



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E**  
**ENGENHARIA DOS MATERIAIS**

**PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE DERIVADOS DE QUITOSANA ASSOCIADA**  
**AO FÁRMACO CEFTAZIDIMA**

**Leudimar Aires Pereira**

**Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho**

**Prof. Dr. Anderson Nogueira Mendes**

**Teresina - Piauí**

**2018**

**LEUDIMAR AIRES PEREIRA**

**PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE DERIVADOS DE QUITOSANA ASSOCIADA  
AO FÁRMACO CEFTAZIDIMA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da Universidade Federal do Piauí – UFPI, como requisito complementar à obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia dos Materiais.

**ORIENTADOR: Prof. Drº. Edson Cavalcanti da Silva Filho**

**CO-ORIENTADOR: Prof. Drº. Anderson Nogueira Mendes**

**Teresina-Piauí**

**2018**

**PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE DERIVADOS DE QUITOSANA ASSOCIADA  
AO FÁRMACO CEFTAZIDIMA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências dos Materiais da Universidade Federal do Piauí – UFPI, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia dos Materiais.

---

**Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho**

Universidade Federal do Piauí (UFPI)

Orientador

---

**Prof. Dr. Anderson Nogueira Mendes**

Universidade Federal do Piauí (UFPI)

Coorientador

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Josy Antevéli Osajima Furtini**

Universidade Federal do Piauí (UFPI)

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Regiane Araújo Soares**

Universidade Federal do Piauí (UFPI - Floriano)

Teresina-PI

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco

P436p      Pereira, Leudimar Aires  
                Propriedades biológicas de derivados de quitosana  
                associada ao fármaco ceftazidima / Leudimar Aires Pereira. –  
                2018.  
                131 f.

                Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia dos  
                Materiais) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2018.  
                “Orientador: Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho”.  
                “Coorientador: Prof. Dr. Anderson Nogueira Mendes”.

                1. Ciência dos Materiais. 2. Biocompatibilidade.  
                3. Hemólise. 4. Quitosana Modificada. I. Título.

CDD 620.112



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DOS MATERIAIS

**ATA DE DEFESA DA 86ª DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Aos trinta e um dias do mês de julho do ano de dois mil e dezoito, às 14:00 horas, reuniu-se a Banca Examinadora de Defesa da Dissertação de Mestrado composta pelos professores doutores: Edson Cavalcanti da Silva Filho – Universidade Federal do Piauí, Presidente; Anderson Nogueira Mendes – Universidade Federal do Piauí, Coorientador; Josy Antevelli Osajima Furtini – Universidade Federal do Piauí, Examinadora Interna; Maria Regiane Araújo Soares – Universidade Federal do Piauí/Florianópolis, Examinadora Externa; perante o qual Leudimar Aires Pereira aluno regularmente matriculado no Curso de Mestrado em Ciência e Engenharia dos Materiais da Universidade Federal do Piauí, defendeu em sessão pública, para obtenção do título de Mestre(a) em Ciência e Engenharia dos Materiais, sua dissertação intitulada “PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE DERIVADOS DE QUITOSANA ASSOCIADA AO FÁRMACO CEFTAZIDIMA”. A defesa da referida dissertação ocorreu, das 14:00 horas às 15:10, tendo o mestrando sido submetido à sabatina, dispondo cada membro da banca do tempo determinado para tal. Finalmente, a Banca reuniu-se em separado e concluiu por considerar o mestrando aprovado (aprovado/reprovado) por unanimidade.

Eu, Edson Cavalcanti da Silva Filho, que presidi a Banca de Defesa da Dissertação, assino a presente Ata, juntamente com os demais membros e dou fé. Em Teresina, 31 de julho de 2018.

Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho - UFPI  
(Orientador - Presidente)

Prof. Dr. Anderson Nogueira Mendes - UFPI  
(Coorientador)

Profa. Dra. Josy Antevelli Osajima Furtini - UFPI  
(Examinadora Interna)

Profa. Dra. Maria Regiane Araújo Soares - UFPI - Florianópolis  
(Examinadora Externa)

## DEDICATÓRIA

À minha querida família,  
Eva Pereira, Maria Pereira (*in memoriam*), Vicente Pereira, Luiza Aires, Maria Natal Aires,  
Genoveva Aires, Valmira Pereira, Adalberto Júnior, Erick Cartimam e Tody.

## AGRADECIMENTOS

Quero expressar toda a minha gratidão e apreço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram nessa jornada de aperfeiçoamento. Em primeiro lugar, a meu orientador Prof. Dr. **Edson Cavalcanti da Silva Filho**, por toda orientação de mediação ao conhecimento nas horas necessárias. Em segundo lugar ao meu co-orientador Prof. Dr. Anderson Nogueira Mendes, por toda orientação e apoio laboratorial nas análises biológicas.

Gostaria de agradecer também ao Prof. Dr. Francisco de Alcântara Neto, pelo apoio institucional sempre que precisei; à Prof. Dra. Alessandra Braga Ribeiro, pela gentileza de fornecer material para a realização inicial dos experimentos em laboratório; ao Prof. Dr. Paulo Humberto Moreira Nunes, pelo fornecimento de material e orientação durante os experimentos; à Dr<sup>a</sup>. Luizângela da Silva Reis, pela orientação necessária para a realização dos experimentos iniciais em laboratório; à Ms. Solranny Carla Cavalcante Costa e Silva, pelo apoio e fornecimento de material para a continuidade dos experimentos; ao Ms. Elton Marks de Araújo Braz, pelas orientações nas análises de laboratório e entendimentos de alguns resultados de caracterização do material; à Dr<sup>a</sup>. Silvéria Regina de Sousa Lira, pelas orientações na liberação dos animais frente ao comitê de ética; ao Prof. Dr. Hélio de Barros Fernandes pelo apoio institucional e pelas orientações nos experimentos das análises biológicas; ao Dr.<sup>o</sup> Adalberto Fortes Rodrigues Júnior, pela paciência nas orientações para realização dos procedimentos cirúrgicos dos animais; aos biólogos Esp. Jailson de Araújo Santos, à Ms. Janete Martins Sousa e Leane Brunelle dos Santos Alves, pelo apoio extraordinário neste processo de pesquisa e aprendizado.

Agradeço também ao Laboratório (UFPI) Interdisciplinar de Materiais Avançados – LIMAV, Laboratório de Atividade Antileishmania no Núcleo de Pesquisas em Plantas

Medicinais (NPPM) e Laboratório de melhoramento genético da cana-de-açúcar (RIDESA), a minha eterna gratidão pela contribuição para a realização deste trabalho.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
REFERÊNCIAS.....	4
<b>2. CAPÍTULO 1: USO DE QUITOSANA MODIFICADA QUIMICAMENTE APLICADA NA ÁREA BIOMÉDICA EM TRATAMENTO GÁSTRICO: UMA PROSPECÇÃO.....</b>	<b>6</b>
RESUMO .....	10
ABSTRACT .....	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	12
2. METODOLOGIA .....	14
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
4. CONCLUSÃO .....	29
5. REFERÊNCIAS .....	30
<b>3. CAPÍTULO 2: PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE DERIVADOS DE QUITOSANA ASSOCADA AO FÁRMACO CEFTAZIDIMA.....</b>	<b>38</b>
RESUMO .....	40
ABSTRACT .....	41
1. INTRODUÇÃO .....	42
2. PARTE EXPERIMENTAL .....	48
2.1 MATERIAIS.....	48
2.2 PROCESSO DE DESODORIZAÇÃO DA QUITOSANA.....	48
2.3 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA QUITOSANA COM ACETILACETONA E ETILENODIAMINA OU DIETILENOTRIAMINA.....	48

2.4 MÉTODO DE INCORPORAÇÃO DOS MATERIAIS QF, QACF, QACENF E QACDIENF .....	50
2.5 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS .....	50
2.6 ANÁLISE DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS: TESTE DE EMÓLISE, ENSAIO SOBRE <i>ARTEMIA SALINA</i> , ENSAIO ANTIOXIDANTE DPPH E TESTE GASTROPROTETORA.....	52
2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	55
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
3. 1 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS .....	79
4. CONCLUSÃO .....	96
5. REFERÊNCIAS .....	97
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	109
7. PERSPECTIVAS .....	110
8. ANEXO 1. APROVAÇÃO DO PROJETO NO COMITÊ DE ÉTICA.....	111

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

Figura 1. Artigos publicados nos últimos três anos sobre “Chitosan” nas bases de dados <i>Web of Science</i> , <i>Scopus</i> , <i>Scielo</i> (a), no período de 2015 a 2017 e ranking dos países que mais publicam artigos sobre o assunto (b), no período de 1945 a 2017.....	18
Figura 2. Artigos publicações sobre “ <i>modified chitosan</i> ” até o ano de 2017.....	19
Figura 3. Área temática dos artigos publicados nas bases de dados <i>Web of Science</i> (a) e <i>Scopus</i> (b) nos últimos cinco anos, conforma as palavras-chaves.....	21

### CAPÍTULO 2

Figura 1. Estrutura química de ceftazidima.....	44
Figura 2. Esquema da estrutura química da proposta de síntese realizada da quitosana com acetilacetona, etilenodiamina e dietilenotriamina.....	50
Figura 3. Aumento gradual do percentual de nitrogênio conforme incorporação do grupo amina e do fármaco aos derivados.....	58
Figura 4. Ilustração da Difração de Raio X da quitosana pura (Q) (A), Q modificado com acetilacetona (Qac), Qac modificado com etilenodiamina (Qacen) e Qac modificado com dietilenotriamina (Qacdien) (B).....	59
Figura 5. Ilustração comparativa da Difração de Raio X da quitosana pura e derivado Qac.....	60
Figura 6. Ilustração da Difração de Raio X do derivado Qac em comparação a Qacen (A), Qac e Qacdien (B), e Qacen em relação a Qacdien (C).....	61
Figura 7. Difração de Raio X de F (A) Q, QF, QacF, QacenF e QacdienF (A) e	

comparação de deslocamento de pico (B).....	62
Figura 8. Ilustração comparativa entre os derivados Qac e QacF (A) e Qacen e QacenF (B).....	63
Figura 9. Ilustração comparativa de mudança dos picos de DRX de QacF e QacdienF (a, b), Qacdien e QacdienF (b), e gráfico comparativo entre todos os derivados em relação à presença de F que levou a mudança de cristalinidade (d).....	64
Figura 10. Espectro de FTIR da quitosana pura(Q), Qac, Qacen e Qacdien.....	66
Figura 11. Ilustração comparativa do espectro de FTIR da quitosana pura .....	67
Figura 12. Ilustração dos espectros de quitosana associada à acetilacetona na ausência de solvente.....	68
Figura 13. Ilustração comparativa entre os espectros de FTIR dos derivados Qacen (a) e Qacdien (b).....	69
Figura 14. Curvas TG (A) e DTG (B) da quitosana (Q) e derivados Qac, Qacen , Qacdien.....	70
Figura 15. Ilustra as curvas de TG (a) e DTG (b) da quitosana.....	71
Figura 16. Curvas TG e DTG do derivado Qac.....	72
Figura 17. Curvas TG e DTG do derivado Qacen.....	72
Figura 18. Curvas TG e DTG do derivado Qacdien.....	73
Figura 19. Ilustração das curvas de TG (A) e DTG (B) do fármaco ceftazidima (F), QF, QacF, QacenF e QacdienF.....	74
Figura 20. Ilustração do fluxo de calor nas curvas de DSC para Q, Qac, Qacen e Qacdien.....	76
Figura 21. Ilustração do fluxo de calor de Qac.....	77

Figura 22. Ilustração do fluxo de calor de Qacen e Qacdien.....	78
Figura 23. Ilustração dos picos endotérmico e exotérmicos nas curvas de DSC de ceftazidima (F) (A), Q e derivados incorporado a ceftazidima (B).....	79
Figura 24. Porcentagem de hemólise da quitosana diluída em ácido acético 2% (A), DMSO 1% preparado com água destilada (B), DMSO (1%) preparado em solução salina (0,9%) (C) e DMSO (1%) em solução salina isolado (D) nas concentrações de 500, 250 e 125 µg/mL.....	80
Figura 25. Porcentagem de hemólise das amostras F (A), QF (B), Qac (C) e QaceF (D) nas concentrações de 500, 250 e 125 µg/mL.....	82
Figura 26. Porcentagem de hemólise das amostras Qacen, QacenF, Qacdien e QacdienF nas concentrações de 500, 250 e 125 µg/mL.....	83
Figura 27. Porcentagem de morte abaixo de 10% de náuplios ( <i>Artemia salina</i> ) das amostras Q, QF, F, Qac, QacF, Qacen, QacenF, Qacdien e QacdienF em concentração de 1000 ppm (a) e DL50% (b) em mg/mL (1 mg=1000 ppm).....	85
Figura 28. Porcentagem de atividade antioxidante das Q, Qac, Qacen, Qacdien (A), QF, QacF, QacenF, QacdienF (B); e valor de absorbância e AA do ác. ascórbico (C, D) e do fármaco ceftazidima (E, F) nas concentrações: 5000, 2500, 1250, 500, 250 e 125 µg/mL.....	88
Figura 29. Volume da lesão gátrica (A) e atividade gastroprotetora do grupo veículo/controle negativo, Cimetidina/grupo controle positivo, quitosana pura e derivados (B), quitosana e derivados incorporados ao ceftazidima (C), na concentração de 80 mg/mL na cicatrização de ferida de úlcera gátrica induzida por ácido acético (80%).....	92
Figura 30. Fotografias ilustrativas do estômagos (os traços indicam a largura da lesão)	

após sete dias sem tratamento do grupo veículo/controlado negativo (A), com tratamento de administração oral de Cimetidina/grupo controle positivo (B), com tratamento de administração oral (dose diária de 80 mg/kg) de quitosana (C) e derivados Qac (D), Qacen (E), Qacdien (F), quitosana incorporada a ceftazidima (G), derivados incorporados ao ceftazidima QacF (H), QacenF (I), QacdenF (J), na cicatrização de ferida de úlcera gástrica induzida por ácido acético (80%)..... 93

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 1. Palavras-chave usadas na busca de artigos nas bases de dados <i>Web of Science</i> , <i>Scopus</i> , <i>Scielo</i> e patentes depositadas no INPI e EPO para a prospecção tecnológica, no período de 1945 a 2017 .....	14
Tabela 2. Número de artigos encontrados nos bancos de dados <i>Scopus</i> , <i>Web of Science</i> , <i>Scielo</i> e patentes na EPO e INPI até o período de dezembro de 2017.....	16
Tabela 3. Principais compostos químicos usados para modificação da quitosana, conforme artigos publicados na <i>Web of Science</i> , <i>Scopus</i> , <i>Scielo</i> , <i>INPI</i> e <i>EPO</i> até o ano de 2017, com a finalidade de aplicação na área biomédica.....	20
Tabela 4. Resumo das patentes encontradas pela busca “ <i>modified chitosan</i> ” na base de patentes da <i>EPO</i> promissoras para serem aplicadas na área da saúde.....	22
Tabela 5. Alguns artigos analisados sobre quitosana modificada com etilenodiamina, dietilenotriamina e outros compostos químicos promissores em aplicações na área biomédica e farmacêutica.....	25

### CAPÍTULO 2

Tabela 1. Índice de hidrogênio (H) e percentuais de carbono (C), nitrogênio (N) pura (Q), ceftazidima (F), derivado Qac, Qacen, Qacdien e derivados incorporados a F, e as respectivas razões molares carbono/nitrogênio (C/N) experimental e teórico para Q e derivados sem F.....	57
Tabela 2. Valores do índice de cristalinidade ICR (%) das intensidades dos picos de	

DRX referentes às regiões cristalinas (IC) e amorfas (IA) da quitosana e derivados Qac, Qacen e Qacdien, QF, QacF, QacenF e QacdienF.....	65
Tabela 3. Eventos térmicos das amostras de F, QF, QacF, QacenF e QacdienF nas curvas de TG, pico de DTG e fluxo de calor em DSC nas taxas de aquecimento de 30 °C/min.....	75
Tabela 4. Dose letal (DL50%) de náuplios ( <i>Artemia salina</i> ) das amostras Q, QF, F, Qac, QacF, Qacen, QacenF, Qacdien e QacdienF.....	86
<b>Tabela 5.</b> Atividade gastroprotetora após sete dias de tratamentos com quitosana e derivados (dose diária de 80 mg/kg), Cimetidina/grupo controle positivo (100 mg/kg) e grupo veículo sem tratamento (controle negativo), na cicatrização de ferida de úlcera gástrica induzida por ácido acético (80%).....	90



## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AA	- Atividade Antioxidante
AETMAC	- Cloreto 2-[(Acriloiloxi) etil] trimetilamônio
$\beta$ -CD	- $\beta$ -ciclodextrina
CNH	- Análise elementar
C	- Carbono
CN	- Controle negativo
CP	- Controle positivo
CS	- Quitosana
CYS	- L-cisteína
CS/NPs	- Nanopartículas de quitosana
CSK	- Peptídeo CSKSSDYQC
CSO-ss-SA	- Quitosana-glicolípido
Chit	- Quitosana
CS-MNP	- Quitosana modificada com ácido acrílico
DRX	- Difração de raio X
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
DTG	- Análise Térmica Diferencial
DDS	- Drug Delivery System
DL50%	- Dose Letal de 50%
DPPH	- 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DMSO	- Dimetilsulfônico
DMAEMA	- Metacrilato de Dimetilaminoetila
EPO	- European Patent Office
F	- Ceftazidima
FTIR	- Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
GRT's	- Gastrorretensivos
H	- Hidrogênio
HA	- Ácido Hialurônico
INPI	- Instituto Nacional da Propriedade Industrial

IBU/MC/TiO <sub>2</sub>	- Quitosana Modificada Tetra n-Butóxido de Titânio
mg	- Miligrama
MA	- Acrilato de Metilo
N	- Nitrogênio
OMS	- Organização Mundial de Saúde
ppm	- Parte por milhão
pH	- Potencial hidrogeniônico
PVP	- Poli (vinil pirrolidona)
PTX	- Paclitaxel
PLGA	- Poli-ácido L-glutâmico
Q	- Quitosana
QAC	- Quitosana de Amônio quaternário
Qac	- Quitosana modificada com acetilacetona
Qacen	- Quitosana modificada com acetilacetona e etilenodiamina
Qacdien	- Quitosana modificada com acetilacetona e dietilenotriamina
QF	- Quitosana incorporado s ceftazidima
QacF	- Quitosana modificada com acetilacetona incorporado a ceftazidima
QacenF	- Quitosana modificada com acetilacetona e etilenodiamina incorporado a ceftazidima
QacdienF	- Quitosana modificada com acetilacetona e dietilenotriamina incorporada a ceftazidima
RNA	- Ácido ribonucleico
SLF	- Sistema de Liberação de Fármaco
HBS	- Sistemas Hidrodinamicamente Balanceados
TG	- Termogravimetria
TPP	- Tripolifosfato de sódio
TMC	- N-trimetil
UnPSi/NPs-	- Nanoparticulas da quitosana modificação com ácido undecilênico
CSUn	
VCM	- vancomicina

## RESUMO

A quitosana tornou-se promissora como biomaterial. A introdução de grupo amina em sua estrutura por síntese química pode melhorar suas características biológicas. Para o desenvolvimento dessa pesquisa, primeiramente foram investigados trabalhos realizados com grupos amins e outros agentes químicos utilizados em sínteses de novos derivados de quitosana e suas aplicações na área biomédica e farmacêutica em tratamento gástrico, através de um estudo prospectivo. As modificações na estrutura da quitosana foram identificadas nos artigos por diferentes compostos químicos com a finalidade principal de melhorar a permeabilidade e mucoadesão, visando aplicação na área da saúde. Porém, não foi encontrado artigo sobre quitosana modificada com base amina no tratamento gástrico. Assim, a quitosana foi modificada neste trabalho para avaliar algumas propriedades biológicas. A quitosana reagiu com acetilacetona (Qac), em seguida com etilenodiamina (Qacen) ou com dietilenotriamina (Qacdien) e associadas ao fármaco ceftazidima (F). A modificação química foi comprovada pelas caracterizações: Análise Elementar, DRX, FTIR e TG/DTG/DSC. Qacen, Qacdien, QacenF e QacdienF apresentaram aumento nos índices de nitrogênio, diminuição no índice de cristalinidade (7,1%; 4,3%; 7,4% e 7,8%, respectivamente) e melhoria na estabilidade térmica para os derivados sem o fármaco e diminuição nos derivados com o fármaco. A biocompatibilidade dos derivados foram confirmadas pela baixa taxa hemolítica (< 5%) em ensaio *in vitro*, pela não toxicidade no ensaio *in vivo* sobre *Artemia salina* (DL50% > 3000 ppm), pelo índice antioxidante significativo em ensaio *in vitro*. Qacen (55,2%) e Qacdien (68,1%) apresentaram resultados superiores ao da quitosana pura (50,7%) na cicatrização de úlcera gástrica. Os resultados qualificam os derivados de quitosana como promissores biomateriais para aplicação na área da saúde.

**Palavras-chave:** Biocompatibilidade, hemólise, quitosana modificada.

## ABSTRACT

Chitosan is it has become promising as a biomaterial. The introduction of amine groups into their structure by chemical synthesis can improve their biological characteristics. For the development of this research, it was first investigated the work done with amine groups and other chemical agents used in syntheses of new chitosan derivatives and their applications in the biomedical and pharmaceutical area in gastric treatment, through a prospective study. Changes in chitosan structure were identified in the articles by different chemical compounds with the main purpose of improving permeability and mucoadhesion, aiming at health applications. However, no article was found on amine-based modified chitosan in gastric treatment. Thus, chitosan was modified in this work to evaluate some biological properties. Chitosan was reacted with acetylacetone (Qac), then with ethylenediamine (Qacen) or with diethylenetriamine (Qacdien) and associated with the drug ceftazidime (F). The chemical modification was verified through the characterization techniques: Elementary Analysis, XRD, FTIR and TG / DTG / DSC. Qacen, Qacdien, QacenF and QacdienF showed increase in the nitrogen indexes, decrease in crystallinity index (7.1%, 4.3%, 7.4% and 7.8%, respectively) and improvement in thermal stability for the derivatives without the drug and decrease in the derivatives with the drug. The biocompatibility of the derivatives was confirmed by the low hemolytic rate (<5%) in *in vitro* assay, by *in vivo* toxicity test on *Artemia salina* (LD50% > 3000 ppm), by the significant antioxidant index *in vitro* assay. Qacen (55.2%) e Qacdien (68.1%) presented higher results than pure chitosan (50.7%) in the healing of gastric ulcer. The results qualify the chitosan derivatives as promising biomaterials for application in the health area.

Key-words: Biocompatibility, modified chitosan, hemolysis.

## 1. INTRODUÇÃO

A quitosana é um biopolímero, polissacarídeo linear, microcristalino, constituído de unidades de glucosamina e *N*-acetilglucosamina, por meio de ligações  $\beta$ -(1→4), obtido da desacetilação da quitina, o segundo maior recurso natural do mundo, encontrado no exoesqueleto de crustáceos, insetos e fungos. É um promissor biomaterial por apresentar diferentes propriedades biológicas importantes para aplicações na área biomédica e farmacêutica (Garcia-Fuentes, *et al.* 2012; Luo & Wang, 2014; Servat-Medina, *et al.* 2015; Zhu, *et al.* 2017; Husain, *et al.* 2017; Kim, *et al.* 2017; Philibert, Lee & Fabien, 2017).

No processo de obtenção da quitosana, calcula-se o seu grau de desacetilação (GD), o qual indica o número de grupo amina ao longo da cadeia polissacarídica, sendo o mesmo calculado como a proporção de D-glucosamina somado a D-glucosamina e *N*-acetil D-glucosamina (Li, *et al.* 2015; Wu, *et al.* 2017), uma vez que para formar a quitosana precisa conter no mínimo 50% de D-glucosamina (Gonsalves, *et al.* 2011). Contudo, o grau de desacetilação está quimicamente ligados as características do polímero, tais como: grau de solubilidade, flexibilidade, conformação do polímero, viscosidade, teor de cristalinidade, porosidade, resistência à tração e nas propriedades biológicas de biodegradabilidade, biocompatibilidade, mucoadesão, analgésico, potenciador de adsorção, antibacteriana, antifúngica, antiulcerogênica e antioxidante (Croisier & Jérôme, 2013; Elsabee & Abdou, 2013; Philibert, Lee & Fabien, 2017).

Nos últimos anos, as modificações da quitosana vêm recebendo muita atenção em relação à sua potencialidade de aplicação, principalmente visando à área farmacêutica (Shukla, *et al.* 2013; Kim, *et al.* 2017). Esse biopolímero pode ser modificado por modificação física (Giannakas, *et al.* 2016; Kumar, *et al.* 2017), em que ocorre a mistura física de dois ou mais polímeros, visando o desenvolvimento de um novo material com

propriedades físicas distintas e modificações químicas, em que ocorre a modificação nas propriedades físico-químicas da quitosana, tais como o carregamento eletrostático e a permeação de superfícies poliméricas (Philibert, Lee & Fabien, 2017; Kim, *et al.* 2017).

A quitosana possui três grupos funcionais reativos: um grupo amino e dois grupamentos hidroxilas (Kim, *et al.* 2017). Esses grupamentos possibilitam algumas modificações químicas na quitosana, definidas como acetilação, quaternização, N-acetilação, N-alquilação, N-carboxilação, N-sulfonação, nitração, fosforilação, xantação, O-carboximetilação, N-carboxialquilação e carboximetilação (Santos, *et al.* 2003; Garcia *et al.*, 2008; Gonsalves, *et al.* 2011).

Dentre os três grupos reativos da quitosana, o grupo amina primária da quitosana possui maior reatividade em comparação aos grupos hidroxila, podendo também reagir com aldeídos e cetonas para formar iminas (bases de Schiff) ou reagir com anidridos carboxílicos dando origem a amidas (Shukla, *et al.* 2013; Osório, *et al.* 2016).

Por ser um polissacarídeo que apresenta biodegradabilidade, elevada taxa de biocompatibilidade (Patil, *et al.* 2018) e baixa toxicidade, a quitosana se destaca entre os biopolímeros por apresetar atividade de regeneração de tecido animal (Azevedo, *et al.* 2013; Nascimento e Lombello, 2016; Wu, *et al.* 2017, Luna-Hernández, *et al.* 2017), antimicrobianas (Pereira, 2013; Giannakas, *et al.* 2016; Kumar, *et al.* 2017), antioxidantes (Anraku, *et al.* 2011; Ngo, *et al.* 2015), anti-inflamatórias e antiulcerogênica (Servat-Medina, *et al.* 2015), gastroprotetora (Al-Hilal, *et al.* 2013; Volod'ko, *et al.* 2014), transportador de gene (Singh, *et al.* 2015) e excipiente farmacêutico e administração de fármaco em sistemas de liberação controlada (Girones Molera, *et al.* 2012; Gomathysankar, *et al.* 2014).

Diante da potencialidade deste biopolímeros, realizou no primeiro capítulo desse trabalho um estudo prospectivo de alguns artigos e patentes do cenário atual de estudo das propriedades biológicas da quitosana modificada com base amina promissora para aplicação

na área biomédica e farmacêutica como carreador em sistema de liberação de fármaco e proteção gástrica.

O segundo capítulo aborda o desenvolvimento experimental da modificação da quitosana com acetilacetona como base para reações subsequentes com grupos amina e incorporação do fármaco ceftazidima para avaliação de suas propriedades biológicas de citotoxicidade aguda *in vivo* frente a *Artemia salina*, *in vitro* de atividade hemolítica e atividade antioxidante. Aborda também, o resultado da atividade gastroprotetora da quitosana pura em tratamento de úlcera gástrica.

## REFERÊNCIAS

- Anraku, M., Fujii, T., Kondo, Y., Kojima, E., Hata, T., Tabuchi, N., & Maruyama, T. (2011). Antioxidant properties of high molecular weight dietary chitosan in vitro and in vivo. *Carbohydrate polymers*, 83(2), 501-505.
- Azevedo, A. S. D., Sá, M. J. C. D., Fook, M. V. L., Nóbrega Neto, P. I. D., Sousa, O. B. D., & Azevedo, S. S. D. (2013). Hidroxiapatita e quitosana isoladas e associadas à medula óssea no reparo do tecido ósseo em coelhos. Estudo histológico e morfométrico. *Ciência Rural*, 43(7).
- Gonsalves, A. de A., Araújo, C. R. M., Soares, N. A., Goulart, M. O. F., & de Abreu, F. C. (2011). Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. *Quim. Nova*, 34(7), 1215-1223.
- Brito, M. K. M. D., Schellini, S. A., Padovani, C. R., Pellizzon, C. H., & Neto, T. (2009). Inclusões de quitosana no subcutâneo de rato: avaliação clínica, histológica e morfométrica. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 35-40.
- Croisier, F., & Jérôme, C. (2013). Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. Croisier, F., & Jérôme, C. (2013). Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 49(4), 780-792. *European Polymer Journal*, 49(4), 780-792.
- Elsabee, M. Z. & Abdou, E. S. (2013). Chitosan based edible films and coatings: A review. *Materials Science and Engineering: C*, 33(4), 1819-1841.
- Garcia-Fuentes, M., & Alonso, M. J. (2012). Chitosan-based drug nanocarriers: where do we stand? *Journal of Controlled Release*, 161(2), 496-504.



Garcia, R. B., da Silva, D. L. P., Costa, M., Raffin, F. N., & Ruiz, N. M. S. (2008). Avaliação de géis obtidos a partir da acetilação da quitosana em meio heterogêneo. *Quim. Nova*, v. 31, n. 3, p. 486-492.

Girones Molera, J., Alberto Mendez, J., & San Roman, J. (2012). Bioresorbable and Nonresorbable Polymers for Bone Tissue Engineering Jordi Girones. *Current pharmaceutical design*, 18(18), 2536-2557.

Giannakas, A., Vlachas, M., Salmas, C., Leontiou, A., Katapodis, P., Stamatis, H., & Ladavos, A. (2016). Preparation, characterization, mechanical, barrier and antimicrobial properties of chitosan/PVOH/clay nanocomposites. *Carbohydrate polymers*, 140, 408- 415.

Gomathysankar, S., Halim, A. S., & Yaacob, N. S. (2014). Proliferation of keratinocytes induced by adipose-derived stem cells on a chitosan scaffold and its role in wound healing, a review. *Archives of plastic surgery*, 41(5), 452-457.

Husain, S., Al-Samadani, K. H., Najeeb, S., Zafar, M. S., Khurshid, Z., Zohaib, S., & Qasim, S. B. (2017). Chitosan Biomaterials for Current and Potential Dental Applications. *Materials*, 10(6), 602.

Kim, S. E., Kim, H. J., Rhee, J. K., & Park, K. (2017). Versatile Chemical Derivatizations to Design Glycol Chitosan-Based Drug Carriers. *Molecules*, 22(10), 1662.

Kumar, M. R., Muzzarelli, R., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., & Domb, A. J. (2004). Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical reviews*, 104(12), 6017-6084.

Kumar, R., Oves, M., Almeelbi, T., Al-Makishah, N. H., & Barakat, M. A. (2017). Hybrid chitosan/polyaniline-polypyrrole biomaterial for enhanced adsorption and antimicrobial activity. *Journal of colloid and interface science*, v. 490, p. 488-496.

Li, L., Li, J., Si, S., Wang, L., Shi, C., Sun, Y., & Mao, S. (2015). Effect of formulation variables on in vitro release of a water-soluble drug from chitosan–sodium alginate matrix tablets. *Asian journal of pharmaceutical sciences*, v. 10, n. 4, p. 314-321.

Luo, Y., & Wang, Q. (2014). Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. *International journal of biological macromolecules*, 64, 353-367.

Luna-Hernández, E., Cruz-Soto, M. E., Padilla-Vaca, F., Mauricio-Sánchez, R. A., Ramirez-Wong, D., Muñoz, R., & Prokhorov, E. (2017). Combined antibacterial/tissue regeneration response in thermal burns promoted by functional chitosan/silver nanocomposites. *International journal of biological macromolecules*, 105, 1241-1249.

Nascimento, M. H. M. D., & Lombello, C. B. (2016). Hidrogéis a base de ácido hialurônico e quitosana para engenharia de tecido cartilaginoso. *Polímeros Ciência e Tecnologia*, 26(4), 360-370.

Ngo, D. H., Vo, T. S., Ngo, D. N., Kang, K. H., Je, J. Y., Pham, H. N. D., & Kim, S. K. (2015). Biological effects of chitosan and its derivatives. *Food Hydrocolloids*, 51, 200-216.

Osório, L. R., Lima, I. S., Barreto, H. M., Osajima, J. A., & Silva Filho, E. C. (2016). Antibacterial Activity of a Chitosan Derivative Obtained in the Absence of a Solvent. In *Materials Science Forum* (Vol. 869, pp. 869-873). Trans Tech Publications. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.869.869>

Santos, J. E. D., Soares, J. D. P., Dockal, E. R., Filho Campana, S. P., & Cavalheiro, É. T. (2003). Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. *Polímeros: ciência e tecnologia*, 13(4).

Servat-Medina, L., González-Gómez, A., Reyes-Ortega, F., Sousa, I. M. O., Queiroz, N. D. C. A., Zago, P. M. W., & Foglio, M. A. (2015). Chitosan–tripolyphosphate nanoparticles as *Arrabidaea chica* standardized extract carrier: synthesis, characterization, biocompatibility, and antiulcerogenic activity. *International journal of nanomedicine*, *10*, 3897.

Singh, B., Maharjan, S., Choi, Y. J., Akaike, T., & Cho, C. S. (2015). Marine Materials: Gene Delivery. In *Springer Handbook of Marine Biotechnology* (pp. 1217-1227). Springer Berlin Heidelberg.

Shukla, S. K., Mishra, A. K., Arotiba, O. A., & Mamba, B. B. (2013). Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. *International journal of biological macromolecules*, *59*, 46-58.

Philibert, T., Lee, B. H., & Fabien, N. (2017). Current status and new perspectives on chitin and chitosan as functional biopolymers. *Applied biochemistry and biotechnology*, *181*(4), 1314-1337.

Patil, P. B., Parit, S. B., Waifalkar, P. P., Patil, S. P., Dongale, T. D., Sahoo, S. C., & Chougale, A. D. (2018). pH triggered curcumin release and antioxidant activity of curcumin loaded  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> magnetic nanoparticles. *Materials Letters*, *223*, 178-181.

Wu, C., Su, H., Karydis, A., Anderson, K. M., Ghadri, N., Tang, S., & Bumgardner, J. D. (2017). Mechanically stable surface-hydrophobilized chitosan nanofibrous barrier membranes for guided bone regeneration. *Biomedical Materials*, *13*(1), 015004.

**CAPÍTULO 1: USO DE QUITOSANA MODIFICADA QUIMICAMENTE APLICADA  
NA ÁREA BIOMÉDICA EM TRATAMENTO GÁSTRICO: UMA PROSPECÇÃO**

**USO DE QUITOSANA MODIFICADA QUIMICAMENTE APLICADA NA ÁREA  
BIOMÉDICA EM TRATAMENTO GÁSTRICO: UMA PROSPECÇÃO**

*Leudimar Aires Pereira<sup>1</sup>, Anderson Nogueira Mendes<sup>2</sup>, Edson Cavalcanti da Silva Filho<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Programa de pós-graduação em ciência dos materiais, [aireslp@yahoo.com.br](mailto:aireslp@yahoo.com.br);

[edsonfilho@edu.br](mailto:edsonfilho@edu.br)

<sup>2</sup>Departamento de Biofísica e Fisiologia, Universidade Federal do Piauí,

[anderson.mendes@gmail.com](mailto:anderson.mendes@gmail.com)

## RESUMO

Quitosana é biopolímero versátil, que pode ser moldado em formas de filmes, nanopartículas, gel, flocos e pó, o que viabiliza modificação quimicamente em sua estrutura para proporcionar aumento na potencialidade de sua estrutura e melhora em suas características, ampliando assim o seu campo de aplicação. Sendo assim, foi realizado um estudo de prospecção considerando publicações atuais sobre o uso da quitosana modificada com base amina e outros agentes químicos utilizados em sínteses de novos derivados de quitosana e suas aplicações na área biomédica e farmacêutica em tratamento gástrico. Foram investigados artigos e patentes, por meio de uma abordagem quantitativa. Usou-se para o inventário artigos das bases *Web of Science*, *Scopus*, *Scielo* e as bases de dados de patentes Instituto Nacional da Propriedade Industrial-INPI e Banco Europeu de Patentes (*European Patent Office - EPO*), no período de 1945-2017. As modificações na estrutura da quitosana foram realizadas por diferentes compostos químicos principalmente com a finalidade de melhorar sua permeabilidade e mucoadesão, visando à aplicação em carreamento em sistema de liberação controlado e tratamento gástrico. Na *Web of Science*, *Scopus*, *Scielo* e *EPO* o ano com maior número de publicações e depósitos de patentes com “*modified chitosan*” foi 2017 e com “*modified chitosan*” *AND pharmaceutical*, “*modified chitosan*” *AND ethylenediamine* e “*modified chitosan*” *AND diethylenetriamine* foi 2016, com destaque no domínio das publicações para China e Índia. Entretanto, o ano de 2015 foi o que mais recebeu registro de patente do *INPI* de origem brasileira sobre quitosana. Contudo, não foi encontrado artigo relacionado à modificação da quitosana com acetilacetona, em seguida com etilenodiamina ou dietilenotriamina que avaliasse as suas propriedades biológicas para fins de aplicação no tratamento de lesão gástrica.

Palavras-Chave: Quitosana modificada, propriedades biológicas e tratamento gástrico.

## ABSTRACT

Chitosan is a versatile biopolymer, which can be molded into film, nanoparticle, gel, flake and powder forms, which allows chemically modifying its structure to increase the potential of bonds and improve its characteristics, thus expanding its field of application. Therefore, a prospecting study was carried out considering current publications on the use of modified chitosan with amine base and other chemical agents used in syntheses of new chitosan derivatives and their applications in the biomedical and pharmaceutical area in gastric treatment. Articles and patents were investigated through a quantitative approach. *Web of Science*, *Scopus*, *Scielo* and the patent databases of the National Institute of Industrial Property (*INPI*) and the *European Patent Office (EPO)* were used for the inventory in the period 1945-2017. The modifications in chitosan structure were performed by different chemical compounds mainly for the purpose of improving their permeability and mucoadhesion, aiming at the application in a controlled release system and gastric treatment. In the *Web of Science*, *Scopus*, *Scielo* and *EPO* the year with the largest number of publications and patent deposits with "modified chitosan" was 2017 and with "modified chitosan" AND pharmaceutical, "modified chitosan" AND ethylenediamine and "modified chitosan" AND diethylenetriamine was 2016, with emphasis on publications for China and India. However, the year 2015 received the highest *INPI* patent registration of Brazilian origin on chitosan. However, no article was found related to the modification of chitosan with acetylacetone, then with ethylenediamine or diethylenetriamine which evaluated its biological properties for the purpose of applying gastric lesion.

Key-words: Modified chitosan, biological properties and gastric treatment.

## 1. INTRODUÇÃO

A quitosana é um biopolímero classificado como polissacarídeo linear, originado da reação de desacetilação alcalina da quitina, pela substituição em parte dos grupos N-acetil existentes na quitina (Bhavsar, *et al.* 2017). É um polímero natural, de baixa toxicidade, de baixo custo, renovável, biodegradável, formado de ligações  $\beta$ -(1-4)-2-amino-2- desoxi-D-glicopiranosose e  $\beta$ -(1-4)-acetamida-2-desoxi-D-glicopiranosose (Nascimento, *et al.* 2017; Liang, *et al.* 2018).

A modificação química na estrutura de polímero natural proporciona uma melhora em sua estrutura, na sua potencialidade de ligação e em suas características, ampliando o seu campo de aplicação em área como a biomédica e farmacêutica, em específico no uso de formulação farmacêutica com o intuito de melhorar o controle da liberação do fármaco em um local específico no organismo (Ebrahimi Samani, *et al.* 2017).

Os biopolímeros quitina e quitosana são copolímeros formados por monômeros *N*-acetil-*D*-glicosamina e *D*-glicosamina em quantidades diferentes, sendo que *N*-acetil-*D*-glicosamina predominante na formação da quitina, enquanto *D*-glicosamina é encontrado em maior proporção na quitosana (Bessa-Júnior *et al.*, 2013; Samrot, *et al.* 2016; Júnior, *et al.* 2017).

A quantidade de grupos amino ( $\text{NH}_2$ ) formados no processo de desacetilação para formação da quitosana, limita a solubilidade a meio ácido (Mendes *et al.*, 2011; Kamath & Sunil, 2017), em consequência a essa característica, muitos estudos buscaram meios de modificar a sua estrutura química para viabilizar a sua solubilidade em meios mais próximo do alcalinos e ampliar o seu campo de aplicação (Nascimento, *et al.* 2017; Liang, *et al.* 2018), visto que algumas enzimas fisiológicas exigem um ambiente próximo do neutro para exercer sua atividade biológicas (Aljawish, *et al.* 2015; Chen & Zeng, 2017). Entretanto, o



maior número de grupo amina em sua estrutura, deixando-a mais biodegradável, menos cristalina e com maior ação antimicrobiana, tornando-a mais promissora como biomaterial (Hu, *et al.* 2015; Haufe, *et al.* 2017) para aplicação na área da saúde e com maior ação reativa, uma vez que a reação poderá levar menos tempo para ocorrer em regiões amorfas do que em cristalinas.

A viabilidade em modificar a quitosana usando diferentes compostos químicos, propiciou a esse biopolímero grande importância para aplicações na área da saúde, visto que a quitosana pura apresenta biocompatibilidade para biomoléculas (Pereira, *et al.* 2017), porém é essencial investigar as propriedades biológicas de novos derivados para garantir segurança em aplicação *in vivo*.

Os polímeros possuem propriedades biológicas eficientes que viabiliza seu uso como excipiente farmacêutico, podendo garantir controle físico, químico e microbiológico ao medicamento, melhorando a efetividade do princípio ativo do fármaco e diminuindo seus efeitos colaterais (2010; Rohilla, *et al.* 2016; Atabi, *et al.* 2017). Além de possibilitar o controle na liberação do fármaco, entretanto, necessita ser modificado para que haja um maior controle da sua ação na concentração plasmática (Lopes, *et al.* 2005; Pezzini, *et al.* 2007; Noël, *et al.* 2013; Atabi, *et al.* 2017).

Visando o conhecimento sobre as publicações atuais, foi realizado um estudo de prospecção sobre o uso da quitosana modificada com grupo amina e outros agentes químicos utilizados em sínteses de novos derivados de quitosana e suas aplicações na área biomédica e farmacêutica em tratamento gástrico.

## 2. METODOLOGIA

Realizou-se uma pesquisa de base quantitativa para investigar as bases de dados de artigos e patentes, no mês de maio de 2018, sobre publicações vinculadas a estudos da quitosana modificada com grupos amina e outros agentes químicos utilizados em sínteses de novos derivados de quitosana e suas aplicações na área biomédica e farmacêutica em tratamento gástrico. Usou-se para o inventário artigos das bases *Web of Science*, *Scopus*, *Scielo* e as bases de dados de patentes Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (*INPI*) e Banco Europeu de Patentes (*European Patent Office - EPO*). Foram pesquisados artigos publicados no ano de 1945 até o ano de 2017, com análise descritiva dos artigos das últimas palavras-chave do refinamento de busca de acordo com a Tabela 1, sem restrição de ano de publicação.

A realização da pesquisa dos depósitos de patentes no banco de dado do *INPI* foi utilizada por palavras-chave em português.

**Tabela 1.** Palavras-chave usadas na busca de artigos nas bases de dados *Web of Science*, *Scopus*, *Scielo* e patentes depositadas no *INPI* e *EPO* para a prospecção tecnológica, no período de 1945 a 2017.

Palavras-chave
Chitosan
“modified chitosan”
“modified chitosan”AND drug AND delivery
“modified chitosan” AND drug AND release
“modified chitosan” AND pharmaceutical
“modified chitosan” AND ethylenediamine
“modified chitosan” AND diethylenetriamine
“modified chitosan” AND ethylenediamine AND hemolysis
“modified chitosan” AND ethylenediamine AND “ <i>Artemia salina</i> ”

---

“modified chitosan” AND ethylenediamine AND “antioxidant”  
“modified chitosan” AND ethylenediamine AND gastric “treatment”  
“modified chitosan” AND diethylenetriamine AND “hemolysis”  
“modified chitosan” AND diethylenetriamine AND “*Artemia salina*”  
“modified chitosan” AND e diethylenetriamine AND “antioxidant”  
“modified chitosan” AND diethylenetriamine AND gastric “treatment”

---

Fonte. Aatoria própria, 2018.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2 encontram-se os resultados da busca de artigos publicados até o período de dezembro de 2017 nos bancos de dados *Scopus*, *Web of Science*, *Scielo* e patentes na *EPO* e *INPI*.

**Tabela 2.** Número de artigos encontrados nos bancos de dados *Scopus*, *Web of Science*, *Scielo* e patentes na *EPO* e *INPI* até o período de dezembro de 2017.

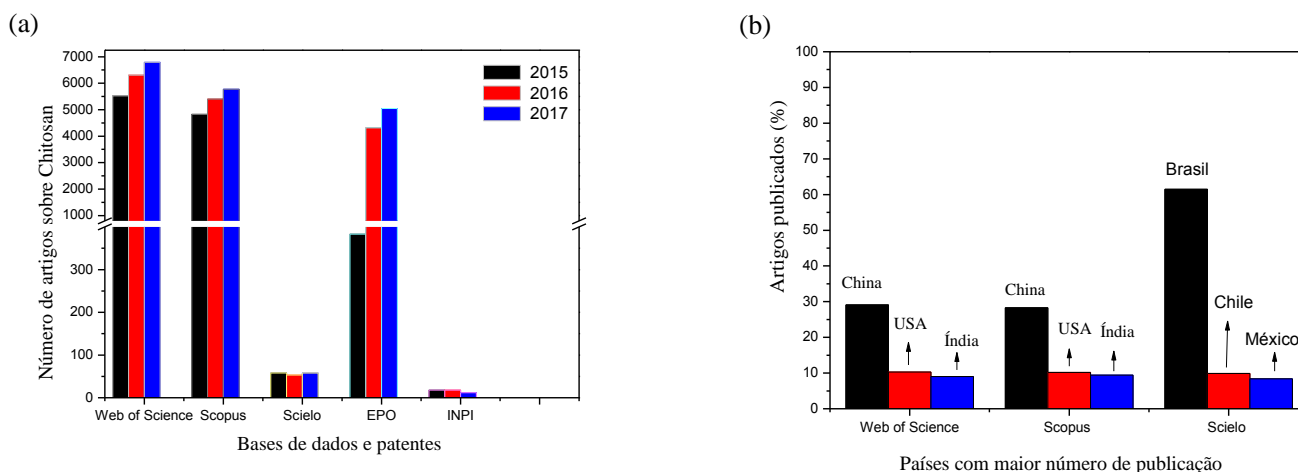
Palavras-chave	Bases de dados				
	<i>Web of Science</i>	<i>Scopus</i>	<i>Scielo</i>	Patentes <i>INPI</i>	Patentes <i>EPO</i>
Chitosan	56.095	54.150	518	217	9.407
“modified chitosan”	1.609	23.190	64	07	2.915
“modified chitosan” AND drug AND delivery	371	11.086	03	0	17
“modified chitosan” AND drug AND release	204	9.162	01	0	17
“modified chitosan” AND pharmaceutical	13	6.735	03	0	15
“modified chitosan” AND ethylenediamine	17	34	02	0	06
“modified chitosan” AND diethylenetriamine	02	05	1	0	02
“modified chitosan” AND ethylenediamine AND “hemolysis”	0	0	0	0	0
“modified chitosan” AND ethylenediamine AND “ <i>Artemia salina</i> ”	0	0	0	0	0
“modified chitosan” AND ethylenediamine AND “antioxidant”	0	0	0	0	0

“modified chitosan” AND ethylenediamine AND gastric “treatment”	0	0	0	0	0
“modified chitosan” AND diethylenetriamine AND “hemolysis”	0	0	0	0	0
“modified chitosan” AND diethylenetriamine AND “ <i>Artemia salina</i> ”	0	0	0	0	0
“modified chitosan” AND e diethylenetriamine AND “antioxidant”	0	0	0	0	0
“modified chitosan” AND diethylenetriamine AND “gastric “treatment”	0	01	0	0	0

Fonte. Autoria própria, 2018.

Conforme a Tabela 2, dos 56.095 artigos publicados na *Web of Science* sobre quitosana, a maioria (6.825; 12,2%) foi publicado no ano de 2017 (Figura 1 a), assim como no *Scopus* (5.837; 10,8%) e no banco de patente *EPO* (5.046; 50,4%). Já no *Scielo* o ano de 2017 e 2015 empatam nos depósitos das patentes (11,0%), bem como no banco de patente do *INPI* (9,7%). Destes artigos, a maioria publicado na *Web of Science* e *Scopus* eram da China e dos Estados Unidos (29,0% e 28,4%; 10,2% e 10,3%, respectivamente), porém no *Scielo* a predominância foi brasileira (62,7%), seguido do Chile (10,0%), Figura 1 (b).

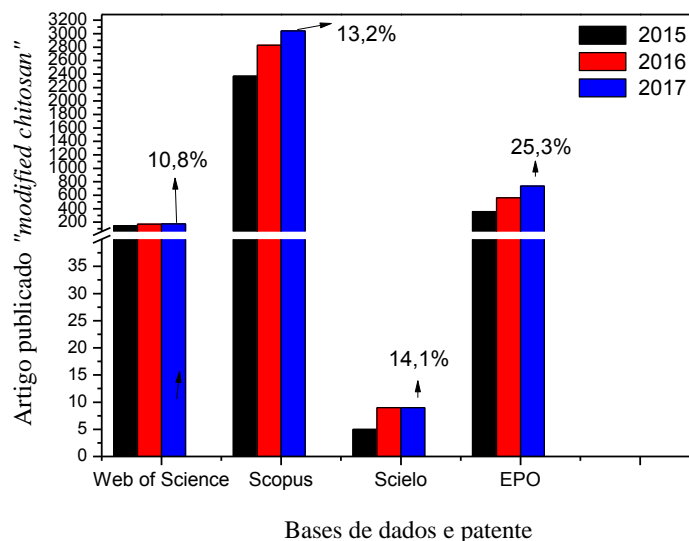
**Figura 1.** Artigos publicados nos últimos três anos sobre “Chitosan” nas bases de dados *Web of Science*, *Scopus*, *Scielo* (a), no período de 2015 a 2017 e ranking dos países que mais publicam artigos sobre o assunto (b), no período de 1945 a 2017.



De acordo com a Figura 1 (a), as bases de dados *Web of Science* e *Scopus* lideram o número de publicações de artigos sobre quitosana, seguido por *EPO* na publicação de patente. A partir de 2015 nestas três bases de dados, o número de artigos publicados aumentou vertiginosamente, assim como o número de depósito de patente na *EPO*. Nestas mesmo período, nestas bases de dados, observa-se que os países que mais publicaram artigos correlacionados ao tema foram China e Brasil.

Na Figura 2 observa-se um aumento quantitativo no número de artigos e patentes de 2015 a 2017 das publicações com a palavra-chave “*modified chitosan*”, com destaque para o ano de 2017. Esse aumento revela que a quitosana modificada se tornou um polímero promissor no mercado tecnológico em consequência às suas propriedades melhoradas conforme a aplicação proposta, e que o aumento no número de publicações mostra a evolução da ciência no uso deste polissacarídeo, sendo um tema atual, e que ainda precisa ser estudado.

**Figura 2.** Artigos publicações sobre “*modified chitosan*” nas bases de dados *Web of Science*, *Scopus*, *Scielo* e base de patente da *EPO*, até o ano de 2017.



Na busca refinada por “*modified chitosan*” a China destaca-se na produção de conhecimento tanto na base de dados *Web of Science* (33,2%) quanto na *Scopus* (33,5%). Este padrão se repete quando os termos “*modified chitosan*” AND drug AND delivery e “*modified chitosan*” AND drug AND release são aplicados na busca, registrando-se 40,1% e 36,2% para *Web of Science* e 28,6% e 27,8% para *Scopus*, respectivamente.

Entretanto, pela busca “*modified chitosan*” AND pharmaceutical, na *Web of Science* a Índia foi quem mais publicou (61,5%), assim como para busca “*modified chitosan*” AND ethylenediamine no *Scopus* empatou com a com a China em (21,4%) artigos publicados, já dos 04 artigos encontrados na busca “*modified chitosan*” AND “diethylenetriamine” no *Scopus* dois eram da Itália, bem como o único artigo publicado sobre quitosana modificada com base amina pela busca refinada “*modified chitosan*” AND diethylenetriamine AND gastric “treatment” no *Scopus* era de origem italiana. Contudo, não foi encontrado artigo sobre quitosana modificada com base amina pela busca “*modified chitosan*” AND gastric “treatment” nas outras bases de dados, assim como não foi encontrado também pela busca das

propriedades biológicas “modified chitosan” AND “hemolysis”; “modified chitosan” AND “*Artemia salina*” e “modified chitosan” AND “antioxidant”.

As modificações na quitosana ocorreram principalmente para melhorar as suas propriedades físicas, químicas e biológicas, com destaque para o uso dos compostos químicos da Tabela 3, possibilitando a quitosana melhoria nas suas propriedades e viabilizando ampliação de sua aplicação na área biomédica e farmacêutica.

**Tabela 3.** Principais compostos químicos usados para modificação da quitosana, conforme artigos publicados na *Web of Science*, *Scopus*, *Scielo*, *INPI* e *EPO* até o ano de 2017, com a finalidade de aplicação na área biomédica.

Reagentes	Aplicação do derivado
3,6- <i>O</i> - <i>N</i> - acetil-etilenodiamina	Antimicrobiano/ Curativos
Resina epoxi/fenol, paraformaldeído, dietilenotriamina e tiourea	
Acrilato de metiladietilenotriamina	
Cloreto 2- [(Acrilóiloxi) etil] trimetilamônio	
Ácido acrílico/etilenodiamina	
Ácido undecilênico/L-Cisteína	Carreador de
Piridinil metilado/L-Cisteína	fármaco e proteção
Etilenodiamina tetra-acético	gástrica
Cloreto de trimesoílo/etilenodiamina	
Ácido glicirretínico/éster metílico/3-O-hemisuccinato de éster metílico/ tripolifosfato	
Ácido 3,3'-ditiodipropiônico	
Anidrido succínico/alginato de sódio	
Ácido glicirretínico	
Ácido láctico/Poli-ácido L-glutâmico/ aldeído	
Succinato de $\alpha$ -tocoferol	Carreador de
Polietilenoglicóis	fármaco

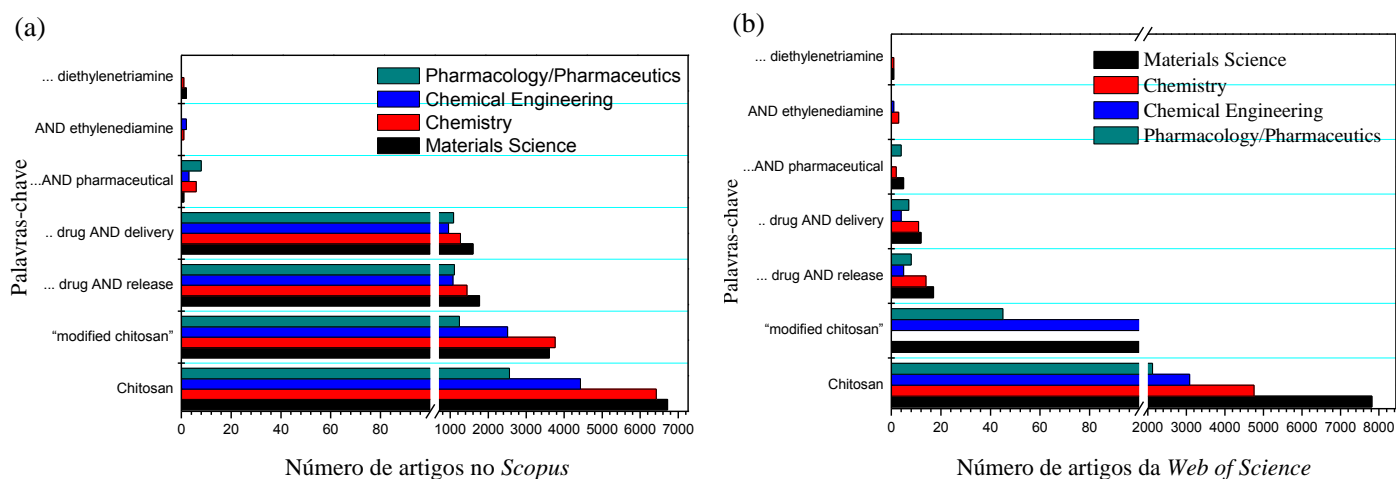


Epoxi cloropropano/dimetilformamida/etilenodiamina/ácido clorídrico	Imobilização enzimática
Imidazólicas/ N-metil-2-pirrolidona, iodeto de metila, hidróxido de sódio e iodeto de sódio	Carreador entrega de DNA plasmídico e siRNA
Éster de N-hidroxissuccinimida hidroxissuccinimida de hemisuccinato de PEG em dimetilformamida ou dimetilsulfóxido/ácido fólico/carbodiimida	Promissor para área da saúde
Ácido fólico	
Polietilenoglicol-hidrofilico/ácido 2,3-dimetil maleico	

Fonte. Autoria própria, 2018.

Os artigos selecionados, pelo refinamento de busca conforme as palavras-chave da Tabela 1, tratavam de vários campos de aplicações dentro da área biomédica e farmacêutica. A Figura 3 revela um crescimento dos estudos com quitosana modificada nessas áreas nos últimos anos.

**Figura 3.** Área temática dos artigos publicados nas bases de dados *Web of Science* (a) e *Scopus* (b) nos últimos cinco anos, conform e palavras-chaves.



Após a exclusão dos artigos e patentes que não tratavam sobre quitosana modificada para aplicação na área da saúde, de acordo com as palavras-chave da Tabela 1, foram analisados 09 artigos e 03 patentes (Tabela 4) sobre “*modified chitosan*” AND *pharmaceutical*, 01 artigo e 01 patentes (Tabela 4) sobre “*modified chitosan*” AND *ethylenediamine*, 01 artigos sobre “*modified chitosan*” AND *diethylenetriamine*, relacionados à aplicações na área biomédica e farmacêutica e 01 artigo sobre quitosana modificada com base amina pela busca “*modified chitosan*” AND *diethylenetriamine* AND “*gastric treatment*” aplicado na área biomédica.

**Tabela 4.** Resumo das patentes encontradas pela busca “*modified chitosan*” na base de patentes da *EPO* promissoras para serem aplicadas na área da saúde.

Referência/Número do Depósito	Resumo
QINGDAO YOUCHENG HIGH-TECH CO LTD (2017) CN107007873	A invenção refere-se á quitosana modificada com 2-bromoetanol, brometo de benzila, ácido monocloroacético, ácido monobromoacético e bicarbonato de sódio (N-alquilada). O derivado apresentou capacidade promissora para uso como curativo hemostático.
CHEN SHIGUO; YAN YAOYAO; LIU BIN (2017) CN106692108	A invenção compreende á quitosana modificada com polietilenoglicol-hidrofílico. O derivado demonstrou potencial excipiente para transporte de fármaco a células tumorais.
YANG DINGJIAN; JIANG YUOXIA (2014) CN104013990 (A)	A invenção trata-se de quitosana modificada com de grupo catecol (pirocatecol). O derivado é um excelente anticoagulante promissor para aplicação na área biomédico.

---

CHUNHUA, X., XIXI, M., LEILEI, P., LI JIANDAN, L., & RUNRUN, Z. (2016) A invenção proporciona obtenção de microesfera magnética de quitosana modificada com N, N-dimetilformamida e etilenodiamina. O derivado apresentou potencial para imobilização enzimática.

CN105524910

---

Fonte. Autoria própria, 2018.

As pesquisas com quitosana modificada vêm sendo realizada para melhorar as suas características, dentre elas as biológicas, assim como descreveram Xu *et al.* (2015) em estudo sobre a aplicação de nanopartículas de quitosana modificada com N-trimetil (TMC) e tripolifosfato de sódio (TPP) para liberação sustentada de vancomicina (VCM) para tratamento de infecções intracelulares.

As pesquisas vêm mostrando que a quitosana é um excelente polímero natural para aplicações na área da saúde, assim como descreveram Ebrahimi Samani *et al.* (2017) em estudos sobre a liberação controlada de um peptídeo de endostatina usando nanopartículas de quitosana. Neste estudo, as nanopartículas de quitosana (CS/Nos) foram aplicadas para a liberação controlada de peptídeo. Esse estudo demonstrou que CS/NPs foi capaz de adsorver em 70% os peptídeos, em um sistema de liberação controlada (49% após 2 h e liberação completa após 80 h). No estudo *in vitro* o composto demonstrou efetividade no combate as células cancerígenas endoteliais, demonstrando assim potencial para o uso terapêutico.

Esses resultados têm sido promissores principalmente por que os derivados de quitosana tem demonstrado biocompatibilidade com organismos vivos, assim como reportaram Ribeiro *et al.* (2015) em estudo sobre a toxicidade da quitosana modificada, carboximetilquitosana, na formação de biofilme por *Candida* sp., o qual descreveu que a carboximetilquitosana não apresentou toxicidade contra *Artemia salina* nas concentrações

menores que 1000 ppm, demonstrando ser um derivado promissor para aplicação na área da saúde.

Entretanto, é fundamental o conhecimento de modulação da quitosana modificada aos compostos ao qual foi incorporada para que seja avaliada a biocompatível com o organismo vivo e seja eficaz na adsorção do fármaco, assim como descreveram Crofton *et al.* (2016) em pesquisa sobre a formulação e caracterização de quitosana esterilizada por plasma para fins de uso como excipiente farmacêutico. Neste trabalho, o floco de quitosana foi micronizado usando moagem crio-esfriada e crio-jato e em seguida esterilizado com plasma de nitrogênio. A moagem jato-crio produziu um tamanho médio de partícula de 16,05  $\mu\text{m}$ , 44% menor do que a moagem crio-esférica. A quitosana criomada demonstrou higroscopicidade aumentada, mas reduziu o peso molecular e o grau de desacetilação (GD). O tratamento com plasma foi utilizado para diminuir a viscosidade do pó da quitosana, deixando-o propício para uso em excipiente farmacêutico, uma vez que o pó e as formas de hidrogel de quitosana foram identificadas como as formas ideais para aplicações farmacêuticas, haja vista que a micronização de materiais é um processo comum indicado na preparação de medicamento.

Algumas pesquisas com quitosana modificada para melhorar a permeabilidade intestinal do fármaco e que possa servir de base para pesquisas futuras em tratamento gástrico também estão sendo realizadas. Shrestha *et al.* (2016) em um estudo sobre administração oral de insulina, o qual testaram a eficiência de nanopartículas da quitosana modificada com ácido undecilênico (UnPSi/NPs-CSUn), em seguida com L-cisteína (CYS-CSUn), para permitir o aumento do efeito mucoadesivo pela formação de ligações dissulfureto entre os grupos tiol imobilizados em cadeias de quitosana modificada com L- cisteína, garantido um aumento no tempo de residência intestinal. Os resultados mostraram uma melhora na permeabilidade intestinal para o fármaco, aumento na mucoadesão e aumento na biocompatibilidade e segurança na administração do fármaco. De maneira similar a pesquisa de Zolfagharnia *et al*

(2017) em síntese de quitosana piridinil metilado (Methylated pyridinyl chitosan), em seguida modificada com L-Cisteína (Cys), demonstraram que a quitosana piridinil metilada tiolada pela formação de ligações amida entre o grupo amina primário de metilado quitosana piridinil e ácido carboxílico de Cys, são promissoras para a administração oral de insulina, por que o derivado apresenta condições próprias no meio gástrico.

Segundo Crofton *et al.* (2016), a quitosana aplicada como excipiente farmacêutico melhora a penetração do fármaco através de tecidos e barreiras epiteliais, mantém o fármaco no órgão de interesse de atuação da droga através da bioadesão existente entre grupos amina catiônicos de quitosana e os tecidos aniônicos, controlando assim a liberação do fármaco por um período maior e mantém o fármaco encapsulado por mais tempo até a degradação física total do mesmo, assim como está descrito na literatura (Tabela 5).

**Tabela 5.** Alguns artigos analisados sobre quitosana modificada com etilenodiamina, dietilenotriamina e outros compostos químicos promissores em aplicações na área biomédica e farmacêutica.

Referência	Resumo
Chen & Zeng (2017)	Sintetizaram o cloreto 2-[(Acriloiloxi) etil] trimetilamônio (AETMAC) com quitosana (Q) para formar quitosana de amônio quaternário (QAC) utilizando persulfato de amônia, para aumentar a solubilidade de Q em solução de pH neutro e alcalino em meio gástrico, ligação dupla do monômero AETMAC foi polimerizada para formar o copolímero enxertado QAC, mostrou-se ser um transportador de fármaco promissor para entrega em um sistema de liberação sustentada.
Anirudhan, Divya, & Nima (2016)	Estudaram nanopartículas de quitosana modificada com ácido acrílico (CS-MNP) e etilenodiamina incorporada a $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) para liberação sustentada e controlada da substância curcumina (CUR), no tratamento anticâncer. Os

---

resultados mostraram que ocorreu maior taxa de liberação do fármaco do estomago em pH 7,4 do que em pH ácido a 1,2 e a incorporação de  $\beta$ -Ciclodextrina na quitosana resultou em maior encapsulação da droga, melhorando a biodisponibilidade e direcionamento específico na mucosa.

---

Hu *et al.* (2015)

Realizaram um estudo sobre o uso de biopolímeros, micelas poliméricas como veículos de fármacos para a liberação direcionada na enfermidade do organismo, o qual verificou a liberação seletiva do fármaco em células tumorais mediadas por nanocarreador semelhante a glicolípídeo à base de quitosana-glicolípídeo (CSO-ss-SA) modificada a partir de ácido 3,3'-ditiodipropiônico, isto é, micelas de quitosana-g-ácido esteárico (CS-SA) atuou como um nanocarreador liberando a droga no tecido lesionado, atuado com efeito de redução das células tumorais. A pesquisa demonstrou que o quitosana-glicolípídeo funcionou como um nanocarreador em sistema redox seletivo (reações de oxirredução), com potencialidade para servir como uma plataforma de alcance de uma toxicidade mínima e facilitar a ocorrência da liberação rápida do fármaco intracelular em células tumorais.

---

Li *et al.* (2015)

Reportaram sobre nanopartículas de quitosana modificada com peptídeo CSKSSDYQC (CSK) para ser usada como carreador de exenatida/byetta (usado no tratamento de diabetes tipo 2) para células caliciformes. Os resultados mostraram que ocorreu aumento da permeação do fármaco através da monocamada de células co-cultivadas Caco-2/HT-29, que simulou o epitélio intestinal. O exenatido administrado foi absorvido, resultando em circulação sistêmica e prolongamento do efeito hipoglicêmico. Estes resultados indicam que o CSK-quitosana atinge eficazmente células caliciformes e é um portador promissor para a entrega oral de exenatido.

---

---

Sadio *et al.* (2014)

Demonstraram em experimentos *in vivo* com camundongos boas propriedades biológicas de quitosana modificada com trimetilquitosana modificada com imidazol incorporada a siRNA direcionado para CDX2 (fator de transcrição da diferenciação intestinal, que está relacionado a manutenção de doenças gastrointestinais, isto é, o gatilho da metaplasia intestinal gástrica, que é uma lesão precursora do câncer gástrico). Os resultados mostraram que trimetilquitosana/siRNA é capaz de diminuir a expressão de CDX2 em linhas celulares gástricas e passar pela mucosa gástrica. Esse estudo mostrou-se promissor para tratamento de lesões gástricas dependentes de CDX2.

---

Fonte. Autoria própria, 2018.

Não foram encontrados estudos com quitosana modificada com grupo amina em estudos de tratamento de lesão gástrica. Porém, na busca “modified chitosan” AND diethylenetriamine AND gastric “treatment” apareceu o estudo de Kamari, & Ghiaci (2016) sobre quitosana modificada com base amina aplicada em carreamento de compostos e avaliação de efeitos colaterais do fármaco no estômago. Nesse estudo a quitosana foi modificada com acrilato de metila seguida com dietilenotriamina, incorporada a ibuprofeno (anti-inflamatório), revestidos com 30-60% de TiO<sub>2</sub>/tetra n-butóxido de titânio (IBU/MC/TiO<sub>2</sub>), como precursor; esse derivado apresentou uma liberação controlada do fármaco por 54 h, enquanto o não revestido foi liberado em 24 h, diminuindo os efeitos colaterais do fármaco por minimizar o contato direto do fármaco com o fluido gástrico.

Os artigos e patentes obtidos sobre modificação da quitosana com diferentes compostos químicos são promissores para serem aplicados na área biomédica e farmacêutica. Contudo, não foi encontrado registro de pesquisa com quitosana modificada com acetilacetona, seguida por etilenodiamina ou dietilenotriamina, que avaliasse as propriedades

biológicas de toxicidade hemolítica, toxicidade sobre *Artemia salina*, atividade antioxidante e atividade no tratamento de lesão gástrica.

Estes resultados, justificam o interesse em se direcionar a aplicação da quitosana modificada com acetilacetona, seguida por etilenodiamina ou dietilenotriamina, na avaliação das propriedades biológicas de toxicidade hemolítica, toxicidade sobre *Artemia salina*, atividade antioxidante e no tratamento de úlcera gástrica.



#### 4. CONCLUSÃO

Na análise dos artigos e patentes foi possível verificar que vários artigos oriundos de vários grupos de pesquisas têm realizado modificações na estrutura da quitosana com diversos compostos químicos, viabilizando um composto final a ser aplicado na área da saúde. Destaca-se as publicações oriundas da China, Estados Unidos e Índia, sobretudo em 2017.

O estudo dos artigos e das patentes permitiu observar que as modificações na estrutura da quitosana ocorreram principalmente para melhorar a permeabilidade e mucoadesão, permitindo aos derivados ser aplicados em diferentes áreas da saúde e farmacêutica.

Não foi encontrado artigo com modificação da quitosana com base amina que avaliasse as suas propriedades biológicas de toxicidade hemolítica, toxicidade sobre organismo vivo, atividade antioxidante para fins de aplicação no tratamento de lesão gástrica. Viabilizando estudo de avaliação do efeito hemolítico, toxicidade sobre *Artemia salina*, atividade antioxidante e ação de cicatrização em tratamento de úlcera gástrica dos derivados com estes grupos aminas.

## 5. REFERÊNCIAS

- Aljawish, A., Chevalot, I., Jasniewski, J., Scher, J., & Muniglia, L. (2015). Enzymatic synthesis of chitosan derivatives and their potential applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 112, 25-39.
- Anirudhan, T. S., Divya, P. L., & Nima, J. (2016). Synthesis and characterization of novel drug delivery system using modified chitosan based hydrogel grafted with cyclodextrin. *Chemical Engineering Journal*, 284, 1259-1269.
- Atabi, F., Gargari, S. L. M., Hashemi, M., & Yaghmaei, P. (2017). Doxorubicin loaded DNA aptamer linked myristilated chitosan nanogel for targeted drug delivery to prostate cancer. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 16(1), 35.
- Bhavsar, C., Momin, M., Gharat, S., & Omri, A. (2017). Functionalized and graft copolymers of chitosan and its pharmaceutical applications. *Expert opinion on drug delivery*, 14(10), 1189-1204.
- Bessa-Junior, A. P., & Gonçalves, A. A. (2013). Análises econômica e produtiva da quitosana extraída do exoesqueleto de camarão. *Acta of Fisheries and Aquatic Resources*, 1(1), 13-28.
- Chen, K. Y., & Zeng, S. Y. (2017). Preparation and Characterization of Quaternized Chitosan Coated Alginate Microspheres for Blue Dextran Delivery. *Polymers*, 9(6), 210.
- Chen, Y., Liu, W., Zeng, G., & Liu, Y. (2017). Microporous PDMAEMA-based stimuli-responsive hydrogel and its application in drug release. *Journal of Applied Polymer Science*, 134(38).

- Chen, W., Yue, L., Jiang, Q., Liu, X., & Xia, W. (2018). Synthesis of varisized chitosan-selenium nanocomposites through heating treatment and evaluation of their antioxidant properties. *International journal of biological macromolecules*, *114*, 751-758.
- Chiva Carvalho, F., Chorilli, M., & Daflon Gremião, M. P. (2014). Plataformas bio (muco) adesivas poliméricas baseadas em nanotecnologia para liberação controlada de fármacos-propriedades, metodologias e aplicações. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, *24*(2).
- Crofton, A. R., Hudson, S. M., Howard, K., Pender, T., Abdelgawad, A., Wolski, D., & Kirsch, W. M. (2016). Formulation and characterization of a plasma sterilized, pharmaceutical grade chitosan powder. *Carbohydrate polymers*, *146*, 420-426.
- Dang, Q., Liu, K., Liu, C., Xu, T., Yan, J., Yan, F., & Cao, Y. (2018). Preparation, characterization, and evaluation of 3, 6-ON-acetylenediamine modified chitosan as potential antimicrobial wound dressing material. *Carbohydrate polymers*, *180*, 1-12.
- Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L., & Chowdhury, P. (2010). Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm*, *67*(3), 217-23.
- Ebrahimi Samani, S., Seraj, Z., Naderimanesh, H., Khajeh, K., Rastaghi, E., Reza, A., ... & Asghari, S. M. (2017). Controlled release of an endostatin peptide using chitosan nanoparticles. *Chemical biology & drug design*, *90*(3), 417-424.
- Elwerfalli, A. M., Al-Kinani, A., Alany, R. G., & ElShaer, A. (2015). Nano-engineering chitosan particles to sustain the release of promethazine from orodispersables. *Carbohydrate polymers*, *131*, 447-461.

Garcia, R. B., Silva, D. L. P., Costa, M., Raffin, F. N., & Ruiz, N. M. S. (2008). Avaliação de géis obtidos a partir da acetilação da quitosana em meio heterogêneo. *Quim. Nova*, 31(3), 486-492.

Haufe, S., Bohrisch, J., Schwarz, D., Bratskaya, S. Y., Steinbach, C., & Schwarz, S. (2017). Flocculation efficiency of reacylated water soluble chitosan versus commercial chitosan. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 532, 222-227.

Hu, Y. W., Du, Y. Z., Liu, N., Liu, X., Meng, T. T., Cheng, B. L., & Hu, F. Q. (2015). Selective redox-responsive drug release in tumor cells mediated by chitosan based glycolipid-like nanocarrier. *Journal of controlled release*, 206, 91-100.

Jing, Z. W., Luo, M., Jia, Y. Y., Li, C., Zhou, S. Y., Mei, Q. B., & Zhang, B. L. (2018). Anti-Helicobacterpylori effectiveness and targeted delivery performance of amoxicillin-UCCs-2/TPP nanoparticles based on ureido-modified chitosan derivative. *International journal of biological macromolecules*, 115, 367-374.

Kamari, Y., & Ghiaci, M. (2016). Preparation and characterization of ibuprofen/modified chitosan/TiO<sub>2</sub> hybrid composite as a controlled drug-delivery system. *Microporous and Mesoporous Materials*, 234, 361-369.

Kean, T., & Thanou, M. (2010). Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced drug delivery reviews*, 62(1), 3-11.

Freitas Mesquita, A. K. de, da Conceição Machado, K., Silva Filho, E. C., & Nunes, L. C. C. (2013). Quitosana na composição de formas mucoadesivas de liberação de fármacos: uma prospecção tecnológica. *Revista GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias*, 3(3), 146-154.

- Mendes, A. A., OLIVEIRA, P. D., CASTRO, H. D., & Giordano, R. (2011). Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. *Química Nova*, 34(5), 831-840.
- Muzzarelli, C., Tosi, G., Francescangeli, O., & Muzzarelli, R. A. (2003). Alkaline chitosan solutions. *Carbohydrate research*, 338(21), 2247-2255.
- Liang, W., Li, M., Zhang, Z., Jiang, Y., Awasthi, M. K., Jiang, S., & Li, R. (2018). Decontamination of Hg (II) from aqueous solution using polyamine-co-thiourea inarched chitosan gel derivatives. *International journal of biological macromolecules*, 113, 106-115.
- Laranjeira, M., & Fávere, V. T. D. (2009). Chitosan: functional byopolymer with biomedical industrial potential. *Química Nova*, 32(3), 672-678.
- Liang, N., Sun, S., Hong, J., Tian, J., Fang, L., & Cui, F. (2016). *In vivo* pharmacokinetics, biodistribution and antitumor effect of paclitaxel-loaded micelles based on  $\alpha$ -tocopherol succinate-modified chitosan. *Drug delivery*, 23(8), 2651-2660.
- Li, X., Wang, C., Liang, R., Sun, F., Shi, Y., Wang, A., & Li, Y. (2015). The glucose-lowering potential of exenatide delivered orally via goblet cell-targeting nanoparticles. *Pharmaceutical research*, 32(3), 1017-1027.
- Li, L., Li, J., Si, S., Wang, L., Shi, C., Sun, Y., & Mao, S. (2015). Effect of formulation variables on in vitro release of a water-soluble drug from chitosan–sodium alginate matrix tablets. *Asian journal of pharmaceutical sciences*, v. 10, n. 4, p. 314-321.
- Mukhopadhyay, P., Maity, S., Chakraborty, S., Rudra, R., Ghodadara, H., Solanki, M., & Kundu, P. P. (2016). Oral delivery of quercetin to diabetic animals using novel pH responsive carboxypropionylated chitosan/alginate microparticles. *RSC Advances*, 6(77), 73210-73221.

Nascimento, E. G. do, de Caland, L. B., de Medeiros, A. S., Fernandes-Pedrosa, M. F., Soares-Sobrinho, J. L., dos Santos, K. S., & da Silva-Júnior, A. A. (2017). Tailoring Drug Release Properties by Gradual Changes in the Particle Engineering of Polysaccharide Chitosan Based Powders. *Polymers*, 9(7), 253.

Noël, F., Neves, C. S. D. M., Gram, K. R., RIVELLI, R. D. F., & Gonçalves, J. C. S. (2013). Estudos de bioequivalência para formas de liberação modificada. *Infarma-Ciências Farmacêuticas*, 16(7/8), 64-66.

Qiu, B., Gong, M., He, Q. T., & Zhou, P. H. (2016). Controlled release of interleukin-1 receptor antagonist from hyaluronic acid-chitosan microspheres attenuates interleukin-1 $\beta$ -induced inflammation and apoptosis in chondrocytes. *BioMed research international*, 2016.

Ribeiro, C. L., Bukzen, A. L., Ribeiro, E. L., Maria do Rosário, R. S., Signini, R., & Naves, P. L. F. (2015). Síntese, Toxicidade e Atividade da Carboximetilquitosana na Formação de Biofilme por *Candida sp.* *Revista Virtual de Química*, 7(6), 2113-2123.

Rohilla, R., Garg, T., Bariwal, J., Goyal, A. K., & Rath, G. (2016). Development, optimization and characterization of glycyrrhetic acid–chitosan nanoparticles of atorvastatin for liver targeting. *Drug delivery*, 23(7), 2290-2297.

R Kamath, P., & Sunil, D. (2017). Nano-chitosan particles in anticancer drug delivery: an up-to-date review. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 17(15), 1457-1487.

Sadio, A., Gustafsson, J. K., Pereira, B., Gomes, C. P., Hansson, G. C., David, L., & Almeida, R. (2014). Modified-chitosan/siRNA nanoparticles downregulate cellular CDX2 expression and cross the gastric mucus barrier. *PloS one*, 9(6), e99449.

- Samrot, A. V., Jahnavi, T., Padmanaban, S., Philip, S. A., Burman, U., & Rabel, A. M. (2016). Chelators influenced synthesis of chitosan–carboxymethyl cellulose microparticles for controlled drug delivery. *Applied Nanoscience*, 6(8), 1219-1231.
- Siepmann, J., & Peppas, N. A. (2001). Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced drug delivery reviews*, 48(2-3), 139-157.
- Silva, H. S. R. C., Dos Santos, K. S. C. R., & Ferreira, E. I. (2006). Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química Nova*, 29(4), 776.
- Storpirtis, S., Marcolongo, R., Gasparotto, F. S., & Vilanova, C. M. (2004). A equivalência farmacêutica no contexto da intercambialidade entre medicamentos genéricos e de referência: bases técnicas e científicas. *Infarma*, 16(9-10), 51-56.
- Swarbrick, J. (2013). *Encyclopedia of pharmaceutical technology*. CRC Press.
- Shao, K., Han, B., Dong, W., Song, F., Liu, W., & Liu, W. (2015). Pharmacokinetics and biodegradation performance of a hydroxypropyl chitosan derivative. *Journal of Ocean University of China*, 14(5), 888-896.
- Shrestha, N., Araújo, F., Shahbazi, M. A., Mäkilä, E., Gomes, M. J., Herranz-Blanco, B., & Hirvonen, J. (2016). Thiolation and Cell-Penetrating Peptide Surface Functionalization of Porous Silicon Nanoparticles for Oral Delivery of Insulin. *Advanced Functional Materials*, 26(20), 3405-3416.
- Pandian, S., Jeevanesan, V., Ponnusamy, C., & Natesan, S. (2016). RES-loaded pegylated CS NPs: for efficient ocular delivery. *IET nanobiotechnology*, 11(1), 32-39.

- Pereira, R. M., Andrade, G. S. S., Castro, H. F. D., & Campos, M. G. N. (2017). Performance of Chitosan/Glycerol Phosphate Hydrogel as a Support for Lipase Immobilization. *Materials Research*, (AHEAD),0-0.
- Pereira, K. A. A., Osório, L. R., Silva, M. P., Sousa, K. S., & Silva Filho, E. C. D. (2014). Chemical modification of chitosan in the absence of solvent for diclofenac sodium removal: pH and kinetics studies. *Materials Research*, *17*, 141-145.
- Peppas, N. A. (2012). An introduction to the most cited papers in the history of Advanced Drug Delivery Reviews (1987–2012).
- Popat, A., Karmakar, S., Jambhrunkar, S., Xu, C., & Yu, C. (2014). Curcumin-cyclodextrin encapsulated chitosan nanoconjugates with enhanced solubility and cell cytotoxicity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *117*, 520-527.
- Taghavi, S., Ramezani, M., Alibolandi, M., Abnous, K., & Taghdisi, S. M. (2017). Chitosan-modified PLGA nanoparticles tagged with 5TR1 aptamer for in vivo tumor-targeted drug delivery. *Cancer letters*, *400*, 1-8.
- Villanova, J. C., Oréfice, R. L., & Cunha, A. S. (2010). Aplicações farmacêuticas de polímeros. *Polímeros: Ciência e tecnologia*, *20*(1).
- Xu, J., Xu, B., Shou, D., Xia, X., & Hu, Y. (2015). Preparation and evaluation of vancomycin-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles. *Polymers*, *7*(9), 1850-1870.
- Xue, W., Chen, Y., Chen, H., & Xia, Y. (2017). Mechanical properties and drug release of microcapsules containing quaternized-chitosan-modified reduced graphene oxide in the capsular wall. *Journal of Applied Polymer Science*, *134*(10).



Xu, W., Xiao, Y., Luo, P., & Fan, L. (2018). Preparation and characterization of C-phycocyanin peptide grafted N-succinyl chitosan by enzyme method. *International journal of biological macromolecules*, *113*, 841-848.

Yan, S., Wang, T., Li, X., Jian, Y., Zhang, K., Li, G., & Yin, J. (2017). Fabrication of injectable hydrogels based on poly (L-glutamic acid) and chitosan. *RSC Advances*, *7*(28), 17005-17019.

Zhang, X., Ma, J., Fu, K., Fu, X., Ding, L., Guan, Q., & Jiang, L. (2017). Research on Synthesis of Nano Chitosan modified Polyacrylamide through Low-pressure Ultraviolet Initiation. *Journal of Polymer Materials*, *34*(1), 129.

Zhu, C., Zou, S., Rao, Z., Min, L., Liu, M., Liu, L., & Fan, L. (2017). Preparation and characterization of hydroxypropyl chitosan modified with nisin. *International Journal of Biological Macromolecules*.

Zolfagharnia, B., Mortazavian, E., Kaviani, D., & Rafiee-Tehrani, M. (2017). Preparation and evaluation of nanoparticles composed of thiolated methylated pyridinyl chitosan as a new strategy for bucal drug delivery of insulin. *Nanomedicine Journal*, *4*(2), 83-88.

**CAPÍTULO 2: PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE DERIVADOS DE QUITOSANA  
ASSOCIADA AO FÁRMACO CEFTAZIDIMA**

**PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE DERIVADOS DE QUITOSANA ASSOCIADA  
AO FÁRMACO CEFTAZIDIMA**

*Leudimar Aires Pereira<sup>1</sup>, Anderson Nogueira Mendes<sup>2</sup>, Edson Cavalcanti da Silva Filho<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> *Programa de pós-graduação em ciência dos materiais, [aireslp@yahoo.com.br](mailto:aireslp@yahoo.com.br);*

*[edsonfilho@edu.br](mailto:edsonfilho@edu.br)*

<sup>2</sup> *Departamento de Biofísica e Fisiologia, Universidade Federal do Piauí,*

*[anderson.mendes@gmail.com](mailto:anderson.mendes@gmail.com)*

## RESUMO

Quitosana é um biopolímero, de baixa toxicidade, renovável, biodegradável, mucoadesivo, antioxidante, antimicrobiano e anti-inflamatório. Visando o conhecimento das propriedades biológicas de citotoxicidade, antioxidante e gastroprotetora, foi realizada síntese da quitosana com acetilacetona e em seguida com etilenodiamina (Qacen) ou dietilenotriamina (Qacdien), com incorporação do fármaco ceftazidima (F). Realizou-se caracterização por análise elementar (CHN), infravermelho (FTIR), análise termogravimétrica (TG/DTG/DSC), difratometria (DRX), teste de citotoxicidade hemolítica, toxicidade sobre *Artemia salina* e antioxidante pela captura do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). A modificação química foi confirmada através dos resultados CHN, DRX, FTIR e TG/DTG/DSC. Os derivados Qacen, Qacdien, QacenF e QacdienF apresentaram os maiores índices percentuais de de nitrogênio (7,6%, 7,9%, 14,1% e 19,2%, respectivamente), comprovando a incorporação dos grupos amina. Esta incorporação provocou diminuição no índice cristalinidade de Qacen (7,1%) e Qacdien (4,3%), assim como a incorporação do Fármaco (QacenF 0,3% e QacdienF 3,4%). No FTIR ocorreu deslocamento das bandas de grupos químicos. Na TG/DTG/DSC houve melhoria na estabilidade térmica dos derivados sem o fármaco e diminuição nos derivados com o fármaco. A biocompatibilidade dos derivados foi confirmada pela baixa taxa hemolítica (<5%) em ensaio *in vitro*, pela não toxicidade no ensaio *in vivo* sobre *Artemia salina* em concentrações menores que 1000 ppm (DL50% > 3000 ppm), pelo índice significativo (1-34%) de atividade antioxidante nas concentrações menores que 5 mg/mL em ensaio *in vitro*. Quitosana (50,7%) e os derivados Qacen (55,2%) e Qacdien (68,1%) apresentaram resultados significativos na cicatrização de úlcera gástrica. Os resultados sugerem que os derivados de quitosana são promissores biomateriais.

**Palavras-chave:** Antioxidante, biomaterial, hemólise.

## ABSTRACT

Chitosan is a biopolymer, low toxicity, renewable, biodegradable, mucoadhesive, antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory. Chitosan was synthesized with acetylacetone and then with ethylenediamine (Qacen) or diethylenetriamine (Qacdien), with the incorporation of the drug ceftazidime (F), aiming at the knowledge of the biological properties of cytotoxicity, antioxidant and gastroprotective. Elemental analysis (CHN), infrared (FTIR), thermogravimetric analysis (TG / DTG / DSC), diffractometry (XRD), hemolytic cytotoxicity test, toxicity on *Artemia salina* and antioxidant by DPPH free radical capture (2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). Chemical modification was confirmed by CHN, XRD, FTIR and TG / DTG / DSC results. The Qacen, Qacdien, QacenF and QacdienF derivatives presented the highest percentage of nitrogen (7.6%, 7.9%, 14.1% and 19.2%, respectively), confirming the incorporation of the amine groups. The incorporation of the amine bases caused a decrease in the crystallinity index of Qacen (7.1%) and Qacdien (4.3%), as well as the incorporation of the drug (QacenF 0.3% and QacdienF 3.4%). In the FTIR, bands of chemical groups occurred. In TG / DTG / DSC there was improvement in the thermal stability of the derivatives without the drug and decrease in the derivatives with the drug. The biocompatibility of the derivatives was confirmed by the low hemolytic rate (<5%) in *in vitro* assay, by non-toxicity in the *in vivo* test on *Artemia salina* at concentrations less than 1000 ppm (LD50% > 3000 ppm), by the significant index (1- 34%) of antioxidant activity at concentrations less than 5 mg / mL *in vitro*. Chitosan (50.7%) and derivatives Qacen (55.2%) e Qacdien (68.1%) presented a significant result in the healing of gastric ulcer. The results potentiate the chitosan derivatives as promising biomaterials.

Key-words: Antioxidant, biomaterial, hemolysis.

## 1. INTRODUÇÃO

A quitosana é um polissacarídeo, copolímero, obtido por meio de reação da hidrólise da quitina em meio alcalino, com ocorrência N-desacetilação, com porcentagem de grupos amino ( $\text{NH}_2$ ) livres maior que 50%, passando a ser solúvel em meio aquoso ácido (Elsabee & Abdou, 2013; Volod'ko, *et al.* 2014; Mahfouz, *et al.* 2015; Júnior, *et al.* 2017; Wu, *et al.* 2018).

A solubilização da quitosana em meio ácido ocorre pela protonação da função  $-\text{NH}_2$  sobre o carbono 2 da unidade de repetição D-glicosamina (Shukla, *et al.* 2013, Bhavsar, Momin & Omri, 2017), similar à estrutura química da celulose, porém a celulose apresenta uma hidroxila secundária no segundo átomo de carbono do monômero de repetição da hexose (Elsabee & Abdou, 2013; Zargar, Asghari & Dashti, 2015; Júnior, *et al.* 2017).

Biopolímeros, como a quitosana, um polissacarídeo catiônico em meio ácido, são promissores como biomateriais, por ser um produto natural, de baixa toxicidade, renovável e biodegradável (Chen, *et al.* 2018; Wu, *et al.* 2018), possui ligações glicosídicas que podem ser degradada *in vivo* por algumas enzimas proteases, como a lisozima, entretanto, a degradação está também ligada, diretamente, a cristalinidade do polímero, que por sua vez é inversamente proporcional à cinética de biodegradação (Croisier & Jérôme, 2013; Xu, *et al.* 2018).

Entretanto, por possuir uma elevada hidrofiliabilidade torna-se mais difícil sua assimilação *in vivo*, limitando assim seu uso sem uma prévia modificação química para melhorar as propriedades hidrófilas (Wang, *et al.* 2018). Contudo, é um biopolímero que possui propriedades específicas potenciais para diversas áreas de aplicações, assim como fator quelante frente a cátions (Philibert, Lee e Fabien, 2017), possibilitando, modificação química na estrutura de seus grupos amins e grupos hidroxila, podendo dessa forma aumentar o número de sítios ativos, tornando viável um aumento na potencialidade de remoção catiônica,

bem como também é possível sua modificação com introdução de grupos hidrofílicos para facilitar a interação entre as ligações intermoleculares de hidrogênio, tornando a sua solubilidade em meio neutro e viabilizando o seu campo de aplicação em distintas formas, como pós, flocos, microesferas, nanopartículas, membranas, esponjas, géis e fibras (Dutta, *et al.* 2009; Yang, *et al.* 2012; Vandamme, *et al.* 2014; Zhang, *et al.* 2016; Philibert, Lee & Fabien, 2017).

A quitosana destaca-se frente a outros polímeros naturais por apresentar atividade antibacteriana e antifúngica (Hernandez-Montelongo, *et al.* 2016; Kumar, *et al.* 2017). Essa capacidade está, a princípio, vinculada aos grupos aminas das unidades 2-amino- 2-desoxi-D-glicopiranosose (Dang, *et al.* 2018), que possuem carregamento positivo em meios ácidos (pH 5,0), que apresentam a capacidade de passar pela membrana celular dos microrganismos, que possuem parede celular com cargas negativas, alterando sua permeabilidade, podendo provocar o rompimento e a liberação de compostos intracelulares (Hernandez-Montelongo, *et al.* 2016; Philibert, Lee & Fabien, 2017), isto é, o aumento do número de grupo amina livre (-NH<sub>2</sub>) na estrutura da quitosana possibilitará uma maior atividade antibacteriana, assim como poderá melhorar a sua hidrofiliicidade e solubilidade em meio básico (Rabea, *et al.* 2003; Doll, *et al.* 2013; Dang, *et al.* 2018).

Além da atividade antibacteriana e antifúngica já descrita na literatura (Zhu, *et al.* 2017), a quitosana pura e a quitosana modificada, por diferentes agentes químicos, apresentam acentuadas atividades biológicas, como efeitos antioxidantes (Anraku, *et al.* 2011), anti-inflamatórias (Ngo, *et al.* 2012), anti-hipertensivos, antidiabéticos, antiobesidade, antialérgicos, neuroprotetores, anticâncer (Anirudhan, Divya & Nima, J. 2016; Cao, *et al.* 2018), anticoagulantes e pode prevenir doenças crônicas (Ngo, *et al.* 2015).

As atividades biológicas apresentadas pela quitosana que garante a biocompatibilidade, bioadesão, permeabilidade, propriedades imunológicas, cicatrizantes,

boas propriedades de resistência mecânicas, entre outras (Servat-Medina, *et al.* 2015; Silva, *et al.* 2015) potencializam esse biopolímero como promissor excipiente em preparação convencional de medicamento, formulação farmacêutica (Silva, *et al.* 2015; Liang, *et al.* 2018; Wang, *et al.* 2018), principalmente para administrada via oral (Hejazi & Amiji, 2003).

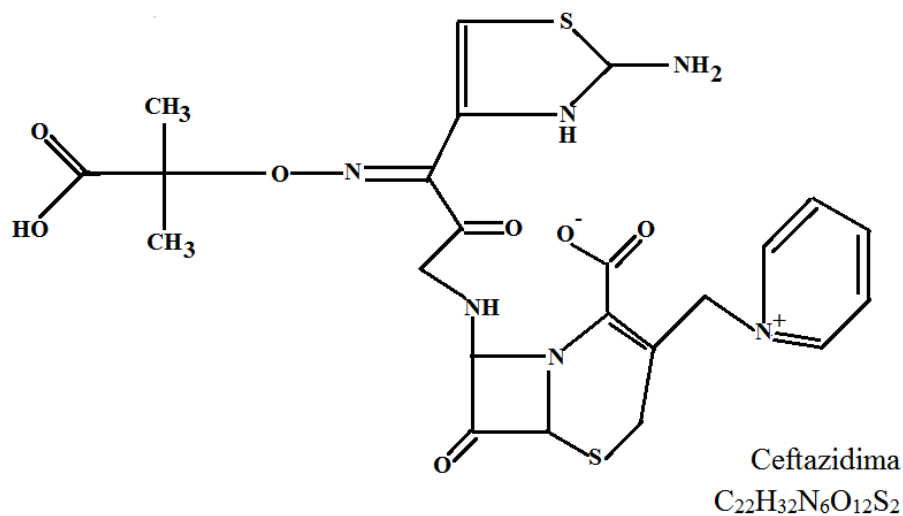
Na formulação farmacêutica, excipiente é a substância, distinta do fármaco, usada, geralmente, para propiciar uma boa preparação do medicamento, garantindo estabilidade física, química e microbiológica ao produto; fornecer um tempo determinado e efetividade do fármaco no organismo, por afetar a dissolução do fármaco, a velocidade e a dosagem liberada a ser absorvida (Villanova, *et al.* 2010; Tronci, *et al.* 2014). Contudo, produto natural como a quitosana apresenta propriedades biológicas, as quais pode ser melhorada por modificação química, tornando esse biopolímero favorável para aplicação na área biomédica e farmacêutica (Volod'ko, *et al.* 2014).

A quitosana modificada com acetilacetona possibilita um aumento no número de sítios ativos, viabilizando uma melhor eficiência na incorporação de grupo amina (Pereira, *et al.* 2014). Contudo, modificação com grupos amina apresenta a formação de ligação imina (base de Schiff), a qual possui ação antimicrobiana (Osório, *et al.* 2016; Silva Filho, *et al.* 2016), tornando-se promissor o uso de quitosana modificada com etilenodiamina ou dietilenotriamina junto a fármaco como o ceftazidima no controle e combate a microrganismo resistente, assim como pode ser eficiente no controle de infecções e regeneração de feridas.

O fármaco ceftazidima é um antibiótico cefalosporina de terceira geração, semissintético, injetável, administração parenteral, ação de amplo espectro, penta-hidratado, com fórmula estrutura  $C_{22}H_{32}N_6O_{12}S_2$  (Figura 1) e peso molecular de 636,6 g/mol (Moreno e Salgado, 2010).



**Figura 1.** Estrutura química de ceftazidima.



As propriedades biológicas de quitosana podem ser avaliadas por diferentes análises, conforme o parâmetro a ser avaliado. Dentre eles estão os ensaios de citotoxicidade ou biocompatibilidade por meio do teste de hemólise em células sanguíneas de mamífero (Dang, *et al.* 2017), toxicidade aguda frente à *Artemia salina* e ensaio de atividade antioxidante.

O teste de hemólise é importante para indicar se o material apresenta um índice baixo ou alto de biocompatibilidade, percentual de afinidade com o plasma sanguíneo (Marani, *et al.* 2017).

A hemólise é a lise da membrana de hemácia e a consequente liberação de hemoglobina para o plasma (Dang, *et al.* 2018). Quando ocorre ruptura acima de 50%, indica baixa afinidade do material com o plasma sanguíneo, podendo causar sérios problemas à saúde no ambiente *in vivo* (Dang, *et al.* 2017; Mendes, *et al.* 2017).

O microcrustáceo *Artemia salina* Leach (TAS) é usado como bioindicador de toxicidade de material com propriedades biológicas, é muito usado por ser eficiente, simples e de baixo custo (Ribeiro, *et al.* 2015).

O ensaio antioxidante é importante para avaliar a ação de produto natural no controle ou eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou nitrogênio (RNS). Os antioxidantes

são substâncias capazes de inibir ou retardar a velocidade de oxidação por um ou mais mecanismos de ação (Bianchi & Antunes, 1999). Esse desequilíbrio pode provocar envelhecimento precoce das células, provocando o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, como diabetes mellitus, distúrbios cardiovasculares, distúrbios inflamatórios e câncer (Ngo, *et al.* 2015; Zimmermann & Kirsten, 2016).

Os ROS e RNS podem ser combatidos por compostos com substâncias antioxidantes, que podem apresentar distintas propriedades protetivas e agir em diversas etapas do processo oxidativo (Pereira, *et al.* 2018). Contudo, os antioxidantes biológicos podem ser enzimáticos, como exemplo superóxido dismutase, catalase, e glutathione peroxidase e não-enzimáticas, tais como inibidores de enzimas oxidantes como a ciclo-oxigenase, cofatores de enzimas antioxidantes e os capturadores de ROS/RNS como a quitosana (Barreiros, David e David, 2006; Pereira, *et al.* 2018) que age na eliminação de radicais livres ou induzido a interrupção da reação oxidação, prevenção de danos oxidativos (Ngo, *et al.* 2015).

Dentre os métodos existentes, o método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) é muito utilizado para indicar a atividade antioxidante em produtos naturais (Nascimento, *et al.* 2011).

As úlceras gástricas são caracterizadas como lesões da parede mucosa do estômago, consequência de um desequilíbrio entre agentes agressivos e defensivos do trato digestivo (Li, *et al.* 2013; Volod'ko, *et al.* 2014; Wang, *et al.* 2015; Silva, *et al.* 2016; Viana, *et al.* 2016). Em geral, são causadas por um desequilíbrio na secreção de muco e bicarbonato, óxido nítrico, fluxo sanguíneo, sulfidrilos, prostaglandinas, secreção de ácido, pepsina e espécies radioativas. Essa alteração pode ser provocada por um elevado índice de estresse, tabagismo, álcool, *infecção por Helicobacter pylori* e injeção antiinflamatória de drogas não esteroides. O tratamento de úlcera gástrica pode ser comprometido por sérios distúrbios gástricos contra a defesa da mucosa (Potrich, *et al.* 2010), provocados por efeitos colaterais graves causados por medicamentos (Viana, *et al.* 2016).

Contudo, produtos naturais como a quitosana representam promissoras possibilidades de pesquisas e descobertas de atividades biológicas favoráveis ao tratamento de úlceras gástricas (Volod'ko *et al.* (2014).

Atualmente, não houve estudos publicados sobre a potencialidade das atividades biológicas de derivados de quitosana com grupos amina e incorporação do fármaco ceftazidima. Realizou-se um estudo visando o conhecimento das propriedades biológicas de biocompatibilidade hemolítica, toxicidade sobre *Artemia salina*, atividade antioxidante e efeito cicatrizante em tratamento de lesão gástrica da quitosana quimicamente modificada com acetilacetona, na ausência de solvente, como base para modificação posterior com etilenodiamina e dietilenotriamina, com incorporação do fármaco ceftazidima aos derivados.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1 Materiais

Quitosana (78% GD, Polymar); ceftazidima pentahidratada (Bio Chimico); hipoclorito de sódio, cloreto de potássio, acetilacetona e etilenodiamina (Vetec); dietilenotriamina e dimetilsulfônico-DMSO (Sigma-Aldrich); sulfato de magnésio (Isofar); carbonato de sódio e cloreto de magnésio (Impex); ácido acético, cloreto de cálcio, metanol e cloreto de sódio (Dinâmica); solução de soro fisiológico (NaCl 0,9%); DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil); ácido ascórbico (Synth); cloridrato cetamina e cloridrato de xilazina 2% (Syntec); tiopental de sódio (Cristália), formalina (Synth) e água ultrapura (Milli-Q/Millipore Corporation) foram utilizados. Os reagentes não foram tratados previamente.

### 2.2 Processo de desodorização da quitosana

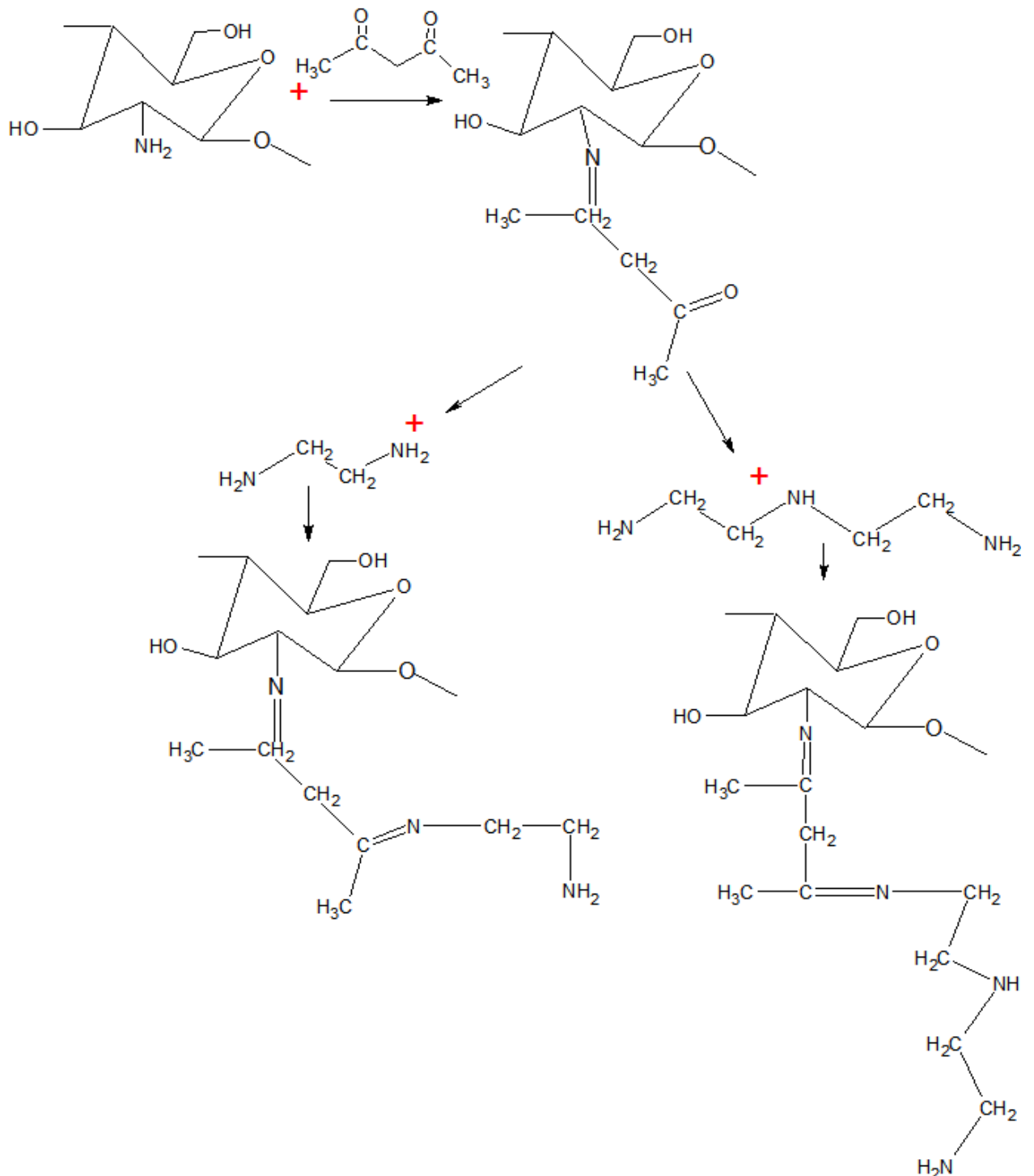
A desodorização da quitosana foi realizada de acordo com Moura *et al.* (2007) e adaptações. Usou-se hipoclorito de sódio a 0,36% (v/v), sob agitação constante 350 rpm por 1 h. Em seguida, o material foi lavado com água destilada, até alcançar o pH neutro. Após a lavagem, o mesmo foi seco a temperatura de 80 °C por 24 horas. Esse processo foi necessário para a redução de odor e a retirada de pigmentos provenientes do processo de desacetilação.

### 2.3 Modificação química da quitosana com acetilacetona, etilenodiamina e dietilenotriamina

A partir de adaptações do protocolo de Pereira *et al.* (2014), a quitosana pura foi misturada a acetilacetona na ausência de solvente, na proporção de 25,0 mL de acetilacetona para 6,0 g de quitosana. Em seguida, o material foi colocado sob refluxo e agitação magnética durante 4 h a 140 °C. Posteriormente, o derivado foi lavado com água ultrapura por sete repetições (centrifuga a 1600 rpm por 5 min a 25 °C, modelo sigma 2-5, 4000), em seguida o

sobrenadante foi descartado e o substrato foi seco a 100 °C por 24 h, e o produto final denominado Qac (Figura 2A). Em um sistema idêntico, foram misturados 3,0 g de Qac com 45,0 mL de etilenodiamina e 4,0 g de Qac com 25,0 mL de dietilenotriamina, separadamente, colocados sob refluxo e agitação magnética durante 4 h a 123 °C para etilenodiamina e 209 °C para dietilenotriamina; no final os derivados foram denominados Qacen (Figura 2B) e Qacdien (Figura 2C), respectivamente.

**Figura 2.** Esquema da estrutura química da proposta de síntese realizada na quitosana com acetilacetona, etilenodiamina e dietilenotriamina.



#### 2.4 Método de incorporação do fármaco aos materiais Q, Qac, Qacen e Qacdien

A incorporação do fármaco ceftazidima pela quitosana e pelos derivados foi conforme a concentração de adsorção da ceftazidima para quitosana: 150,0 mg/L, Qac 175,0 mg/L, Qacen 150,0 mg/L e Qacdien 225,0 mg/L, concentração esta que ocorreu a maior capacidade de adsorção em pH 1,2. Em seguida, proporcionalmente, 3 mg de ceftazidima foram misturados a 40,0 mg de C e Cacen; 3,5 mg de ceftazidima para 40,0 mg de Cac e 4, 5 mg de ceftazidima para 40,0 mg de Cacdien, foram misturado com água pura e colocado para agitar a 130 rpm durante 48 h a temperatura ambiente (25 °C) de 298±2K. Logo após, separou-se o substrato e secou a 30 °C.

## 2.5 Caracterização dos materiais

A análise elementar da porcentagem de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio da quitosana pura e quitosana quimicamente modificada foi determinada com o uso do equipamento Perkin-Elmer, modelo PE 2400.

Os espectros de FTIR da quitosana pura e dos derivados foram registrados com pastilhas de KBr em um espectroscópio na região do infravermelho com transformada de Fourier (Vertex 70, Bruker), com módulo VCD (PMA 50, Bruker), com varreduras na região de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

A análise termogravimétrica (TGA-DTG-DSC) das amostras de quitosanas e derivados foram realizadas no aparelho SDT Q600 V20.9 Build 20 da TA Instruments (M. DSC-TGA Standard- InstSerial 0600-0883), utilizando aproximadamente 10 mg de amostra com razão de aquecimento de 20 °C/min em atmosfera de Argônio com fluxo de 100,0 mL  $\text{min}^{-1}$  em porta amostra de alumina na faixa de 800 °C.

A difração de raios-X foi realizada em um difratômetro da marca Shimadzu, modelo XR-D600 A, na faixa 2 $\theta$  entre 5 a 75°. A velocidade de varredura foi de 5°  $\text{min}^{-1}$ , utilizando a fonte de radiação  $\text{CuK}\alpha$ , com comprimento de onda 154,06 pm. Esta análise foi realizada para

verificar se houve mudança na cristalinidade da quitosana quimicamente modificados, com realização do cálculo do índice de cristalinidade (ICR) com o uso da Equação (1):

$$I_{CR}(\%) = [(IC - I_A) / (IC)] \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

Em que  $I_{CR}$  (%) corresponde ao índice de cristalinidade, IC as intensidades dos picos difratados referente às regiões cristalinas ( $2\theta \cong 20^\circ$ ) e  $I_A$  as regiões sem picos, amorfos ( $2\theta \cong 12^\circ$ ) (Battisti e Campana-Filho, 2008).

## 2.6 Análises das Propriedades Biológicas: Teste de Hemólise, Ensaio sobre *Artemia salina*, Ensaio de Atividade Antioxidante por DPPH e Teste de atividade gastroprotetora

Após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí (protocolo nº 463/18), foi realizado o teste de hemólise para verificar as porcentagens de hemólise de Q, F, QF, Qac, QacF, Qacen, QacenF, Qacdien e QacdienF conforme método descrito por Dang *et al.* (2017) e Mendes *et al.* (2017). As amostras de quitosana e derivados com e sem ceftazidima foram preparadas em solução de DMSO (1% em solução salina) na concentração de 20 mg/mL. Em seguida, em uma placa de 96 poços, diluiu 40 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) de cada amostra em 160  $\mu\text{L}$  de solução salina (0,9%). Posteriormente, o sangue arterial de mamífero foi tratado (lavado 3 vezes em solução salina na proporção 1/1 e 1/4 em centrifuga a 3000 rpm por 5 minutos para separar os eritrócitos). Logo após, nos poços com as amostras, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de eritrócitos em cada amostra de Q e derivados, ficando as amostras nas concentrações finais de 500, 250 e 125  $\mu\text{g/mL}$ , em seguida colocou-se para incubar por 1 h a 37 °C. Depois, o material foi centrifugado a 300 rpm por 5 minutos, coletado o sobrenadante e transferido para uma placa de 96 poços e levado para quantificação (leitura a 550 nm em espectrofotômetro de leitura de placas EL800 Blotek). Solução salina foi usada para o controle negativo (CN=0% de lise) e solução de detergente a 1% para o positivo (CP=100% lise). Os percentuais de hemólise foram calculados conforme a Equação 2:



$$\text{Hemolise (\%)} = [(\text{absorbância da amostra} - \text{absorbância do CN}) / (\text{absorbância do CP} - \text{absorbância do CN})] \times 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

O bioensaio com náuplios (larva) do microcrustáceos *Artemia salina* Leach (TAS) foi realizado como bioindicadores de toxicidade de acordo com método de Meyer *et al.* (1982) adaptado por Lopes *et al.* (2002). Preparou-se 1 L (solução 1) de solução de água do mar sintética (15,153g NaCl; 1,398g MgCl; 1,888g MgSO<sub>4</sub>; 0,652g CaCl<sub>2</sub>; 0,414g KCl e 0,116g NaHCO<sub>3</sub>), com pH ajustado para 8,0-9,0 com solução 0,1 mol L<sup>-1</sup> de NaOH, para eclosão dos ovos de *A. salina*. Os ovos foram colocados para eclodir por 24 horas, com aeração constante a 25 °C. Em seguida, 10 náuplios foram colocados em tubos contendo 5 mL da solução 1, posteriormente, as amostras Q, Qac, Qacen, Qacdien, F, QF, QacF, QacenF e QacdienF (DMSO 1%) foram adicionadas em concentrações finais: 1, 10, 30, 50, 100 e 1000 ppm. Em seguida, após 24 h os náuplios mortos e vivos foram contabilizados. Logo após, testou-se as concentrações 2000, 3000, 4000, 5000, 8500 e 10000 ppm para análise de verificação da dose letal das amostras para 50% da população (DL<sub>50</sub>). O bioensaio foi realizado em triplicata, acompanhado de um controle negativo (solução 1) e controle positivo (DMSO 99,9%).

A partir de adaptações do protocolo de Nunes *et al.* (2014) e Chen *et al.* (2018), foi realizado o ensaio de Atividade Antioxidante pela captura do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). O método baseia-se na transferência de elétrons, em que ocorre a ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar, passando o DPPH da cor púrpura para coloração amarela, diminuindo assim a absorção. As amostras Q, Qac, Qacen, Qacdien, QF, F, QacF, QacenF e QacdienF foram preparadas em DMSO (99,9%), em concentrações finais de 5000, 2500, 1250, 500, 250 e 125 µg/mL, em metanol. Em duzentos microlitros (200 µg) das soluções com diferentes concentrações foram adicionadas a 2 mL de solução de DPPH em metanol (DPPH 40 µg/mL) e incubado no escuro para reagir à temperatura ambiente. Após 30 minutos os valores de absorbância foram medidos a 516 nm por um espectrofotômetro UV-

Vis (Espectrofotômetro Luz UV-Vis 190-1000 nm/banda 4 nm, Kasliaki/IL-592). Em seguida, foi calculada a porcentagem da atividade antioxidante (AA%) e EC50% (eficiência concentração = a concentração do antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50%). A atividade antioxidante (AA%) foi calculada usando a Equação 3:

$$AA\% = \frac{[(\text{absorbância do controle} + \text{absorbância do branco} - \text{absorbância da amostra}) / \text{absorbância do controle}] \times 100}{\text{Eq. 3}}$$

Para controle negativo de AA foi preparado 2 mL de DPPH com 200 µg/mL de metanol, para o branco foi usado 2 mL de metanol misturado a 200 µl de cada amostra e para o zero foi usado 2 mL de metanol.

Conforme protocolo usado por Silva *et al.* (2016), com adaptações de acordo com Servat-Medina *et al.* (2015), foi realizada a investigação da atividade gastroprotetora e antiulcerogênica dos materiais Q, após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí (protocolo nº 463/18). O experimento foi conduzido em uma etapa no Laboratório do setor do núcleo de pesquisa com planta medicinal (NPPM), respeitando-se a Legislação Brasileira de Animais de Experimentação regulamentada regido pela Lei Federal nº 6.638/1979.

Por amostra, foram utilizados 12 ratos heterogênicos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem Wistar, fêmea, com peso corporal médio de 200- 320 g, provenientes do Biotério central da Universidade Federal do Piauí. Os ratos foram vermifugados por sete dias e mantidos por mais sete dias em repouso em condições controladas ( $24 \pm 1$  °C), com alimentos e água livre. Após essa etapa, os ratos jejuaram durante 18 h, em seguida foram aleatoriamente designados para diferentes grupos. Logo após foi induzida a lesão gástrica por ácido acético (80%), por meio inicial de anestesiamento dos animais com uso de cloridrato de cetamina 10% (100 mg/kg peso do animal/1,5 mL de cada fármaco) e cloridrato de xilazina 2% (5 mg/kg), relaxante muscular. Em seguida, os animais passaram por uma

incisão de cerca de 2 cm na região abdominal para exposição do estômago. Prosseguindo na indução da úlcera gástrica, utilizou-se um cilindro de vidro de 8 mm de diâmetro e 2 cm de comprimento, o qual foi colocado em contato com a serosa do estômago para limitar a área a ser lesionada. Após esse procedimento, colocou-se 70 µl de ácido acético (80%) dentro do cilindro, deixando por 1 minuto, retirando em seguida o ácido acético, lavando bem o local lesionado com solução salina e prosseguindo com a realização da acomodação do estômago na cavidade abdominal e por fim foi realizado a sutura do tecido da região abdominal aberta.

Para testar a atividade gastroprotetora, o tratamento foi iniciado um dia após a indução da úlcera com veículo oral de cimetidina (100 mg/kg), 80 mg/kg (animal) da amostra Q e derivados preparados em água ultrapura (pH 6,64), durante sete dias. Após os sete dias de tratameto, os animais foram eutanasiados com o uso de tiopental de sódio (100 mg/kg), em seguida foram realizados as retiradas dos estômagos, lavado em água destilada, aberto ao longo da curvatura menor, descartado o conteúdo gástrico, lavado a mucosa estomacal com água destilada e esticada em placa de isopor para realização das medidas de largura, altura e profundidade da úlcera da área com o auxílio de um paquímetro digital. Após esse procedimento, foi realizado o cálculo da área (milímetros quadrados) ulcerada dos seis animais por grupo através das medidas de largura x altura; o volume da úlcera (milímetros cúbicos) foi calculado medindo a área ulcerada x profundidade da úlcera (Silva *et al.* (2016). Em seguida, conforme Servat-Medina *et al.* (2015) o resultado foi aplicado na Equação (4):

$$\text{Gastroproteção (\%)} = (\text{Controle Negativo} - \text{controle da amostra} / \text{Controle Negativo}) \times 100$$

(Eq. 4)

## 2.7. Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata em três experimentos independentes. Foi realizada análise de variância (ANOVA), com comparação múltipla com o teste de Tukey, no programa SAS System, tomando-se o valor de  $p < 0,05$  como nível máximo de significância estatística.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A síntese foi confirmada pela caracterização dos derivados por Análise Elementar, DRX, FTIR e TG/DTG/DSC.

A análise elementar foi realizada para identificar variação de nitrogênio nos derivados da quitosana e compara-las ao material precursor, e estes dados estão apresentados na Tabela 1. A razão molar experimental da quitosana pura mudou após reação com acetilacetona de 6,19 mmol/g para 7,80 mmol/g, em decorrência do aumento do percentual de carbono oriundo da acetilacetona (Q 40,51% para Qac 43,55%), o qual proporcionou um aumento da razão C/N experimental, comprovando a eficiência da síntese na reação, resultados similares foram reportados por Pereira *et al.* (2014).

**Tabela 1-** Índice de hidrogênio (H), carbono (C), nitrogênio (N) para quitosana pura (Q), ceftazidima (F), derivado Qac, Qacen, Qacdien e derivados incorporado a F, e as respectivas razões molares carbono/nitrogênio (C/N) experimental e teórico para Q e derivados sem F.

Amostra	% C	%H	% N	C (mmol/g)	N (mmol/g)	C/N experimental	C/N teórico
Q pura	40,51	7,86	7,63	33,75	5,45	6,19	6
Qac	43,55	7,48	6,51	36,29	4,65	7,80	11
Qacen	39,47	7,56	7,55	32,89	5,39	6,10	4,3
Qacdien	39,71	7,61	7,86	33,09	5,61	5,89	3,7
F	38,19	4,89	12,65	31,82	9,04	3,51	3,14
QF	39,61	6,80	8,69	33,00	6,20	5,32	*
QacF	43,28	6,90	9,75	36,07	6,96	5,18	*
QacenF	40,38	6,80	14,14	33,65	10,1	3,33	*
QacdienF	40,31	6,42	19,23	33,59	13,73	2,44	*

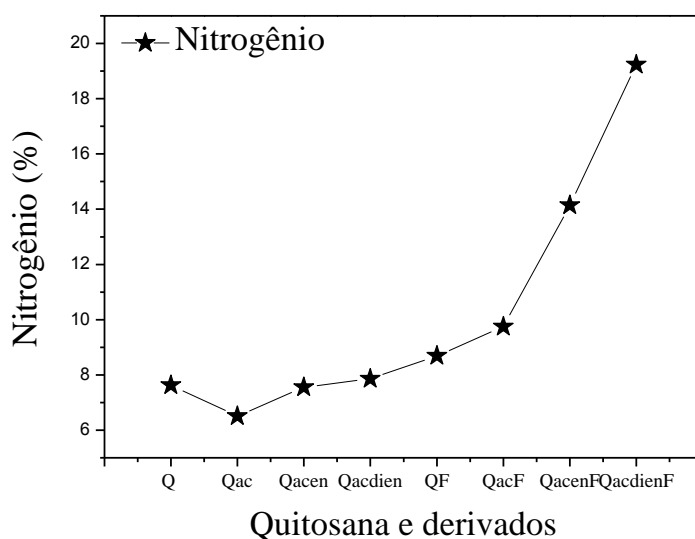
Fonte. Autoria própria (2018). \* Não foi feito este cálculo, pois não é possível prever o valor teórico de adsorção

No derivado Qac ocorreu redução no percentual de nitrogênio e a incorporação de grupos amina provenientes da síntese com etilenodiamina e dietilenotriamina ao derivado Qac viabilizou um pequeno aumento no percentual de nitrogênio em proporção crescente. Isso

ocorreu em consequência da incorporação de dois átomos de nitrogênio da molécula de etilenodiamina (7,55%) e 3 átomos de nitrogênio da molécula de dietilenotriamina (7,86%). Esse aumento proporcionou a diminuição da razão molar C / N experimental Qacen e Qacdien (6,10 mmol/g e 5,89 mmol/g, respectivamente) em relação a Q (6,19 mmol/g).

A incorporação das seis moléculas de nitrogênio de ceftazidima (Figura 1, pág. 45) aos derivados Qac, Qacen e Qacdien proporcionou aumento da porcentagem de nitrogênio para 9,75%; 14,14% e 19,23%, respectivamente (Figura 3). Esse aumento ocasionou um maior índice de mmol/g de nitrogênio para QF (6,20 mmol/g), QacF (6,96 mmol/g), QacenF (10,10 mmol/g) e QacdienF (13,73 mmol/g).

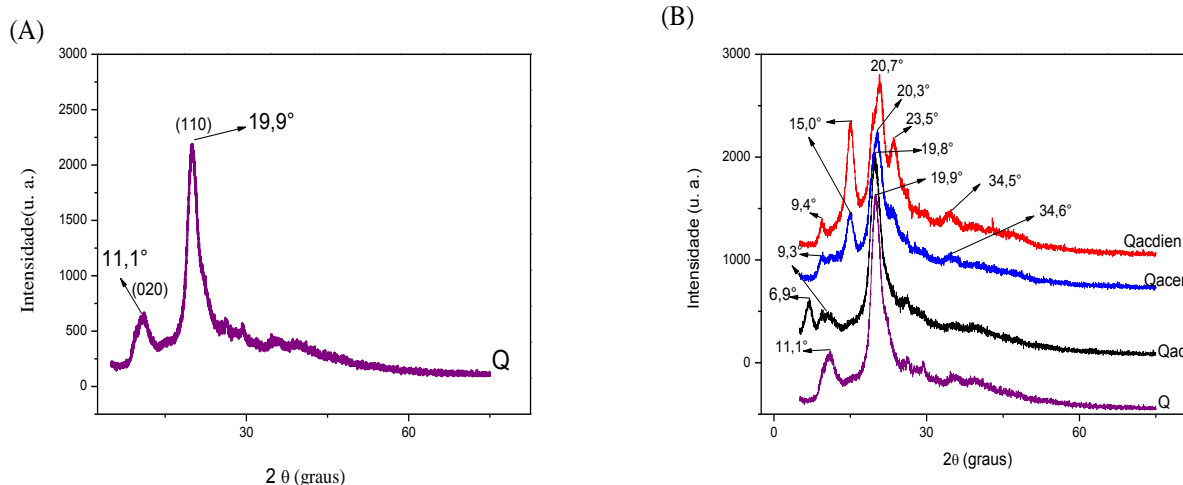
**Figura 3.** Aumento gradual do percentual de nitrogênio conforme incorporação do grupo amina e do fármaco aos derivados.



A Figura 4 ilustra o Difratoimetria de Raio X do estado cristalino dos materiais. É possível observar o estado microcristalino de Q marcado por dois picos, um pico a  $2\theta$  de  $11,1^\circ$  e o outro a  $2\theta$  de  $19,9^\circ$ , em decorrência da forte ligação de hidrogênio intra e intermolecular, formadas principalmente entre os grupos amino, hidroxila e amida presentes na molécula de quitosana (Lucena, *et al.* 2013; Santana, *et al.* 2017; Nascimento, *et al.* 2017;

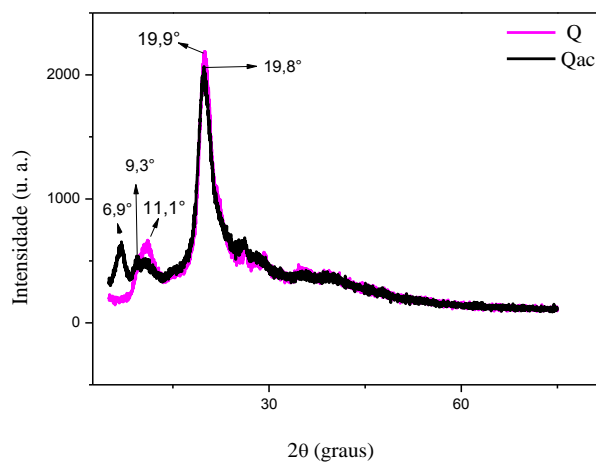
Seghir & Benhamza, 2017). Esses picos correspondem aos planos cristalográficos (020) e (110) Figura 3 (A), similares ao descritos por Silva, Fideles & Fook, (2015).

**Figura 4.** Ilustração da Difração de Raio X da quitosana pura (Q) (A), Q modificado com acetilacetona (Qac), Qac modificado com etilenodiamina (Qacem) e Qac modificado com dietilenotriamina (Qacdien) (B).



A Figura 5 mostra que ocorreu um pequeno deslocamento no pico de Qac para  $2\theta$  de  $6,9^\circ$ , a formação de um pico largo a  $2\theta$  de  $9,3^\circ$  e diminuição da intensidade do terceiro em  $2\theta$  de  $19,8^\circ$ , porém não houve mudança significativa nos picos, mas ocorreu uma pequena diminuição da cristalinidade dos derivados Qac em comparação ao padrão cristalino da quitosana, proporcionando ao Qac menor hidrofobicidade em comparação a Q, indicando que após a modificação houve alteração no arranjo estrutural do polissacarídeo, provocado pelas mudanças nas ligações de hidrogênio.

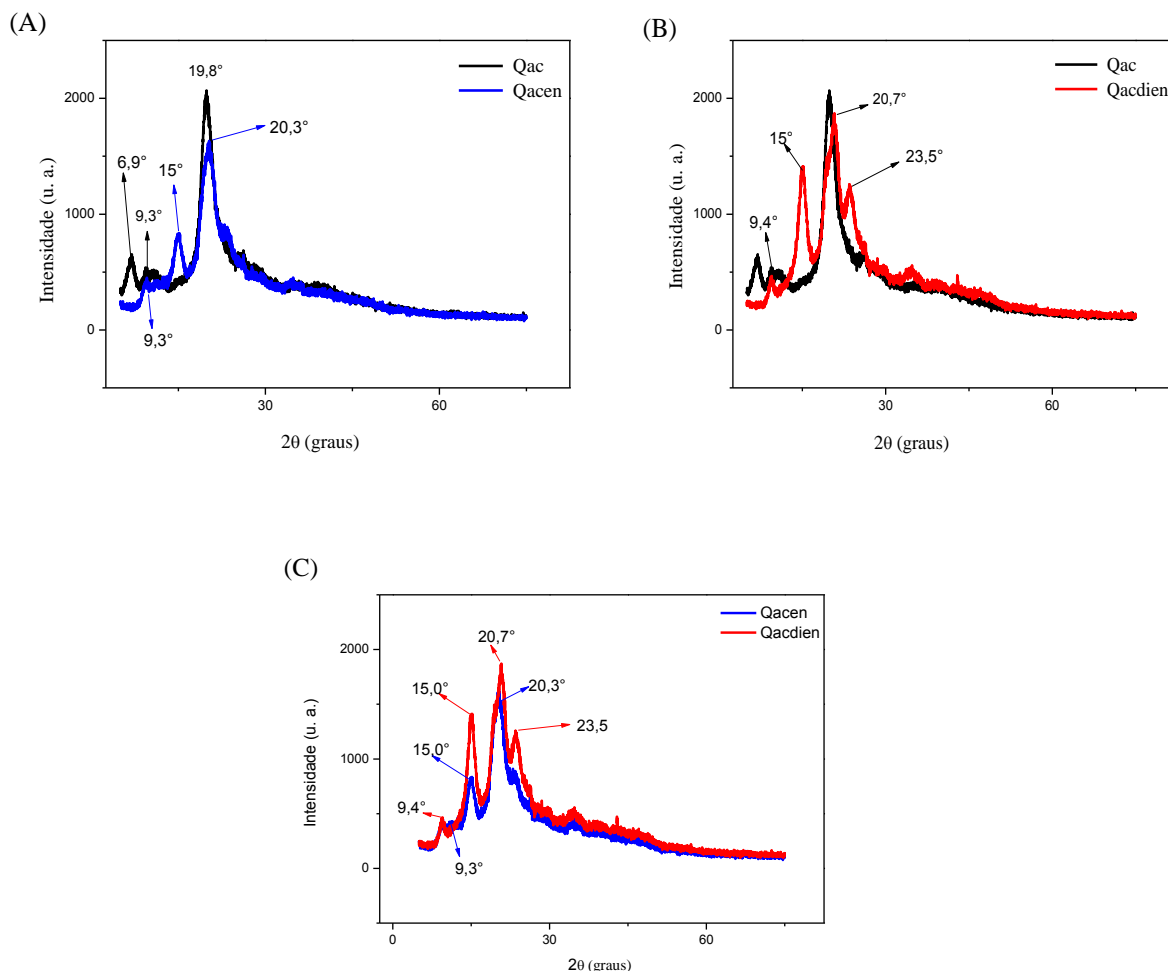
**Figura 5.** Ilustração comparativa da Difração de Raio X da quitosana pura e derivado Qac.



Em Qacen, em comparação a Qac (Figura 6 A), ocorreu um deslocamento do primeiro pico para  $2\theta$  de  $9,3^\circ$ , com um aumento de intensidade e estreitamento do segundo pico para  $2\theta$  de  $15,0^\circ$  e no terceiro pico houve perda de intensidade com pequeno deslocamento em  $2\theta$  para  $20,3^\circ$ , interferindo na perda de cristalinidade do material. Em comparação a Qac (Figura 6 B) e Qacen (Figura 6 C), Qacdien apresentou aumento de intensidade no segundo pico, porém diminuição no primeiro e terceiro, com formação de um quatro pico estreito em  $2\theta$  de  $23,5^\circ$ .



**Figura 6.** Ilustração da Difração de Raio X do derivado Qac em comparação a Qacen (A), Qac e Qacdien (B), e Qacen em relação a Qacdien (C).

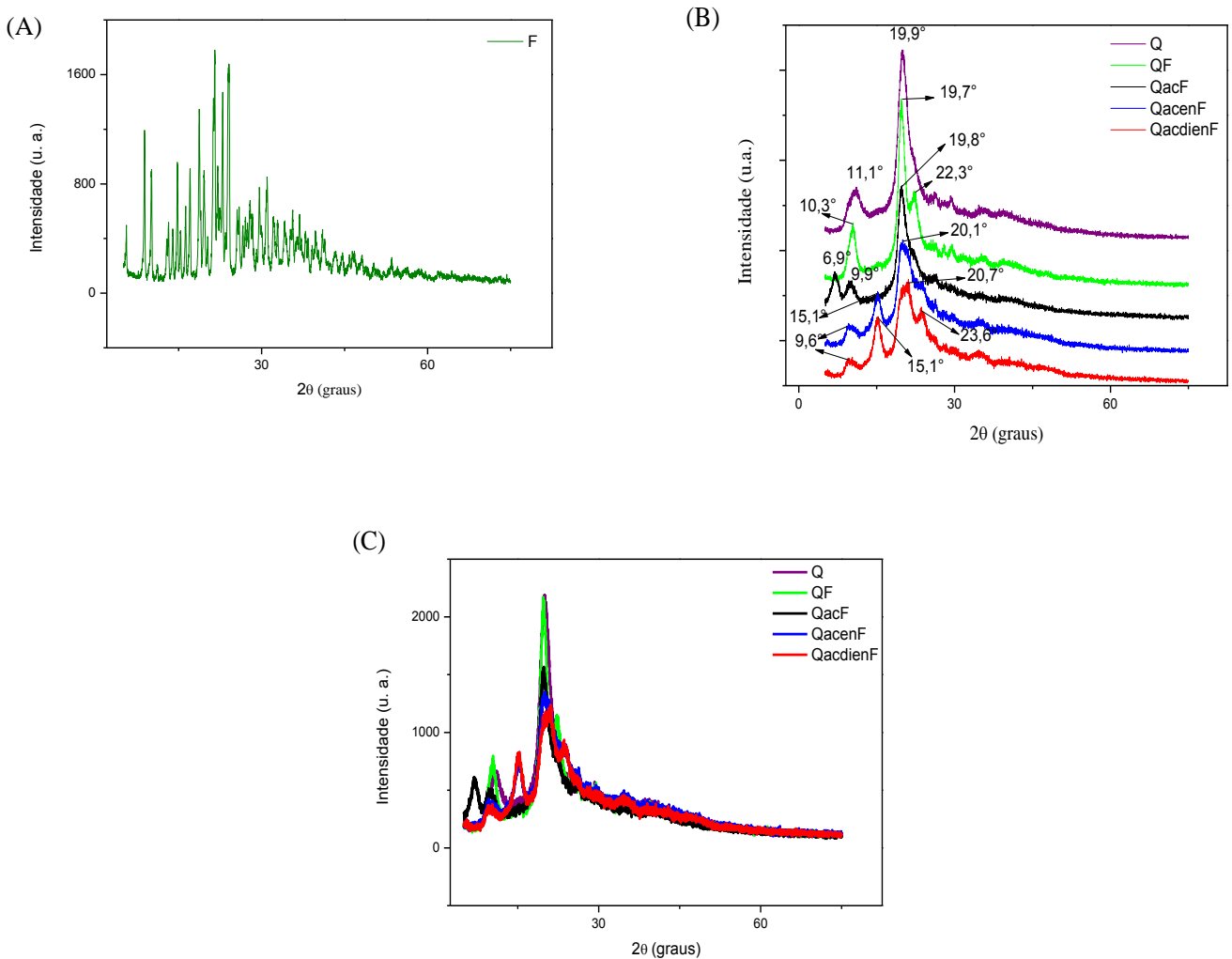


A diminuição da intensidade do primeiro pico de Qacdien, pode estar relacionado ao maior caráter hidrofílico de Qacdien em comparação ao derivado Qac, com maior disponibilidade de grupos amina livre ( $\text{NH}_2$ ), levando a diminuição do índice de cristalinidade (Dang, *et al.* 2018). Essa diminuição do índice de cristalinidade poderá proporcionar um aumento da taxa de biodegradação do material (Croisier & Jérôme, 2013), assim como melhoria na solubilidade (Dang, *et al.* 2018), em consequência ao aumento da região amorfa do polímero, tornando-o mais hidrofílico.

A Figura 7 mostra o DRX da quitosana e seus derivados com a incorporação do fármaco ceftazidima (F), Q, QF, QacF, QacenF e QacdienF, na qual pode-se verificar que QF,

em comparação ao pico da quitosana pura apresentou um aumento de intensidade (Figura 7 C), com pequeno deslocamento, uma leve diminuição de alargamento do primeiro e segundo pico em  $2\theta$  de  $11,1^\circ$  para  $10,3^\circ$  e no segundo de  $2\theta$  de  $19,9^\circ$  para  $2\theta$  de  $19,7^\circ$ , com aparecimento de um terceiro pico em  $22,3^\circ$ .

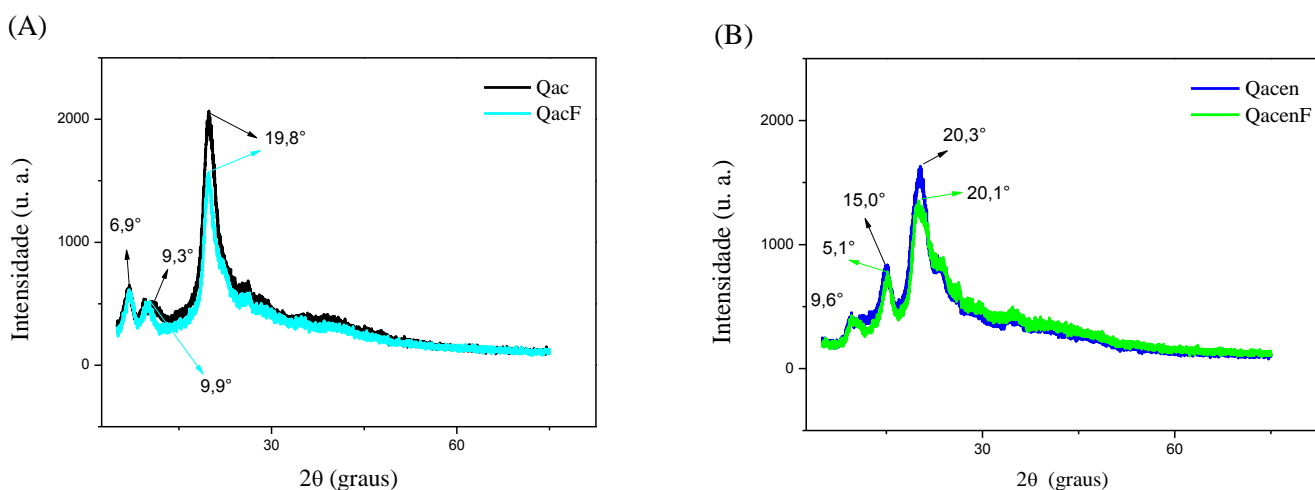
**Figura 7.** Difração de Raio X de F (A) Q, QF, QacF, QacenF e QacdienF (A) e comparação de deslocamento de pico (B).



Em QacF, em comparação a Qac (Figura 8 A), apresentou menor intensidade, com abertura do primeiro pico, mas sem deslocamento, no entanto, no segundo pico houve um pequeno alargamento e deslocamento de pico em  $2\theta$  de  $9,3^\circ$  para  $9,9^\circ$  e terceiro pico em  $2\theta$  de

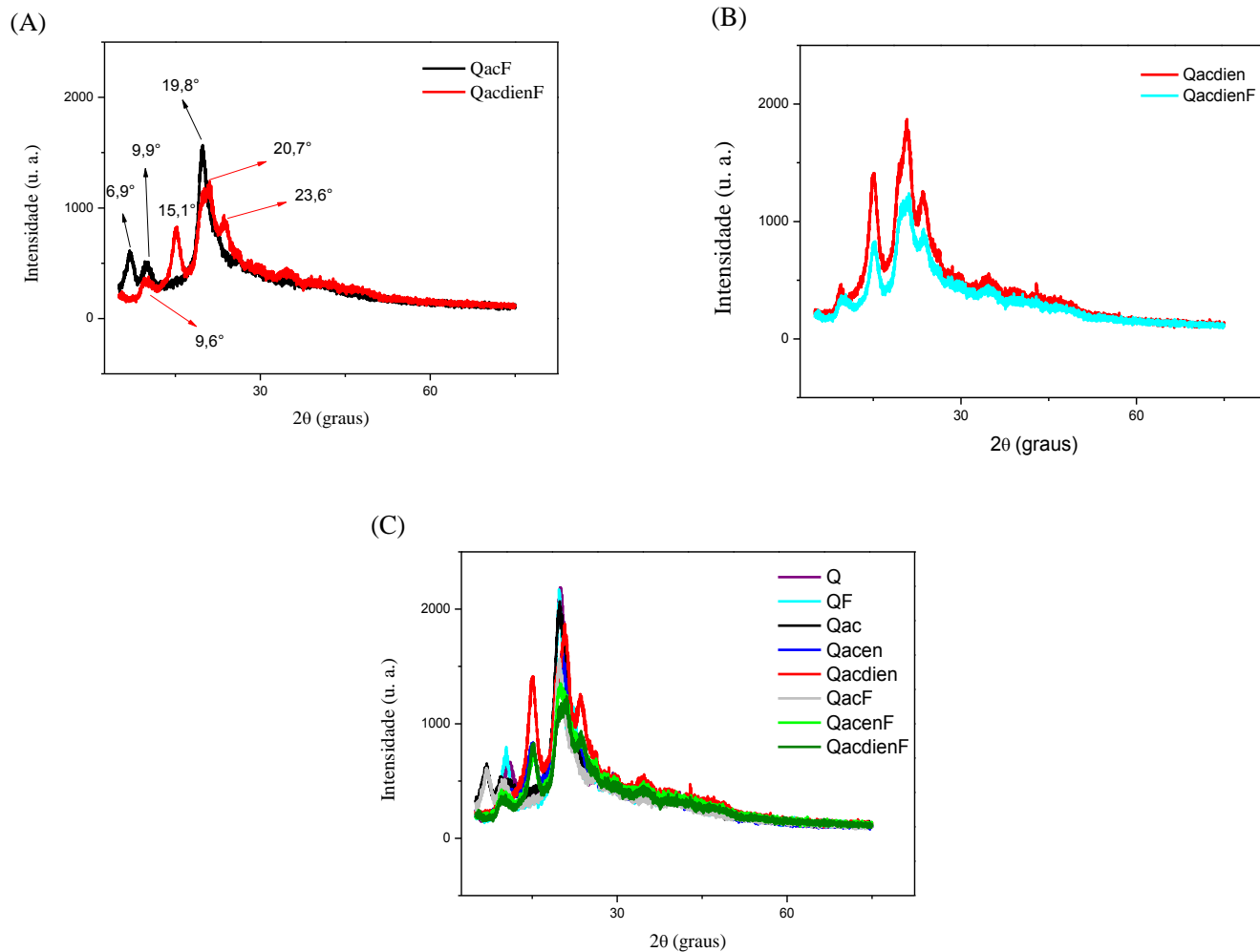
18,8° para 19,8°, ocorrendo a diminuição no índice cristalinidade. Em QacenF (Figura 8 B) é possível verificar que ocorreu diminuição de intensidade, pequeno deslocamento dos três principais picos. Essa diminuição no índice de cristalinidade está vinculada a incorporação do fármaco com característica hidrofílica na cadeia polimérica do Qacen.

**Figura 8.** Ilustração comparativa entre os derivados Qac e QacF (A) e Qacen e QacenF (B).



Na Figura 9 é possível visualizar que QacdienF apresentou um alargamento com diminuição bem significativa na intensidade dos picos em comparação a QacF, porém em relação à Qacdien apresentou um pequeno deslocamento nos picos, deixando visível a ocorrência na diminuição de cristalinidade (Tabela 2).

**Figura 9.** Ilustração comparativa de mudança dos picos de DRX de QacF e QacdienF (A, B), Qacdien e QacdienF (B), e gráfico comparativo entre todos os derivados em relação a presença de F que levou a mudança de cristalinidade (C).



**Tabela 2.** Valores do índice de cristalinidade ICR (%) das intensidades dos picos de DRX referentes às regiões cristalinas (IC) e amorfas (IA) da quitosana e derivados Qac, Qacen, Qacdien, QF, QacF, QacenF e QacdienF.

AMOSTRAS	ICR (%)
Q	85,05
Qac	82,27
Qacen	77,94
Qacdien	80,72
QF	87,66
QacF	79,98
QacenF	77,67
QacdienF	77,22

Fonte: autoria própria (2018).

A quitosana é um biopolímero que apresenta um padrão microcristalino, porém esse padrão pode variar com o grau de desacetilação ou modificação química em sua estrutura (Li, Wang & Wu, 1998), como pode ser observado na Tabela 2.

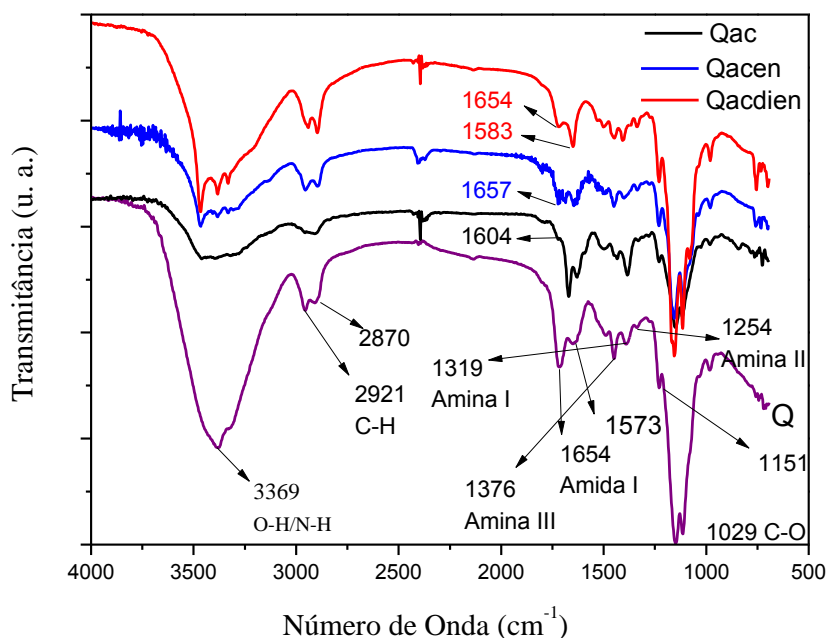
O índice de cristalinidade da quitosana de 85% poderá estar ligado ao processo de purificação, para eliminação de resíduos de reagente do processo de desacetilação, fato este relatado por Battisti & Campana-Filho, (2008) que reportaram índices de cristalinidade maiores que 71% para quitosana purificadas e menores que 68% para quitosana não purificada.

A mudança de cristalinidade dos derivados com a incorporação do fármaco poderá estar relacionada à substituição dos átomos de hidrogênio dos grupos amina dos derivados por grupos CHCOOH do fármaco, deixando os monômeros mais volumosos e hidrofílicos, afetando a conformação espacial das cadeias e suas interações.

A Figura 10 mostra o espectro das bandas características de FTIR para Q pura, entre 3400-3500  $\text{cm}^{-1}$  é referente ao alongamento axial da ligação OH e NH, corroborando com

Souza & Mansur (2008) e Santana *et al.* (2017). A banda larga próximo a região de  $3369\text{ cm}^{-1}$  está ligada às vibrações de estiramento dos grupos OH das hidroxilas, no entanto, a banda que ocorre entre  $2860\text{ cm}^{-1}$  e  $2931\text{ cm}^{-1}$  refere-se ao alongamento da ligação C-H, estiramento angular C-H, simétricos e assimétricos, atribuído a mudança axial da ligação C-H de grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  (Seghir & Benhamza, 2017).

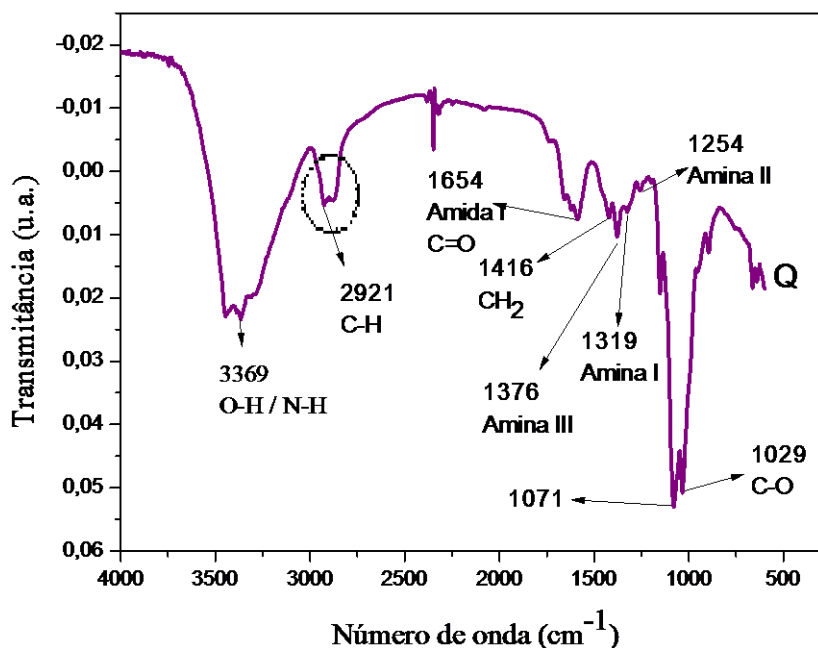
**Figura 10.** Espectro de FTIR da quitosana pura(Q), Qac,Qacen e Qacdien.



A banda de vibração de deformação axial entre a região de  $1654\text{ cm}^{-1}$  é característico de banda de estiramento de C=O da amida I, assim como as bandas na região de  $1573$  a  $1301\text{ cm}^{-1}$  de deformação CO-NH está relacionada à amida II e amida III (N-H), porém a banda  $1319$ ,  $1254$  e  $1376\text{ cm}^{-1}$  de estiramento angular são características de grupo amina (N-H) referentes à amina I, II e II, respectivamente, corroborando com resultados de Júnior *et al.* (2017); Souza & Mansur (2008) (Figura 10); Kumar, *et al.* 2017; Nascimento *et al.* (2017); Seghir & Benhamza, (2017); Jiang, Cai & Li (2017) e Santana, *et al.* (2017).

De acordo com a Figura 11, as bandas no entorno de  $1151\text{ cm}^{-1}$ ,  $1071\text{ cm}^{-1}$  a  $1029\text{ cm}^{-1}$  estão relacionadas ao alongamento antissimétrico das pontes C-O-C, referentes às vibrações de alongamento da ligação glicosídica e polissacarídica, conforme resultados reportados por Souza & Mansur (2008) e Chaleawler-Umpon *et al.* (2011) e a banda em  $900\text{ cm}^{-1}$  está relacionada ao Anel de piranose originário da reação do grupo hidroxilo do carbono 5 (anel piranósido) (Júnior, *et al.* 2017).

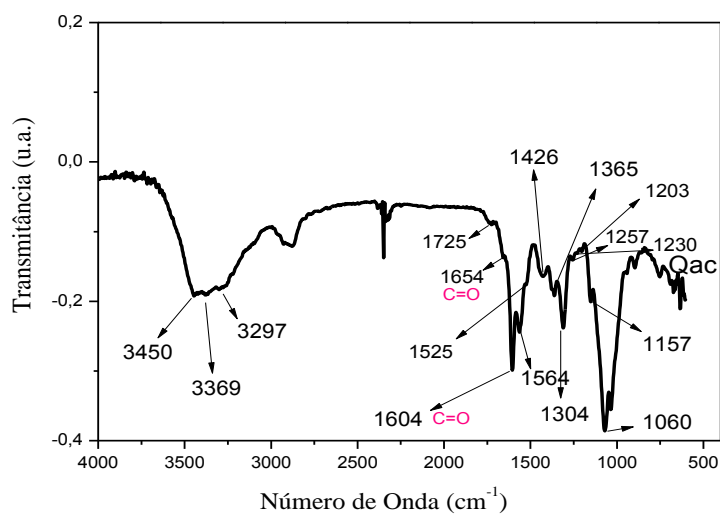
**Figura 11.** Ilustração do espectro de FTIR da quitosana pura.



O espectro da Qac (Figura 12) apresentou uma diferenciação da banda entre  $1604$  a  $1654\text{ cm}^{-1}$ , referente á presença da carbonila dos grupos cetona e a formação da ligação amida, cujo aparecimento confirma a incorporação dessa molécula da acetilcetona na quitosana. Observa-se também deslocamento da banda próximo a região de  $1304\text{ cm}^{-1}$  referente a deformações dos grupos  $\text{CH}_3$  presentes na acetilcetona e deslocamento da banda

na região de  $1157\text{ cm}^{-1}$  atribuída aos grupos ésteres alifáticos presentes na acetilacetona, corroborando com Silverstein & Webster (2014).

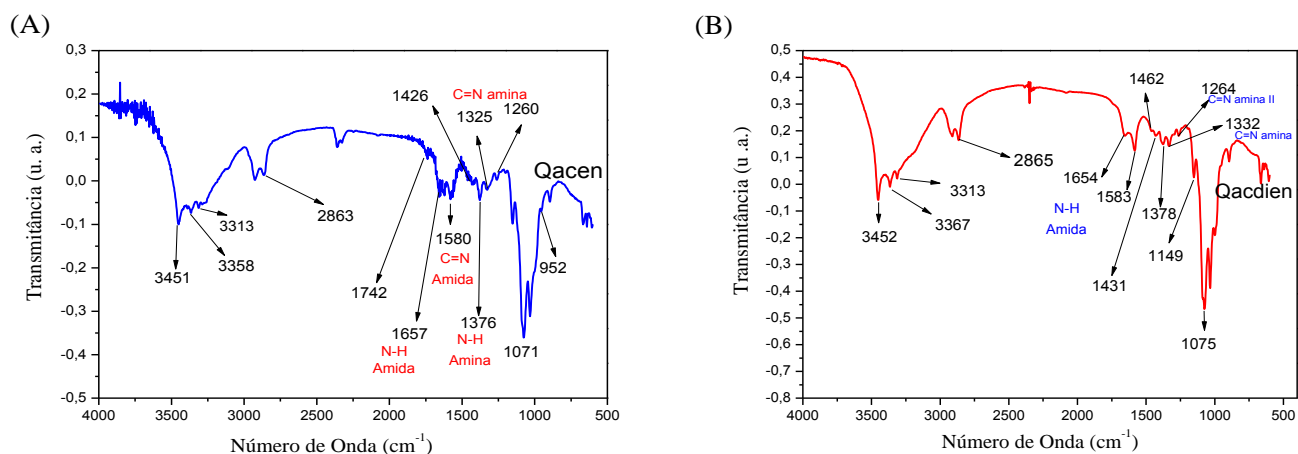
**Figura 12.** Ilustração dos espectros de quitosana associada a acetilacetona na ausência de solvente.



Os espectros de Qacen e Qacdien (Figura 13), apresentaram vibrações intensas relacionadas aos grupos metilênicos com bandas em torno de  $3451\text{-}3313$  e  $2926$  a  $2863\text{ cm}^{-1}$  para Qacen e bandas na região de  $3452$  a  $3313\text{ cm}^{-1}$  e  $2909$  a  $2865\text{ cm}^{-1}$  para Qacdien, ambas relacionadas à deformação axial N-H e O-H dos grupos amins livres, C=C e do grupo O-H que se encontra na mesma região.



**Figura 13.** Ilustração comparativa entre os espectros de FTIR dos derivados Qaczen (A) e Qacdien (B).



Os derivados Qaczen e Qacdien, em comparação a Qac, apresentaram um deslocamento da banda 1604 cm<sup>-1</sup> para 1657 cm<sup>-1</sup> para Qaczen e 1654 cm<sup>-1</sup> para Qacdien relacionada a deformação N-H e o deslocamento de outra banda próximo a 1580 cm<sup>-1</sup> para os dois derivados referente à formação da ligação amida (C=N), em consequência da reação com etilenodiamina (Figura 13 A) e dietilenotriamina (Figura 13 B).

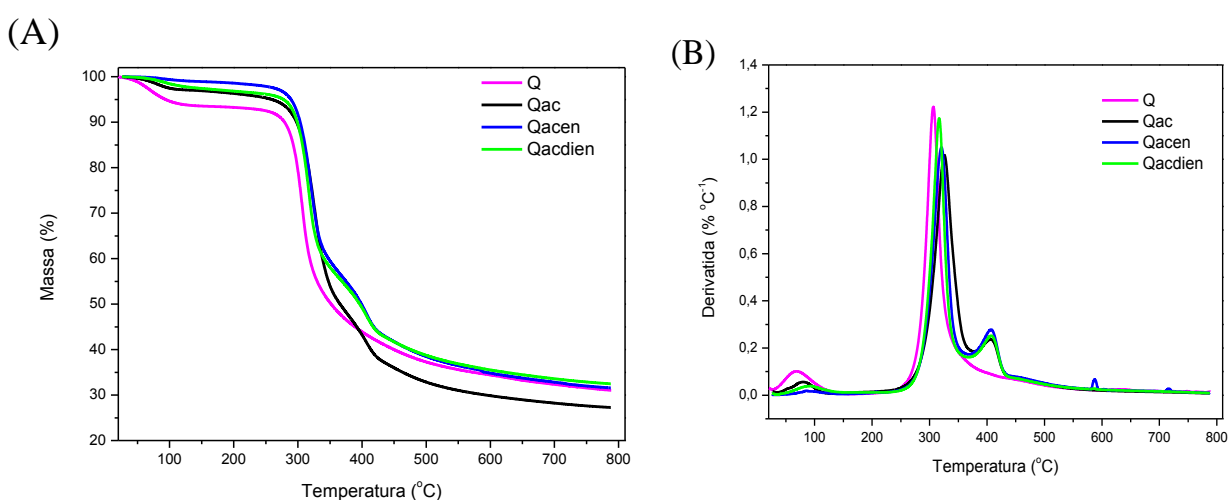
A Figura 13 mostra também uma banda de vibração na região 1462 a 1431 cm<sup>-1</sup> referentes à carbonila do grupo cetona, que vibram com aproximação de grupos amina na região de 1378 cm<sup>-1</sup>, confirmando a ligação do grupo amina na reação de modificação com etilenodiamina, similar a identificados por Lopes, Sousa & Airolti (2009), e dietilenotriamina. Observa-se também o aparecimento de uma banda intensa na região de 1325 cm<sup>-1</sup> para Qaczen e 1332 cm<sup>-1</sup> para Qacdien, relacionadas às ligações C=N de amina primária e outra banda de deformação angular no entorno da região de 1329 cm<sup>-1</sup> (C=N) atribuído a aminas secundárias presentes nos dois derivados.

O espectro de Qacdien, em comparação a Qaczen, apresentou um deslocamento das bandas nas regiões de 1654 e 1583 cm<sup>-1</sup> referente às vibrações intensas de ligações amidadas

consequentes da reação com dietilenotriamina, resultados diferentes foram encontrados por Yan, *et al.* (2013), ao modificar esferas de quitosana (quitosana modificada com benzaldeído e hidróxido de sódio) direto com dietilenotriamina.

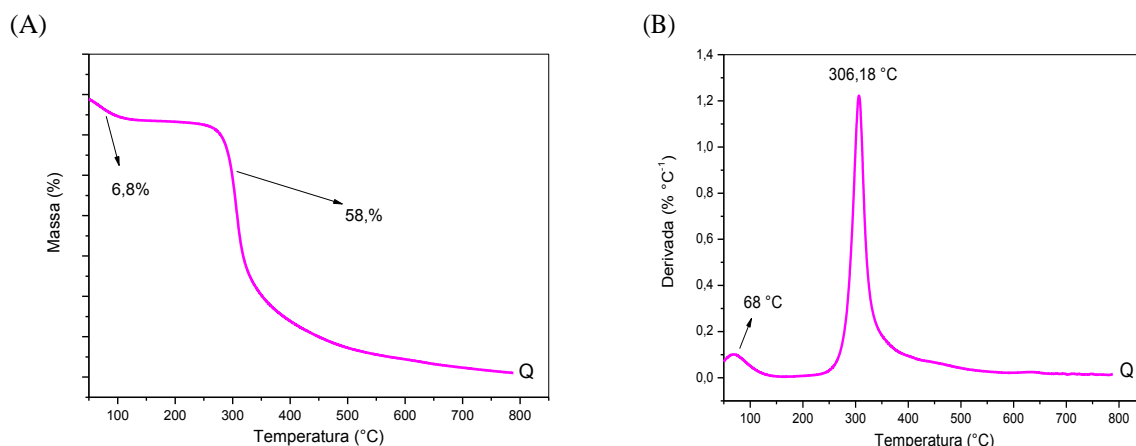
A Figura 14 (A) mostra a ocorrência de dois eventos de degradação térmica para Q (Sakurai, Maegawa & Takahashi, 2000) e três para os derivados, comprovados na curvas de DTG (Figura 14 B).

**Figura 14.** Curvas TG (A) e DTG (B) da quitosana (Q) e derivados Qac, Qacen , Qacdien.



Conforme a Figura 15, o primeiro estágio de decomposição térmica para Q começou em torno de 37 °C a 235 °C, com pico na DTG em 68 °C, perda inicial de massa de 6,8%, porém segundo estágio de degradação térmica ocorreu entre 235 a 588 °C com pico máximo de 306 °C na curva de DTG e a perda final de massa de 58,1%, resultados próximos foram descritos por Santana *et al.* (2017) e Júnior *et al.* (2017).

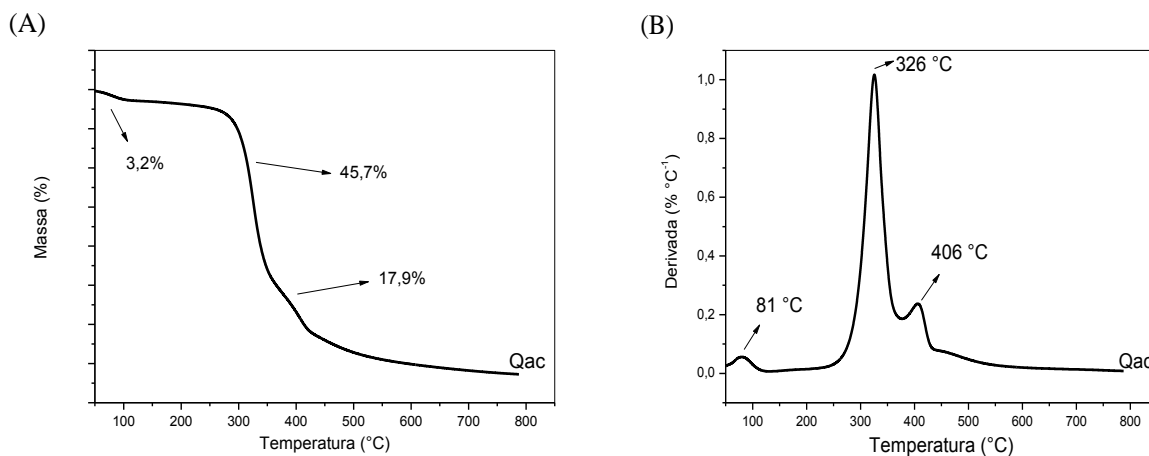
**Figura 15.** Ilustra as curvas de TG (A) e DTG (B) da quitosana.



A perda de massa no primeiro evento de degradação térmica ocorreu em consequência à eliminação de água da parte superficial do material, das ligações da água dos grupos amina e hidroxila, entretanto, no segundo evento a perda de massa estar relacionada à degradação térmica da ligação éter da estrutura do polímero, a pirólise (decomposição) de polissacarídeos pela perda de ligações glicosídicas e também a eliminação de produtos voláteis (Patil, *et al.* 2017; Santana, *et al.* 2017; Júnior, *et al.* 2017).

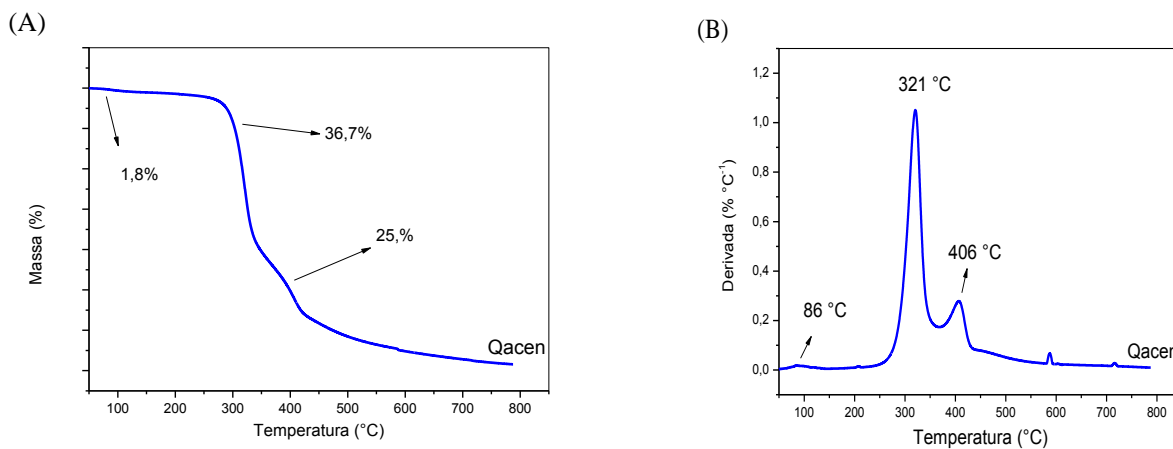
Na Figura 16 observa-se o primeiro estágio de degradação térmica menos intenso em comparação a Q, com estágio de decomposição começando entre 54 °C a 225 °C com pico máximo na curva de DTG em 80°C, com perda de massa de 3,2%, o segundo estágio tem início a 225 a 363 °C com pico máximo de 325 °C na curva de DTG, com perda de massa de 45,7%, perda menor em comparação a Q e o terceiro evento ocorreu a 363 a 506 °C, podendo ser confirmado no pico de 406 °C da DTG (Figura 16 B), com perda de massa menor que o evento anterior (17,9%).

**Figura 16.** Curvas TG (A) e DTG (B) do derivado Qac.



O derivado Qacen apresentou o primeiro estágio de decomposição térmica em temperatura maior que Qac, entre 71 °C a 247 °C (Figura 17 A), com pico máximo de 86 °C na curva de DTG (Figura 17 B), com pouca perda de massa (1,8%), uma redução significativa em relação a Q e Qac. Entretanto, o segundo estágio foi mais intenso dos três eventos, ocorreu entre 247 °C a 341 °C, com pico máximo 321 °C da curva de DTG, com perda de massa de 36,7%.

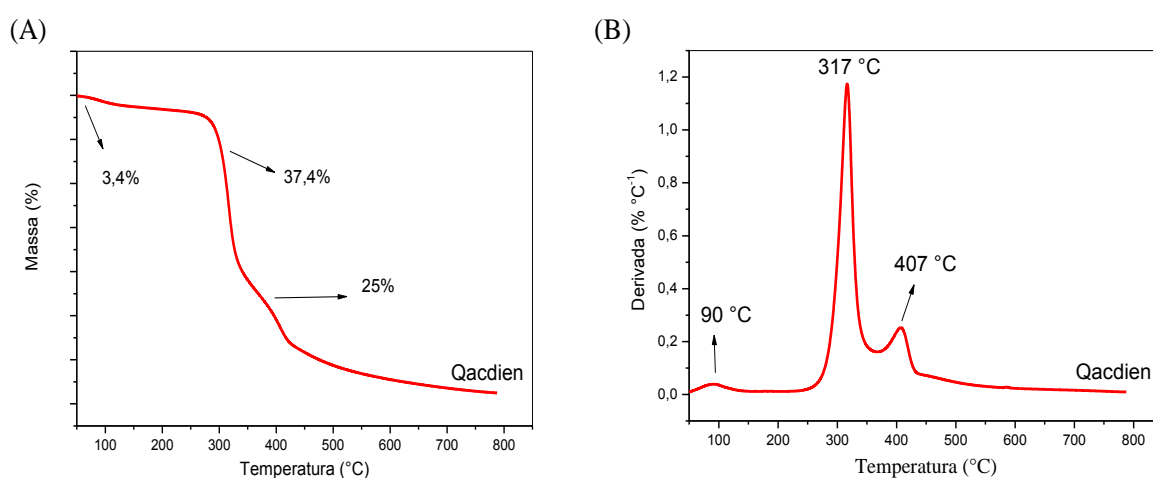
**Figura 17.** Curvas TG (A) e DTG (B) do derivado Qacen.



O terceiro estágio de degradação térmica foi menos intenso em relação ao segundo, ocorreu entre 341 °C a 558 °C, confirmado no pico de 406 °C (Figura 17 B), ocasionou perda de massa de 25,1%. Esse estágio de decomposição térmica poderá está relacionado à degradação de elementos voláteis da amostra (Canevarolo Jr, 2007).

Para Qacdien (Figura 18) o processo de decomposição térmica ocorreu similar ao de Qacen, porém com maior perda de massa (3,4%) no primeiro estágio de degradação entre 67°C a 247 °C, com pico inicial na DTG em 90,5 °C, e no segundo estágio de decomposição ocorreu entre 247 °C a 345 °C com derivada de pico em 316 °C, com perda de massa de 37,4%.

**Figura 18.** Curvas TG (A) e DTG (B) do derivado Qacdien mostrando os três estágios de degradação térmica.

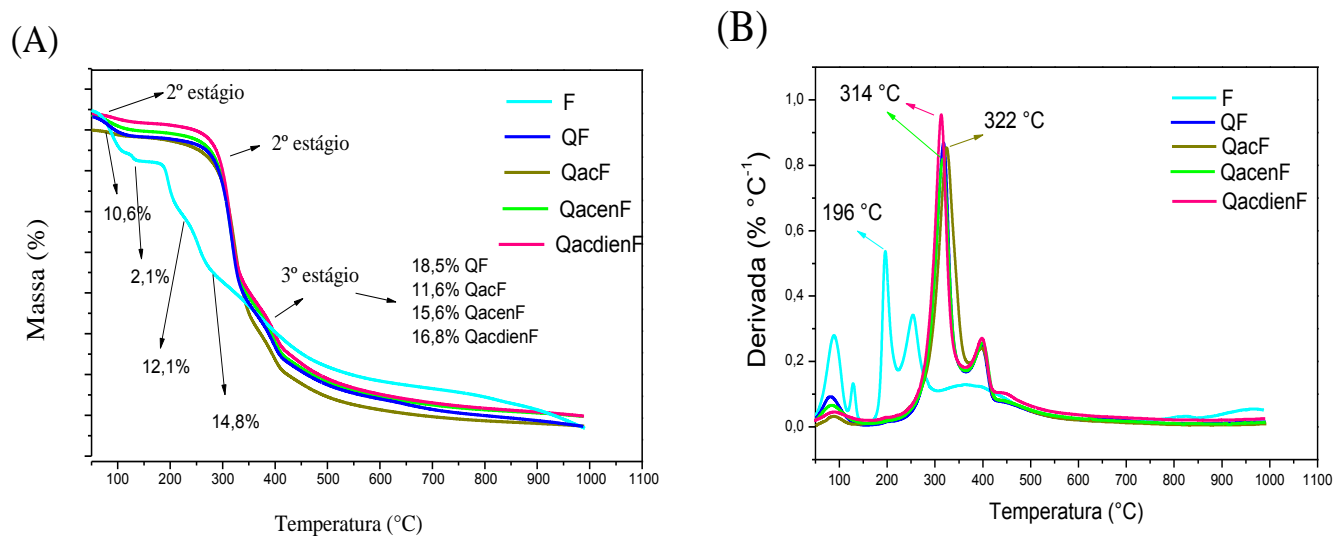


A síntese da quitosana com acetilacetona (Qac) possibilitou aos derivados uma pequena resistência à decomposição térmica inicial em relação à quitosana pura (Q), viabilizando um menor índice de perda de massa, propiciando a esses derivados uma estabilidade térmica melhorada em comparação a quitosana pura. Essa melhoria pode estar relacionada aos grupos hidrofóbicos de Qac serem susceptíveis a interações eletrostáticas com

toda a cadeia polimérica, propiciando um aumento na ordenação da estrutura cristalina, apesar do índice de cristalinidade de Qac ser inferior a quitosana pura, corroborando com Pereira *et al.* (2014).

A Figura 19 mostra as curvas de TG e suas derivadas dos derivados de quitosana incorporados ao fármaco ceftazidima(F).

**Figura 19.** Ilustração das curvas de TG (A) e DTG (B) do fármaco ceftazidima (F), QF, QacF, QacenF e QacdienF.



De acordo com a Figura 19, o antibiótico ceftazidima apresentou cinco eventos de degradação térmica (Tabela 3). O primeiro estágio de decomposição térmica ocorreu em 33°C até 108 °C com pico na DTG de 87,9 °C e perda de massa de 10,6%; o segundo estágio ocorreu a 149 °C com pico máximo na DTG em 128 °C e perda de massa de 2,1 %; o terceiro estágio foi o mais extenso com ocorrência a 217 °C com pico máximo de maior intensidade na DTG em 196 °C e perda de massa de 12,1%; o quarto evento de degradação térmica ocorreu em 281 °C, com DTG de pico máximo em 253 °C com perda de massa de 14,8%, e quinto estágio ocorreu entre 281 °C a 531 °C com pico máximo na DTG em 365 °C (Figura 19 B) e perda de massa de 24,1%, corroborando com Moreno & Salgado (2010).

**Tabela 3.** Eventos térmicos das amostras de F, QF, QacF, QacenF e QacdienF nas curvas de TG, pico de DTG e fluxo de calor em DSC nas taxas de aquecimento de 20 °C/min.

Eventos térmicos		Amostra				
		F	QF	QacF	QacenF	QacdienF
	Temperatura (°C)	33-108	43-123	40-170	34-243	31-142
	TG					
Primeiro	Massa (%)	10,6	4,7	2,0	5,6	3,8
	Pico DTG (°C)	87,88	28,6	88,3	83,8	91,3
	Pico endotermico	102,5	30,8	90,5	95,7	106
	DSC (°C)					
	Temperatura (°C)	108-149	123-330	172-358	243-339	176-333
Segundo	Massa (%)	2,1	33,9	45,5	34,6	32,7
	Pico DTG (°C)	128,1	316	322,3	315	314,8
	Pico DSC (°C)	267,1	330	334,7	330	328,52
Terceiro	Temperatura (°C)	149-217	330,3-417	358-411	339-416	334-410
	Massa (%)	12,14	18,5	11,6	15,6	16,8
	Pico DTG (°C)	195,6	293,2	334,7	398,4	399,9
Quarto	Temperatura (°C)	216,9-281				
	Massa (%)	14,8				
	Pico DTG (°C)	253,5				
Quinto	Temperatura (°C)	281-531,5				
	Massa (%)	24,1				
	Pico DTG (°C)	365				

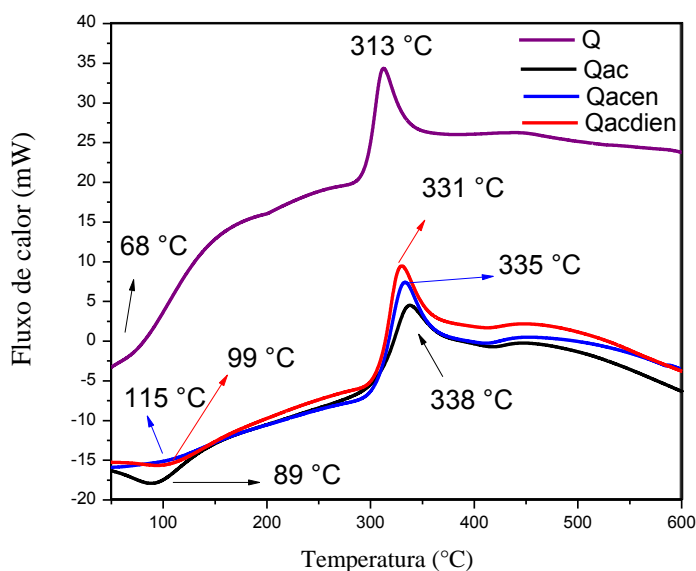
Fonte: autoria própria (2018).

Segundo a Tabela 3 e Figura 19, em QF ocorreu um estágio térmico a mais (em 417°C, com pico na DTG em 395 °C e perda de massa de 18,5% em comparação a Q. Já para QacF, QacenF e QacdienF, os três estágios de degradação térmica foram similares aos mesmos dos derivados sem o fármaco, porém com estágios de degradações em temperaturas menores, mas com perda de massa maior no segundo estágio e menor no terceiro evento.

A incorporação do fármaco ceftazidima ( $C_{22}H_{32}N_6O_{12}S_2$ ) a quitosana pura e aos seus derivados Qac, Qacen e Qacdien proporcionou perda de estabilidade térmica ao material, com início da degradação térmica a temperaturas mais baixas, mas não mudou significativamente o perfil de degradação térmica do material em comparação aos derivados sem o fármaco.

A Figura 20 mostra o DSC dos materiais. A Q, Qac, Qacen e Qacdien apresentaram um pico endotérmico e outro exotérmico. O pico endotérmico está relacionado à perda de umidade por vaporização de água das ligações de hidrogênio das moléculas dos grupos hidroxila e amina, e o pico exotérmico está ligado à degradação da estrutura polissacarídica da molécula e dos anéis sacarídeos do polímero e unidades de amina (Silva, Fideles & Fook, 2015; Sakurai, Maegawa & Takahashi, 2000; Patil, *et al.* 2017; Seghir & Benhamza, 2017; Júnior, *et al.* 2017).

**Figura 20.** Ilustração do fluxo de calor nas curvas de DSC para Q, Qac, Qacen e Qacdien.

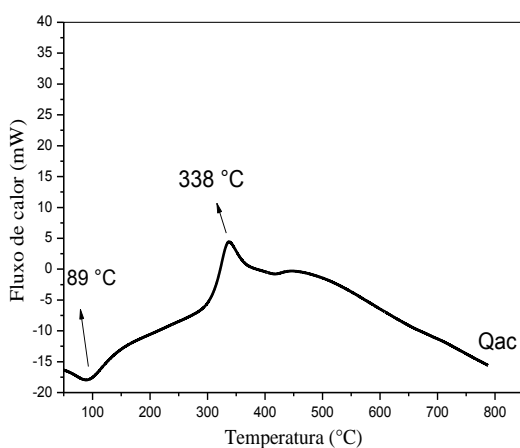


A Figura 21 mostra que após a primeira modificação da quitosana (Qac) houve uma mudança de fluxo de calor nos pico endotérmico e exotérmico (89 °C e 338 °C,



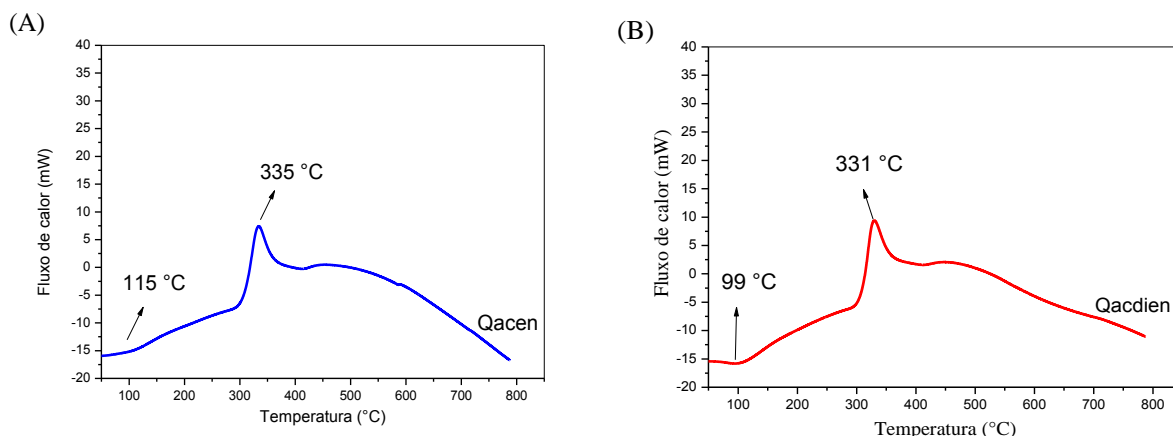
respectivamente). Essa mudança pode ter ocorrido em consequência a quebra de mais ligações de hidrogênio da água pela presença da incorporação de grupo carbonila e éter no grupo amina do carbono 2 (NH<sub>2</sub>) do derivado Qac, e também por causa do aumento linear da ramificação na cadeia monomérica do carbono 2.

**Figura 21.** Ilustração do fluxo de calor de Qac.



O derivado Qacen (Figura 22 A) em comparação a Qac, houve aumento da temperatura do pico de decomposição endotérmico (115 °C), com menor perda de água, porém o pico exotérmico diminuiu (335 °C), provavelmente em consequência à incorporação de grupos aminas (orgânicos) do etilenodiamina no final da ramificação do carbono 2, na substituição do oxigênio no radical éter por grupos amina (NH<sub>2</sub>) com necessidade de menos energia para quebra das ligações, corroborando com Pereira *et al.* (2014).

**Figura 22.** Ilustração do fluxo de calor de Qacem e Qacdien.

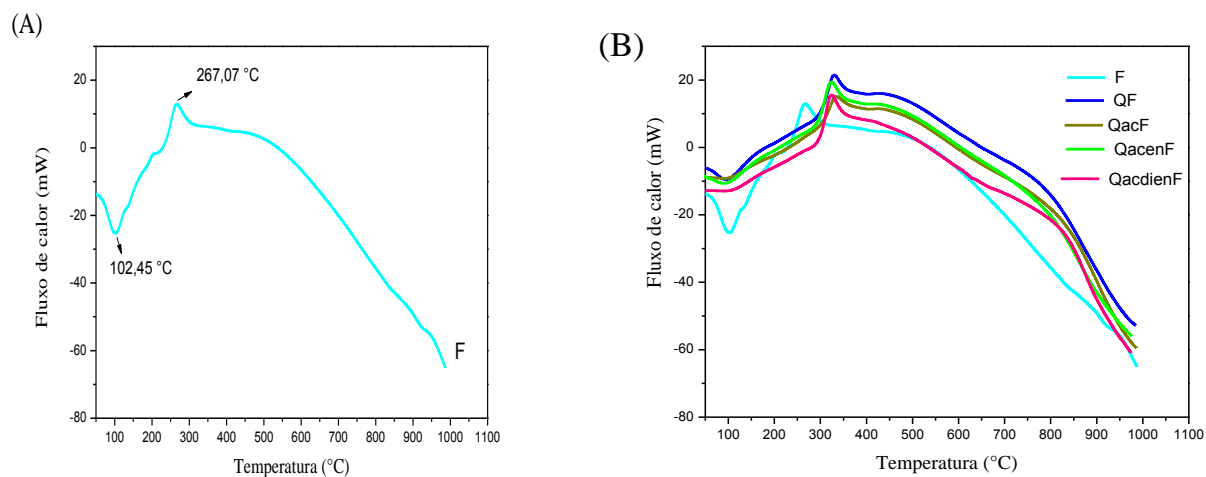


Em Qacdien (Figura 22 B) em comparação a Qac não houve variação significativa de energia no pico endotérmico (99 °C), entretanto, percebe-se no pico exotérmico (331 °C) um aumento da intensidade da energia necessário para decomposição do Qacdien, provavelmente por causa da degradação térmica das quebra das ligações simples e duplas das cadeias poliméricas dos grupos amina proveniente da incorporação do dietilenotriamina, porém precisou de temperatura menor para degradar o material, em consequência ao seu grau de cristalinidade ser inferior.

O derivado Qac comportou-se mais estável termicamente em comparação a quitosana pura e os seus derivados Qacem e Qacdien ( $Qac > Qacem > Qacdien$ ).

A Figura 23 mostra que a incorporação do fármaco ceftazidima não alterou significativamente a estabilidade térmica dos derivados. O fármaco apresentou pico endotérmico em temperatura maior que Q (F 102 °C), porém o exotérmico foi em temperatura menor (F 267 °C), corroborando com resultado de Moreno & Salgado (2010).

**Figura 23.** Ilustração dos picos endotérmico e exotérmicos nas curvas de DSC de ceftazidima (F) (A), Q e derivados incorporado a ceftazidima (B).



A Figura 23 (B) mostra que os derivados incorporados a F, em comparação aos derivados sem F, apresentaram picos endotérmico [QF (94 °C), QacF (90 °C), QacenF (95 °C) e QacdienF (106 °C)] e exotérmico [QF (330 °C), QacF (335 °C), QacenF (330 °C) e QacdienF (328 °C)] em temperaturas menores. Entretanto, similares aos derivados sem o fármaco.

### 3. 1 Propriedades biológicas

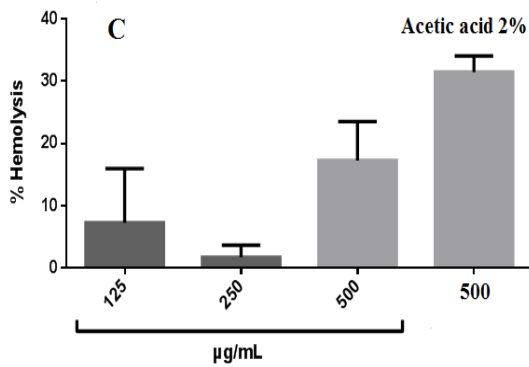
Conforme a literatura, para um material ser promissor como biomaterial é fundamental que o mesmo seja biocompatibilidade (Dang, *et al.* 2018), que tenha um índice aceitável de afinidade com o plasma sanguíneo (Yang, *et al.* 2008), haja vista que taxa elevadas e frequentes de hemólise *in vivo*, podem causar sérios problemas a saúde.

O ensaio de hemólise de Q e derivados diluídos em ácido acético (2%) nas concentrações 500, 250 e 125 µg/mL apresentaram percentual de hemólise maior que 20% (Figura 24 A) em todas as amostras. A literatura descreve que solução de ácido acético,

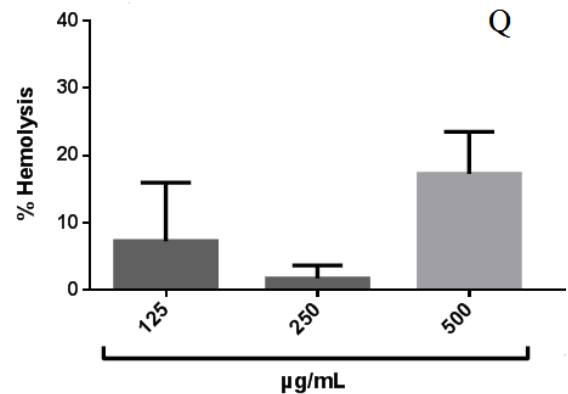
mesmo em concentrações baixas, podem induzir a coagulação sanguínea e deformação dos eritrócitos, podendo provocar ruptura da membrana de célula sanguínea (Yang, *et al.* 2008). Porém, em análise usando DMSO (1%), como solvente preparado em água destilada, esse índice caiu para 3-20% e em DMSO (1%) (Figura 24 B), preparado em solução salina 0,9%, diminuiu para menos de 3% (Figura 24 C), resultado melhor que o resultado do solvente isolado (Figura 24 D).

**Figura 24.** Porcentagem de hemólise da quitosana diluída em ácido acético 2% (A), DMSO 1% preparado com água destilada (B), DMSO (1%) preparado em solução salina (0,9%) (C) e DMSO (1%) em solução salina isolado (D) nas concentrações de 500, 250 e 125 µg/mL.

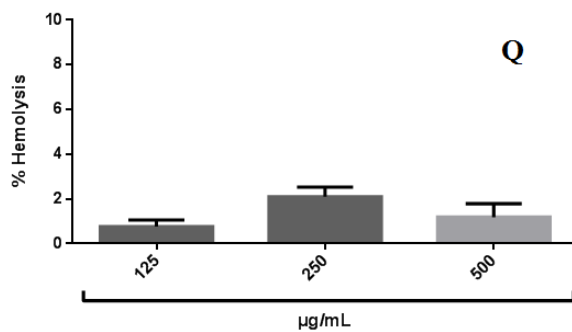
(A)



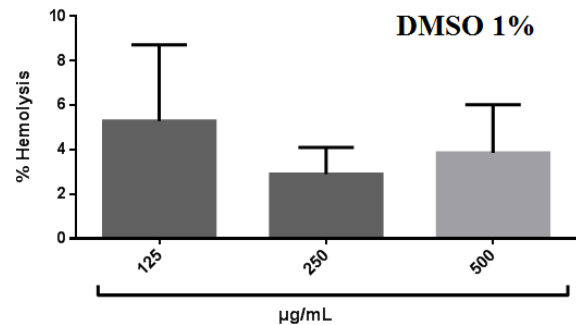
(B)



(C)



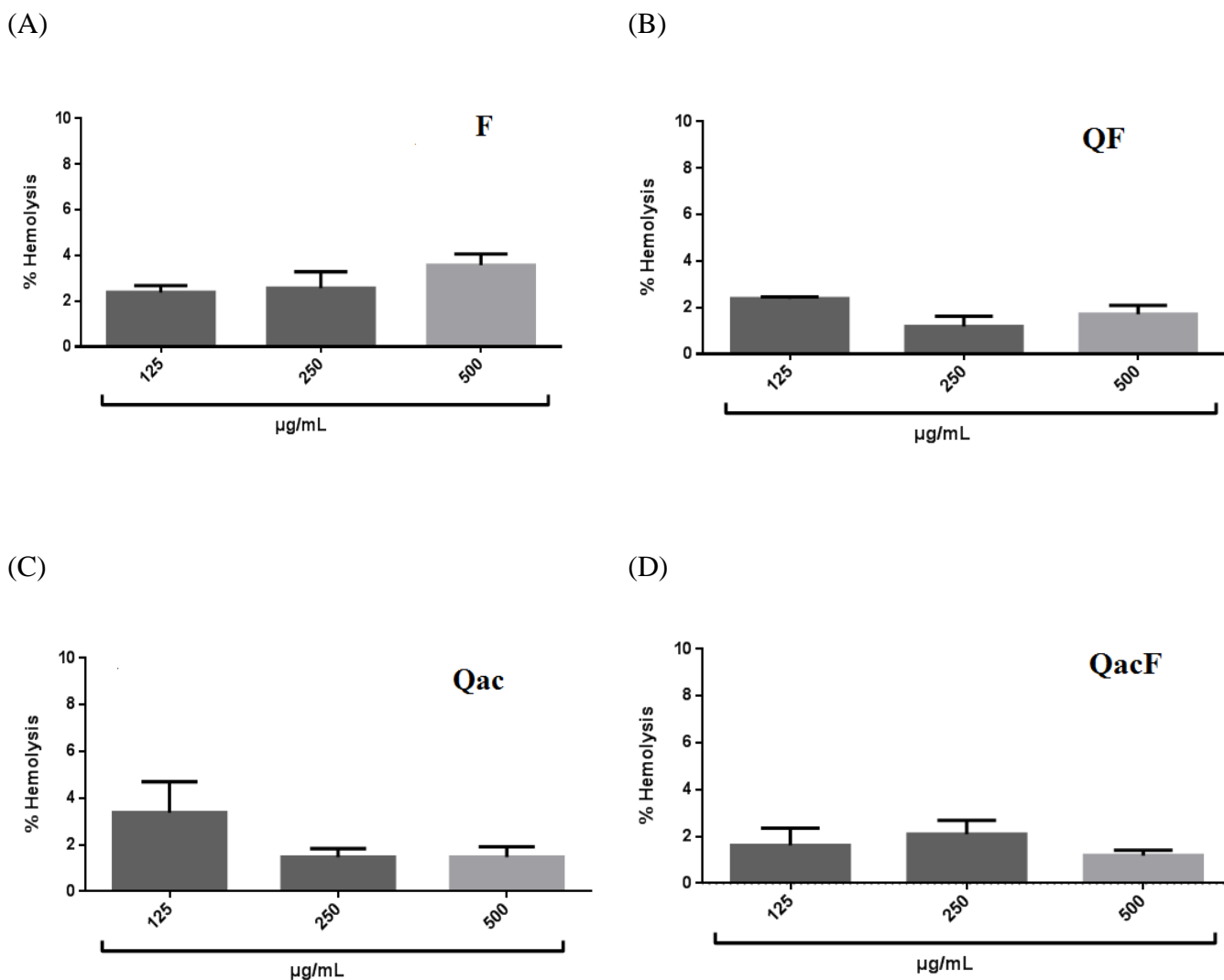
(D)



Ocorreu toxicidade hemolítica abaixo de 10% nas concentrações testadas: 500, 250 e 125  $\mu\text{g/mL}$  para todas as amostras: Q, Qac, Qacen, Qacdien, F, QF, QacF, QacenF e QacdienF diluídas em DMSO (1%) preparado em solução salina a 0,9%, indicando biocompatibilidade dos derivados com as hemácias, corroborando com estudo de Dang *et al.* (2018) em estudo com quitosana modificada com 3,6- *O* - *N*- acetil-etilenodiamina.

Quando avaliado a porcentagem de hemólise na amostra de quitosana pura (Figura 24 C), ocorreu menos de 2% de efeito hemolítico para Q na concentração mais elevada (500  $\mu\text{g/mL}$ ), baixando mais nas concentrações menores (250 e 125  $\mu\text{g/mL}$ ), entretanto na concentrações 250  $\mu\text{g/mL}$  a taxa hemolítica foi maior que na maior concentrações, isso deve ter ocorrido em consequência a algum fator externo como pressão de pipetagem, assim como provavelmente ocorreu na amostra QF e Qac na concentração 125  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 25).

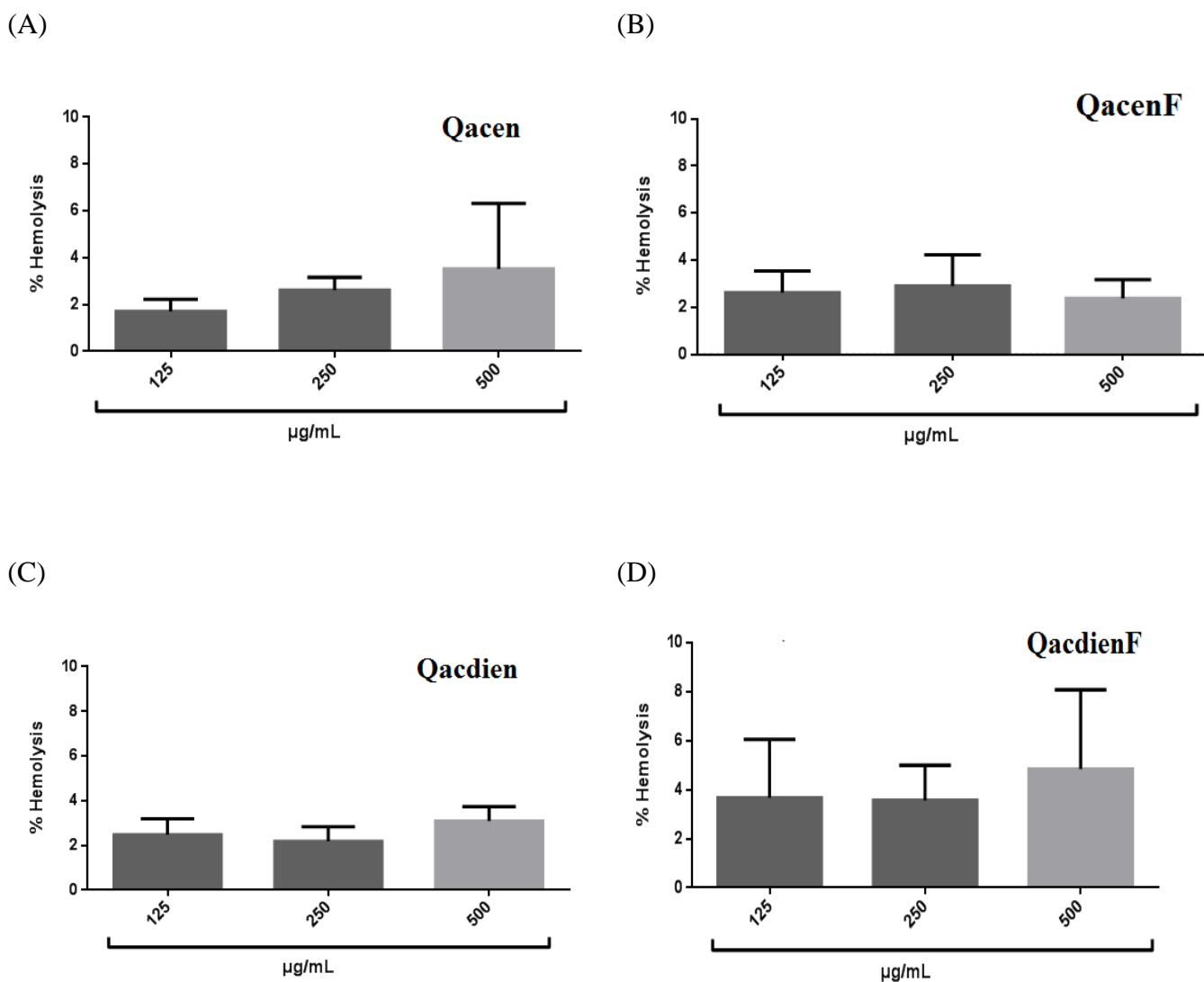
**Figura 25.** Porcentagem de hemólise das amostras Ceftazidima (A), QF (B), Qac (C) e QacF (D) nas concentrações de 500, 250 e 125 µg/mL.



Os derivados Qac, Qacen e Qacdien, apresentaram taxas hemolíticas abaixo de 4% em todas as concentrações, assim como os mesmos incorporados ao fármaco a toxicidade foi menor para QacF (Figura 25 D) e QacenF em comparação a Qac e Qacen, respectivamente (Figura 26), porém maior que a taxa hemolítica de Q, provavelmente em consequência a maior concentração de grupos amina (-NH<sub>2</sub>), assim como descreveu Dang *et al.* (2018). Entretanto, a Figura 26 (D) mostra que o fármaco ceftazidima interferiu na ação hemolítica de

QacdienF, apresentando efeito hemolítico superior ao derivado sem o fármaco, porém estatisticamente não apresentaram diferenças significativa ( $p < 0,05$ ).

**Figura 26.** Porcentagem de hemólise das amostras Qacen (A), QacenF (B), Qacdien (C) e QacdienF (D) nas concentrações de 500, 250 e 125  $\mu\text{g/mL}$ .



Os resultados indicaram baixa taxa hemolítica dos derivados com e sem o fármaco, não houve diferenças significativas nos valores de hemólise ( $p < 0,05$ ) entre Q e os derivados nas concentrações de 500, 250 e 125  $\mu\text{g/mL}$ , indicando bicompatibilidade, baixa toxicidade hemolítica permitida (Dang, *et al.* 2018).

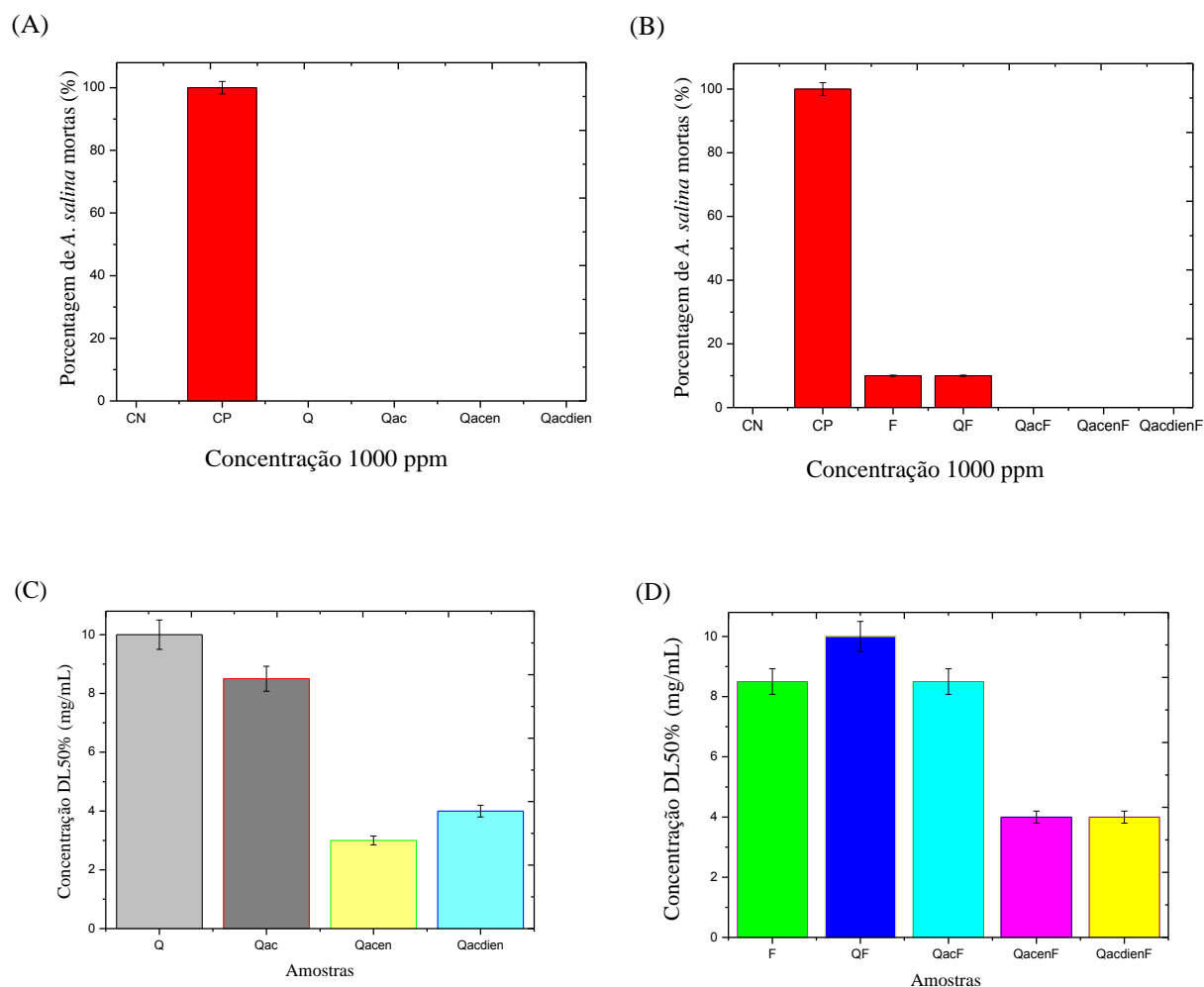
Contudo, o grau de desacetilação (GD) e peso molecular da quitosana poderá ter interferido na ocorrência de hemólise, uma vez que já foi descrito na literatura que quitosana com GD próximo ou maior que 80% poderá apresentar moderada atividade hemostática por induzir a modulação da atividade fibrinolítica de macrófagos (Yang, *et al.* 2008) ou induzir ação hemolítica por meio de interação eletrostática (Zhou, *et al.* 2014), haja vista que os grupamentos amino protonados ( $\text{NH}_3^+$ ) tem a capacidade de atrair molécula com carga negativa como as glicoproteínas presentes nos eritrócitos, podendo provocar a quebra da membrana celular.

No ensaio *in vivo* de toxicidade aguda, os náuplios de *Artemia salina* foram usados como bioindicadores (Libralato, 2014) para avaliar o grau de toxicidade da quitosana e derivados com e sem o ceftazidima nas concentrações 1, 10, 30, 50, 100, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 8500 e 10.000 ppm.

A porcentagem de náuplios mortos foi menor que 10% em concentrações inferiores e igual a 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (1000 ppm) nas amostras de F, Q, Qac, Qacen, Qacdien, QacF, QacenF e QacdienF (Figura 27).



**Figura 27.** Porcentagem de morte abaixo de 10% de náuplios (*Artemia salina*) das amostras Q, Qac, Qacen, Qacdien (A) e F, QF, QacF, QacenF, QacdienF (B) em concentração de 1000 ppm e DL<sub>50%</sub> (C, D) em 1000-10.000 ppm (1-10 mg/mL).



De acordo com a Tabela 4, os derivado com e sem o fármaco apresentaram-se sem efeito tóxico frente a *Artemia salina* em concentrações abaixo de 1000 ppm, com dose letal de 50% (DL<sub>50%</sub>) maior que 3000 ppm, corroborando com Ribeiro *et al.* (2015). Contudo, o fármaco ceftazidima não apresentou interferência significativa no DL<sub>50</sub> dos derivados, visto que isolado apresetou DL<sub>50</sub> maior que de 8500 ppm.

**Tabela 4.** Dose letal (DL50%) de náuplios (*Artemia salina*) das amostras Q, QF, F, Qac, QacF, Qacen, QacenF, Qacdien e QacdienF.

Amostra	Dose DL50% (ppm)	Média de náuplios mortos após a incubação	Mortalidade (%)
Controle positivo (DMSO puro)	0,5 (mL)	10 ± 0,0	100
Controle negativo (água salina)	Pura	0,0 ± 0,0	0
F	8500	5,7 ± 1,56	57
Q	> 10000	1,7 ± 1,11	17
Qac	8500	5,3 ± 1,56	53
Qacen	3000	5,3 ± 0,44	53
Qacdien	4000	5 ± 2,00	50
QF	> 10000	2 ± 1,67	20
QacF	8500	4,7 ± 1,11	47
QacenF	4000	5 ± 0,89	50
QacdienF	4000	6 ± 0,67	60

Fonte: autoria própria (2018).

Conforme a Organização Mundial de Saúde (OMS), produtos naturais como a quitosana são classificados como substâncias tóxicas quando apresentam valores de DL<sub>50%</sub> abaixo de 1000 ppm para *Artemia salina* (Mendonça, *et al.* 2015).

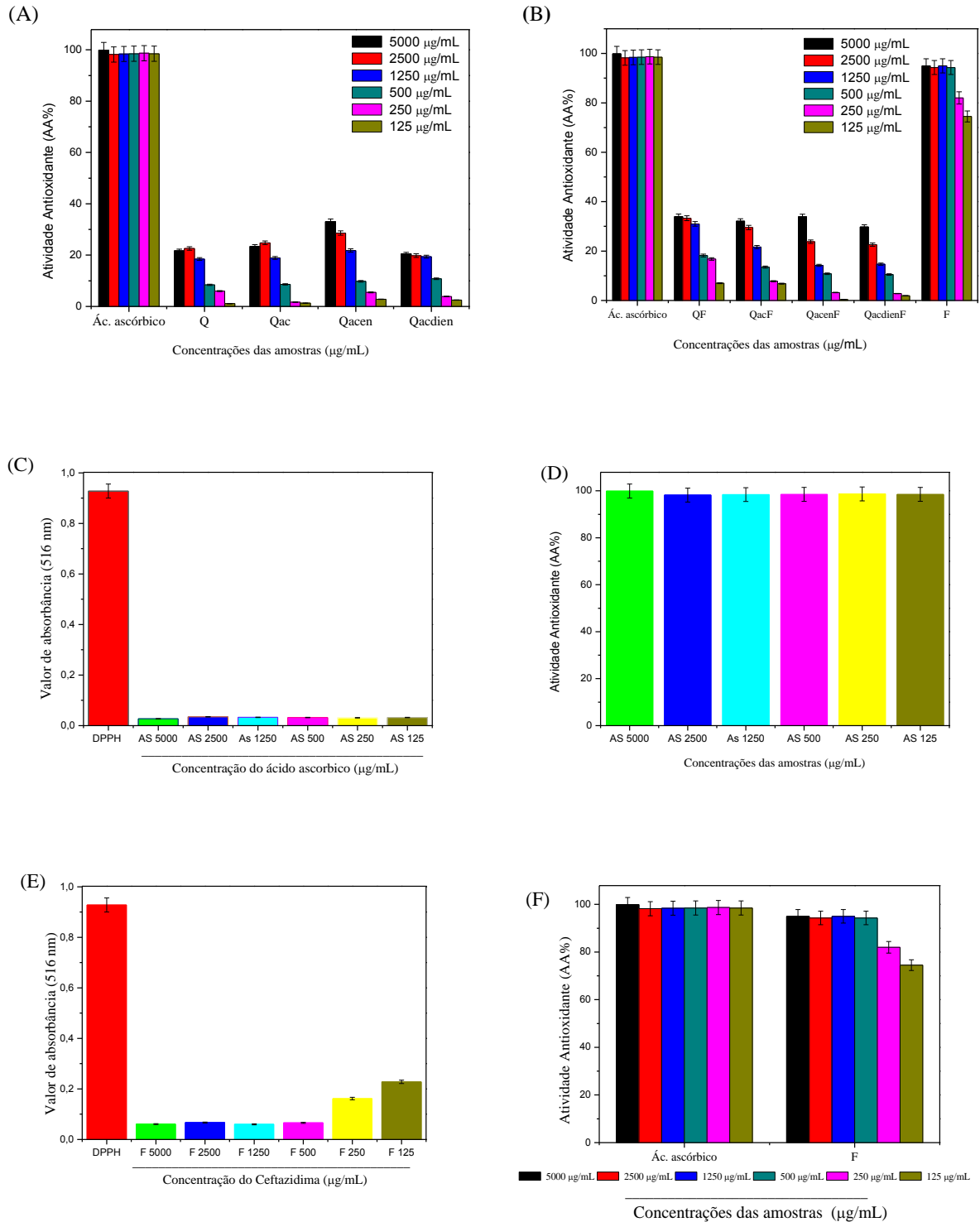
A morte de alguns náuplios na presença dos derivados de quitosana ocorreu provavelmente em consequência a alta viscosidade da quitosana, que pode ter provocado a formação de uma camada viscosa nas brânquias dos náuplios dificultando a entrada de oxigênio, assim como descreveu Parvez *et al.* (2012).

O estudo *in vitro* de atividade de remoção de espécie reativa de oxigênio dos derivados foi determinado pelo método de eliminação de radicais DPPH e comparado com a atividade do ácido ascórbico (vitamina C, antioxidante padrão que age protegendo as células contra as espécies reativas de oxigênio). A solução de DPPH com metanol apresenta cor púrpura, mas

após redução por um antioxidante ou uma espécie radicalar muda para amarelo, levando a diminuição na absorção (Ak & Gulçin, 2008).

Assim, no ensaio de atividade antioxidante (AA) conforme (Ak & Gulçin, 2008), a quitosana e derivados apresentaram atividade antioxidante menor que a do ácido ascórbico (Figura 28 A, B), corroborando com Anraku *et al.* (2011). Porém, o fármaco ceftazidima apresentou AA similar ao ácido ascórbico, nas mesmas concentrações (Figura 28 B), mas sem diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

A **Figura 28**. Porcentagem de atividade antioxidante da Q, Qac, Qacen, Qacdien (A), QF, QacF, QacenF, QacdienF (B), e valor de absorbância e AA do ác. ascórbico (C, D) e do fármaco ceftazidima (E, F) nas concentrações: 5000, 2500, 1250, 500, 250 e 125 µg/mL.



A Figura 28 mostra as porcentagens de atividade antioxidante (AA) referente à quantidade de DPPH consumida pelo efeito antioxidante dos derivados de quitosana (Anraku *et al.* 2011; Nascimento *et al.* 2011). Quanto maior a degradação de DPPH pela amostra, maior é sua atividade antioxidante, corroborando com estudo descrito por Patil *et al.* (2018) em estudo do potencial antioxidante da curcumina carregada com nanopartículas magnéticas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  revestidas com quitosana, e Ngo *et al.* (2015) em estudos sobre os efeitos antioxidante de quitosana modificada, o qual descreveu resultados de AA significativos, mas inferiores ao do ácido ascórbico.

Conforme a figura anterior, os derivados apresentaram capacidade de neutralização de DPPH, com índice de atividade antioxidante entre 1-34%, porém com taxa maior nas concentrações mais elevadas (5000, 2500 e 1250  $\mu\text{g/mL}$ ), com destaque para Qacen. No entanto, os derivados com o fármaco apresentam efeitos antioxidantes maiores, principalmente nas concentrações 5000, 2500 e 1250  $\mu\text{g/mL}$  (31-34%), em consequência ao efeito antioxidante apresentado pelo fármaco (Figura 28 F), porém todas as amostras mostraram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em comparação ao ác. Ascórbico e o fármaco isolado. Não foi possível calcular o  $\text{IC}_{50\%}$  de AA das amostras.

A degradação do DPPH foi diretamente proporcional ao aumento da concentração da amostra. Todos os derivados apresentaram capacidade de degradação de DPPH, visto que os percentuais de absorvâncias após reação de DPPH foram diferente do controle negativo e de DPPH isolado, resultados diferentes foram descritos por Chen *et al.* (2018) em estudo com nanopartículas de quitosana modificada, em que descreveu resultado maiores que 20% de AA.

Os resultados foram positivos, a quitosana e seus derivados possuem atividade antioxidante, provavelmente por agir na eliminação das espécies reativas de oxigênio (ROS) ou induzido a interrupção da reação oxidação, prevenindo os danos oxidativos, assim como reportou Xu *et al.* (2018).

A Tabela 5 traz os resultados de atividade gastroprotetora do experimento *in vivo* em rato com úlcera gástrica crônica induzida por ácido acético (80%). O grupo de animais com úlcera sem tratamento produziu uma média de área lesionada de  $190,3 \pm 25,4 \text{ mm}^3$  (controle negativo/grupo veículo), e o grupo com tratamento oral com cimetidina/grupo controle positivo (dose diária de 100 mg/kg por sete dias) reduziu a área ulcerada em 76,9% ( $43,9 \pm 10,2 \text{ mm}^3$ ) em comparação ao grupo controle negativo/veículo, resultado próximo foi reportado por Silva *et al.* (2016). O tratamento com administração oral de uma dose diária de 80 mg/kg por um período consecutivo de sete dias diminuiu significativamente a área da lesão ulcerativa (Figura 29 A) em 50,7% ( $93,6 \pm 35,5 \text{ mm}^3$ ) para quitosana pura, resultado semelhante foi reportado por Ito & Ishihara (2000); já Qac teve redução de 18,4% ( $155,3 \pm 21,5 \text{ mm}^3$ ), Qacen 55,2% ( $85,3 \pm 18,0 \text{ mm}^3$ ) e Qacdien 68,1% ( $60,8 \pm 28,7 \text{ mm}^3$ ) (Figura 29 B), em relação ao grupo controle negativo/veículo, corroborando com Servat-Medina *et al.* (2015). Esta atividade foi potencializada com a incorporação do fármaco ceftazidima aos derivados (Figura 29 C). Quitosana incorporada ao ceftazidima e os derivados Qacen, Qacdien, QacF, QacenF e QacdienF apresentaram diferença significativa de atividade gastroprotetora ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo veículo.

**Tabela 5.** Atividade gastroprotetora após sete dias de tratamentos com quitosana e derivados (dose diária de 80 mg/kg), Cimetidina/grupo controle positivo (100 mg/kg) e grupo veículo sem tratamento (controle negativo), na cicatrização de ferida de úlcera gástrica induzida por ácido acético (80%).

Amostra (grupos)	Média da área total lesionada ( $\text{mm}^3$ ) e erro padrão da média (S.E.M)	Atividade gastroprotetora (%)
Controle negativo (veículo)	$190,3 \pm 25,4$	0,0
Controle Positivo (Cimetidina)	$43,9 \pm 10,2$	76,9
Q pura	$93,6 \pm 35,5$	50,7

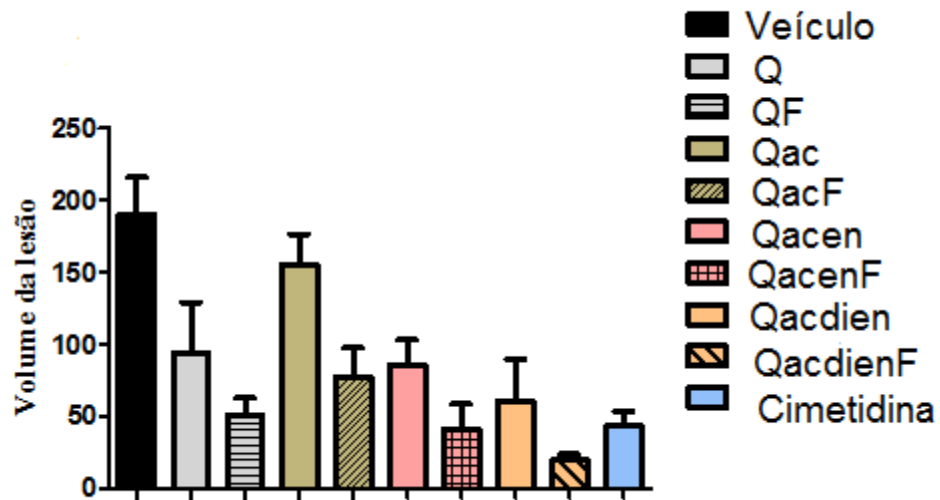
---

Qac	$155,3 \pm 21,5$	18,4
Qacen	$85,3 \pm 18,0$	55,2
Qacdien	$60,8 \pm 28,7$	68,1
QF	$50,9 \pm 12,0$	73,2
QacF	$77,3 \pm 20,4$	59,4
QacenF	$41,0 \pm 17,8$	78,5
QacdienF	$19,9 \pm 3,9$	89,7

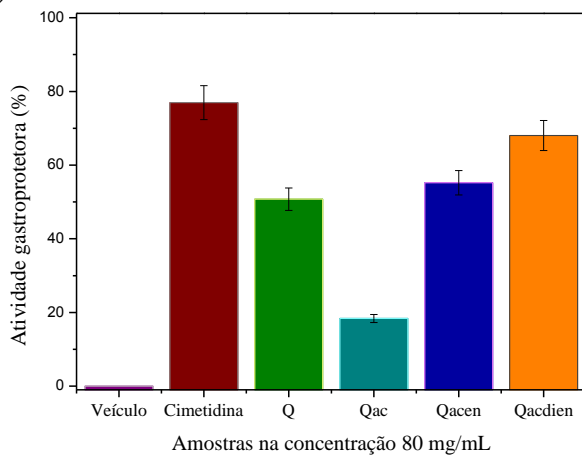
---

**Figura 29.** Volume da lesão gástrica (A) e atividade gastroprotetora do grupo veículo/controlado negativo, cimetidina/grupo controle positivo, quitosana pura e derivados (B), quitosana e derivados incorporados a ceftazidima (C), na concentração de 80 mg/mL na cicatrização de ferida de úlcera gástrica induzida por ácido acético (80%).

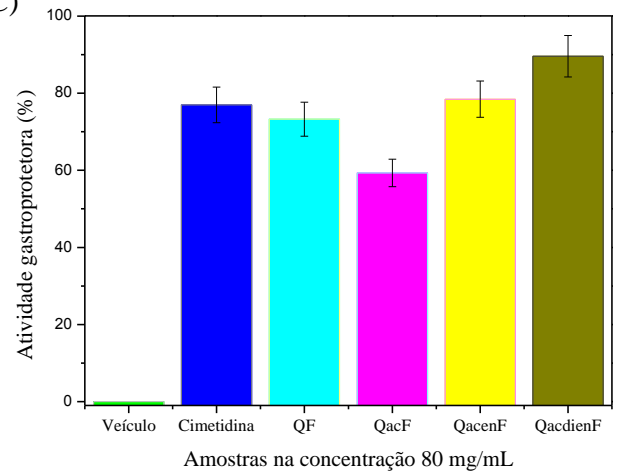
(A)



(B)



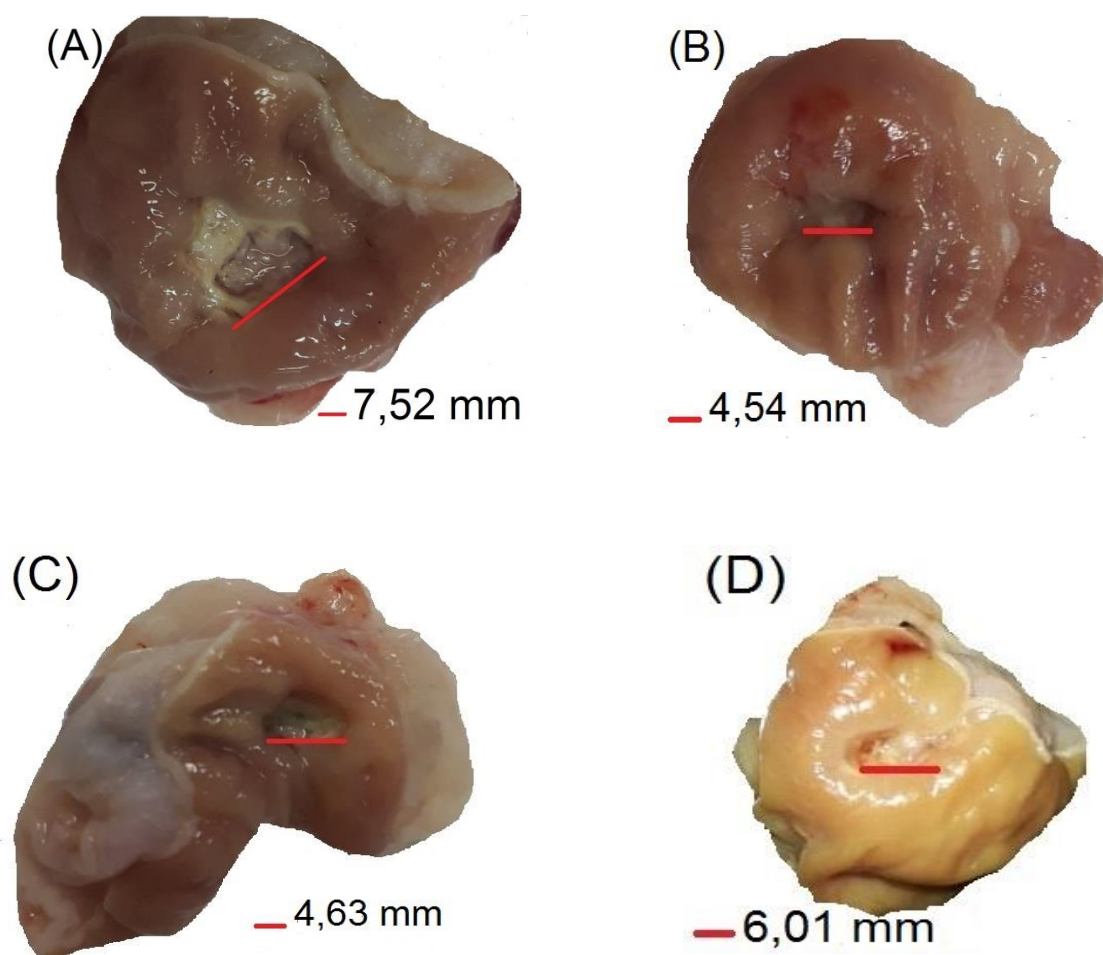
(C)

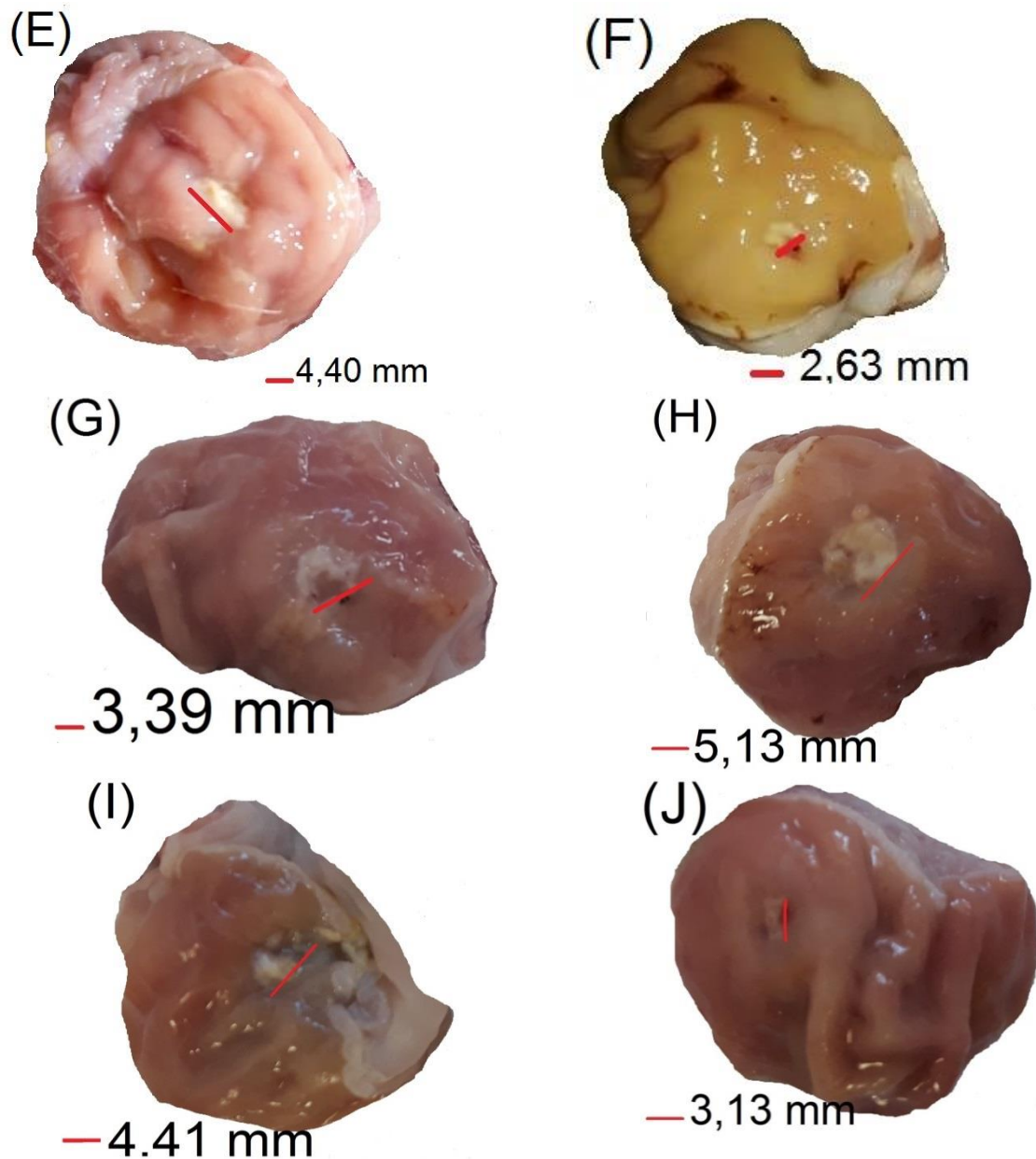




A Figura 29 (A) mostra que o tratamento com os derivados Qacen e Qacdien atuaram de forma positiva no controle da lesão, com redução de mais de 55% da área ulcerada. Este resultado sugere que provavelmente estes derivados agiram na proteção da área lesionada da mucosa gástrica do estômago, agindo inicialmente como uma barreira gastroprotetora, visto que a mucoadesão do material é um fator importante por evitar a ação de elementos ácidos e enzimas do estômago (Potrich, *et al.* 2010; Silva, *et al.* (2016) em contato direto com a região ulcerada, uma vez que a quitosana apresenta ação anti-inflamatório, propriedade imunomoduladora e reparativo relacionadas a quantidade de grupo amina (Volod'ko, *et al.* 2014; Servat-Medina, *et al.* 2015), com ativação eficiente de macrófago levando a aceleração da atividade cicatrizante de região lesionada (Silva, *et al.* 2006), o que justifica o efeito cicatrizante próximo ao controle cimetidina (Figura 30 B), a quitosana pura (Figura 30 C) e o derivado Qac (Figura 30 D), sugerindo que esta ação mais efetiva pode está relacionada além da quantidade maior de grupo aminas, também a atividade antioxidante apresentada pelos derivados Qacen e Qacdien. Assim como a atividade cicatrizante maior dos derivados QacF, QacenF e QacdienF (Figura 29 B e Figura 30 G, I, J), em relação as derivados Qac, Qacen e Qacdien, está relacionada a ação antibactericida (Rains & Peters,1995) contra algumas bactérias presentes no estômago que podem afetar o processo de cicatrização da lesão gátrica, e o efeito antioxidante apresentado pelo fármaco ceftazidima.

**Figura 30.** Fotografias ilustrativas dos estômagos (os traços indicam a largura da lesão) após sete dias sem tratamento do grupo veículo/controle negativo (A), com tratamentos de administração oral de Cimetidina (100 mg/kg)/grupo controle positivo (B), com tratamento de administração oral (dose diária de 80 mg/kg) de quitosana (C) e derivados Qac (D), Qacen (E), Qacdien (F), quitosana incorporada ao ceftazidima (G), derivados incorporados ao ceftazidima QacF (H), QacenF (I), QacdienF (J), na cicatrização de ferida de úlcera gástrica induzida por ácido acético (80%).





Neste estudo o tratamento oral durante o período consecutivo por sete dias com cimetidina reduziu significativamente a úlcera gástrica induzida pelo ácido acético em rato. Similarmente, o tratamento com quitosana pura e seus derivados com e sem a incorporados do fármaco ceftazidima apresentaram atividades gastroprotetoras positiva, com efeito maior na aceleração da cicatrização da úlcera gástrica para os derivados com incorporação do ceftazidima, revelando que a incorporação do fármaco melhorou o efeito de cicatrização da úlcera gástrica induzida por ácido acético (80%).

#### 4. CONCLUSÃO

A modificação química ocorreu com sucesso, comprovadas principalmente pelas análises FTIR com deslocamento e surgimento de novas bandas associadas a grupos amina e também por meio da análise elementar com aumento do percentual de nitrogênio.

O DRX mostrou uma pequena diminuição do grau de cristalinidade padrão da quitosana quando modificada com as bases aminas e ao ser incorporado ao fármaco.

As curvas TG, DTG e DSC mostraram que os derivados com ou sem fármaco ao serem submetidos a mudanças de temperaturas, comportaram-se estáveis, com perda de massa inicial e final semelhante à quitosana pura.

Os derivados de quitosana incorporados ou não à ceftazidima apresentaram baixo efeito citotóxico para célula sanguínea de mamífero, permitindo boa afinidade com o plasma sanguíneo. O índice hemolítico diminuiu gradativamente com a diminuição das concentrações das amostras e com a diminuição do grau de cristalinidade.

A biocompatibilidade dos derivados foi confirmada pela baixa taxa hemolítica, pela não toxicidade sobre *Artemia salina* em concentrações menores que 1000 ppm, pelo índice significativo de atividade antioxidante nas concentrações menores e igual a 5000 µg/mL.

Os derivados Qacen e Qacdien apresentaram resultados superiores ao da quitosana pura na cicatrização de úlcera gástrica induzida por ácido acético. A incorporação de ceftazidima a estes derivados potencializaram este efeito de cicatrização.

Os resultados potencializam estes derivados de quitosana como promissores biomateriais para a aplicação na área da saúde.

## 5. REFERÊNCIAS

Anraku, M., Fujii, T., Kondo, Y., Kojima, E., Hata, T., Tabuchi, N., & Maruyama, T. (2011). Antioxidant properties of high molecular weight dietary chitosan in vitro and in vivo. *Carbohydrate polymers*, 83(2), 501-505.

Anirudhan, T. S., Divya, P. L., & Nima, J. (2016). Synthesis and characterization of novel drug delivery system using modified chitosan based hydrogel grafted with cyclodextrin. *Chemical Engineering Journal*, 284, 1259-1269.

ANVISA. Bula de Ceftazidima. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=12958382016&pIdAnexo=3125972](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=12958382016&pIdAnexo=3125972). Acessado em 03 de nov. de 2017.

Ak, T., & Gülçin, İ. (2008). Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-biological interactions*, 174(1), 27-37.

Barreiros, A. L. B. S., David, J. M., & David, J. P. D. L. (2006). Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo.

Bianchi, M. D. L. P., & Antunes, L. M. G. (1999). Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev Nutr*, 12(2), 123-30.

Battisti, M. V., & Campana-Filho, S. P. (2009). Obtenção e caracterização de  $\alpha$ -quitina e quitosana de cascas de *Macrobrachium rosenbergii*. *Química Nova*, 31 (8), 2014-2019.

Bhavsar, C., Momin, M., Gharat, S., & Omri, A. (2017). Functionalized and graft copolymers of chitosan and its pharmaceutical applications. *Expert opinion on drug delivery*, 14(10), 1189-1204.

- Cao, Y., Ding, Y., Zhang, L., Shi, G., Sang, X., & Ni, C. (2018). Preparation of surface-modified, micrometer-sized carboxymethyl chitosan drug-loaded microspheres. *Journal of Applied Polymer Science*, 135(4).
- Canevarolo Jr, S. V. (2007). Técnicas de caracterização de polímeros. *Artliber, São Paulo*, v. 430.
- Chaleawlerlert-umpon, S., Nuchuchua, O., Saesoo, S., Gonil, P., Ruktanonchai, U. R., Sajomsang, W., & Pimpha, N. (2011). Effect of citrate spacer on mucoadhesive properties of a novel water-soluble cationic  $\beta$ -cyclodextrin-conjugated chitosan. *Carbohydrate polymers*, 84(1), 186-194.
- Chen, W., Yue, L., Jiang, Q., Liu, X., & Xia, W. (2018). Synthesis of varisized chitosan-selenium nanocomposites through heating treatment and evaluation of their antioxidant properties. *International journal of biological macromolecules*, 114, 751-758.
- Croisier, F., & Jérôme, C. (2013). Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 49(4), 780-792.
- Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M., & Chiellini, E. (2011). Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in polymer science*, 36(8), 981-1014.
- Dang, Q., Liu, K., Liu, C., Xu, T., Yan, J., Yan, F., & Cao, Y. (2018). Preparation, characterization, and evaluation of 3, 6-ON-acetylene diamine modified chitosan as potential antimicrobial wound dressing material. *Carbohydrate polymers*, 180, 1-12.
- Doll, T; Raman, S; Dey, R., & Burkhard, P (2013). Nanoscale assemblies and their biomedical applications. *Journal of the Royal Society Interface* 10:20120740.

- Dutta, P. K., Tripathi, S., Mehrotra, G. K., & Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food chemistry*, *114*(4), 1173-1182.
- Elsabee, M. Z. & Abdou, E. S. (2013). Chitosan based edible films and coatings: A review. *Materials Science and Engineering: C*, *33*(4), 1819-1841.
- Hernandez-Montelongo, J., Lucchesi, E. G., Gonzalez, I., Macedo, W. A. A., Nascimento, V. F., Moraes, A. M., & Cotta, M. A. (2016). Hyaluronan/chitosan nanofilms assembled layer-by-layer and their antibacterial effect: A study using *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *141*, 499-506.
- Hejazi, R., & Amiji, M. (2003). Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. *Journal of controlled release*, *89*(2), 151-165. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(03\)00126-3](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(03)00126-3)
- Ito, M., Ban, A., & Ishihara, M. (2000). Anti-ulcer effects of chitin and chitosan, healthy foods, in rats. *The Japanese journal of pharmacology*, *82*(3), 218-225.
- Junior, A. P. D., Tavares, E. J. M., Alves, T. V. G., de Moura, M. R., da Costa, C. E. F., Júnior, J. O. C. S., e Costa, R. M. R. (2017). Chitosan nanoparticles as a modified diclofenac drug release system. *Journal of Nanoparticle Research*, *19*(8), 274.
- Jiang, W. Z., Cai, Y., & Li, H. Y. (2017). Chitosan-based spray-dried mucoadhesive microspheres for sustained oromucosal drug delivery. *Powder Technology*, *312*, 124-132.
- Kumar, R., Oves, M., Almeelbi, T., Al-Makishah, N. H., e Barakat, M. A. (2017). Hybrid chitosan/polyaniline-polypyrrole biomaterial for enhanced adsorption and antimicrobial activity. *Journal of colloid and interface science*, v. 490, p. 488-496.

Mahfouz, M. G., Galhoum, A. A., Gomaa, N. A., Abdel-Rehem, S. S., Atia, A. A., Vincent, T., & Guibal, E. (2015). Uranium extraction using magnetic nano-based particles of diethylenetriamine-functionalized chitosan: equilibrium and kinetic studies. *Chemical Engineering Journal*, 262, 198-209.

Lopes, E. C., Sousa, K. S., & Airoidi, C. (2009). Chitosan–cyanuric chloride intermediary as a source to incorporate molecules—thermodynamic data of copper/biopolymer interactions. *Thermochimica Acta*, 483(1), 21-28.

Lopes, W. B., Moroni, F. T., Brandeburgo, M. I. H., & Hamaguchi, A. (2002). Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para avaliação da toxicidade de extratos vegetais. *Rev Eletr Hor Científico*, 1, 1-11.

Libralato, G. (2014). The case of *Artemia* spp. in nanoecotoxicology. *Marine environmental research*, 101, 38-43.

Liang, W., Li, M., Zhang, Z., Jiang, Y., Awasthi, M. K., Jiang, S., & Li, R. (2018). Decontamination of Hg (II) from aqueous solution using polyamine-co-thiourea inarched chitosan gel derivatives. *International journal of biological macromolecules*, 113, 106-115.

Lucena, G. L.; Silva, A. G.; Honório, L. M. C., & Santos, V. D. (2013). Remoção de corantes têxteis a partir de soluções aquosas por quitosana modificada com tioacetamida. *Ambi-Agua, Taubaté*, v. 8, n. 1, p. 144-154.

Marani, M. M., Perez, L. O., de Araujo, A. R., Placido, A., Sousa, C. F., Quelemes, P. V., ... & Tomas, A. M. (2017). Thaulin-1: The first antimicrobial peptide isolated from the skin of a Patagonian frog *Pleurodema thaul* (Anura: Leptodactylidae: Leiuperinae) with activity against *Escherichia coli*. *Gene*, 605, 70-80.



Machado, M. O., Lopes, E. C., Sousa, K. S. & Airoidi, C. (2009). The effectiveness of the protected amino group on crosslinked chitosans for copper removal and the thermodynamics of interaction at the solid/liquid interface. *Carbohydrate Polymers*, 77(4), 760-766.

Mendes, A. N., Filgueiras, L. A., Siqueira, M. R. P., Barbosa, G. M., Holandino, C., de Lima Moreira, D. & Nele, M. (2017). Encapsulation of Piper cabralanum (Piperaceae) nonpolar extract in poly (methyl methacrylate) by miniemulsion and evaluation of increase in the effectiveness of antileukemic activity in K562 cells. *International journal of nanomedicine*, 12, 8363.

Mendonça, M. A. G., Naves, P. L. F., Signini, R., & Costa, M. B. (2015). Toxicidade preliminar e potencial antioxidante de quitosana guanidilada. In *Anais do Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão da UEG (CEPE)(ISSN 2447-8687)* (Vol. 2).

Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnan, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E., & Mcl. Aughlin, J. (1982). Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medical Plant Research*, v. 45, n.1, p. 31-34.

Moreno, A. H., & Salgado, H. R. N. (2010). Desenvolvimento de metodologia qualitativa para identificação de ceftazidima. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 31(3), 165-173.

Moura, C. M. de, Muszinski, P., Schmidt, C., Almeida, J., & Pinto, L. A. A. (2007). Quitina e quitosana produzidas a partir de resíduos de camarão e siri: avaliação do processo em escala piloto. *VETOR-Revista de Ciências Exatas e Engenharias*, 16(1), 37-45.

Nascimento, E. G.do, de Caland, L. B., de Medeiros, A. S., Fernandes-Pedrosa, M. F., Soares-Sobrinho, J. L., dos Santos, K. S., & da Silva-Júnior, A. A. (2017). Tailoring Drug Release

Properties by Gradual Changes in the Particle Engineering of Polysaccharide Chitosan Based Powders. *Polymers*, 9(7), 253.

Ngo, D. H., Ngo, D. N., Vo, T. S., Ryu, B., Van Ta, Q., & Kim, S. K. (2012). Protective effects of aminoethyl-chitooligosaccharides against oxidative stress and inflammation in murine microglial BV-2 cells. *Carbohydrate polymers*, 88(2), 743-747.

Ngo, D. H., Vo, T. S., Ngo, D. N., Kang, K. H., Je, J. Y., Pham, H. N. D., ... & Kim, S. K. (2015). Biological effects of chitosan and its derivatives. *Food Hydrocolloids*, 51, 200-216.

Nunes, P. H. M., Martins, M. D. C. C., Oliveira, R. D. C. M., Chaves, M. H., Sousa, E. A., Leite, J. R. S., & Almeida, F. R. C. (2014). Gastric antiulcerogenic and hypokinetic activities of *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc.(Combretaceae). *BioMed research international*, 2014.

Osório, L. R., Lima, I. S., Barreto, H. M., Osajima, J. A., & Silva Filho, E. C. (2016). Antibacterial Activity of a Chitosan Derivative Obtained in the Absence of a Solvent. In *Materials Science Forum* (Vol. 869, pp. 869-873). Trans Tech Publications.

Parvez, S., Rahman, M. M., Khan, M. A., Khan, M. A. H., Islam, J. M., Ahmed, M., & Ahmed, B. (2012). Preparation and characterization of artificial skin using chitosan and gelatin composites for potential biomedical application. *Polymer bulletin*, 69(6), 715-731. <https://doi.org/10.1007/s00289-012-0761-7>

Patil, P. B., Parit, S. B., Waifalkar, P. P., Patil, S. P., Dongale, T. D., Sahoo, S. C., & Chougale, A. D. (2018). pH triggered curcumin release and antioxidant activity of curcumin loaded  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> magnetic nanoparticles. *Materials Letters*.

Pereira, M. C., Oliveira, D. A., Hill, L. E., Zambiasi, R. C., Borges, C. D., Vizzotto, M., & Gomes, C. L. (2018). Effect of nanoencapsulation using PLGA on antioxidant and antimicrobial activities of guabiroba fruit phenolic extract. *Food Chemistry*, *240*, 396-404.

Pereira, K. A. A., Osório, L. R., Silva, M. P., Sousa, K. S., & Silva Filho, E. C. D. (2014). Chemical modification of chitosan in the absence of solvent for diclofenac sodium removal: pH and kinetics studies. *Materials Research*, *17*, 141-145.

Philibert, T., Lee, B. H., & Fabien, N. (2017). Current status and new perspectives on chitin and chitosan as functional biopolymers. *Applied biochemistry and biotechnology*, *181*(4), 1314-1337.

Potrich, F. B., Allemand, A., da Silva, L. M., dos Santos, A. C., Baggio, C. H., Freitas, C. S., & Marques, M. C. A. (2010). Antiulcerogenic activity of hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* L.: involvement of the antioxidant system. *Journal of ethnopharmacology*, *130*(1), 85-92.

Rains, C. P., Bryson, H. M., & Peters, D. H. (1995). Ceftazidime. *Drugs*, *49*(4), 577-617.

Rabea, E. I., Badawy, M. E. T., Stevens, C. V., Smaghe, G., e Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, *4*(6), 1457-1465.

REIS, L. da S. (2017). Avaliação das propriedades química e biológica da quitosana e derivados associados com ceftazidima. 94p. Tese de Doutorado em Biotecnologia. Rede Nordeste de Biotecnologia. Universidade Federal do Piauí.

Ribeiro, C. L., Bukzen, A. L., Ribeiro, E. L., Maria do Rosário, R. S., Signini, R., & Naves, P. L. F. (2015). Síntese, Toxicidade e Atividade da Carboximetilquitosana na Formação de Biofilme por *Candida* sp. *Revista Virtual de Química*, 7(6), 2113-2123.

Sakurai, K., Maegawa, T., & Takahashi, T. (2000). Glass transition temperature of chitosan and miscibility of chitosan/poly (N-vinyl pyrrolidone) blends. *Polymer*, 41(19), 7051-7056.

Santana, A. C. S. G. V., Sobrinho, J. L. S., da Silva Filho, E. C., & Nunes, L. C. C. (2017). Preparation and physicochemical characterization of binary composites palygorskite–chitosan for drug delivery. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 128(3), 1327-1334.

Servat-Medina, L., González-Gómez, A., Reyes-Ortega, F., Sousa, I. M. O., Queiroz, N. D. C. A., Zago, P. M. W., e Foglio, M. A. (2015). Chitosan–tripolyphosphate nanoparticles as *Arrabidaea chica* standardized extract carrier: synthesis, characterization, biocompatibility, and antiulcerogenic activity. *International journal of nanomedicine*, 10, 3897.

Souza, C. Jr, E. de, & Mansur, H. S. (2008). Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli (álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. *Quim. Nova*, 31(6), 1460-1466.

Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemle, D. J., & Bryce, D. L. (2014). Spectrometric identification of organic compounds. *John wiley & sons*.

Silva, M. C., Fideles, T. B., & Fook, M. V. L. (2015). Esferas de quitosana e quitosana/curcumina pelo método de gelificação ionotrópica: influência da incorporação do fármaco. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, 10(1), 21-28.

Silva Filho, E.C. da; Nunes, L.C.C.; Barreto, H.M.; Osório, L.R., & Lima, I. (2016). Quitosana quimicamente modificada com grupos iminas - avaliação das propriedades

antimicrobianas. In 9º Congresso Latino-Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais/13º Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Órgãos Artificiais e Engenharia de Tecidos – SLABO. Foz do Iguaçu –PR.

Silva, F. V. da; Barros Fernandes, H. de; Oliveira, I. S.; Viana, A. F. S. C.; Costa, D. S. da; Lopes, M. T. P., & Oliveira, R. D. C. M. (2016). Beta-cyclodextrin enhanced gastroprotective effect of (-)-linalool, a monoterpene present in rosewood essential oil, in gastric lesion models. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, v. 389, n. 11, p. 1245-1251.

Silva, H. S. R. C.; Dos Santos, K. S. C. R.; Ferreira, Elizabeth I. (2006). Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química Nova*, v. 29, n. 4, p. 776.

Shukla, S. K., Mishra, A. K., Arotiba, O. A. & Mamba, B. B. (2013). Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 59, 46-58.

Terinte, N., Ibbett, R., & Schuster, K. C. (2011). Overview on native cellulose and microcrystalline cellulose I structure studied by X-ray diffraction (WAXD): Comparison between measurement techniques. *Lenzinger Berichte*, 89, 118-131.

Vandamme, D., Muylaert, K., Fraeye, I., e Foubert, I. (2014). Floc characteristics of *Chlorella vulgaris*: influence of flocculation mode and presence of organic matter. *Bioresource technology*, v. 151, p. 383-387.

Viana, A. F. S. C., Silva, F. V., Fernandes, H. D. B., Oliveira, I. S., Braga, M. A., Nunes, P. I. G., & Almeida Santos, F. (2016). Gastroprotective effect of (-)-myrtenol against ethanol-induced acute gastric lesions: possible mechanisms. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 68(8), 1085-1092.

- Villanova, J. C., Oréface, R. L., & Cunha, A. S. (2010). Aplicações farmacêuticas de polímeros. *Polímeros: Ciência e tecnologia*, 20(1).
- Volod'ko, A. V., Davydova, V. N., Chusovitin, E., Sorokina, I. V., Dolgikh, M. P., Tolstikova, T. G., & Yermak, I. M. (2014). Soluble chitosan–carrageenan polyelectrolyte complexes and their gastroprotective activity. *Carbohydrate polymers*, 101, 1087-1093.
- Wang, X., Wei, J., Chen, J., & Tang, S. (2018). Improvement of surface hydrophilicity, water uptake, biodegradability, and cytocompatibility through the incorporation of chitosan oligosaccharide into poly (l-lactide). *Journal of Applied Polymer Science*.
- Wang, Q. S., Zhu, X. N., Jiang, H. L., Wang, G. F., & Cui, Y. L. (2015). Protective effects of alginate–chitosan microspheres loaded with alkaloids from *Coptis chinensis* Franch. and *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.(Zuojin Pill) against ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. *Drug design, development and therapy*, 9, 6151.
- Wu, T., Huang, J., Jiang, Y., Hu, Y., Ye, X., Liu, D., & Chen, J. (2018). Formation of hydrogels based on chitosan/alginate for the delivery of lysozyme and their antibacterial activity. *Food chemistry*, 240, 361-369. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.052>
- Xu, W., Xiao, Y., Luo, P., & Fan, L. (2018). Preparation and characterization of C-phycocyanin peptide grafted N-succinyl chitosan by enzyme method. *International journal of biological macromolecules*, 113, 841-848.
- Yan, Y., Xiang, B., Li, Y., & Jia, Q. (2013). Preparation and adsorption properties of diethylenetriamine-modified chitosan beads for acid dyes. *Journal of Applied Polymer Science*, 130(6), 4090-4098.

Yan, F., Dang, Q., Liu, C., Yan, J., Wang, T., Fan, B., & Zhang, Z. (2016). 3, 6-O-[N-(2-Aminoethyl)-acetamide-yl]-chitosan exerts antibacterial activity by a membrane damage mechanism. *Carbohydrate polymers*, 149, 102-111.

Yang, Z., Yuan, B., Huang, X., Zhou, J., Cai, J., Yang, H., & Cheng, R. (2012). Evaluation of the flocculation performance of carboxymethyl chitosan-graft-polyacrylamide, a novel amphoteric chemically bonded composite flocculant. *Water research*, v. 46, n. 1, p. 107-114.

Yang, J., Tian, F., Wang, Z., Wang, Q., Zeng, Y. J., & Chen, S. Q. (2008). Effect of chitosan molecular weight and deacetylation degree on hemostasis. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 84(1), 131-137.)

Zargar, V., Asghari, M., & Dashti, A. (2015). A review on chitin and chitosan polymers: structure, chemistry, solubility, derivatives, and applications. *ChemBioEng Reviews*, 2(3), 204-226.

Zhang, S., Dong, Y., Yang, Z., Yang, W., Wu, J., & Dong, C. (2016). Adsorption of pharmaceuticals on chitosan-based magnetic composite particles with core-brush topology. *Chemical Engineering Journal*, v. 304, p. 325-334.

Zhou, X., Kong, M., Cheng, X., Li, J., Li, J., & Chen, X. (2014). Investigation of acetylated chitosan microspheres as potential chemoembolic agents. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 123, 387-394.

Zhu, C., Zou, S., Rao, Z., Min, L., Liu, M., Liu, L., & Fan, L. (2017). Preparation and characterization of hydroxypropyl chitosan modified with nisin. *International Journal of Biological Macromolecules*.

Zimmermann, A. M., & Kirsten, V. R. (2016). Alimentos com função antioxidante em doenças crônicas: uma abordagem clínica. *Disciplinarum Scientia/ Saúde*, 8(1), 51-68.



## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O crescente aumento no número de enfermidades tem estimulado a busca por novos compostos naturais, como a quitosana, que apresente efetividade no controle e eliminação de doença sem provocar efeitos colaterais que prejudiquem o tratamento.
- No cenário atual é visível o crescente aumento das pesquisas com a quitosana modificada com a finalidade de aplicação na área da saúde.
- Os resultados das análises de propriedades biológicas mostraram que os derivados resultantes da modificação química da quitosana com bases aminas são seguros para aplicações em testes de atuação na área biomédica e farmacêutica.
- Os derivados Qacen, Qacdien, QacenF e QacdienF apresentaram excelentes resultados de cicatrização de úlcera gástrica induzida por ácido acético (80%).
- Este trabalho é inovador.
- Estudos complementares devem ser realizados para um melhor entendimento da ação gastroprotetora da quitosana.

## **7. PERSPECTIVAS**

Os resultados obtidos na presente pesquisa enfatizam a importância de estudos adicionais para avaliação da atividade gastroprotetora destes novos derivados da quitosana associados a fármaco de uso em tratamento gástrico, para avaliar sua potencialidade na proteção e regeneração da mucosa gástrica.

## 8. ANEXO 1. APROVAÇÃO DO PROJETO NO COMITÊ DE ÉTICA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Campus Universitário Ministro Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil, CEP: 64040-550  
Telefone (86) 3215-5734, e-mail: ceap@ufpi.edu.br



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "*Propriedades biológicas de derivados poliméricos nanoparticulados com protótipos farmacêuticos*", registrada nº 463/18, sob a responsabilidade do Prof. Dr. ANDERSON NOGUEIRA MENDES do Departamento Biofísica e Fisiologia/CCS/UFPI que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **27/04/2018**.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Maio/2018 à Abril/2028
Espécie/Linhagem/raça	Rato heterogênico/wistar
Nº de Animais	286
Peso/ Idade	80-300g/ 3-6
Sexo	Machos ou Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFPI

Teresina, 27 de Abril de 2018.  
  
Profa. Dra. Waldilene Ribeiro de Araújo Moura  
Vice- Coordenadora da CEUA/UFPI