pode observar nas Figuras de 1 a 3.

As Figuras 1 a 3a representam gráficos referentes a medidas de viscosidade de soluções de SCMC F_{75} , F_{40} e F_4 cujas diluições foram efetuadas dentro do próprio viscosímetro. As Figuras 3a e 3b referem-se a medidas feitas com a mesma amostra (SCMC F_4 não marcada), sendo que em 3b as diluições foram feitas fora do viscosímetro, com lavagem do instrumento entre uma e outra determinação, com a intenção de se evitarem possíveis efeitos de acúmulo de material polimérico nas paredes do capilar do viscosímetro, bem como se promover melhor homogeneização das soluções.

FIGURA 1 - Variação da relação $\eta_{esp}/conc$ em função da concentração do polímero, para SCMC F₇₅ marcada e não marcada, em: NaCl 0,05 M.

FIGURA 2 - Variação da relação $\eta_{\text{esp}}/\text{conc.}$ em função da concentração do polímero, para SCMC F₄₀ marcada e não marcada, em NaCl 0,05 M.

FIGURA 3 - Variação da relação $\eta_{sp}/conc.$ em função da concentração do polímero, para SCMC F_4 não marcada, em NaCl 0,05M. As curvas referem-se a ensaios efetuados com a mesma amostra, empregando-se dois diferentes procedimentos de diluição.

3.1.2 - Verificação da possível ocorrência de liberação de íons pela fase sólida. Medidas condutimétricas

A determinação da constante da cela foi efetuada com solução de KCl 0,02N a 25°C cuja condutividade específica κ é igual a 0,002768 $\text{ohm}^{-1}\text{cm}^{-1}$. A cela empregada apresentou uma constante $k = 1,299 \text{ cm}^{-1}$, a 25°C.

A condutividade da água nessa temperatura variou de $0,11 \times 10^{-5}$ a $0,24 \times 10^{-5} \text{ ohm}^{-1}\text{cm}^{-1}$, faixa de valores que consideramos suficiente baixa para a realização das determinações efetuadas posteriormente.

Os valores de condutividade de soluções de SCMC F_4 marca de concentrações 0,0005g/g solução e 0,002g/g solução, em água, a 25°C, mostraram-se iguais a $8,84 \times 10^{-5}$ e $30,68 \times 10^{-5} \text{ ohm}^{-1}\text{cm}^{-1}$, respectivamente.

Os resultados das determinações condutimétricas dos sistemas HAP/H₂O e HAP/SCMC estão apresentados nas Figuras 4, 5 e 6 e Tabela I.

TABELA I - Velocidade de dissolução de HAP e sua dependência da presença de SCMC no meio

S i s t e m a	$\frac{dk}{dt} \Big _{t \rightarrow \infty} (\frac{\text{ohm}^{-1}\text{cm}^{-1}}{\text{min}})$
HAP + SCMC F_4 0,0005g/g solução	0,000828
HAP + SCMC F_4 0,002g/g solução	0,000857
HAP + H ₂ O	0,000625

FIGURA 4 - Condutividade em função do tempo para o sistema HAP(0,3g) + 30 ml de H_2O , a 25°C .

FIGURA 5 - Condutividade em função do tempo para o sistema HAP (0,3g) + 30 ml de solução a 0,0005 g/g solução de SCMC F₄ marcada, em água, a 25°C.

FIGURA 6 - Condutividade em função do tempo para o sistema HAP (0,3g) + 30 ml de solução a 0,002g/g solução de SCMC F₄ marcada, em água, a 25°C.

3.2 - Marcação e purificação do material polimérico

De um modo geral, observou-se baixa eficiência de marcação quando se utilizou o método que emprega carbodiimida como acoplador. O processo que utiliza brometo de cianogênio mostrou-se, ao contrário, bastante eficiente. Por esta razão, todo o material polimérico marcado que se usou nos diversos ensaios de adsorção foi aquele obtido de marcações que empregaram brometo de cianogênio como ativador. O grau de substituição para o marcador de spin que se obtem com esse procedimento é de cerca de 1 marcador para cada 24 monômeros de SCMC⁽¹⁷⁾.

O método de filtração em gel, empregando-se Sephadex G-25, foi utilizado na purificação de solução de SCMC F₇₅. Os espectros obtidos das várias frações eluídas indicaram diferentes valores das razões entre alturas de pico em campo alto e médio (h_{-1}/h_0). A relação de alturas observada nos primeiros tubos é constante e igual àquela observada quando o marcador livre é removido por adsorção em resina catiônica e por tratamento com Al^{3+} ; foi portanto tomada como sendo correspondente a polímero isento de marcador livre (Tabela II). O método foi empregado na purificação de material já submetido a processo de diálise (por cerca de 7 a 10 dias), cujos espectros em EPR apresentavam invariavelmente relações h_{-1}/h_0 de diferentes valores, conforme a preparação.

Na eluição de solução de SCMC F₄ marcada foi também possível separar-se um material com relação $h_{-1}/h_0 = 0,35$ do marcador livre ($h_{-1}/h_0 = 0,96$). Não foram no entanto detecta-

TABELA II - Relações entre alturas de picos de campo alto e campo médio em EPR (h_{-1}/h_0) de alíquotas de solução de SCMC F₇₅ marcada eluída em Sephadex G-25

Número do tubo	h_{-1}/h_0
17 a 22	0,35
28	0,65
32	0,70
38	0,85
52	0,85
58	0,96

das aqui espécies com valores intermediários da relação referida.

A desvantagem do método foi a de fornecer o material purificado em grandes volumes, fato que impediu o seu emprego para fins preparativos.

A eficiência de um procedimento usual de diálise, feita em sacos de diálise durante cerca de oito dias, foi testada fazendo-se passar a solução em diálise por uma cela contendo membranas de polissulfona dispostas em feixe. Esse sistema oferece uma maior relação área/volume tornando o processo muito mais eficiente e rápido. Foram tomados os valores de condutância antes e depois da passagem do material por tais membranas. Não se observou diferença significativa nos valores obtidos (variação de 2% na resistência das soluções), pelo que se considerou inútil o aumento do tempo que se vinha empregando na diálise convencional.

Deve-se frisar entretanto que o limite de eficiência da diálise forneceu sempre, nos diversos ensaios realizados, material com relações h_1/h_0 variáveis de uma para outra preparação. Foi testada uma precipitação da SCMC em solução com $Al_2(SO_4)_3$ a 5%, com posterior redissolução do precipitado em NaOH 0,1M. Esse procedimento, embora tenha fornecido um material com características espectrais uniformes, trouxe sérias dificuldades de solubilização da SCMC. A eluição em Sephadex, igualmente eficiente, apresentou, como já se disse, a desvantagem de fornecer um material bastante diluído, dificultando ou mesmo tornando quase impraticável a sua utilização.

Dos processos de purificação estudados apenas o tratamento com resina de troca catiônica mostrou-se eficiente e adequado aos fins desejados. O espectro obtido para o material

al assim tratado apresentou uma relação $h_{-1}/h_0 = 0,35$ que se mostrou invariável para as diversas preparações. Essa uniformidade espectral do material tratado bem como a simplicidade e rapidez do método o recomendaram como método de escolha.

3.3 - Estudos de adsorção

3.3.1 - Espectros de ressonância paramagnética de elétron

Os espectros em EPR obtidos para os sedimentos não dissolvidos dos sistemas de adsorção (HAP + SCMC adsorvida) apresentaram a mesma forma espectral em toda a faixa de concentração estudada (0,0001 a 0,0004 g de SCMC/g de solução) (Figura 7e).

Foram obtidos espectros de SCMC em meios de alta viscosidade: pectina 0,01 g/ml, glicerol 0,25 g/ml glicerol 0,44 g/ml, sacarose 0,44 g/ml (Figuras 7a,b,c,d, respectivamente). Obteve-se também o espectro da SCMC sólida (Figura 8).

As curvas de calibração foram obtidas através dos espectros das soluções de SCMC em tampão utilizadas nos ensaios de adsorção (Figura 9). Quando submetidas a tratamento com resina essas soluções apresentaram o espectro que se vê na Figura 10b no qual a relação $h_{-1}/h_0 = 0,35$. As soluções de SCMC não submetidas a tal tratamento apresentaram relações h_{-1}/h_0

FIGURA 7 - Espectros (EPR) de carboximetilcelulose em meios de diferentes viscosidades

- a) SCMC F_4 em pectina 0,01g/ml
- b) SCMC F_4 em glicerol 0,25 g/ml
- c) SCMC F_4 em glicerol 0,44 g/ml
- d) SCMC F_4 em sacarose 0,44 g/ml
- e) SCMC F_{75} adsorvida em HAP

FIGURA 8 - Espectro (EPR) da carboximetilcelulose (SCMC F₇₅)
sólida, liofilizada.

FIGURA 9 - Curva de calibração obtida a partir de dados de EPR das soluções de SCMC F₇₅ em tampão acetato 0,1M pH 6,3 (soluções preparadas por pesagem).

FIGURA 10 - Espectros (EPR) dos sistemas:

- a) Sedimento (HAP + SCMC F₄ adsorvida) dissolvido em EDTA 0,25 M pH 6,3.
- b) Solução de SCMC F₇₅ submetida a tratamento com resina de troca iônica, em tampão acetato 0,1M pH 6,3.
- c) Marcador de spin livre, em água.

variáveis conforme a preparação. Observou-se no entanto que os espectros dos sedimentos (HAP + SCMC adsorvida), dissolvidos em EDTA 0,25 M pH 6,3 apresentaram sempre a mesma relação h_{-1}/h_0 (igual a 0,35) (Figura 10a), independentemente das características espectrais das soluções originais utilizadas nos ensaios.

O espectro do marcador livre é apresentado na Figura 10c. A relação h_{-1}/h_0 mostra um valor igual a 0,96.

3.3.2 - Isotermas de adsorção

Foram determinadas as isotermas de adsorção em tampão acetato 0,1 M pH 6,3, com tempo de contacto de 3 horas, dos seguintes sistemas:

SCMC F_{75} /HAP a 0°C , 25°C e 55°C (Figuras 11a, b, c)

SCMC F_4 /HAP a 25°C (Figura 12b)

e em tampão acetato 0,1M/fosfato 0,005M pH 6,3, com 3 horas de contacto, do sistema:

SCMC F_4 /HAP a 25°C (Figura 12a)

Conc. no sobrenadante (g SCMC / g solução)

○—○ 0°C
●—● 25°C
△---△ 55°C

FIGURA 11 - Isothermas de adsorção para os sistemas SCMC F₇₅/HAP, em tampão acetato 0,1 M pH 6,3, com 3 horas de incubação, a três temperaturas (0°C, 25°C e 55°C).

Conc. no sobrenadante (g SCMC / g solução)

- tampão acetato 0,1M/fosfato 0,005M, pH 6,3
- tampão acetato 0,1M pH 6,3

FIGURA 12 - Isotermas de adsorção para o sistema SCMC F₄/HAP, a 25°C, com 3 horas de incubação, em diferentes tampões.

3.2.3 - Comportamento das isotermas de adsorção

Aos dados obtidos foi aplicado o formalismo da teoria de LANGMUIR, segundo o qual:

$$\frac{C}{Q} = \frac{1}{KN} + \frac{C}{N} \quad \text{Equação 3.1}$$

onde:

C = concentração de polieletrólito em solução após a adsorção, em μ mol de monômero de SCMC/g de solução.

Q = quantidade adsorvida, em μ mol de monômero de SCMC/g HAP.

N = número máximo de sítios de adsorção/g HAP, em μ mol de monômero de SCMC/g HAP.

K = afinidade das moléculas de adsorbato pelos sítios de adsorção, em g solução/ μ mol monômero de SCMC.

Foram traçados gráficos C/Q contra C que são apresentados nas Figuras 13, 14, 15 e 16. Os valores dos parâmetros N e K, determinados graficamente, são apresentados na Tabela III.

FIGURA 13 - Variação da relação concentração/quantidade adsorvida em função da concentração de polímero no sobrenadante, para o sistema SCMC F₇₅/HAP, a 0°C, 3 horas de incubação, em tampão acetato 0,1M pH 6,3. A reta foi ajustada por regressão linear (R = 0,992).

FIGURA 14 - Variação da relação concentração/quantidade adsorvida em função da concentração de polímero no sobrenadante, para o sistema SCMC F₇₅/HAP, a 25°C, 3 horas de incubação, em tampão acetato 0,1 M pH 6,3. A reta foi ajustada por regressão linear (R = 0,997).

FIGURA 15 - Variação da relação concentração/quantidade adsorvida em função da concentração de polímero no sobrenadante, para o sistema SCMC F₇₅/HAP, a 55°C, 3 horas de incubação, em tampão acetato 0,1M pH 6,3. A reta foi ajustada por regressão linear (R = 0,991).

FIGURA 16 - Variação da relação concentração/quantidade adsorvida em função da concentração de polímero no sobrenadante, para o sistema SCMC F_4 /HAP, a 25°C, 3 horas de incubação, em tampão acetato 0,1 M pH 6,3. A reta foi ajustada por regressão linear ($R=0,999$).

TABELA III - Número máximo de sítios por grama de adsorvente (N) e constante de afinidade (K), calculados a partir de retas de Langmuir para sistemas SCMC/HAP em tampão acetato 0,1M pH 6,3, 3 horas de incubação.

Sistema	N	K
	$\frac{\mu \text{ mol polímero}}{\text{g HAP}}$	$\frac{\text{g solução}}{\mu \text{ mol polímero}}$
SCMC F ₄ /HAP 25°C	4,20 $\pm$ 0,29	289 $\pm$ 215
SCMC F ₇₅ /HAP 0°C	0,46 $\pm$ 0,05	205 $\pm$ 74
SCMC F ₇₅ /HAP 25°C	0,49 $\pm$ 0,07	312 $\pm$ 132
SCMC F ₇₅ /HAP 55°C	0,54 $\pm$ 0,05	201 $\pm$ 70

3.3.4 - Tempo de equilíbrio

A variação na quantidade adsorvida em função do tempo mostrou o comportamento que se observa na Figura 17.

3.3.5 - Cinética de adsorção

Foram efetuadas medidas espectrofotométricas a 590 nm para observação da variação de turbidez das suspensões com o tempo:

HAP (0,05g) + tampão acetato 0,1 M pH 6,3 (5,0 ml)

HAP (0,05g) + SCMC F₄ 0,0008 g/g de solução em tampão acetato 0,1 M pH 6,3 (5,0 ml)

Os resultados estão nas Figuras 18 e 19.

3.3.6 - Efeito da concentração de SCMC em solução sobre a estabilidade de suspensões de HAP

Foram efetuadas medidas espectrofotométricas a 590 nm nos sistemas SCMC F₄/HAP em várias concentrações, após se terem passado 4 horas da mistura e agitação dos tubos. Os resultados estão expressos na Figura 20.

FIGURA 17 - Variação na quantidade adsorvida em função do tempo para o sistema HAP/SCMC F₇₅, em tampão acetato 0,1 M pH 6,3, a 25°C. Concentração do polímero = $3,032 \times 10^{-3}$ g/g solução.

FIGURA 18 - Transmitância de suspensão de HAP em tampão acetato 0,1 M pH 6,3 (0,05 g HAP/5,0 ml solução), em função do tempo.

FIGURA 19 - Transmitância de suspensão HAP (0,05g/5,0 ml solução) em tampão acetato 0,1 M pH 6,3, na presença de SCMC F_4 numa concentração de $0,8 \times 10^{-3}$ g polímero/g solução, em função do tempo.

FIGURA 20 - Transmitância de suspensões de hidroxilapatita em tampão acetato 0,1M pH 6,3 (0,05 g HAP/5ml solução), na presença de SCMC F_4 , em função da concentração inicial do polímero em solução. As leituras foram feitas após aproximadamente 12-15 horas de contacto HAP-SCMC e decorridas 4 horas da última homogeneização dos tubos.

3.3.7 - Efeito da concentração de SCMC em solução sobre o volume de sedimentação de HAP

Os mesmos sistemas referidos no item 3.3.6 foram submetidos à verificação de seus volumes de sedimentação. Os resultados são mostrados na Figura 21.

3.3.8 - Susceptibilidade da SCMC adsorvida à ação enzimática

Foram realizados diversos ensaios com a finalidade de se estudar o comportamento da SCMC adsorvida em HAP sob ação da celulase. O tampão empregado nos ensaios foi o tampão acetato (referido em ensaios de celulase)⁽³⁶⁾, 0,1 M pH 6,3. Os espectros apresentados na Figura 22 estão na mesma escala.

3.3.8.1 - Verificação da ocorrência de adsorção da celulase na HAP.

Ensaio

Tubo a:- 1,0 ml de solução de celulase em tampão (1,0 mg/ml) + 4,0 ml de tampão + 0,05 g de HAP →
→ homogeneização → incubação (37°C, 6 horas)
→ centrifugação → leitura espectrofotométrica ($\lambda = 280 \text{ nm}$) do sobrenadante.

FIGURA 21 - Volumes de sedimentação de hidroxilapatita em tampão acetato 0,1 M pH 6,3, em função da concentração inicial de SCMC F_4 em solução.

FIGURA 22 - Susceptibilidade da SMC F₇₅ adsorvida à ação enzimática. Espectros (EPR) dos sistemas:

- a) Sedimento HAP+SCMC adsorvida (25°C, 3 horas), não dissolvido, após incubação com celulase a 37°C, por 6 horas.
- b) Sedimento HAP+SCMC adsorvida (25°C, 3 horas) dissolvido em EDTA 0,25 M pH 6,3, sem contacto com celulase.
- c) Sedimento HAP+SCMC adsorvida (25°C, 3 horas) dissolvido em EDTA 0,25 M pH 6,3, após incubação a 37°C por 6 horas, sem celulase.
- d) Sedimento HAP+SCMC adsorvida (25°C, 3 horas) dissolvido em EDTA 0,25 M pH 6,3, após incubação com celulase por 6 horas, a 37°C.

Tubo b:- leitura espectrofotométrica ($\lambda = 280 \text{ nm}$) de solução de celulase em tampão (1,0 mg/ml).

Resultados

Tubo	Densidade óptica ($\lambda = 280 \text{ nm}$)
a	0,075
b	0,620

Os resultados mostram a ocorrência de adsorção de celulase numa taxa de 39% nas condições de ensaio. Não foi determinada a atividade celulásica do material não adsorvido.

3.3.8.2 - Determinação da quantidade de SCMC adsorvida

Ensaio

5,0 ml de SCMC F₇₅ marcada 0,00302 g/g solução, em tampão + 0,05 g HAP → homogeneização → incubação (25°C, 3 horas) → centrifugação → EPR do sedimento lavado dissolvido em 5,0 ml de EDTA 0,25 M pH 6,3 (Figura 22b)

3.3.8.3 - Verificação da ocorrência de redissolução da SCMC adsorvida

Ensaio

5,0 ml de SCMC F₇₅ marcada 0,00302 g/g solução, em tampão + 0,05 g HAP → homogeneização → incubação (25°C, 3 horas) → centrifugação → sedimento lavado + 5,0 ml de tampão → incubação (37°C, 6 horas) → centrifugação → EPR do sedimento lavado dissolvido em 5,0 ml de EDTA 0,25 M pH 6,3 (Figura 22c)

3.3.8.4 - Verificação da ação da celulase sobre a SCMC adsorvida

Ensaio

5,0 ml de SCMC F₇₅ marcada 0,00302 g/g solução, em tampão + 0,05 g HAP → homogeneização → incubação (25°C, 3 horas) → centrifugação → sedimento lavado + 1,0 ml de solução de celulase (1,0 mg/ml) em tampão → incubação (37°C, 6 horas) → EPR do sedimento lavado dissolvido em EDTA 0,25 M pH 6,3 (Figura 22 d).

3.3.8.5 - Verificação da conformação do polímero adsorvido após ação da celulase

O espectro obtido para o sedimento HAP/SCMC F₇₅ marcada, após incubação com a celulase (nas condições descritas no

item 3.3.8.4) não mostrou alteração significativa na forma das linhas (Figuras 22a) quando comparado ao obtido para o mesmo sistema sem contacto com a celulase (Figura 7e).

3.3.8.6 - Verificação da susceptibilidade da SCMC em solução ao ataque enzimático

Com a finalidade de se acompanhar a degradação da SCMC em solução pela celulase, efetuaram-se medidas viscométricas em função do tempo no seguinte sistema: 2,0 ml de SCMC F₇₅ marcada 0,00302 g/g de solução, em tampão + 0,0060 g de celulase, a 37⁰C (Figura 23). O tempo de escoamento da água foi de 60,9 seg.

FIGURA 23 - Tempos de escoamento de solução de SCMC F₇₅ marcada ($3,02 \times 10^{-3}$ g/g de solução) em tampão acetato 0,1 M pH 6,3, na presença de celulase, em função do tempo de incubação. Temperatura do experimento = 37°C.

4 - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

As medidas de viscosidade do material marcado e não marcado confirmaram um comportamento anômalo das soluções de SCMC nos meios estudados, fato que dificultou a determinação da viscosidade intrínseca das soluções. De um modo geral, a relação $\eta_{\text{esp}}/\text{conc.} \times \text{conc.}$ mostrou-se linear apenas numa faixa restrita de concentração. STROMBERG relata, em sua revisão sobre adsorção de polímeros⁽⁷⁸⁾, a ocorrência de resultados de estudos de viscosidade que foram considerados de início como anômalos. Segundo este autor, curvas $\eta_{\text{esp}}/\text{conc.} \times \text{conc.}$ produziram retas até regiões de baixas concentrações quando então desvios para cima e para baixo eram observados. CUTLER e KIMBALL⁽¹⁸⁾ atribuíram esses efeitos, já em 1951, à adsorção do polímero nas paredes do viscosímetro. Cuidados no sentido de minimizar a ocorrência desses efeitos foram por nós tomados como descrito em 3.1.1. No entanto a providência referida, qual seja, a de efetuar as diluições fora do viscosímetro, levou novamente à obtenção de resultados com desvios da idealidade (Figura 3) e não coincidentes com o comportamento que se vinha observando nos outros sistemas (Figuras 1 e 2). STREETER⁽⁷⁷⁾ e BOYER⁽¹⁵⁾ atribuíram essas anomalias ao embaraçamento das moléculas de polímero em baixas concentrações e UMSTÄTTER⁽⁸¹⁾ apresentou evidência teórica e experimental de que esses desvios não eram causados por efeitos de adsorção. ÖHRN⁽⁶³⁾, revendo extensivamente a literatura no que se referia a viscometria de precisão concluiu que as anomalias observadas decorriam da fal

ta de um termo de correção para os efeitos de adsorção. A literatura registra referências específicas ao comportamento não newtoniano de soluções de SCMC. Pontos de mínimo e de máximo na relação $\eta_{esp}/conc.$ para soluções de carboximetilcelulose em água foram relatados por MOAN e WOLFF⁽⁵⁷⁾. Esses autores atribuíram o ponto de mínimo a uma situação na qual não ocorre nenhuma interpenetração entre as moléculas e o ponto de máximo ao limite das interações eletrostáticas e à máxima extensão do políon. O estudo do comportamento dessas soluções levou os autores referidos a admitirem que as moléculas de carboximetilcelulose comportam-se como partículas rígidas em soluções aquosas, na ausência de eletrólitos. A presença de NaCl, empregada em nossos ensaios, favorece a flexibilidade da cadeia e revela desvios menos intensos que aqueles observados na ausência de eletrólitos. Nossos resultados mostraram ainda um aumento não proporcional da relação $\eta_{esp}/conc.$ especialmente em concentrações mais altas. Pode-se especular que tais resultados se devam a agregação de moléculas de polímero nessas regiões. De fato, mesmo se considerando que as moléculas de SCMC apresentem cargas negativas distribuídas ao longo de suas cadeias nas condições de ensaio, é possível admitir-se que tais agregações sejam mediadas por pontes iônicas entre elas. Apesar dos efeitos relatados observou-se que de um modo geral para um mesmo polímero (marcado e não marcado) as curvas $\eta_{esp}/conc. \times conc.$ situaram-se numa mesma faixa mas diferiram marcadamente daquelas verificadas para soluções de polímeros de diferentes pesos moleculares (Figuras 1, 2 e 3). Assim sendo, concluiu-se não ter havido alteração de massa molecular e/ou conformação dos polímeros a considerar, decorrente do processo de marcação a

que foram submetidos.

Com a intenção de se verificar a possível influência da SCMC sobre a estabilidade da HAP foram efetuadas medidas con dutimétricas em suspensões de HAP na presença e ausência de SCMC. Essas determinações mostraram a ocorrência de uma lenta liberação de Íons pelo mineral, afetada em pequeno grau pelo polieletrólito (Figuras 4, 5, 6 e Tabela I). A cinética do processo de dissolução é complexa e segundo SMITH et al.⁽⁷⁵⁾ is to se deve ao fato dos cristais de HAP apresentarem-se numa po pulação heterogênea no que se refere a tamanho e forma, de tal modo que os sítios defeituosos que esses cristais carregam apre sentam diferentes probabilidades para escape de Íons .

Entre os processos de marcação empregados observou-se maior eficiência naquele que utilizou brometo de cianogênio como acoplador. Por esta razão foi este o método adotado na obtenção do material polimérico marcado empregado nos diversos ensaios deste trabalho.

As preparações de SCMC marcada utilizadas na determi nação das isotermas de adsorção revelaram a presença de espê cies contendo marcador não covalentemente ligado, conforme se pôde observar pelos resultados da eluição do polímero em gel - Sephadex G-25 (Tabela II). Tal conclusão procede da varia - ção observada na relação de alturas de pico em EPR nas diver sas alíquotas eluídas. As quantidades presentes de tais espê cies variaram de uma para outra preparação, como se pôde veri ficar pela não uniformidade dos espectros obtidos. As espécies referidas não se mostraram removíveis por diálise prolongada e sua eliminação foi apenas possível por filtração em gel ou tra tamento com resina de troca iônica. A eficiência de purifica-

ção obtida através dos dois métodos foi semelhante, sendo que o último procedimento mostrou-se mais adequado para fins preparativos em razão de fornecer um material não diluído e de se tratar de uma técnica bem mais simples. Embora as preparações empregadas nos estudos de adsorção contivessem as espécies mencionadas, não se observou adsorção pela HAP de marcador não covalentemente ligado. Essa conclusão é obtida a partir da relação entre as alturas dos picos de campo alto e médio nos espectros dos sedimentos (HAP + SCMC adsorvida) dissolvidos em EDTA (Figura 10a) que se mostrou constante em todos os ensaios e igual a 0,35.

As isotermas foram obtidas pela avaliação direta da quantidade de polímero adsorvido na superfície da hidroxilapatita. Este procedimento foi escolhido por ter-se mostrado mais adequado em comparação ao procedimento usual, qual seja, a determinação da quantidade adsorvida por diferença entre as concentrações da espécie no sobrenadante, antes e depois da adsorção. Este último tipo de abordagem introduz na verdade notável imprecisão nas medidas sempre que a quantidade adsorvida é muito baixa, como é o caso dos sistemas SCMC/HAP nas condições em que foram estudados neste trabalho. A imprecisão decorre sobretudo da manipulação de dados correspondentes a altos valores de intensidade espectral em que evidentemente o erro experimental representa muito em valor absoluto, comprometendo assim a quantidade da espécie adsorvida. Esse fonte de erro é consideravelmente minimizada pela determinação direta da quantidade adsorvida na superfície.

A cobertura máxima das isotermas obtidas em tampão acetato mostrou pequena dependência da temperatura e peso mole

cular do polieletrólito (de 0,034 a 0,043 g SCMC/g HAP) (Figuras 11a,b,c e 12b). A concentração do polieletrólito no sobrenadante correspondente à saturação do fenômeno de adsorção foi de cerca de 0,1% para SCMC F₇₅ e 0,05% para SCMC F₄, confirmando resultados dos experimentos de estabilização e volume de sedimentação de HAP (Figuras 20 e 21, respectivamente).

O efeito de íons fosfatos nas características adsorventes da fase sólida foi investigado e verificou-se que a presença desses íons no meio modifica a isoterma a concentrações de polímero no sobrenadante maiores que 0,05%, preservando no entanto a afinidade polímero-substrato. A isoterma obtida não apresenta patamar (Figura 12a). O aumento progressivo na quantidade adsorvida em regiões de alta concentração pode indicar a ocorrência de precipitação de material macromolecular sobre a primeira camada de SCMC adsorvida e/ou mudança na composição química do substrato. Os dados experimentais no entanto não permitem maiores especulações a respeito do eventual papel dos íons fosfato nesse processo. Cabe notar que nossos resultados diferem de dados da literatura segundo os quais a capacidade adsorvente da HAP na presença de fosfato é significativamente diminuída para moléculas de adsorbato negativamente carregadas. RØLLA⁽⁶⁹⁾ registra ausência de adsorção de dextrana em HAP numa concentração de fosfato de 0,5 M. GLUECKAUF et al.⁽³⁴⁾ apresentam dados segundo os quais a adsorção de γ globulina e soro albumina bovinas em HAP são apreciavelmente diminuídas já em concentração de fosfato igual a 0,005M. A adsorção de compostos contendo grupamentos positivamente carregados é no entanto favorecida por um tratamento prévio da superfície com o íon⁽⁴⁷⁾. Em nosso caso, a ausência de atividade inibidora de fosfato so

bre a adsorção de SCMC reflete a elevada afinidade do polieletrólito pela HAP.

Informações quantitativas sobre adsorção de polieletrólitos em HAP são de um modo geral escassas na literatura. Assim, incluiremos aqui alguns resultados obtidos para outros sistemas de adsorção que, embora possam diferir em muitos aspectos do nosso, trazem em comum essencialmente um mesmo tipo de problema em cuja abordagem esforços interpretativos semelhantes estão envolvidos. Dados de literatura⁽⁶⁹⁾ registram valores para adsorção de dextrana em HAP da ordem de 0,005 g/g HAP. Este resultado é cerca de 8 vezes menor que o obtido por nossos experimentos para o sistema SCMC/HAP. Outras referências sobre adsorção de polímeros em superfícies indicam em geral valores bem mais altos de adsorbância. Álcool polivinílico adsorve em AgI⁽²³⁾ numa relação de 0,0010 a 0,0015 g/m² (variação com a viscosidade e grau de hidrólise), ou seja, cerca de 2,7 vezes o verificado para o nosso sistema (0,034 a 0,043 g SCMC/g HAP ou $3,7 \times 10^{-4}$ a $4,6 \times 10^{-4}$ g SCMC/m² HAP). Adsorção de albumina humana plasmática sobre poliestireno⁽⁶²⁾ apresenta valores 3 a 8 vezes maiores que aqueles obtidos para o nosso sistema de ensaio, variando com o pH e a temperatura. Álcool polivinílico adsorve também em poliestireno⁽¹⁴⁾ numa quantidade de 8 a 17 vezes maior que aquela que se observou para a adsorção de SCMC em HAP.

As isotermas de adsorção, com exceção daquela obtida em presença de fosfato, apresentaram um comportamento que se pode descrever através da extensão do formalismo de LANGMUIR para adsorção na interface sólido-líquido (Figuras 13, 14, 15 e 16). Convém no entanto lembrar que as premissas de tal teoria

podem não ser necessariamente obedecidas por sistemas poliméricos. As considerações fundamentais da teoria referida admitem: sistemas em equilíbrio, adsorção física reversível em monocamada, independência da energia livre de Gibbs de adsorção quanto ao grau de cobertura do adsorvente pelo adsorbato e comportamento ideal dos componentes do sistema de adsorção. Sistemas envolvendo polímeros não obedecem em geral a tais considerações. No entanto, o fato de termos obtido bom ajuste dos dados experimentais em curvas de acordo com a teoria de LANGMUIR nos leva a pensar em que a adsorção de SCMC carregada possa apresentar aspectos muito semelhantes aos do comportamento de espécies não poliméricas. A esse respeito, EIRICH⁽²¹⁾ ressalta o fato de que todas as teorias de adsorção de polímeros e mais particularmente a FSE incluem a isoterma de LANGMUIR como um caso especial, isto é, para adsorção localizada de cadeias sem nenhum outro tipo de interação a não ser a repulsão de curta distância. Em vista disso ele classifica de surpreendente a concordância bem próxima que se observa entre grande número de isotermas de adsorção de material macromolecular com a isoterma de LANGMUIR. SILBERBERG no entanto, conforme observa STROMBERG⁽⁷⁸⁾, considera que essa concordância é de certo modo enganadora uma vez que para altos valores de concentração de polímero no sobrenadante (C), a quantidade adsorvida (Q) tende para um valor constante, de modo que num gráfico $C/Q \times C$ as retas obtidas poderão ser decorrência dessa particularidade matemática e não do comportamento do sistema. É importante no entanto ressaltar que as observações de SILBERBERG referem-se a sistemas com afinidades altíssimas, ou seja, nas quais a isoterma consiste praticamente apenas de um patamar. Nossos re-

sultados no entanto mostram um comportamento segundo LANGMUIR também em regiões de baixa concentração, com coberturas incompletas. Equações empíricas mais complexas são apresentadas por GLUECKAUF e PATTERSON⁽³⁴⁾ para descrever o comportamento de proteínas (soro albumina e γ globulina bovinas) adsorvidas em superfície de hidroxilapatita. Nossos resultados no entanto evidenciaram uma concordância no comportamento dos sistemas SCMC/HAP em tampão acetato com as expectativas da teoria de LANGMUIR. Foram obtidas retas a partir de gráficos $C/Q \times C$ (Figuras 13, 14, 15 e 16) e os parâmetros calculados - N (número máximo de sítios por grama de adsorvente) e K (constante de afinidade adsorvente-adsorbato) - são apresentados na Tabela III.

As constantes de afinidade mostraram-se independentes do peso molecular e temperatura dentro dos limites do erro experimental. A semelhança nos valores de K pode ser interpretada como uma confirmação de que grupos funcionais similares no polímero e na HAP estão envolvidos na adsorção. É razoável que tais grupos sejam identificados como carboximetilas na SCMC e íons cálcio na superfície da HAP. A não dependência de K com o peso molecular mostra ainda que nenhuma variação detectável na energia livre molar de adsorção ocorre com o aumento do grau de polimerização da SCMC, dentro da faixa considerada.

O parâmetro N não mostrou variação significativa com a temperatura mas revelou uma apreciável dependência do peso molecular ($N_{F_{75}} < N_{F_4}$) como se pode observar ainda na Tabela III. Esta última observação é consistente com a formulação das seguintes possibilidades:

- a) A molécula polimérica uma vez ligada à superfície oferece uma restrição estérica, dependente do peso molecular,

ã aproximação de outras moléculas. Em solução a distância de ponta a ponta de SCMC F_{75} é, em primeira aproximação, pelo menos $\sqrt{8}$ vezes maior que a distância de ponta a ponta de SCMC F_4 , valor que permite uma primeira estimativa da relação de área ocupada por mol de cada um desses polímeros.

- b) Uma molécula polimérica poderá estabelecer um número de contactos com a superfície tanto maior quanto maior for o comprimento da cadeia. Esta possibilidade é, portanto, dependente do peso molecular e incorpora o efeito estérico descrito no item anterior.

Os valores determinados em nossos estudos para N e K podem ser interpretados paralelamente a resultados de KRESAK et al.⁽⁴⁷⁾, cujos estudos sobre adsorção de aminoácidos em HAP permitiram a elaboração de um modelo geométrico consistente com as observações experimentais. Esses autores consideraram que a molécula adsorvida possui liberdade de rotação de tal modo que o volume efetivo de adsorção é descrito por um cone em cujo vértice está a carboxila ligada a um íon cálcio da superfície de HAP. Assim, qualquer íon localizado dentro da projeção do cone na superfície não poderá funcionar como um sítio de adsorção. Os valores de N determinados por esses autores para a adsorção de aminoácidos em HAP variaram aproximadamente de 8 a $54 \mu \text{ mol}$ por grama de adsorvente ($\bar{a} \text{rea superficial} = 59,56 \text{ m}^2/\text{g}$). Quando extrapolados para a área de nossa amostra ($92,6 \text{ m}^2/\text{g}$) esses valores sofrem uma variação de 12 a $83 \mu \text{ mol/g}$. Esses resultados são consideravelmente maiores que aqueles observados

em nossos sistemas (Tabela III). O parâmetro N aumentou com a diminuição do peso molecular, confirmando as expectativas do modelo teórico. Os autores citados observaram ainda uma significativa concordância entre os valores de N calculados a partir dos dados experimentais das isotermas de adsorção e aqueles obtidos a partir do modelo geométrico. As constantes de afinidade mostraram-se independentes do peso molecular tal como nos nossos resultados e os valores obtidos para a adsorção de aminoácidos em HAP foram de cerca de $0,200 \text{ ml}/\mu\text{mol}$, significativamente menores que aqueles verificados para os sistemas poliméricos por nós ensaiados (Tabela III).

A conformação da SCMC adsorvida mostrou-se independente do grau de cobertura em toda a faixa de concentração estudada ($0,0001$ a $0,004 \text{ g SCMC/g solução}$). Os espectros do material adsorvido (Figura 7e) mostram uma acentuada restrição de mobilidade de spin quando comparados aos espectros obtidos para os polímeros em solução (Figura 10a,b); este fato permite que se admita a ocorrência de conformação em "trens" de parte considerável do material adsorvido, uma vez que o espectro do polímero em solução refere-se a conformação exclusiva em "alças". Espectros foram obtidos em meios de alta viscosidade na tentativa de se efetuar uma análise conformacional da SCMC adsorvida por decomposição dos espectros dos sedimentos em seus dois componentes: componente com mobilização restrita (trens) e componente com livre mobilização (alças). O espectro em pectina (Figura 7a) não apresentou mudança de forma em relação ao obtido para o polieletrólito em tampão acetato ou em EDTA (Figuras 10b e 10a, respectivamente). É possível supor-se que um meio polimérico não induza restrição ao movimento de spin pelo fato

de preservar, no seio de uma solução viscosa, através de sua estrutura cruzada tridimensional, regiões cuja microviscosidade não se altera. O mesmo não se observa para solução do polímero em sacarose ou glicerol, em que tal efeito estrutural não ocorre. A restrição à mobilização do spin é considerável nesses casos, como se pode observar nas Figuras 7d e 7c respectivamente, embora não seja suficiente para a decomposição do espectro do sedimento (HAP + SCMC adsorvida). Concentrações mais baixas de glicerol não alteram significativamente o aspecto das linhas obtidas em EPR (Figura 7b). O espectro da SCMC na forma sólida é apresentado na Figura 8. Pode-se aí observar a notável modificação das formas das linhas espectrais bem como o alargamento do desdobramento hiperfino. Tais características no entanto podem ser em parte consequência de interações spin-spin, favorecidas pelo meio anidro, o que torna o uso de tal espectro impróprio aos estudos conformacionais da SCMC adsorvida em HAP, em meio aquoso.

Os experimentos de tempo de equilíbrio (Figura 17) indicaram a ocorrência de um aumento muito lento na quantidade adsorvida com o tempo. A variação nessa quantidade mostrou-se constante a partir de um tempo igual a 15 minutos, antes do qual a experimentação foi impraticável. O valor obtido nesse tempo para a quantidade adsorvida já é da mesma ordem de grandeza que aquele verificado para tempos maiores. É possível assim admitir-se a ocorrência de etapas muito rápidas de interação SCMC-HAP cujo equilíbrio seja atingido em menos de 15 minutos. A limitação experimental de tempo necessário à manipulação da amostra impediu no entanto que se investigasse o possível atingimento do equilíbrio nessa etapa inicial de interações.

A respeito da ação enzimática sobre a SCMC adsorvida, verificou-se a permanência da forma espectral após a incubação com a celulase (Figuras 22d e 22b) e considerou-se desprezível a diferença de intensidade de sinal entre os espectros referidos. O espectro do sedimento (HAP + SCMC adsorvida) apresentado na Figura 22a mostrou também um comportamento inalterado, independente da presença da enzima e semelhante ao que se observa na Figura 7e para a SCMC adsorvida não submetida à ação da celulase. O controle da digestibilidade da SCMC em solução pela celulase mostrou que o substrato solúvel é susceptível à ação enzimática e que a digestão já é completa no tempo de incubação (6 horas) que se empregou nos ensaios (Figura 23). As observações experimentais sobre o sistema em estudo permitem que se especule a cerca de algumas possibilidades que expliquem o comportamento observado:

- a) Susceptibilidade inexistente ou desprezível da SCMC adsorvida à ação da celulase.
- b) Susceptibilidade reduzida da SCMC adsorvida, com hidrólise não extensiva da cadeia e adsorção dos segmentos hidrolisados; os fragmentos de hidrólise devem ser nesse caso de tamanho tal a não comprometer significativamente a conformação do polímero.
- c) Adsorção seletiva pela HAP de formas ativas da enzima, deixando disponível em solução um material inativo ou de baixa atividade.
- d) Inativação da enzima pela HAP.

As possibilidades referidas não foram testadas no presente trabalho.

Os resultados experimentais permitem ainda afirmar-se que a redissolução da SCMC adsorvida é um processo praticamente desprezível no tempo de incubação empregado (Figura 22c).

Os estudos cinéticos mostraram um interessante efeito estabilizador de suspensões de HAP por parte da SCMC, em tempos menores que 500 minutos; a partir daí uma rápida e eficiente floculação é observada (Figura 19). Este efeito não é observado na ausência do polieletrólito (Figura 18). Verificou-se ainda um efeito de diminuição de volumes de sedimentação de HAP (Figura 21) e de estabilização de suspensões de HAP em função da concentração de SCMC (Figura 20). Fundamentalmente três tipos de considerações poderiam ser feitas a respeito desse duplo efeito estabilizante/floculante:

- a) Repulsão eletrostática entre trechos de cadeias da SCMC adsorvida que se encontrem voltados para a solução, de modo a impedir a aproximação de partículas de HAP umas das outras, mantendo a dispersão estável.
- b) Neutralização de cargas positivas da HAP (ponto de carga zero = pH 8,5⁽⁹⁾; pH de ensaio = 6,3) pela SCMC negativamente carregada (pK SCMC em diluição infinita⁽⁴⁵⁾ = 5,45) diminuindo a repulsão eletrostática interpartículas e levando à sedimentação dos cristais.
- c) Formação de pontes interpartículas mediadas por SCMC, levando à sedimentação da HAP.

Nenhuma dessas considerações no entanto, se tomada exclusivamente, explica o comportamento observado. A possibilidade b é conflitante com as demais e as exclue, uma vez que supõe uma compensação de cargas. As possibilidades a e c tomadas conjuntamente forneceria uma descrição coerente do quadro não fôsse sua impossibilidade de apresentar uma razão suficiente para que o sistema, uma vez mantido estável por um tempo considerável (~8 horas) flocule tão rápida e eficientemente. Além disso as considerações feitas não acrescentam nenhum esclarecimento quanto ao mecanismo pelo qual se processa o lento aumento na quantidade adsorvida com o tempo após a relativamente intensa adsorção inicial. Com referência ao último caso, poder-se-ia pensar num rearranjo conformacional do polieletrólito adsorvido capaz de liberar novos sítios de adsorção. No entanto, os espectros dos sedimentos obtidos não revelaram mudança conformacional com o tempo.

Nesse ponto julgamos adequada a proposição de um modelo capaz de comportar evidências experimentais descritas neste trabalho. As considerações que se seguem decorrem da tentativa de se esboçar um quadro coerente que descreva o comportamento do sistema SCMC/HAP cujo estudo constituiu o objeto desta pesquisa.

A partir da análise dos resultados do experimento de tempo de equilíbrio para o fenômeno de adsorção (já discutido neste item), admitimos que a adsorção de SCMC em HAP se processe através de interações fortes e específicas num tempo inferior a 15 minutos. O estabelecimento de uma ligação adsorvente-adsorbato induzirá mudanças conformacionais na hidroxilapatita capazes de liberar sítios de adsorção antes inexistentes

na superfície dos cristais. Desse modo, novos equilíbrios virão a ser estabelecidos. Essa extensão na área da HAP é termodinamicamente viável uma vez que conduz a superfície a um valor mais baixo de energia livre interfacial. Os novos sítios liberados são então disputados por moléculas de SCMC livres na solução, aumentando desse modo a quantidade adsorvida e por aquelas já adsorvidas em outras partículas, estabelecendo-se assim pontes poliméricas inter-partículas. É possível perceber-se o caráter exponencial de tal fenômeno em relação ao efeito floculante, uma vez que agregados de tamanhos gradativamente maiores formar-se-ão até o ponto em que a estabilidade garantida pela repulsão eletrostática seja vencida pelo peso dos agregados, tornando a sedimentação inevitável. O volume de empacotamento das partículas de HAP seria, por estas mesmas razões, diminuído.

Uma estimativa da distância entre dois sítios de adsorção ocupados por moléculas de SCMC pode ser feita a partir de dados do parâmetro N (número máximo de sítios de adsorção por grama de HAP). Para $\overline{PM} = 80\ 000$ (SCMC F_{75}) $N = 0,49$ μ mol de polímero/g HAP, a 25°C (Tabela III). Isto corresponde a 1 mol de polímero / $2,02 \times 10^6$ g HAP. Tomando-se a área superficial da HAP ($92,6\ m^2/g$) tem-se 1 mol de polímero / $1,87 \times 10^8\ m^2$ ou 1 molécula de polímero / $3,11 \times 10^2\ nm^2$. Considerando-se uma distância média ponta a ponta para cada unidade repetitiva de $3\ \overset{0}{A}$, teremos para SCMC de $\overline{PM} = 80\ 000$ (grau de polimerização = 410) um comprimento médio da cadeia polimérica de $1230\ \overset{0}{A}$ ou 123 nm. Supondo-se ainda uma largura de cadeia da ordem de $3\ \overset{0}{A}$, temos uma área de $37\ nm^2$ efetivamente ocupada por cada molécula de SCMC F_{75} adsorvida na superfície da HAP, o

que corresponde a 11% da área total disponível por molécula.

O mesmo tipo de consideração pode ser aplicado à SCMC F_4 ($\overline{PM} = 10\ 000$). O valor de N para o sistema SCMC F_4 /HAP a 0°C foi de $4,21\ \mu\text{mol}$ de polímero/g HAP. Assim teremos uma relação de 1 molécula de polímero/ $0,3536 \times 10^2\text{nm}^2$. O comprimento médio da cadeia polimérica de SCMC F_4 (grau de polimerização = 53) será de $159\ \text{\AA}$ ou $16\ \text{nm}$ e a área efetivamente ocupada por cada molécula de SCMC F_4 adsorvida na superfície da HAP será igual a $5\ \text{nm}^2$. Este valor representa 13% da área total disponível por molécula de polímero.

Segundo KRESAK et al.⁽⁴⁷⁾ os íons cálcio encontram-se em planos [100] nos cristais de HAP. De acordo com os autores essa conclusão é consistente com o hábito cristalino do mineral: finas agulhas hexagonais com seu eixo maior paralelo ao eixo cristalográfico c. Desse modo a maior parte da área superficial exposta corresponde a planos [100]. Os íons cálcio estão dispostos em colunas separadas por uma distância correspondente ao parâmetro a da cela unitária ($9,432\ \text{\AA}$). A distância interatômica em cada coluna é de $3,441\ \text{\AA}$.

Assim, com as informações estruturais referidas e as estimativas de área disponível por molécula feitas a partir do parâmetro N, é possível esboçar-se um esquema da disposição do polímero sobre a HAP (Figura 24) que corresponde à situação mais desfavorável sob o ponto de vista estérico, qual seja, aquela em que toda a cadeia do polieletrólito se encontra adsorvida em trens na superfície. Como se vê na Figura 24a, a área ocupada por uma molécula de SCMC F_{75} corresponde em média a um quadrado de 51 linhas por 19 colunas de íons cálcio. Para a SCMC F_4 a área ocupada é menor (17 linhas por 6 colunas). KRESAK obte

FIGURA 24 - Esquema da disposição das moléculas de SCMC adsorvidas na superfície de HAP.

a) SCMC F_{75}

b) SCMC F_4

ve os seguintes resultados para adsorção de aminoácidos em HAP: ácido aspártico - ligação a cada 2 íons cálcio, em todas as colunas; ácido glutâmico - ligação a cada 4 íons cálcio, em todas as colunas; ácido amino adípico - ligação a cada 4 íons cálcio, coluna sim coluna não. Esses valores são consideravelmente menores que aqueles obtidos em nossas determinações para as espécies poliméricas. Embora este comportamento já devesse ser uma expectativa decorrente da diferença de pesos e tamanhos moleculares é importante notar que os valores de fração de massa adsorvida por íon cálcio são significativamente maiores para as espécies poliméricas (de cerca de 1,5 a 6,0 vezes) quando comparados com resultados obtidos para aminoácidos contendo de 4 a 7 átomos de carbono na cadeia. Isto nos leva a admitir que a molécula de SCMC deva possuir suficiente flexibilidade para a formação de alças que justifiquem essa discrepância nos valores da quantidade adsorvida.

Apesar da quantidade adsorvida ser maior do que o que se esperaria por extrapolação da dados de adsorção de material monomérico, ainda assim o grau de cobertura é baixo para as duas amostras de SCMC (F_{75} e F_4). O espaço disponível para as macromoléculas adsorvidas, mesmo para a situação estérica mais desfavorável que é mostrada na Figura 24, é suficiente para permitir uma acomodação das mesmas em situação geométrica que não implique em interações laterais significantes ou mesmo restritivas. Por outro lado, esse baixo grau de recobrimento é compatível com um modelo para a distribuição do polímero adsorvido baseado no modelo de KRESAK para a adsorção em HAP. Admitindo que cada carboxila na SCMC esteja ligada a um íon de cálcio da superfície, que cada carboxila ligada bloqueie esterica

mente os sete íons de cálcio na vizinhança imediata do sítio de ligação e dado o grau de substituição da SCMC, resulta que cada molécula de SCMC F_4 deve recobrir uma área correspondendo a 128 íons de cálcio superficiais. O resultado experimental corresponde a 102 íons. Isto confirma o modelo acima proposto, mostrando que:

- a) o número de carboxilas em alças é pequeno
- b) as alças são de dimensões relativamente pequenas (em média, contem 2 unidades repetitivas)

Em decorrência, repulsões eletrostáticas ou interações estéricas ao nível do polímero adsorvido devem ser muito pequenas, de acordo com outros fatos experimentais:

- a) adequação da isoterma ao tratamento de LANGMUIR,
- b) independência da conformação do polímero adsorvido quanto ao grau de cobertura do substrato, indicada pelos espectros de sedimentos.

5 - RESUMO

Este trabalho relata estudos sobre adsorção de carboximetilcelulose (SCMC) marcada com nitróxido (marcador de spin) em hidroxilapatita (HAP), em meio aquoso.

São apresentadas isotermas de adsorção, obtidas em tampão acetato, cujo comportamento é descrito pelo formalismo da teoria de LANGMUIR. A quantidade adsorvida é dependente do peso molecular do polímero, sendo observado um incremento de cerca de 20% na adsorbância para um aumento de oito vezes no peso molecular médio. A afinidade independe da temperatura ou peso molecular. O número de sítios por unidade de massa de adsorvente não varia com a temperatura mas diminui com o aumento do tamanho da cadeia polimérica, o que é interpretado como uma consequência da maior restrição estérica oferecida pela molécula de maior peso molecular à aproximação de outras moléculas à superfície.

O fenômeno de adsorção estudado tem uma etapa inicial rápida e depois dos primeiros 15 minutos a quantidade adsorvida aumenta muito pouco. Dessorção não é detectável quando o sedimento de carboximetilcelulose/hidroxilapatita é deixado em contacto com o tampão durante 6 horas.

A adsorção de SCMC modifica algumas características de HAP dispersa em tampão acetato, diminuindo seu volume de sedimentação a 20% do valor em ausência de SCMC, estabilizando-a em tempos curtos (cerca de 8 horas) e floculando-a efetivamente em tempos maiores de contacto.

A SCMC adsorvida não é atacada de maneira detectável por celulase, ao contrário de SCMC em solução.

Espectros de ressonância paramagnética de elétron de sedimentos de SCMC/HAP não dependem, quanto à forma, da quantidade de polímero adsorvida, de onde se conclui que a conformação do polímero adsorvido independe do grau de cobertura da superfície.

É proposto um modelo para a adsorção de SCMC que é compatível com as observações deste trabalho e com um modelo existente para a adsorção de ácidos carboxílicos não poliméricos em HAP.

ABSTRACT

This is a study on the adsorption of spin-labelled carboxymethyl-cellulose (SCMC) on hydroxylapatite (HAP), in aqueous media.

Adsorption isotherms obtained in acetate buffer are presented and their behaviour is formally described by LANGMUIR theory. The amount adsorbed is dependent on the polymer molecular weight, with an increment of about 20% in the adsorbance for an eightfold increase in the average molecular weight. The affinity is independent of temperature or molecular weight. The number of sites per adsorbent unit mass does not change with temperature but diminishes with the increase of the polymeric chain size, what is interpreted as a result of the larger steric restriction offered by the molecule having the higher molecular weight to the approach of other molecules to the surface.

The adsorption phenomena studied have a fast initial step and after the first 15 minutes the amount adsorbed increases too slowly. De-sorption is not detectable when the sediment SCMC/HAP is left in contact with the buffer for 6 hours.

The adsorption of SCMC alters some characteristics of HAP dispersed in acetate buffer, diminishing its sedimentation volume to 20% of its value in the absence of polymer. The colloidal stability of HAP is increased if measured in short times after exposure to SCMC but turbidity measurements in times longer than 8 hours show that the polymer flocculates HAP effectively.

The adsorbed SCMC is not attacked in a detectable way by cellulase, although dissolved SCMC is a substrate for this enzyme.

The shape of the electron paramagnetic resonance spectra of the SCMC/HAP sediments does not depend on the amount of adsorbed polymer. From these observations we conclude that the conformation of the adsorbed polymer is not affected by the degree of coverage of the surface.

We propose a model to the adsorption of SCMC on HAP, which fits the experiments described in this work and is consistent with an existing model for the adsorption of non-polymeric carboxylic acids on HAP.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ADAM, N.K. - The Physics and Chemistry of Surfaces. 3a. ed. New York, Ed. Dover Publications Inc., 1968.
- 2 - ADAMSON, A.W. - Physical Chemistry of Surfaces. 3a. ed. New York, Wiley-Interscience Publication, 1976.
- 3 - AHMED, A. - J. Pathol., 117:247-51, 1975.
- 4 - AIMOTO, K.; OHTA, M. & HASHIMOTO, S. - Japan 74 35411 (Cl. A 61 j k) 21 Sept. 1974, Appl. 70 128012, 28 Dec, 5 pp, 1970. Apud Chemical Abstracts, 83:84852 d.
- 5 - ALLEN, T.C. & CUCULO, J.A. - J.Polymer Sci. - Macromolecular Reviews, 7:189-262, 1973.
- 6 - AVEYARD, R. & HAYDON, D.A. - An introduction to the principles of surface chemistry. Cambridge, University Press, 1973. p.19-28.
- 7 - AVEYARD, R. & HAYDON, D.A. - An introduction to the principles of surface chemistry. Cambridge, University Press, 1973. p.21, p.155.
- 8 - BEINERT, H. & PALMER, G. - Adv.Enzymol., 27:105-198, 1965.
- 9 - BELL, L.C.; POSNER, A.M. & QUIRK, J.P. - J.Colloid Interface Sci., 42:250-261, 1973.

- 10 - BERNARDI, G. - Proced.Nucleic Acid Res. New York, Cantoni, G.L., ed., 2, 455-499, 1971. Apud Chemical Abstracts, 77:85126 h.
- 11 - BERNARDI, G. - Methods in Enzymology, 22: 325-339, 1971.
- 12 - BERNARDI, G.; GIRO, M. G. & GAILLARD, C. - Biochem.Biophys. Acta, 278:409-420, 1972.
- 13 - BEZRUK, V.I.; KOVYLOV, A.E.; KOLYKOV, G.A.; LAVROV, I.S. & LAZAREV, A.N. - J.Appl.Chem. of USSR, 47:974-976, 1974.
- 14 - BOOMGAARD, Th. van den; KING, T.A.; TADROS, Th.F.; TANG, H. & VINCENT, B. - J. Colloid Interface Sci., 66:68-76, 1978.
- 15 - BOYER, R.F. & STREETER, D.J. - J.Polymer Sci., 17:154-156, 1955.
- 16 - BRUNAUER, S.; EMMETT, P.H. & TELLER, E. - J.Amer.Chem.Soc., 60:309-319, 1938.
- 17 - a) CAFE, M.; PRYCE, N.G. & ROBB, I.D. - Polymer, 17:91-92, 1976.
- b) CAFE, M. - Comunicação pessoal a GALEMBECK, F., 1976.
- 18 - CUTLER, M. & KIMBALL, G.E. - J.Polymer Sci., 7:445-447 , 1951.
- 19 - DANA, E.S. - Textbook of Mineralogy. 4a.ed. New York, John Wiley & Sons, Inc., 1932, p. 703-706.

- 20 - DANIELS, F.; MATHEWS, J.H.; WILLIAMS, J.W.; BENDER, P. & ALBERTY, R.A. - Experimental Physical Chemistry. 6a.ed., New York, Book Company, Inc., 1962, p. 158.
- 21 - EIRICH, F.R. - J.Colloid Interface Sci., 58:423-436, 1977.
- 22 - ELLIOTT, J.C.; MACKIE, P.E. & YOUNG, R.A. - Science, 180: 1055-1057, 1973.
- 23 - FLEER, G.J. - Polymer Adsorption and Its Effect on Colloidal Stability. Wageningen, The Netherlands, H. Veenman & Zonen N.V., 1971. p.27 (Tese, Mededelingen Landbouwhogeschool).
- 24 - FLORES, J.J. & LECKIE, J.O. - Nature, 224, 435-436, 1973.
- 25 - FONTANA, B.J. In HAIR, M.I.,ed. - The Chemistry of Biosurfaces. New York, Dekker, 1971, capítulo 3.
- 26 - FORSMAN, W.C. & HUGHES, R.E. - J.Chem.Phys., 38:2130-2135, 1963.
- 27 - FOX, K.K.; ROBB, I.D. & SMITH, R. - J.C.S. Faraday I. 70: 1186-1190, 1974.
- 28 - FRISCH, H.L. - J.Phys.Chem., 59:633-636, 1955.
- 29 - FRISCH, H.L. & SIMHA, R. - J.Phys.Chem., 58:507-512, 1954.
- 30 - FRISCH, H.L. & SIMHA, R. - J.Chem.Phys., 27:702-706, 1957.

- 31 - FRISCH, H.L.; SIMHA, R. & EIRICH, F.R. - J.Chem.Phys., 21:
365-366, 1953.
- 32 - GANZ, A.J. - Cereal Sci.Today, 18(12):398-403 e 415-416 ,
1973. Apud Chemical Abstracts, 84:178277 t.
- 33 - GILLILAND, E.R. & GUTOFF - J.Phys.Chem., 64:407-410, 1960.
- 34 - GLUECKAUF, E. & PATTERSON, L. - Biochem.Biophys.Acta, 351:
57-76, 1974.
- 35 - GRADUASHVILI, V.M. - Kolloid Zh., 35(5):963-966, 1973 .
Apud Chemical Abstracts, 80:84014 v.
- 36 - HALLIWELL, G. -Cellulose. In: BERGMEYER, H.U., ed. - Me-
thods of Enzymatic Analysis. New York, Academic Press,
1974. p. 1132-1142.
- 37 - HESSELINK, F. Th. - J.Phys.Chem., 73:3488-3490, 1969.
- 38 - HESSELINK, F. Th. - J.Phys.Chem., 75:65-71, 1971.
- 39 - HESSELINK, F. Th. - Electroan.Chem.Interfacial Electrochem.
37:317-325, 1972.
- 40 - HESSELINK, F. Th. - J.Colloid Interface Sci., 50:606-608,
1975.
- 41 - HESSELINK, F. Th. - VRIJ, A. & OVERBEEK, J. Th. G. - J.
Phys.Chem., 75, 2094-2103, 1971.

- 42 - HIGUCHI, W.I. - J.Phys.Chem., 65:487-491, 1961.
- 43 - HOEVE, C.A.J.; Di MARZIO, E.A. & PEYSER, P. - J.Chem. Phys., 42:2558-2563, 1965.
- 44 - JENCKEL, E. & RUMBACH, B. - Z.Elektrochem., 55:612-618 , 1951. Apud referência 78.
- 45 - KASHKINA, N.A.; PORMALE, M. & ADAMONE, D. - Khim.Drev., 2: 79-83, 1977. Apud Chemical Abstracts, 87:7713 q.
- 46 - KIMURA, Y. - Japan Kokai 75. 82137 (C1C09J, C04B), 03 Jul. 1975, Appl. 73 130529, 2 pp., 19 Nov 1973. Apud Chemical Abstracts, 83:194721 t.
- 47 - KRESAK, M.; MORENO, E.C.; ZAHRADNIK, R.T. & HAY, D.I. - J. Colloid Interface Sci., 59:283-292, 1977.
- 48 - KRUGLITSKII, N.N.; NASTAS, V.A.; PARKHOMENKO, V.V. & KUDRA, L.A. - Ukr.Khim.Zh., 41(6):624-629, 1975. Apud Chemical Abstracts, 83:103815 m.
- 49 - LEHNINGER, A.L. - Biochemistry. 2a. ed. New York, Worth Publishers Inc., 1975. p. 1031-1056.
- 50 - LEINZ, V. & SOUZA CAMPOS, J.E. de - Guia para determinação de minerais. 4a. ed., São Paulo, Companhia Editora Nacional e Editora da USP, 1968. p.70-71.
- 51 - LEMP, M.A. & HOLLY, F.J. - Ann.Ophthalmol., 4(1):15-20 , 1972. Apud Chemical Abstracts, 76:90019 j.

- 52 - LEPRI, L.; DESIDERI, P.G. & LEPORI, M. - J. Chromatogr. ,
123:175-184, 1976.
- 53 - LEVIN, O - Methods in Enzymology, 5:27-32, 1962.
- 54 - MAKELA, K.J. & MALKONEN, P.J. - Finn. 53396 (C1.A24D1/06)
31 Jan. 1978, Appl. 75/3, 449, 10 pp., 08 Dec 1975. Apud
Chemical Abstracts, 88:186328 h.
- 55 - MARTINSON, H.G. - Biochemistry, 12:139-145, 1973.
- 56 - MARTINSON, H.G. - Biochemistry, 12:2737-2746, 1973.
- 57 - MOAN, M. & WOLFF, C. - Europ. Polymer J., 9:1085-1093, 1973.
- 58 - MUSASHI, H.; MARUI, H. - Japan Kokai 75 57984 (C1.B01DJ,
B29B, C02C), 20 May 1975, Appl. 73 108229, 3 pp., 25
Sept 1973. Apud Chemical Abstracts, 84:169267 m.
- 59 - NARKAR, A.K. & NARKAR, R.K. - Text Dyer Printer, 9(1):41-
-44, 1975. Apud Chemical Abstracts, 84:32394 g.
- 60 - NEUMAN, W.F. & NEUMAN, M.W. - The Chemical Dynamics of Bone
Mineral. Univ. Chicago Press, 1958. Apud SIMKISS, K.
- Bone and Biomineralization. London, Edward Arnold ,
ed., 1975, p. 13-18.
- 61 - NORDE, W. - Proteins at interfaces. Wageningen, The Nether
lands, H. Veenman & Zonen, N.V., 1976. p. 1-2. (Tese ,
Mededelingen Landbouwhogeschool).

- 62 - NORDE, W. - Proteins at interfaces. Wageningen, The Netherlands, H. Veenman & Zonen, N.V., 1976, p. 41 (Tese Mededelingen Landbouwhogeschool).
- 63 - ÖHRN, O.E. - J. Polymer Sci., 19:199-200, 1956.
- 64 - OPARIN, A.I. - Proc. 5th. Internat. Congr. Biochem., (Moscow). New York, The MacMillan Company, 3:69-85, 1963.
- 65 - PATAT, F.; KILLMANN, E. & SCHLIEBENER, C. - Adsorption of macromolecules from solution. In: BEVILACQUA, E.M., ed. - Rubber Chemistry and Technology, Lancaster, American Chemical Society, 1966. V. 39:p.36-87.
- 66 - PRYCE, N.G. - Research Report. Unilever Research, Port Sunlight Laboratory, 1974.
- 67 - ROBB, I.D. & SMITH, R. - Europ. Polymer J., 10:1005-1010, 1974.
- 68 - ROE, R.-J. - J.Chem.Phys., 43:1591-1598, 1965.
- 69 - RØLLA, G. - Archs.Oral Biol., 16:527-533, 1971.
- 70 - SAKAI CHEMICAL INDUSTRY Co. Ltd. - Fr. Demande 2 200 020 (Cl.A 61 k) 19 Apr. 1974, Japan. Appl. 72 95562, 13 pp., 14 Sept. 1972. Apud Chemical Abstracts 83:84851 c.
- 71 - SCHREIER-MUCCILLO, S. & SMITH, I.C.P. - Spin Labels as Probes of the Organization of Biological and Model Membranes. Ottawa, National Research Council Canada, 1973.

- 72 - SILBERBERG, A. - J.Phys.Chem., 66:1872-1883, 1962.
- 73 - SILBERBERG, A. - J.Phys.Chem., 66:1884-1907, 1962.
- 74 - SIMHA, R.; FRISCH, H.L. & EIRICH, F.R. - J.Phys.Chem. ,
57:584-589, 1953.
- 75 - SMITH, A.N.; POSNER, A.M. & QUIRK, J.P. - J.Colloid Inter-
face Sci., 62:475-494, 1977.
- 76 - STONE, T.J.; BUCKMAN, T.; NORDIO, P.L. & McCONNELL, H.M.-
Proc.Nat.Acad.Sci., U.S.A., 54:1010-1017, 1965.
- 77 - STREETER, D.J. & BOYER, R.J. - J.Polymer Sci., 14:5-14, 1954.
- 78 - STROMBERG, R.R. - Adsorption of Polymers. In: PATRICK, R.
L., ed. - Treatise on Adhesion and Adhesives. Dekker ,
1967. Vol. 1(Theory): p.69-118.
- 79 - SUNDARAM, P.V. - Biochem.Biophys.Res.Comm., 61:667-672,
1974.
- 80 - SUZUKI, M. - Cryobiology, 10(5):435-439, 1973.
- 81 - UMSTÄTTER, H. - Makromol.Chem., 12:94-99, 1954. Apud refe-
rência 78.
- 82 - VINCENT, B. - Adv. Colloid Interface Sci., 4:193-277, 1974.
- 83 - WEAST, R.C., ed. - Handbook of Chemistry and Physics. 55th
ed., Ohio, CRC Press, 1974.

- 84 - YANOVSKAYA, A.P.; ALEKSANDROVICH, K.M.; AKULICH, N.A. &
IVANOVA, N.S. - Kolloidn. Zh., 39(5):1012-1016, 1977 .
Apud Chemical Abstracts, 88:75986 b.
- 85 - YORESEF, R.T.; EL NAKKEB, M.A. & SALAMA, S. - Pharm.Ind.,
35(3):154-156, 1973. Apud Chemical Abstracts, 79:45758a.
- 86 - ZACHARIAS, M.A. - Comunicação pessoal, 1977.