UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Instituto de Química

Programa de Pós-graduação em Química

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS DE COBRE E ZINCO COM ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO-ESTERÓIDES E ESTUDO DA INTERAÇÃO COM O BIOPOLÍMERO QUITOSANA

DOUGLAS DE JESUS MARTINS

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890.

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP.

SÃO PAULO

Data de Depósito na SPG:

11/07/201

DOUGLAS DE JESUS MARTINS

i

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS DE COBRE E ZINCO COM ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO-ESTERÓIDES E ESTUDO DA INTERAÇÃO COM O BIOPOLÍMERO QUITOSANA

Tese presentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências - Área: Química

Orientadora: Profa. Dra. Denise De Oliveira Silva

SÃO PAULO

2013

Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Biblioteca e

Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Martins, Douglas de Jesus

M386s Síntese e caracterização de complexos de cobre e zinco com anti-inflamatórios não esteróides e estudo da interação com o biopolímero quitosana / Douglas de Jesus Martins. -- São Paulo, 2013

183p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental. Orientador: Silva, Denise de Oliveira

1. Química bioinorgânica 2. Polímeros : Química inorgânica I. T. II. Silva, Denise de Oliveira, orientador.

546.3 CDD

"E que em todos os momentos, o meu caminho seja

iluminado pela luz de **Deus**". (DDJM)

"Elegância para a Alma". (DDJM)

DEDICATÓRIA

Dedico o presente trabalho ao meu Pai e a minha Mãe que são e sempre serão os meus verdadeiros amores. Aqueles que sempre me deram tudo. Tudo o que um filho pode precisar. Obrigado pelo amor, pelo carinho, pela motivação, pelo exemplo e pela honra de ser filho de vocês.

Dedico também a Deus, Jesus, Nossa Senhora Aparecida e ao meu Anjo da Guarda.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus. Agradeço por ter me guiado quando eu já não mais enxergava. Por ter me erguido quando eu não mais me aguentava de pé. Deus, obrigado por ter me elevado e me honrado com tamanha chance. Obrigado.

À Profa. Denise por ter acreditado em mim, em meu potencial, enfim, na minha pessoa. Agradeço ainda pelos ensinamentos, pela compreensão, pelas inúmeras chances e pela conduta. Exemplo de profissionalismo, de ética e companheirismo.

A todos os colegas de grupo: Claudia, Renata Rolim, Renata Torres, Geise, Rodrigo, João, Iguatinã, Rute, Samara, Hanif, Marcus, Rachel, Alan, Carol, Jaqueline e outros que possa estar me esquecendo.

À Cida e ao Ricardo que tanto me ajudaram em momentos dos mais corriqueiros aos mais emergências.

Ao Prof. André Zonetti A. Leite e a todo o seu grupo (LIM 7) que me recebeu de maneira tão especial.

A toda a minha família pela ajuda, apoio, carinho e amor. Sem eles nada teria sido possível.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado e à FAPESP pelo apoio financeiro às pesquisas do grupo.

Enfim, a todos que de uma de forma ou de outra estiveram junto a mim contribuindo para com o meu trabalho.

RESUMO

Martins, D. J. Síntese e Caracterização de Complexos de Cobre e Zinco com Antiinflamatórios Não-esteróides e Estudo da Interação com o Biopolímero Quitosana. 2013 (183p). Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O presente trabalho teve como principal objetivo o estudo da interação de complexos de cobre e de zinco contendo fármacos anti-inflamatórios não-esteróides (FAINEs) com o biopolímero quitosana. Foram preparados alguns complexos já reportados na literatura como os complexos de cobre com indometacina, ibuprofeno e naproxeno e os complexos de zinco com indometacina, para os quais foram incluídos estudos adicionais de caracterização. Também foram sintetizados complexos inéditos de cobre com cetoprofeno e de zinco com ibuprofeno e meloxicam.

Estudou-se a interação de alguns dos metalofármacos com microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído, preparadas pelo método de coacervação. Investigou-se também materiais obtidos por spray-drying, resultantes da interação dos metalofármacos de Cuibuprofeno e Cu-indometacina, e do fármaco indometacina, com quitosana. Esses materiais foram submetidos a ensaios preliminares de avaliação macroscópica da lesão intestinal *in vivo*. Os compostos e materiais obtidos foram caracterizados por análise elementar, espectroscopia eletrônica, espectroscopia vibracional FTIR, difratometria de raios X de pó (DRX), e análise térmica (TG/DTG/DSC).

Palavras-chave: cobre, zinco, quitosana, metalofármacos, coacervação, spray-drying.

ABSTRACT

Martins, D. J. Synthesis and Characterization of Copper and Zinc Complexes with Antiinflammatory Drugs and Studies on their Interaction with the Chitosan Biopolymer. 2013 (183p). PhD Thesis - Post-Graduation Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The present work aimed the study of interactions between copper and zinc complexes containing non-steroidal anti-inflammatory drugs with the chitosan biopolymer. Complexes already reported in the literature such as copper with indomethacin, ibuprofen and naproxen and zinc with indomethacin were prepared and additional characterization studies were performed. New complexes of copper and zinc with ketoprofen, ibuprofen and meloxicam were also synthesized.

The interactions of some metallodrugs with microspheres of chitosan cross-linked with glutaraldeyde, prepared by the coacervation method were studied. Materials prepared by spray-drying method, resulting from the interactions of copper-ibuprofen and copper-indomethacin metallodrugs, and from the Indomethacin drug, with chitosan were also investigated. These materials were submitted to preliminary assays to evaluate the macroscopic intestinal damage *in vivo*. The compounds and materials were basically characterized by elemental analysis, electronic spectroscopy, FTIR vibrational spectroscopy, powder X-rays diffractometry, and thermal analysis (TG/DTG/DSC).

Keywords: copper, zinc, chitosan, metallodrugs, coacervation, spray-drying.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| C | Concentração |
|---------------|---|
| CHN | Análise Química dos Elementos C, H e N |
| СМС | Carboximetilcelulose |
| Cu | Cobre |
| CuAc | Acetato de Cobre |
| Cu-Ceto | Complexo Cu(II)-cetoprofeno |
| Cu(II)-FAINEs | Complexos de Cu(II) com FAINEs |
| Cu-Ibp | Complexo Cu(II)-Ibuprofeno |
| Cu-Indo | Complexo Cu(II)-Indometacina |
| Cu-Napx | Complexo Cu(II)-Naproxeno |
| DMA | Dimetilacetamida |
| DMF | Dimetilformamida |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DRX | Difratometria de Raios X |
| DSC | Calorimetria Exploratória Diferencial |
| DTG | Curva Referente à Primeira Derivada da Curva TG |

| EPR | Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica | | | | | |
|----------------------|--|--|--|--|--|--|
| EtOH | Etanol | | | | | |
| FAINEs | Fármaco Anti-inflamatório Não-esteroidal | | | | | |
| FTIR | Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho | | | | | |
| GA | Glutaraldeído | | | | | |
| GMD | Grau Médio de Desacetilação | | | | | |
| HCeto | Fármaco Cetoprofeno | | | | | |
| HIbp | Fármaco Ibuprofeno | | | | | |
| HIndo | Fármaco Indometacina | | | | | |
| H ₂ Melox | Fármaco Meloxicam | | | | | |
| HNapx | Fármaco Naproxeno | | | | | |
| HPLC | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência | | | | | |
| ICP-AES | Espectroscopia de Emissão Atômica (Plasma | | | | | |
| | Indutivamente Acoplado) | | | | | |
| MeOH | Metanol | | | | | |
| MEV | Microscopia Eletrônica de Varredura | | | | | |
| MF | Mistura Física | | | | | |

| MS | Espectrometria de Massa |
|----------------|---|
| M _v | Massa Molar Viscosimétrica Média |
| QT | Quitosana |
| QTAPM | Quitosana de Alta Massa Molar |
| QTBPM | Quitosana de Baixa Massa Molar |
| QTMPM | Quitosana de Média Massa Molar |
| sd | Spray Dryed |
| TG | Análise Térmica |
| UV-vis | Espectroscopia Eletrônica na Região do Ultravioleta-visível |
| Zn | Zinco |
| ZnAc | Acetato de Zinco |
| Zn(II)-FAINEs | Complexos de Zn(II) com FAINEs |
| Zn-Hmelox | Complexo Zn(II)-Meloxicam |
| Zn-Ibp | Complexo Zn(II)-Ibuprofeno |
| Zn-Indo | Complexo Zn(II)-Indometacina |
| Zn-Indo_1 | Complexo Zn(II)-Indometacina Mononuclear |
| Zn-Indo_2 | Complexo Zn(II)-Indometacina Dinuclear |

SUMÁRIO

| | | Página | | | | | | | |
|----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| 1. | INTROD | UÇÃO15 | | | | | | | |
| 2. | OBJETIV | / OS | | | | | | | |
| 3. | MATERI | AIS E MÉTODOS | | | | | | | |
| | 3.1. Materiais | | | | | | | | |
| | 3.1.1. | Reagentes e solventes | | | | | | | |
| | 3.2. Me | étodos | | | | | | | |
| | 3.2.1. | Sínteses dos complexos metálicos de cobre e de | | | | | | | |
| | | zinco | | | | | | | |
| | 3.2.2. | Determinação da massa molar viscosimétrica média (M _v) das quitosanas de | | | | | | | |
| | | alta massa molar (QTAPM), média massa molar (QTMPM) e baixa massa | | | | | | | |
| | | molar (QTBPM) | | | | | | | |
| | 3.2.3. | Determinação do grau médio de desacetilação (GMD) das quitosanas de | | | | | | | |
| | | alta e baixa massa molar (QTAPM e | | | | | | | |
| | | QTBPM) | | | | | | | |
| | 3.2.4. Preparação dos materiais contendo HIbp, HCeto, Cu-Ibp, Cu-Ceto e Z | | | | | | | | |
| | | em microesferas de QTAPM obtidas pela técnica de coacervação e | | | | | | | |
| | | reticuladas com glutaraldeído (QTAPM/GA) | | | | | | | |
| | 3.2.5. | Preparação dos materiais contendo Cu-Npx em microesferas de | | | | | | | |
| | | QTAPM/GA obtidas pela técnica de coacervação (QTAPM/GA_CuNapx) | | | | | | | |
| | | e Ensaios de liberação40 | | | | | | | |
| | 3.2.6. | Preparação via spray dryer dos materiais contendo os compostos Cu-Ibp. | | | | | | | |
| | • • | Cu-Indo e HIndo em microesferas/microcápsulas de | | | | | | | |
| | | OTBPM | | | | | | | |

| | 3.2 | 2.7. | Ensai | ios E | Biológicos | | | | | | .55 |
|----|---|--|--|--------|-------------------|------------------|----------------|---------------------------|--------|-----------|----------------|
| | 3.3. | Técnicas e Instrumentação | | | | | | | | | .57 |
| 4. | RESU | LT | ADOS | S E I | DISCUSSÃO | | | | | | .60 |
| | 4.1. | Sín | ntese | e | caracterização | dos | complexos | metálicos | de | cobre | e |
| | | zinco | | | | | | | | | .60 |
| | 4.1 | 4.1.1. Sínteses | | | | | | | | | |
| | 4.1 | 4.1.2. Espectroscopia de absorção eletrônica (UV-vis) | | | | | | | | | 57 |
| | 4.1.3. Espectroscopia Vibracional no Infravermelho (FTIR) | | | | | | | | | | 74 |
| | 4.1 | l .4. | Análi | ise T | érmica (TG/DT | G/DSC |) | | | | .84 |
| | 4.2. | De | termir | nação | o da massa mol | ar visc | osimétrica m | édia (M _v) da | as qui | itosanas | de |
| | | alta | a mass | sa m | olar (QTAPM), | de méo | dia massa mo | ar (QTMPN | 1) e b | aixa ma | .ssa |
| | | mo | olar (Q | TBF | PM) | | | | ••••• | | 96 |
| | 4.2 | 2.1. | Quito | osana | a de baixa massa | molar | (QTBPM) | | | 9 |) 8 |
| | 4.2 | 2.2. | Quito | osana | a de média massa | a molar | (QTMPM) | | | 1 | 00 |
| | 4.2 | 2.3. | Quito | osana | a de alta massa m | nolar ((| QTAPM) | | | 1 | .02 |
| | 4.3. | De | termir | nação | o do grau médio | de des | acetilação (G | MD) das qui | tosan | as de alt | a e |
| | | bai | xa ma | issa 1 | molecular (QTA) | PM e Ç | (TBPM) | | | 1 | .04 |
| | 4.4. | Est | tudo d | as ir | nterações dos fár | macos | HIbp e HCeto | e dos comp | olexos | Cu-Cet | o e |
| | | Zn | -Ibp c | om e | esferas de QTAP | M obti | das pela técni | ca de coace | rvação | o – Ensa | ios |
| | | de | Adsor | ção | 1 | | | | | 1 | 109 |
| | 4.5. | Est | tudo d | las i | nterações dos fá | rmacos | s HIbp e HCe | to e dos co | mplex | os Zn-I | bp, |
| | | Cu | 1-Ibp e Cu-Ceto com esferas de QTAPM obtidas pela técnica de coacervação | | | | | | | | |
| | | - E | nsaio | de a | dsorção 2 | | | | | 1 | 18 |
| | 4.6. | De | termir | nação | o das curvas de | adsorç | ção do compl | exo Cu-Nap | x em | esferas | de |
| | | QT | CAPM | obti | das pela técnica | de coa | cervação | | | 1 | 125 |

| | 4.7. | Ensaio | de | liberação | a | par | tir do | m | aterial |
|----|-------|------------|------------|--------------|--------|----------|--------------|--------|---------|
| | | QTAPM | /0,1%GA_C | uNapx_27 | | | | | 135 |
| | 4.8. | Estudo | dos mat | eriais QTB | PM_CuI | bp_sd1, | QTBPM/GA | _CuIbp | 5_sd1, |
| | | QTBPM | /GA_ZnIbp | _sd1 e QTBPI | M/GA_Z | nIbp_sd1 | | | 137 |
| | 4.9. | Estudo | dos mate | eriais QT/B | PM_CuI | bp_sd2, | QTBPM/GA | _CuIbp | 5_sd2, |
| | | QTBPM | _CuIndo_sd | 2 e QTBPM/0 | GA_CuI | ndo_sd2 | | | 157 |
| | 4.10. | Ensaios | biológicos | preliminare | s de a | valiação | macroscópica | a da | lesão |
| | | intestinal | l | | | | | | 167 |
| 5. | CON | CLUSÕES | S E CONSI | DERAÇÕES | FINAIS | 5 | | | 172 |
| 6. | BIBL | IOGRAF | [A | | | | | | 174 |

Os fármacos anti-inflamatórios não-esteróides (FAINEs) pertencem a uma classe de drogas que exercem atividade anti-inflamatória, analgésica, antipirética e possuem propriedades inibidoras de plaquetas. A maior classe dos FAINES é a dos ácidos arilalcanóicos, de fórmula geral ArCRHCOOH (Ar = arila ou heteroarila; R = H, CH_3 , alquila), e inclui salicilatos, indoles, ácidos propiônicos e fenamatos¹. As estruturas de alguns desses fármacos são apresentadas na Figura 1 a seguir.



Figura 1 - Estruturas dos fármacos cetoprofeno (HCeto), ibuprofeno (HIbp), indometacina (HIndo) e meloxicam (H₂melox).

Os fármacos anti-inflamatórios não-esteróides estão entre os mais utilizados de todos os agentes terapêuticos. Atualmente, há mais de cinquenta diferentes FAINEs no mercado e há, ainda, um fluxo contínuo de novas preparações. O grande número de novas substâncias

significa que nenhuma dessas, até o momento, tem sido ideal no controle ou modificação dos sinais da inflamação, sem que haja efeitos tóxicos para o indivíduo. A eficácia dos FAINEs está correlacionada à inibição da atividade das enzimas ciclooxigenases; fato este que resulta no bloqueio da síntese de prostaglandinas e tromboxanos. Os medidores pró-inflamatórios resultantes da ação da ciclooxigenase-1 (COX-1), que é a enzima constitutiva, estão representados pelas prostaglandinas relacionadas com os efeitos fisiológicos nos sistemas renal, gastrointestinal e cardiovascular. Por outro lado, a ciclooxigenase-2 (COX-2), enzima induzida, leva à formação de prostaglandinas presentes no processo inflamatório. Dessa forma, os FAINEs que bloqueiam inespecificamente as ciclooxigenases predispõem o surgimento de sérios efeitos colaterais, especialmente relacionados com o trato gastrointestinal².

Muitos estudos têm demonstrado que a utilização frequente e prolongada dos FAINEs pode ser benéfica à saúde, reduzindo o risco de artrites, alguns tipos de câncer, mal de Alzheimer e até mesmo doenças cardíacas. Mas como já foram citadas anteriormente, as terapias com base no uso prolongado de FAINEs recebem sérias restrições por causa dos efeitos colaterais das drogas, principalmente sobre o trato gastrointestinal. Os tratamentos necessários para reduzir os problemas causados por tais efeitos, em geral, têm custo bastante elevado³.

O desenvolvimento de metalofármacos contendo FAINEs coordenados a íons metálicos tais como cobre e zinco, é uma alternativa interessante de reduzir os efeitos colaterais causados pelos FAINEs orgânicos convencionais. Os benefícios verificados nos casos dos fármacos metalados, sobretudo a diminuição de toxicidade gastrointestinal, estimulou diversos estudos sobre as propriedades farmacológicas metalo-FAINEs, os quais estiveram entre os compostos que mais receberam atenção e crescente interesse dentro da área

16

de química inorgânica medicinal nos últimos 15 anos, As áreas de pesquisa mais atuantes foram as relacionadas às descobertas de fármacos ativos contra cânceres, doenças do sistema imunológico e inflamações⁴.

Intrigantemente, o uso de metais pesados com o objetivo de tornar a vida dos homens mais saudável é muito antigo. Há 5.000 anos a civilização egípcia usava cobre para esterilizar a água, e alguns séculos depois, 1.500 anos a.C, esta mesma civilização também descobriu que remédios a base de zinco eram bons para curar ferimentos^{5,6}.

Sabe-se que durante processos inflamatórios agudos, é possível encontrar altas concentrações de íons Zn²⁺ nos tecidos atingidos pela inflamação. Isto não é surpresa do ponto de vista das propriedades anti-inflamatórias do zinco. A atividade semelhante foi reportada para os íons Cu²⁺, e tais observações originaram um grande interesse pelo estudo tanto da participação de íons desses metais pesados na ação anti-inflamatória quanto da ação sinergística quando eles estão ligados especialmente aos FAINEs⁶. Alguns complexos metálicos se mostraram mais efetivos e/ou menos tóxicos que os correspondentes fármacos orgânicos⁷ e originaram uma nova classe de metalodrogas com propriedades inflamatórias. Complexos metálicos de Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II) e Mn(II) com FAINEs são exemplos que mostram que a coordenação pode potencializar a eficácia de uma droga orgânica através da minimização dos efeitos colaterais sobre o trato gastrointestinal e/ou do aumento da ação anti-inflamatória, quando comparada com a droga livre, ou seja, não complexada^{1.8,9}.

Estudos de nosso grupo mostraram que um complexo de cobre com ibuprofeno apresenta atividade anti-inflamatória semelhante à do fármaco ibuprofeno, mas com a vantagem de provocar menor lesão gástrica do que aquela causada pela administração do composto orgânico livre¹⁰.

Apesar de serem conhecidas as vantagens dos complexos metálicos contendo FAINEs como ligantes, o uso clínico desses compostos até o momento é muito limitado⁷. Um único complexo de cobre com indometacina tem sido empregado em veterinária na Austrália, na Nova Zelândia e na África do Sul, desde 1992, para tratamento de inflamações músculo-esqueletal/locomotora em cães e cavalos¹.

A complexação de íons metálicos a fármacos de uso clínico pode apresentar algumas vantagens, em relação às drogas orgânicas livres, tais como: efeitos sinergísticos dos ligantes no restante da estrutura de coordenação, proteção da droga contra degradação enzimática, melhoria no processo de transporte da droga através das membranas das células e aumento de estabilidade térmica. No entanto, aspectos como melhoria de biodisponibilidade, permeabilidade celular e aumento no tempo de residência^{12, 11} podem ser atingidos pelo uso de agentes encapsulantes/carregadores, tais como: lipossomas, polímeros solúveis, quitosanas, ciclodextrinas, surfactantes não iônicos ou iônicos bioativos¹².

A tecnologia de liberação controlada de drogas representa uma das áreas de fronteira da ciência. Os sistemas de liberação oferecem inúmeras vantagens, comparados às formas convencionais de dosagens, tais como: melhor eficácia e menor toxicidade. Desta forma, muitos tratamentos que não seriam possíveis, tornaram-se viáveis com o uso de sistemas de liberação controlada. Frequentemente, macromoléculas são usadas como carregadores das drogas nestes sistemas¹³. Dentre os polímeros orgânicos, podem ser citados os neutros, tais como: ciclodextrinas e acetato de celulose. As ciclodextrinas já são utilizadas para liberação de algumas drogas comerciais que são administradas por via oral e têm sido investigadas para aplicação de muitas outras, inclusive de alguns FAINEs¹⁴. O acetato de celulose mostrou-se eficaz para liberação controlada de FAINEs, especialmente para tratamento de periodontia¹⁵.

Polímeros carregados como polissacarídeos catiônicos, como a quitosana, e aniônicos, como o alginato, pectina ou carragenina¹⁶ também podem ser usados.

Recentemente, em nosso grupo de pesquisa uma colega propiciou através da técnica de spray-drying a preparação de novos materiais híbridos contendo metalofármacos de cobre com os anti-inflamatórios naproxeno e sulindaco incorporados em acetato de celulose, objetivando o aumento da eficácia terapêutica e a minimização dos problemas de toxicidade gerados por esses fármacos¹⁷.

A quitosana (Figura 2), polissacarídeo obtido pela hidrólise alcalina da quitina, em particular, é um polímero muito interessante devido à sua biocompatibilidade, baixa toxicidade e biodegradabilidade, características responsáveis por suas aplicações médicas e farmacêuticas, além da importância no campo de desenvolvimento de biomateriais^{18,19}.

Dentre as inúmeras aplicações do biopolímero quitosana, encontra-se também a sua ação como agente floculante em tratamentos de efluentes líquidos e como resina quelante na remoção de metais pesados. Esse polissacarídeo vem sendo usado como sistema polimérico na liberação de fármacos, tais como prednilisolona, albumina e melatonina. A quitosana é metabolizada por certas enzimas humanas, especialmente a lisozima e, portanto é considerada biodegradável²⁰. A biocompatibilidade da quitosana já foi comprovada em implantes como biomaterial nos tecidos vivos e a sua baixa toxicidade foi verificada em animais (DL₅₀: dose letal em ratos 16 g/kg). Estas propriedades permitiram o emprego da quitosana em formulações médicas. Comprimidos encapsulados por quitosana se comportam como géis em soluções de baixo pH e são adequados para a liberação de fármacos solúveis em água. Isto porque a quitosana mantém forma de gel em pH baixos sendo a liberação do agente bioativo retardada nesta condição, podendo haver uma liberação constante²¹. Outros trabalhos

descrevem que as formulações orais revestidas do biopolímero quitosana flutuam e intumescem gradualmente em solução de pH 1,2.

Salienta-se, ainda, que a quitosana e seus derivados apresentam algumas vantagens importantes com relação às atividades farmacológicas, atuando como antiácido, antiúlcera, protegendo a mucosa gástrica e inibindo a adesão de bactérias nas células epiteliais bucais e vaginais²².



Figura 2 - Estrutura da quitosana.

Dentre as principais propriedades biológicas da quitosana destacam-se a atividade antimicrobiana, o efeito coagulante, o efeito analgésico, a aceleração da cicatrização, sua utilização no tratamento de osteoartrite, seu efeito hipocolesterolêmico e hipolipidêmico e a sua utilização de tratamentos para redução de peso. Atualmente, há uma infinidade de trabalhos, livros e revisões que abordam as diferentes aplicações para esse biopolímero, sendo que aplicações na área farmacêutica, médica e química têm tido um destaque muito maior. Alguns trabalhos disponíveis na literatura relacionam a quitosana com a preparação de membranas cirúrgicas, outros o seu uso como agente hipocolesterolêmico, a regeneração tecidual, a latenciação e desenvolvimento de pró-fármacos, a liberação transdérmica de fármacos, o uso de complexos de quitosana no transporte de DNA no desenvolvimento de vacinas e ainda o uso como transportador de fármacos. O uso da quitosana como transportador de fármacos tem permitido solucionar problemas como insolubilidade e hidrofobicidade de diversos agentes terapêuticos. No entanto, o caráter semicristalino destas preparações dificulta a compressão direta, se tornando necessária a adição de agregantes para facilitar essa operação. O desenvolvimento de esferas pode diminuir este inconveniente, uma vez que estas são dotadas de caráter amorfo. Sua preparação pode ser feita de diversas maneiras, em que são considerados aspectos como hidrofilicidade, lipofilicidade e estabilidade térmica do fármaco²³.

Infelizmente, algumas aplicações farmacêuticas da quitosana são limitadas por problemas de hidrossolubilidade, uma vez que esta é insolúvel em água em meio neutro, condição em que enzimas fisiológicas exercem sua atividade. Partindo do princípio que derivados de quitosana podem ser preparados a fim de se melhorar sua solubilidade em água, a aplicações deste polímero podem aumentar significativamente. Desde a descoberta da molécula de quitosana, há cerca de 150 anos, sempre se acreditou que este polímero fosse insolúvel em meio alcalino. Porém, descobriu-se posteriormente que é possível desenvolver um sistema no qual a QT se torna solúvel, mesmo em pH 10. Esta solubilidade é alcançada devido à formação do íon carbamato após adição de NH₄HCO₃ de acordo com a Equação 1:

$$CHIT-NH_2 + NH_4HCO_3 \rightarrow CHIT-NHCO_2 NH_4^+ + H_2O$$
(1)

A forma solúvel do carbamato de amônio tem sido utilizada satisfatoriamente na obtenção de microesferas de quitosana por spray-drying, visando sua utilização como transportadores de fármaco²⁴.

21

O processo de spray-drying vem sendo usado há décadas em diversos processos industriais para a obtenção de materiais desidratados na forma de pós finos. O processo é de relativo baixo custo, quando comparado à liofilização, e apresenta diversas vantagens como alta produtividade e rapidez (para instalações industriais), aplicabilidade para produtos termicamente sensíveis, dentre outras. A secagem por spray-drying é definida pela transformação de um material fluído (solução, dispersão ou pasta) para forma de partículas secas (pó) pela aspersão desse fluído em um meio de secagem aquecido (normalmente o ar). Os pós finos produzidos por spray-dryer reúnem padrões elevados de qualidade com respeito à granulometria do produto, umidade final, homogeneidade, densidade e forma, sendo que estas podem ser modificadas por modificações nos parâmetros do processo. O pó obtido por esta tecnologia é particularmente apreciado devido à sua alta fluidez, sendo que esta propriedade pode ser atribuída à forma esférica das partículas obtidas. Este processo é uma operação contínua que envolve a atomização do fluído e sua mistura com o ar aquecido, evaporação do solvente e separação do produto seco^{24, 25}.

Nesses últimos anos, tem-se constatado um notável crescimento em torno da criação de novos sistemas de liberação de fármacos. Durante esse período, a indústria farmoquímica se destacou no uso e no aproveitamento de matérias-primas de baixo custo e fácil acesso para o desenvolvimento de novos materiais poliméricos, o que permitiu o uso de várias técnicas para encapsulamento de muitos compostos em sistemas de multipartículas, como microesferas e microcápsulas, no intuito de proteger, estabilizar, mascarar os sabores indesejáveis ou modificar as propriedades de liberação. Os sistemas de multipartículas têm suscitado um grande interesse nas formulações orais por apresentarem muitas vantagens, tais como dose única, variabilidade do tempo de trânsito no trato gastrointestinal e a possibilidade de mistura de fármacos de diferentes propriedades de liberação²⁴.

De acordo com o que já foi colocado anteriormente, a técnica de spray-drying tem sido utilizada em vários segmentos industriais devido à rápida e eficiente secagem de alimentos, produtos farmacêuticos, entre outras substâncias. Além do processo de desidratação é amplamente usada para microencapsulação de produtos farmacêuticos aplicados em sistemas de liberação controlada de drogas²⁶. A técnica oferece diversas vantagens, tais como baixo custo de operação, alta qualidade das micropartículas produzidas, capacidade de processar diversas matérias-prima, produção de micropartículas com elevada área superficial, processo de etapa única e apresenta flexibilidade na formulação do material empregado. Entre as principais desvantagens pode ser citada a limitação na escolha do encapsulante que, preferencialmente, deve apresentar baixa viscosidade em altas concentrações. Os fatores de formulação e os parâmetros selecionados no equipamento determinam as propriedades das micropartículas produzidas. A QT está entre os polímeros mais usados (quitina, dextrana, albumina, colágeno, celulose e derivados, amido e derivados, pectina, alginato, cloreto de polivinila e polimetacrilato) na produção de micropartículas por spray-drying²⁷.

Microesferas de quitosana apresentam grande área superficial e, dependendo do processo de reticulação do polímero, podem apresentar maior porosidade, aumentando a capacidade para imobilização de espécies de interesse. O biopolímero quitosana possui um grupo amino primário e dois grupos hidroxila livres em cada unidade glicosamina, que podem ser modificados por agentes reticulantes. Ligações do tipo base de Schiff são formadas entre os grupos amino da quitosana e os grupos aldeídos de agentes reticulantes, tais como glutaraldeído, glioxal, formaldeído, entre outros. Outro processo de ativação da quitosana é realizado em meio ácido, sendo os grupos amino da quitosana protonados e essas cargas positivas formadas podem interagir com diversos ânions como, por exemplo, tripolifosfato de sódio, sulfato de sódio, citrato de sódio, alginato de sódio, entre outros²⁸.

O principal problema enfrentado durante o preparo de formulações utilizando-se quitosana é a falta de caracterizações confiáveis desse biopolímero. Muitas são as origens das quitosanas comerciais e também são muitas as insuficiências encontradas nas caracterizações das diferentes amostras de quitosana. As propriedades físico-químicas da quitosana são função do grau médio de acetilação e da massa molar média. Na presença de soluções diluídas de ácidos, a quitosana comporta-se como um polieletrólito catiônico, constituído de um copolímero de 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranose e 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranose de composição variável em função do grau médio de acetilação e 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranose e é um dos principais parâmetros para sua caracterização²⁹. A proporção relativa dessas unidades nas cadeias macromoleculares de quitosana tem efeito marcante na solubilidade³⁰.

A quitosana é insolúvel em água, mas dissolve-se em soluções aquosas de ácidos orgânicos, como acético, fórmico, cítrico, além de ácidos inorgânicos, diluído resultando em soluções viscosas. A solubilidade da quitosana está relacionada com a quantidade de grupos amino protonados $(-NH_3^+)$ na cadeia polimérica.

Quanto maior a quantidade destes grupos, maior a repulsão eletrostática entre as cadeias e também maior a solvatação em água. O grau de protonação pode ser determinado pela variação da concentração da quitosana. Para uma dada concentração de ácido, o grau de protonação depende do pK do ácido usado para solubilizar a quitosana. A QT é susceptível a mudanças estruturais, devido à grande quantidade de grupos reativos como as hidroxilas e principalmente os grupos amino, especialmente em reações de N-acetilação, N-alquilação, N-carboxilação, N-sulfonação e formação de bases de Schiff com aldeídos e cetonas³².

Um dos principais matérias obtidos através da QT são esferas por técnicas de coacervação, liofilização, spray-drying, dentre outras. Para muitos casos as esferas de QT

podem ser submetidas a um processo de reticulação com GA com a finalidade de aumentar a resistência mecânica. Os grupos aldeídos do GA reagem com os grupos amino da QT formando iminas devido à ressonância estabelecida com ligações etilênicas adjacentes via reação de base de Schiff existentes na literatura (Figura 3)³¹.



Figura 3 - A: estrutura molecular da quitosana; **B**: possível estrutura formada a partir da reticulação da quitosana com o agente reticulante glutaraldeído (GA).

Sabe-se que a quitosana apresenta importantes propriedades biológicas tais como baixa toxicidade, não causa alergia, pode ser empregada como coagulante, é biodegradável, biocompatível e possui propriedades antibacterianas³². Além dessas propriedades a QT também se apresenta como ótimo adsorvente de metais pesados possui capacidade para formar complexos com íons de metais de transição devido à presença de grupos $-NH_2$ e -OHem sua estrutura, sendo seu poder quelante para diversos cátions metálicos da ordem de 5 a 6 vezes acima da quitina. Apresenta alta capacidade de adsorção, maior que 1 mmol do cátion metálico/g de quitosana para a maioria dos íons metálicos. A capacidade de adsorção da quitosana varia de acordo com a cristalinidade, afinidade por água, porcentagem de desacetilação e quantidade de amino-grupos³³. A quitosana ao atuar como quelante de íons metálicos, libera íons H^+ de acordo com a Figura 4. Isto sugere que a interação de íons metálicos com a quitosana é fortemente dependente do pH em soluções aquosas devido à competição entre prótons e íons metálicos. No entanto, não há informações suficientes sobre a relação entre pH e adsorção de íons metálicos pela quitosana³⁴.



Figura 4 - Esquema para a quelação do íon Cu(II) com a quitosana³⁷.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como principal objetivo o estudo da interação entre complexos de cobre e de zinco contendo FAINEs com o biopolímero quitosana.

Foram sintetizados e caracterizados complexos já reportados na literatura como os complexos de cobre com indometacina (Cu-Indo), ibuprofeno (Cu-Ibp) e naproxeno (Cu-Napx) e os complexos de zinco (Zn-Ibp) com indometacina (Zn-Indo). Também foram sintetizados complexos inéditos de cobre com cetoprofeno (Cu-Ceto) e de zinco com ibuprofeno (Zn-Ibp) e meloxicam (Zn-Hmelox).

Para o estudo da interação dos complexos com a quitosana, foram utilizadas duas técnicas distintas: coacervação e spray-drying.

Além disso, realizou-se um estudo preliminar da avaliação macroscópica da lesão intestinal do complexo metálico de cobre-indometacina (Cu-Indo) e de materiais contendo cobre-indometacina em quitosana e indometacina em quitosana, comparando-se os resultados com os obtidos para o fármaco orgânico de uso clínico, indometacina (HIndo).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Reagentes e solventes

- Acetato de zinco (Synth).

- Acetato de cobre monohidratado (Mallinckrot).
- Acetato de sódio anidro (Mallinckrot).
- Acetona (Merck).
- Ácido acético glacial (Merck).
- Ácido bórico (Reagen).
- Ácido clorídrico (Merck).
- Ácido fosfórico (Merck).
- Cetoprofeno (Sigma-Aldrich).
- Cloreto de Cálcio (Synth).
- Cloreto de potássio (Synth).
- Clorofórmio (Merck).
- Corante de Evans (Vetec).

- Diclorometano (Merck).
- Dihidrogenofosfato de sódio (Synth).
- Dimetilacetamida (Vetec).
- Dimetilformamida (Merck).
- Dimetilsulfóxido (Merck).
- Etanol (Merck).
- Glutaraldeído (Sigma-Aldrich).
- Glicerina (Synth).
- Hexano (Merck).
- Hidróxido de Sódio (Synth).
- Hidrogenofosfato dissódico (Synth).
- Ibuprofeno (Farmácia de Manipulação Rhamus).
- Indometacina (Farmácia de Manipulação Rhamus).
- Isopropanol (Merck).
- Meloxicam (Farmácia de Manipulação Rhamus).
- Metanol (Merck).
- Naproxeno (Farmácia de Manipulação Rhamus).

- Pentóxido de Fósforo (Synth).

- Quitosanas de alta, média e baixa massa molar (Sigma-Aldrich).

3.2. Métodos

3.2.1. Sínteses dos complexos metálicos de cobre e de zinco

3.2.1.1. Síntese do complexo Cu-Ceto: [Cu₂(Ceto)₄(H₂O)₂]

A uma solução de cetoprofeno (HCeto) (1,526 g, 6,0 mmol) em etanol (15 mL), foi adicionada lentamente sob agitação magnética uma solução de acetato de cobre II portador de uma estrutura do tipo gaiola { $[Cu_2(CH_3CO_2)_4(H_2O)_2]$ } (0,599 g, 3,0 mmol) dissolvido em água deionizada (12 mL). Houve formação de um precipitado verde-escuro e, após o término da adição, a mistura reacional foi deixada sob agitação magnética por 5 min, e, em seguida, deixada em repouso por 24 h. Na sequência, separou-se o sobrenadante e o sólido foi dissolvido em 10 mL de metanol. Esta solução foi deixada por ~ 30 dias em dessecador contendo cloreto de cálcio e pentóxido de fósforo, para evaporação do solvente e cristalização do complexo. Após essa período constatou a formação de um sólido verde escuro de fácil maceração. Na sequência este sólido foi macerado e então lavado com três porções de 30 mL água deionizada. O sólido obtido após a lavagem foi mantido por 7 dias num dessecador contendo cloreto de cálcio e pentóxido de fósforo, sob vácuo. Rendimento: 29%.

3.2.1.2. Síntese do complexo Cu-Indo³⁵: [Cu₂(Indo)₄ (DMF)₂]·DMF·2H₂O

A uma solução de indometacina (HIndo) (3,612 g, 10,7 mmol) em N,Ndimetilformamida (DMF) (10 mL), sob agitação magnética e sob aquecimento (50 °C), adicionou-se lentamente uma solução de acetato de cobre, $[Cu_2(CH_3CO_2)_4(H_2O)_2]$ (1,002 g, 5,0 mmol) dissolvido em DMF (10 mL). A mistura foi aquecida 80 °C por 1 h adicionou-se 65 mL de etanol e em seguida, manteve-se em repouso na capela por 5 dias. Os cristais verdes formados foram separados por filtração a vácuo em filtro de placa porosa, lavados inicialmente com 30 mL de água deionizada e então com 3 porções de 5 mL de etanol. O sólido foi mantido por 5 dias num dessecador contendo cloreto de cálcio e pentóxido de fósforo, sob vácuo. Rendimento: 78%.

3.2.1.3. Síntese do complexo Cu-Ibp³⁶: [Cu₂(Ibp)₄]

A uma solução de ibuprofeno (HIbp) (8,202 g, 40,0 mmol) em metanol (100 mL), sob agitação magnética, adicionou-se lentamente uma solução de acetato de cobre, $[Cu_2(CH_3CO_2)_4(H_2O)_2]$ (4,007 g, 20,0 mmol) dissolvido em água deionizada (80 mL). Formou-se um precipitado azul claro e, após o término da adição da solução de acetato de cobre, a mistura reacional foi mantida sob agitação magnética por 1 h. O sólido formado foi separado por filtração a vácuo em filtro de placa porosa e lavado com 30 mL de água deionizada e então com 3 porções de 5 mL de metanol. O composto foi deixado por 5 dias no dessecador contendo cloreto de cálcio e pentóxido de fósforo, sob vácuo. Rendimento: 94%. 3.2.1.4. Síntese do complexo Cu-Napx³⁹: [Cu₂(Napx)₄(DMSO)₂]

A uma solução de naproxeno (HNapx) (4,450 g, 20,0 mmol) em 75 mL de metanol, sob agitação magnética, adicionou-se, lentamente uma solução de acetato de cobre, $[Cu_2(CH_3CO_2)_4(H_2O)_2]$ (2,000 g, 10,0 mmol) em 100 mL de DMSO. A mistura foi mantida sob refluxo durante 1h em banho-maria (60 °C). Em seguida, aguardou-se até a solução atingir a temperatura ambiente e adicionou-se 100 mL de diclorometano. Um sólido branco depositado no fundo do balão foi removido por filtração e a solução foi mantida na capela por ~ 5 dias. Os cristais verdes formados foram coletados por filtração a vácuo em filtro de vidro de placa porosa, lavados rapidamente com etanol e mantidos por 3 dias em dessecador contendo cloreto de cálcio e pentóxido de fósforo, sob vácuo. Rendimento: 79%.

3.2.1.5. Síntese do complexo Zn-Hmelox: [Zn(Hmelox)₂(H₂O)₂]·1,5H₂O

A uma suspensão do fármaco meloxicam (H₂Melox) (0,560 g, 1,6 mmol) em água deionizada (200 mL) adicionou-se lentamente, sob agitação, uma solução de NaOH 1,0 mol L^{-1} até que ocorresse total dissolução do fármaco; obteve-se uma solução amarela (pH final da solução = 7 - 8). Uma solução de acetato de zinco, 0,160 g (0,8 mmol) em 10 mL de água deionizada foi adicionada lentamente à solução do fármaco, sob agitação, ocorrendo imediatamente a formação de um sólido amarelo muito fino. A suspensão foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 90 min. O sólido amarelo foi isolado por centrifugação, lavado com água deionizada e mantido por 3 dias em dessecador contendo cloreto de cálcio e pentóxido de fósforo, sob vácuo. Rendimento: 76%.

3.2.1.6. Síntese do complexo Zn-Indo_1³⁷: [Zn(Indo)₂(MeOH)₂]

A uma solução de indometacina (HIndo) (3,611 g, 10,09 mmol) em N,N-Dimetilformamida (DMF) (10 mL), foi adicionada lentamente sob agitação magnética uma solução de acetato de zinco (1,240 g, 5,65 mmol) dissolvido em DMF (10 mL). A mistura foi agitada sob aquecimento em banho-maria (50°C) por 6 h. Depois de resfriada à temperatura ambiente, adicionou-se 50 mL de metanol, ocorrendo a formação de um sólido amarelo. A mistura foi deixada em repouso por 3 dias. O sólido foi separado por filtração a vácuo em filtro de placa porosa, lavado inicialmente com 30 mL de água deionizada e então com 3 porções de 5 mL de metanol gelado. O composto foi deixado por 5 dias no dessecador contendo cloreto de cálcio e pentóxido de fósforo, sob vácuo. Rendimento: 54%.

3.2.1.7. Síntese do complex Zn-Indo_2³⁷: [Zn₂(Indo)₄(DMA)₂]·1/2DMA·1/2H₂O

A uma solução de indometacina (HIndo) (3,660 g, 10,23 mmol) em N,Ndimetilacetamida (DMA) (10 mL), foi adicionada lentamente sob agitação magnética uma solução de acetato de zinco (1,240 g, 5,65 mmol) dissolvido em DMA (10 mL). A mistura foi agitada sob aquecimento em banho de glicerina (60 °C) por 24 h e resfriada à temperatura ambiente. Em seguida, a mistura foi deixada em repouso por 3 semanas. Os cristais foram separados por filtração a vácuo em filtro de placa porosa, lavados inicialmente com 30 mL de água deionizada e então com 3 porções de 5 mL de metanol. O composto foi deixado por 5 dias no dessecador contendo cloreto de cálcio e pentóxido de fósforo, sob vácuo. Rendimento: 44%.

3.2.1.8. Síntese do complexo Zn-Ibp: [Zn₂(Ibp)₄]·2MeOH·H₂O

A uma solução de ibuprofeno (HIbp) (4,103 g, 20,0 mmol) em metanol (MeOH) (50 mL), foi adicionada lentamente sob agitação magnética uma solução de acetato de zinco (2,002 g, 10,00 mmol) dissolvido em água deionizada (40 mL). A mistura foi deixada sob agitação magnética por 1 h e o sólido branco formado foi separado por filtração a vácuo em filtro de placa porosa, lavado inicialmente com 30 mL de água deionizada e em seguida com 2 porções de 10 mL de hexano gelado. O composto foi deixado por 5 dias no dessecador contendo cloreto de cálcio e pentóxido de fósforo, sob vácuo. Rendimento: 70%.

3.2.2. Determinação da massa molar viscosimétrica média (M_v) das quitosanas de alta massa molar (QTAPM), média massa molar (QTMPM) e baixa massa molar (QTBPM)

As medidas viscosimétricas das quitosanas de alta massa molar (QTAPM), de média massa molar (QTMPM) e de baixa massa molar (QTBPM) foram feitas num viscosímetro capilar Ubbelhode Schot 531-10, a 25 \pm 0,1 °C. Inicialmente, preparou-se uma solução tampão contendo 0,3 mol L⁻¹ de ácido acético e 0,2 mol L⁻¹ de acetato de sódio: volumes de 250 mL de ácido acético 0,6 mol L⁻¹ e de acetato de sódio 0,4 mol L⁻¹ foram misturados em um balão volumétrico de 500 mL. Em seguida, preparou-se 5 soluções de concentrações diferentes para cada tipo de QT em análise. Para o preparo dessas soluções as referidas massas de QT (Tabela 1) foram transferidas para balões volumétricos de 50 mL, aos quais se adicionou ~ 35 mL de solução tampão. Os balões foram fechados e agitados magneticamente por cerca de 30 min até a rápida e parcial dissolução da QT. Em seguida, o volume de cada balão foi completado com solução tampão e adicionou-se uma pequena barra magnética para
agitar o sistema por 5 dias. Após este período, as soluções poliméricas foram filtradas através de membranas de acetato de celulose com tamanho de poro de 0,45 mm. Registrou-se, então, os tempos de escoamento das soluções poliméricas usando-se o viscosímetro imerso em banho termostatizado a 25 °C⁴⁸.

| QTBPM | | QTMPM | | QTAPM | | |
|-------------------------|----------|-------------------------|-------------|-------------------------|----------|--|
| Concentração | Massa de | Concentração | Massa de QT | Concentração | Massa de | |
| da Solução de | QT (g) | da Solução de (g) | | da Solução de | QT (g) | |
| QT (g L ⁻¹) | | QT (g L ⁻¹) | | QT (g L ⁻¹) | | |
| 0,50 | 0,0252 | 0,90 | 0,0453 | 0,90 | 0,0453 | |
| 1,00 | 0,0504 | 1,20 | 0,0601 | 1,20 | 0,0604 | |
| 1,50 | 0,0758 | 1,50 | 0,0754 | 1,50 | 0,0752 | |
| 2,00 | 0,1003 | 1,80 | 0,0901 | 1,80 | 0,0902 | |
| 2,50 | 0,1254 | 2,10 | 0,1053 | 2,10 | 0,1051 | |

Tabela 1 - Valores de massa de QT utilizados para determinação da M_v.

3.2.3. Determinação do grau médio de desacetilação (GMD) das quitosanas de alta e baixa massa molar (QTAPM e QTBPM)

Adicionou-se uma quantidade conhecida (25 mL) de solução de ácido clorídrico 0,02 mol L⁻¹, previamente padronizada a uma determinada massa seca (100 °C, por 24 h) de QT, e manteve-se sob agitação magnética moderada por 24 h. O ensaio foi realizado em triplicata, em que as massas de QT seca utilizadas foram: a) 0,2030 g; b) 0,2022 g e c) 0,2004 g. As soluções ácidas foram tituladas com solução de hidróxido de sódio 0,0835 mol L⁻¹ padronizada com o auxílio de um pHmetro operando na função mV para construção das curvas potenciométricas³⁸.

A derivada primeira dessa curva de pH em função do volume de base fornece dois pontos de inflexão que permitem determinar o número de mols de hidróxido de sódio necessários para desprotonação dos grupos amino da QT. A Equação 2 a seguir foi utilizada para determinar o grau de desacetilação:

$$\% NH_2 = \frac{MNaOH \times (V2 - V1) \times 161 \times 100}{m_2}$$
(2)

Em que: M_{NaOH} é a concentração molar da solução de NaOH (mol L⁻¹), V₁ e V₂ são respectivamente os volumes de NaOH empregados para neutralizar o excesso de HCl e a amostra de QT protonada, obtidos a partir das inflexões da curva de titulação potenciométrica, 161 u é a massa molar da unidade monomérica de QT e m₂ a massa da amostra seca utilizada para a titulação.

3.2.4. Preparação dos materiais contendo HIbp, HCeto, Cu-Ibp, Cu-Ceto e Zn-Ibp em microesferas de QTAPM obtidas pela técnica de coacervação e reticuladas com glutaraldeído (QTAPM/GA)

3.2.4.1. Procedimento 1 de preparação das microesferas de QTAPM/GA

Microesferas de QTAPM: Em um béquer de 200 mL, foram colocados 98 mL de água deionizada e em seguida 2,0 mL de ácido acético glacial. Esta solução foi deixada sob agitação magnética branda por 2 min, em seguida adicionou-se lentamente e sob agitação

mecânica branda (cerca de 100 rpm) 3,0 g de QTAPM. A mistura foi deixada sob agitação mecânica a 300 rpm por 15 h, adquirindo no final um aspecto de um gel de cor bege clara, e depois foi gotejada lentamente em uma solução de NaOH 2,0 mol L⁻¹ com o auxílio de uma bomba peristáltica (Ismatec) com uma velocidade de fluxo de ~ 5 mL h⁻¹. As esferas de quitosana permaneceram na solução de NaOH 2,0 mol L⁻¹ sob agitação branda por 24 h, foram lavadas com várias porções de água deionizada até resultar em pH 5 e, em seguida mantidas em repouso por 24 h em água deionizada em recipiente fechado. As esferas foram então separadas da solução, com o auxílio de uma peneira (tamanho aproximado da cavidade = 1 mm), e secadas cuidadosamente sobre papel de filtro. A massa obtida de microesferas de QTAPM hidratadas foi 66,30 g.

Reticulação das microesferas de QTAMP: Em três erlenmeyers separados foram colocadas massas de 22,10 g de microesferas de QTAPM hidratadas. A cada um deles adicionou-se 50 mL de água deionizada e em seguida, com o auxílio de uma micropipeta, os seguintes volumes de solução de GA (25% em água): erlenmeyer 1 (grau de reticulação das esferas – 0,1%): 4 μ L; erlenmeyer 2 (grau de reticulação das esferas - 0,5%): 20 μ L; erlenmeyer 3 (grau de reticulação das esferas - 1,0%): 40 μ L. Os erlenmeyers foram fechados, as microesferas permaneceram sob agitação magnética branda por 24 h, e, em seguida, foram mantidas em repouso na mesma solução de GA por mais 4 dias. No final do quarto dia as microesferas foram lavadas com muitas porções de água deionizada para retirar o excesso do agente reticulante GA. As microesferas de QTAPM reticuladas com 0,1% GA (QTAPM/0,1%GA) foram utilizadas nos experimentos a seguir.

Ensaio de adsorção 1 - Materiais contendo os fármacos HIbp e HCeto e os complexos Zn-Ibp e Cu-Ceto em microesferas QTAPM/0,1%GA

As massas dos compostos relacionadas na Tabela 2 foram pesadas em frascos de 20 mL. A cada um deles adicionou-se 12 mL de etanol e as misturas foram deixadas sob agitação magnética branda por cerca de 10 min. Adicionou-se lentamente 4,0 g das esferas QTAPM/0,1%GA a cada um dos frascos e as esferas permaneceram em contato com as soluções dos compostos por 5 dias, sendo agitadas periodicamente. Após esse período, as esferas foram peneiradas e lavadas rapidamente com uma única porção de etanol. Em seguida, foram colocadas em vidros de relógio e levadas para secagem em estufa a 40 °C por 6 h. Os materiais obtidos foram pesados e guardados em frascos fechados.

 Tabela 2 - Massas dos compostos HIbp, Zn-Ibp, HCeto e Cu-Ceto utilizadas no ensaio

 de adsorção 1.

| Composto | Massa (g) |
|----------|-----------|
| HIbp | 0,0874 |
| Zn-Ibp | 0,1037 |
| HCeto | 0,0453 |
| Cu-Ceto | 0,0302 |

3.2.4.2. Procedimento 2 de preparação das microesferas de QTAPM/GA

Microesferas de QTAPM: o procedimento experimental aqui seguido foi similar ao descrito anteriormente (3.2.4.1). No presente procedimento, a massa da QTAPM, os volumes

de ácido acético glacial e de água deionizada tiveram suas quantidades triplicadas, passando a ser 9,0 g, 6,0 mL e 294 mL, respectivamente. Massa obtida de esferas hidratadas: 205,5 g.

Reticulação das microesferas de QTAMP: Em três erlenmeyers separados foram colocadas massas de 68,5 g de microesferas de QTAPM hidratadas. A cada um deles adicionou-se 150 mL de água deionizada e em seguida, com o auxílio de uma micropipeta, os seguintes volumes de solução de GA (25% em água): erlenmeyer 1 (grau de reticulação das esferas - 0,1%): 12 µL; erlenmeyer 2 (grau de reticulação das esferas - 0,5%): 60 µL; erlenmeyer 3 (grau de reticulação das esferas - 1,0%): 120 µL. Os erlenmeyers foram fechados, as microesferas permaneceram sob agitação magnética branda por 24 h, e, em seguida, foram mantidas em repouso na mesma solução de GA por mais 4 dias. No final do quarto dia as microesferas foram lavadas com muitas porções de água deionizada para retirar o excesso do agente reticulante GA. As microesferas de QTAPM reticuladas com GA (QTAPM/GA) foram utilizadas nos experimentos a seguir.

Ensaio de adsorção 2 - Materiais contendo os fármacos HIbp e HCeto e os complexos Zn-Ibp Cu-Ibp e Cu-Ceto em microesferas QTAPM/GA

Este ensaio foi realizado com esferas de QTAPM/GA com os três graus de reticulações (QTAPM /0,1%GA, QTAPM /0,5%GA e QTAPM /1,0%GA). As massas dos compostos relacionadas na Tabela 3 foram pesadas em frascos de 20 mL. A cada um deles adicionou-se 12 mL de etanol e as misturas foram deixadas sob agitação magnética branda por cerca de 10 min. Adicionou-se lentamente 6,5 g das esferas QTAPM/GA a cada um dos frascos e as esferas permaneceram em contato com as soluções dos compostos por 3 dias, sendo agitadas periodicamente. Uma mesma quantidade de microesferas de QTAPM/GA

hidratadas (6,5 g) dos 3 graus de reticulações foi adicionada a 3 frascos separados contendo apenas etanol. Em seguida as esferas foram peneiradas e lavadas rapidamente com uma porção de etanol. Na sequencia, as esferas foram levadas para secagem em estufa a 40 °C por 7 h. Os materiais sintetizados foram pesados e guardados em fracos fechados.

Tabela 3 - Massas dos compostos HIbp, Zn-Ibp, Cu-Ibp, HCeto e Cu-Ceto utilizadasno ensaio de adsorção.

| | Grau de reticulação das esferas de QTAPM/GA | | | | | | |
|----------|---|---------|---------|--|--|--|--|
| Composto | 0,1% GA | 0,5% GA | 1,0% GA | | | | |
| | Massas (g) | | | | | | |
| HIbp | 0,0417 | 0,0426 | 0,0410 | | | | |
| Zn-Ibp | 0,0536 | 0,0520 | 0,0528 | | | | |
| Cu-Ibp | 0,0178 | 0,0179 | 0,0178 | | | | |
| HCeto | 0,0514 | 0,0508 | 0,0509 | | | | |
| Cu-Ceto | 0,0590 | 0,0588 | 0,0592 | | | | |

3.2.5. Preparação dos materiais contendo Cu-Npx em microesferas de QTAPM/GA obtidas pela técnica de coacervação (QTAPM/GA_CuNapx) e ensaios de liberação

3.2.5.1. Preparação das microesferas de QTAPM/GA

Microesferas de QTAPM: Colocou-se em um béquer de 1000 mL, 700 mL de água deionizada e em 14 mL de ácido acético glacial e esta solução foi deixada sob agitação

magnética branda por 2 min. Em seguida, adicionou-se lentamente, sob agitação mecânica branda (~ 100 rpm), 20,0 g de QTAPM e a mistura foi mantida sob agitação mecânica a 300 rpm por 15 h resultando em um gel de cor bege clara. Essa solução de QT foi gotejada lentamente em uma solução de NaOH 2,0 mol L⁻¹ com auxílio de uma bomba peristáltica (Ismatec) com uma velocidade de fluxo de ~ 5 mL h⁻¹. As microesferas de QTAPM foram mantidas na solução de NaOH sob agitação branda por 24 h e depois lavadas com várias porções de água deionizada até dar pH 5. Em seguida, permaneceram em repouso por 24 h em água deionizada num recipiente fechado. Após esse período as esferas foram peneiradas e secadas cuidadosamente sobre papel de filtro. A massa obtida de microesferas de QTAPM hidratadas foi 400 g.

Reticulação das microesferas de QTAMP: Em dois erlenmeyers separados foram colocadas massas de 200 g de microesferas de QT hidratadas. A cada um deles adicionou-se 100 mL de água deionizada e em seguida, com o auxílio de uma micropipeta, os seguintes volumes de solução de GA (25% em água): erlenmeyer 1 (grau de reticulação das esferas - 0,1%): 36 μL; erlenmeyer 2 (grau de reticulação das esferas - 1,0%): 363 μL. Os erlenmeyers foram fechados, as microesferas permaneceram sob agitação magnética branda por 24 h, e, em seguida, foram mantidas em repouso na mesma solução de GA por mais 4 dias. No final do quarto dia as microesferas foram lavadas com muitas porções de água deionizada para retirar o excesso do agente reticulante GA. As microesferas de QTAPM reticuladas com GA (QTAPM/GA) foram utilizadas nos experimentos a seguir.

3.2.5.2. Preparação e curvas de adsorção dos materiais QTAPM/GA_CuNapx

Este ensaio foi realizado com esferas de QTAPM/GA com os três graus de reticulação (QTAPM/0,1%GA, QTAPM/0,5%GA e QTAPM/1,0%GA). As massas de Cu-Napx listadas nas Tabelas 4 e 5 foram pesadas em frascos de 20 mL à temperatura ambiente. A cada um deles adicionou-se 1,0 mL DMF. Em seguida, cada sistema foi agitado magneticamente por cerca de 2 min até que todo o complexo se dissolvesse formando uma solução verde esmeralda. Acrescentou-se 9,0 mL de etanol, manteve-se sob agitação magnética branda por ~ 1 min e, depois adicionou-se lentamente cerca de 4,7 g das esferas de QTAPM/GA hidratadas. Para comparação, em 2 frascos separados, preparou-se misturas de 1,0 mL de DMF e 9,0 mL de etanol e em seguida adicionou-se 4,7 g de esferas QTAPM/GA de graus de reticulação 0,1% GA e 1,0% GA. As esferas foram mantidas em contato com as soluções do Cu-Napx por 10 dias, sendo agitadas periodicamente. Após os 10 dias, as esferas foram peneiradas, lavadas rapidamente com 5 mL de etanol e, em seguida levadas para secagem em estufa a 40 °C por 18 h. Ao final desse período, o material foi retirado da estufa e deixado para esfriar à temperatura ambiente. Na sequência, os materiais obtidos foram pesados e guardados em fracos fechados. Os materiais obtidos foram pesados e devidamente guardados em fracos fechados.

| Solução | Massa da Cu Nany (a) | Concentração de Cu-Napx | | | |
|---------|----------------------|-------------------------|--|--|--|
| Solução | Massa ue Cu-Mapx (g) | $(mol L^{-1})$ | | | |
| 1 | 0,0047 | 3,92 x 10 ⁻⁴ | | | |
| 2 | 0,0070 | 5,83 x 10 ⁻⁴ | | | |
| 3 | 0,0100 | 8,33 x 10 ⁻⁴ | | | |
| 4 | 0,0123 | 1,03 x 10 ⁻³ | | | |
| 5 | 0,0227 | 1,89 x 10 ⁻³ | | | |
| 6 | 0,0264 | 2,20 x 10 ⁻³ | | | |
| 7 | 0,0304 | 2,53 x 10 ⁻³ | | | |
| 8 | 0,0377 | 3,14 x 10 ⁻³ | | | |
| 9 | 0,0428 | 3,57 x 10 ⁻³ | | | |
| 10 | 0,0493 | 4,11 x 10 ⁻³ | | | |
| 11 | 0,0537 | 4,48 x 10 ⁻³ | | | |
| 12 | 0,0608 | 5,07 x 10 ⁻³ | | | |
| 13 | 0,0661 | 5,51 x 10 ⁻³ | | | |
| 14 | 0,0736 | 6,13 x 10 ⁻³ | | | |
| 15 | 0,0858 | 7,15 x 10 ⁻³ | | | |
| 16 | 0,0965 | 8,04 x 10 ⁻³ | | | |
| 17 | 0,0974 | 8,12 x 10 ⁻³ | | | |
| 18 | 0,1141 | 9,51 x 10 ⁻³ | | | |
| 19 | 0,1327 | 1,11 x 10 ⁻² | | | |
| 20 | 0,1458 | $1,22 \ge 10^{-2}$ | | | |
| 21 | 0,1562 | 1,30 x 10 ⁻² | | | |
| 22 | 0,1684 | 1,40 x 10 ⁻² | | | |
| 23 | 0,1808 | 1,51 x 10 ⁻² | | | |
| 24 | 0,2026 | 1,69 x 10 ⁻² | | | |
| 25 | 0,2213 | 1,84 x 10 ⁻² | | | |
| 26 | 0,2414 | 2,01 x 10 ⁻² | | | |
| 27 | 0,2611 | 2,18 x 10 ⁻² | | | |

Tabela 4 - Massas utilizadas na preparação dos materiais QTAPM/0,1%GA_CuNapx.

| Salvaão | Magga da Cu Nany (g) | Concentração de Cu-Napx | | | |
|---------|----------------------|-------------------------|--|--|--|
| Solução | Massa de Cu-Napx (g) | $(mol L^{-1})$ | | | |
| 1 | 0,0032 | 2,67 x 10 ⁻⁴ | | | |
| 2 | 0,0073 | 6,08 x 10 ⁻⁴ | | | |
| 3 | 0,0108 | 9,00 x 10 ⁻⁴ | | | |
| 4 | 0,0160 | 1,33 x 10 ⁻³ | | | |
| 5 | 0,0231 | 1,92 x 10 ⁻³ | | | |
| 6 | 0,0240 | 2,00 x 10 ⁻³ | | | |
| 7 | 0,0304 | 2,53 x 10 ⁻³ | | | |
| 8 | 0,0362 | 3,02 x 10 ⁻³ | | | |
| 9 | 0,0424 | 3,53 x 10 ⁻³ | | | |
| 10 | 0,0482 | 4,02 x 10 ⁻³ | | | |
| 11 | 0,0547 | 4,56 x 10 ⁻³ | | | |
| 12 | 0,0601 | 5,01 x 10 ⁻³ | | | |
| 13 | 0,0665 | 5,54 x 10 ⁻³ | | | |
| 14 | 0,0709 | 5,91 x 10 ⁻³ | | | |
| 15 | 0,0758 | 6,32 x 10 ⁻³ | | | |
| 16 | 0,0984 | 8,20 x 10 ⁻³ | | | |
| 17 | 0,1060 | 8,83 x 10 ⁻³ | | | |
| 18 | 0,1157 | 9,64 x 10 ⁻² | | | |
| 19 | 0,1344 | 1,11 x 10 ⁻² | | | |
| 20 | 0,1457 | 1,21 x 10 ⁻² | | | |
| 21 | 0,1806 | 1,51 x 10 ⁻² | | | |
| 22 | 0,2616 | 1,68 x 10 ⁻² | | | |
| 23 | 0,2228 | 1,86 x 10 ⁻² | | | |
| 24 | 02408 | 2,01 x 10 ⁻² | | | |
| 25 | 0,2620 | 2,18 x 10 ⁻² | | | |

Tabela 5 - Massas utilizadas na preparação dos materiais QTAPM/1,0%GA_CuNapx.

3.2.5.3. Ensaios de liberação do fármaco naproxeno (HNapx) a partir do material QTAPM/0,1%GA_CuNapx

3.2.5.3.1. Preparo das soluções-tampão

Tampão pH 1,2: Uma solução contendo 0,5234 g de ácido fosfórico e 0,108 g de dihidrogenofosfato de sódio em 1,0 L de água deionizada foi deixada sob agitação magnética moderada por 20 min e o pH final foi medido com o auxílio de um pHmetro devidamente calibrado³⁹.

Tampão pH 6,8: Uma solução contendo 0,4259 g de dihidrogenofosfato de sódio e 0,2280 g de hidrogenofosfato dissódico em 0,5 L de água deionizada foi deixada sob agitação magnética moderada por 20 min e o pH final foi medido com o auxílio de um pHmetro devidamente calibrado⁴⁰.

Tampão pH 9,8: Preparou-se inicialmente 50 mL de uma solução 2,0 mol L⁻¹ de ácido bórico e cloreto de potássio, misturando-se 0,7450 g de cloreto de potássio e 0,6200 g de ácido bórico em 50 mL de água deionizada. Após agitação por cerca de 20 min, adicionou-se a esta solução 40,6 mL de solução de hidróxido de sódio 2,0 mol L⁻¹ e o pH final foi medido com o auxílio de um pHmetro devidamente calibrado⁴².

3.2.5.3.2. Estudos de liberação

Inicialmente, amostras de ~ 25,0 mg (Tabela 6) de QTAPM/0,1%GA_CuNapx foram separadamente suspensas dentro de membranas de diálise (Sigma-Aldrich) em 10,0 mL de soluções tampão de pH 1,2, pH 6,8 e pH 9,8. As membranas foram introduzidas em béqueres contendo 30 mL das correspondentes soluções tampão. Tais sistemas foram mantidos sob agitação (100 rpm) em banho termostatizado de 37 °C com o auxílio de uma incubadora, simulando as condições do trato gastrointestinal⁴¹. Procedimento semelhante foi realizado para os materiais sem o complexo (QTAPM/0,1%GA).

Ao longo de 12 h, alíquotas de 1,0 mL foram retiradas dos sistemas a cada 30 min para análise por HPLC para a determinação da quantidade de fármaco liberado. Aos sistemas dos quais foram retiradas as referidas alíquotas, adicionou-se na sequência 1,0 mL da correspondente solução tampão⁴¹.

| Tabela 6 - Ma | ssas dos | materiais | QTAPM/0,1%GA | _CuNapx | e QTAPM/0,1%GA |
|---------------------------|-----------|-----------|--------------|---------|----------------|
| utilizadas no ensaio de l | iberação. | | | | |

| Sistemas | Massa do material QTAPM/0,1%GA_CuNapx (g) | Massa do material QTAPM/0,1%GA (g) |
|----------|--|---------------------------------------|
| pH 1,2 | 0,0254 | 0,0286 |
| рН 6,8 | 0,0273 | 0,0264 |
| рН 9,8 | 0,0259 | 0,0262 |

3.2.6. Preparação via spray-dryer dos materiais contendo os compostos Cu-Ibp, Cu-Indo e HIndo em microesferas/microcápsulas de QTBPM

As preparações foram realizadas em duas condições: usando excesso de ácido acético, simbolizadas por sd1, e sem excesso de ácido acético (com otimização do tempo reacional), simbolizadas por sd2.

3.2.6.1. Preparação de microesferas/microcápsulas de QTBPM vazias (QTBPM_vazia_sd1)

Em um béquer de 250 mL foram colocados 100,0 mL de água deionizada e 10,0 mL de ácido acético glacial. Esta solução foi deixada sob agitação magnética por 2 min e em seguida adicionou-se lentamente 1,0 g de QTBPM. A mistura foi agitada mecanicamente a 500 rpm por 15 h. À mistura de pH ~ 2,0 - 2,5, adicionou-se 10,0 mL de etanol e o sistema foi agitado mecanicamente a 500 rpm por 8 h, resultando em uma solução viscosa de cor areia de pH ~ 2,0 - 2,5. Esta foi submetida ao processo de spray-drying (temperatura inlet e outlet, potência do aspirador e da bomba e pressão do ar sintético foram 140 °C, 45 °C, 100%, 20% e 4,2 x 10^2 kPa, respectivamente). A massa obtida do material branco foi de 0,8808 g. Rendimento: 81%.

3.2.6.2. Preparação de microesferas/microcápsulas de QTBPM reticuladas com GA (QTBPM/GA_sd1)

Em um béquer de 250 mL, foram colocados 100,0 mL de água deionizada e 10,0 mL de ácido acético glacial. Esta solução foi deixada sob agitação magnética por 2 min e em seguida adicionou-se lentamente 1,0 g de QTBPM. A mistura foi agitada mecanicamente a

500 rpm por 15 h e o pH final foi de ~ 2,0 - 2,5. Acrescentou-se, sob agitação mecânica (150 rpm), 0,6 mL de solução de GA (solução 25% em água) e a mistura foi então agitada mecanicamente a 500 rpm por 20 h, resultando uma solução de pH 2,0 - 2,5. Em seguida adicionou-se 10,0 mL de etanol e o sistema foi novamente agitado mecanicamente a 500 rpm por 8 h, obtendo-se uma solução viscosa de cor caramelo e pH na faixa de 2,5 - 3,0. Esta foi submetida ao processo de spray-drying (temperatura inlet e outlet, potência do aspirador e da bomba e pressão do ar sintético foram 140 °C, 60 °C, 100%, 20% e 4,2 x 10^2 kPa, respectivamente). Obteve-se 0,9792 g de um sólido marrom. Rendimento: 85%.

3.2.6.3. Preparação de microesferas/microcápsulas de QTBPM contendo Cu-Ibp (QTBPM_Cu-Ibp_sd1)

Em um béquer de 250 mL, foram colocados 100,0 mL de água deionizada e 10,0 mL de ácido acético glacial. Esta solução foi deixada sob agitação magnética por 2 min e em seguida adicionou-se lentamente 1,0 g de QTBPM. A mistura foi agitada mecanicamente a 500 rpm por 15 h (pH ~ 2,0 - 2,5). Em paralelo preparou-se uma suspensão contendo 0,0650 g de Cu-Ibp em 10,0 mL de etanol que foi mantida sob agitação branda 15 h. Sob agitação mecânica branda, essa suspensão de Cu-Ibp foi adicionada gota a gota à solução de QTBPM e o sistema foi agitado a 500 rpm por 6 h, obtendo-se uma suspensão viscosa com partículas azuis muito pequenas e pH ~ 2,0 - 3,0. Esta foi submetida ao processo de spray-drying (temperatura inlet e outlet, potência do aspirador e da bomba e pressão do ar sintético foram 140 °C, 45 °C, 100%, 20% e 4,2 x 10^2 kPa, respectivamente). A massa obtida do material azul-esverdeado foi de 0,9315 g. Rendimento: 88%.

3.2.6.4. Preparação de microesferas/microcápsulas de QTBPM reticuladas com GA contendo Cu-Ibp (QTBPM/GA_Cu-Ibp_sd1)

Em um béquer de 250 mL, foram colocados 100,0 mL de água deionizada e 10,0 mL de ácido acético glacial. Esta solução foi deixada sob agitação magnética por 2 min e em seguida adicionou-se lentamente 1,0 g de QTBPM. A mistura foi agitada mecanicamente a 500 rpm por 15 h (pH ~ 2,0 - 2,5. Acrescentou-se sob agitação mecânica (150 rpm) 0,6 mL de solução de GA (solução 25% em água) e a mistura foi então agitada mecanicamente (500 rpm) por 20 h, obtendo-se uma solução de cor caramelo de pH 2,0 - 2,5. Em paralelo preparou-se uma suspensão contendo 0,0650 g de Cu-Ibp em 10,0 mL de etanol que foi mantida sob agitação branda 15 h. Sob agitação mecânica branda, a suspensão de Cu-Ibp foi adicionada gota a gota à solução de QTBPM e o sistema foi agitado a 500 rpm por 8 h, obtendo-se uma suspensão viscosa de cor amarelo-esverdeado com partículas azuis muito pequenas e pH ~ 2,0 - 3,0. Esta foi submetida ao processo de spray-drying (temperatura inlet e outlet, potência do aspirador e da bomba e pressão do ar sintético foram 140 °C, 45 °C, 100%, 20% e 4,2 x 10^2 kPa, respectivamente). A massa obtida do material azul-esverdeado foi de 0,9315 g. Rendimento: 89%.

3.2.6.5. Preparação de microesferas/microcápsulas de QTBPM contendo Zn-Ibp (QTBPM_Zn-Ibp_sd1): Em um béquer de 250 mL colocou-se 100 mL de água deionizada e 10,0 mL de ácido acético glacial. Esta solução foi deixada sob agitação magnética por 2 min e em seguida adicionou-se lentamente 1,0 g de QTBPM. A mistura foi agitada mecanicamente a 500 rpm por 15 h, e o valor de pH medido foi entre 2,0 - 2,5. Em paralelo preparou-se uma suspensão contendo 0,0650 g de Zn-Ibp em 10,0 mL de etanol. A mistura foi agitada brandamente por 15 h, e em seguida, sob agitação mecânica branda, foi adicionada gota a gota

à solução de QTBPM. O sistema foi agitado a 500 rpm por 6 h, obtendo-se uma suspensão viscosa de cor amarelada com partículas brancas muito pequenas (pH 2,0 - 2,5). Esta foi passada em spray-dryer (temperatura inlet e outlet, potência do aspirador e da bomba e pressão do ar sintético foram 140 °C, 45 °C, 100%, 20% e 4,2 x 10² kPa, respectivamente). A massa obtida do material branco-amarelado foi de 0,8196 g. Rendimento: 77%.

3.2.6.6. Preparação de microesferas/microcápsulas de QTBPM reticuladas com GA contendo Zn-Ibp (QTBPM/GA_Zn-Ibp_sd1): Em um béquer de 250 mL, colocou-se 100 mL de água deionizada e 10,0 mL de ácido acético glacial. Esta solução foi deixada sob agitação magnética por 2 min e em seguida adicionou-se lentamente 1,0 g de QTBPM. A mistura foi agitada mecanicamente a 500 rpm por 15 h (pH 2,0 - 2,5) e em seguida acrescentou-se 0,6 mL de solução de GA (solução 25% em água) sob agitação mecânica (150 rpm). A mistura foi então agitada mecanicamente a 500 rpm por 20 h, obtendo-se uma solução de cor caramelo de pH 2,0 - 2,5. Em paralelo preparou-se uma suspensão contendo 0,0650 g de Zn-Ibp em 10,0 mL de etanol. A mistura foi agitada brandamente por 15 h. Em seguida, sob agitação mecânica branda, a suspensão de Zn-Ibp foi adicionada gota a gota à solução de QTBPM e o sistema foi agitado a 500 rpm por 8 h. Ao término desse período, obteve-se uma suspensão viscosa de cor amarelada com partículas brancas muito pequenas (pH 2,0 - 2,5). Esta foi passada em spray-dryer (temperatura inlet e outlet, potência do aspirador e da bomba e pressão do ar sintético foram 140 °C, 45 °C, 100%, 20% e 4,2 x 10² kPa, respectivamente). Obteve-se 0,9315 g de um sólido marrom. Rendimento: 88%.

3.2.6.7. Preparação de microesferas/microcápsulas de QTBPM vazias (QTBPM_vazia_sd2)

Em um béquer de 500 mL foram colocados 198,0 mL de água deionizada e 2,0 mL de ácido acético glacial. Esta solução foi deixada sob agitação magnética por 2 min e em seguida adicionou-se lentamente 4,0 g de QTBPM. A mistura foi agitada mecanicamente a 500 rpm por 3 h. Em seguida adicionou-se 40,0 mL de etanol e o sistema foi agitado mecanicamente a 500 rpm por 30 min, obtendo-se uma solução viscosa de cor areia. Esta foi submetida ao processo de spray-drying (temperatura inlet e outlet, potência do aspirador e da bomba e pressão do ar sintético foram 140 °C, 45 °C, 100%, 20% e 4,2 x 10² kPa, respectivamente). A massa obtida do material branco foi de 3,0912 g. Rendimento: 77%.

3.2.6.8. Preparação de microesferas/microcápsulas de QTBPM reticuladas (QTBPM/GA_sd2)

Em um béquer de 500 mL foram colocados 198,0 mL de água deionizada e 2,0 mL de ácido acético glacial. Esta solução foi deixada sob agitação magnética por 2 min e em seguida adicionou-se lentamente 4,0 g de QTBPM. A mistura foi agitada mecanicamente a 500 rpm por 3 h. Acrescentou-se sob agitação mecânica de 150 rpm 0,1 mL de solução de GA (solução 25% em água). A mistura foi então agitada mecanicamente a 500 rpm por 1 h, obtendo-se uma solução de cor caramelo clara. Em seguida adicionou-se 40,0 mL de etanol e o sistema foi novamente agitado mecanicamente (500 rpm) por 30 min, obtendo-se uma solução viscosa de cor caramelo clara. Esta foi submetida ao processo de spray-drying (temperatura inlet e outlet, potência do aspirador e da bomba e pressão do ar sintético foram 140 °C, 55 °C, 100%,

20% e 4,2 x 10^2 kPa, respectivamente). A massa obtida do material branco-amarelado foi de 1,8497 g. Rendimento: 47%.

3.2.6.9. Preparação de microesferas/microcápsulas de QTBPM contendo Cu-Ibp (QTBPM_Cu-Ibp_sd2)

Em um béquer de 500 mL foram colocados 198,0 mL de água deionizada e 2,0 mL de ácido acético glacial. Esta solução foi deixada sob agitação magnética por 2 min e em seguida adicionou-se lentamente 4,0 g de QTBPM. A mistura foi agitada mecanicamente a 500 rpm por 3 h. Em paralelo preparou-se uma suspensão contendo 0,2880 g de Cu-Ibp em 40,0 mL de etanol. A mistura foi agitada brandamente por 3 h. Em seguida, sob agitação mecânica branda, a suspensão de Cu-Ibp foi adicionada gota a gota à solução de QTBPM e o sistema foi agitado a 500 rpm por 30 min, obtendo-se uma suspensão viscosa de cor azul clara com partículas azuis muito pequenas. Esta foi submetida ao processo de spray-drying (temperatura inlet e outlet, potência do aspirador e da bomba e pressão do ar sintético foram 140 °C, 45 °C, 100%, 20% e 4,2 x 10^2 kPa, respectivamente). A massa obtida do material azul-esverdeado foi de 2,9972 g. Rendimento: 75%.

3.2.6.10. Preparação de microesferas/microcápsulas de QTBPM reticuladas com GA contendo Cu-Ibp (QTBPM/GA_Cu-Ibp_sd2)

Em um béquer de 500 mL foram colocados 198,0 mL de água deionizada e 2,0 mL de ácido acético glacial. Esta solução foi deixada sob agitação magnética por 2 min e em seguida adicionou-se lentamente 4,0 g de QTBPM. A mistura foi agitada mecanicamente a 500 rpm

por 3 h. Acrescentou-se sob agitação mecânica de 150 rpm 0,1 mL de solução de GA (solução 25% em água). A mistura foi então agitada mecanicamente a 500 rpm por 1 h, obtendo-se uma solução de cor caramelo clara. Em paralelo preparou-se uma suspensão contendo 0,2880 g de Cu-Ibp em 10,0 mL de etanol. A mistura foi agitada brandamente por 40 min. Em seguida, sob agitação mecânica branda, a suspensão de Cu-Ibp foi adicionada gota a gota à solução de QTBPM e o sistema foi agitado a 500 rpm por 40 min, obtendo-se uma suspensão viscosa de cor azul-esverdeado com partículas azuis muito pequenas. Esta foi submetida ao processo de spray-drying (temperatura inlet e outlet, potência do aspirador e da bomba e pressão do ar sintético foram 140 °C, 45 °C, 100%, 20% e 4,2 x 10² kPa, respectivamente). A massa obtida do material azul claro foi de 2,5556 g. Rendimento: 64%.

3.2.6.11. Preparação de microesferas/microcápsulas de QTBPM contendo Cu-Indo (QTBPM_Cu-Indo_sd2)

Em um béquer de 500 mL foram colocados 198,0 mL de água deionizada e 2,0 mL de ácido acético glacial. Esta solução foi deixada sob agitação magnética por 2 min e em seguida adicionou-se lentamente 4,0 g de QTBPM. A mistura foi agitada mecanicamente a 500 rpm por 3 h. Em paralelo preparou-se uma suspensão contendo 0,5420 g de Cu-Indo em 40,0 mL de etanol. A mistura foi agitada brandamente por 40 min. Em seguida, sob agitação mecânica branda, a suspensão de Cu-Indo foi adicionada gota a gota à solução de QTBPM e o sistema foi agitado a 500 rpm por 40 min, obtendo-se uma suspensão viscosa de cor esverdeada clara com partículas verdes muito pequenas. Esta foi submetida ao processo de spray-drying (temperatura inlet e outlet, potência do aspirador e da bomba e pressão do ar sintético foram 140 °C, 45 °C, 100%, 20% e 4,2 x 10^2 kPa, respectivamente). A massa obtida do material verde claro foi de 2,5801 g. Rendimento: 65%.

3.2.6.12. Preparação de microesferas/microcápsulas de QTBPM reticuladas com GA contendo Cu-Indo (QTBPM/GA_Cu-Indo_sd2)

Em um béquer de 500 mL foram colocados 198,0 mL de água deionizada e em seguida 2,0 mL de ácido acético glacial. Esta solução foi deixada sob agitação magnética por 2 min e em seguida adicionou-se lentamente 4,0 g de QTBPM. A mistura foi agitada mecanicamente a 500 rpm por 3 h. Acrescentou-se sob agitação mecânica de 150 rpm 0,1 mL de solução de GA (solução 25% em água) e a mistura foi então agitada mecanicamente a 500 rpm por 4 h, obtendo-se uma solução de cor caramelo clara. Em paralelo preparou-se uma suspensão contendo 0,5420 g de Cu-Indo em 40,0 mL de DMF. A mistura foi agitada brandamente por 40 min. Em seguida, sob agitação mecânica branda, a suspensão de Cu-Indo foi adicionada gota a gota à solução de QTBPM e o sistema foi agitado a 500 rpm por 40 min, obtendo-se uma suspensão viscosa de cor esverdeada com partículas verdes muito. Esta foi submetida ao processo de spray-drying (temperatura inlet e outlet, potência do aspirador e da bomba e pressão do ar sintético foram 140 °C, 45 °C, 100%, 20% e 4,2 x 10² kPa, respectivamente). A massa obtida do material azul-esverdeado foi de 2,5337 g. Rendimento: 64%.

3.2.6.13. Preparação de microesferas/microcápsulas de QTBPM contendo o fármaco HIndo (QTBPM_HIndo_sd2)

Em um béquer de 500 mL adicionou-se 198,0 mL de água deionizada e 2,0 mL de ácido acético glacial. Esta solução foi deixada sob agitação magnética por 2 min e em seguida colocou-se lentamente 4,0 g de QTBPM. A mistura foi agitada mecanicamente a 500 rpm por 3 h. Em paralelo preparou-se uma suspensão contendo 0,4534 g de HIndo em 40,0 mL de

DMF. A mistura foi agitada brandamente por 40 min. Em seguida, sob agitação mecânica branda, a solução de HIndo foi adicionada gota a gota à solução de QT e o sistema foi agitado a 500 rpm por 40 min, obtendo-se uma suspensão viscosa amarelada clara com partículas amarelas. Esta foi seca no spray-dryer (temperatura inlet e outlet, potência do aspirador e da bomba e pressão do ar sintético foram 140 °C, 45 °C, 100%, 20% e 4,2 x 10² kPa, respectivamente). A massa obtida do material verde claro foi de 2,3358 g. Rendimento: 59%.

3.2.7. Ensaios biológicos

Avaliação macroscópica da lesão intestinal

O protocolo para esta pesquisa (nº 096/11 LIM 07) foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e seguiu as normas de proteção e cuidados com animais de experimentação⁴².

Os estudos foram realizados em colaboração com o Prof. André Zonetti de Arruda Leite, do Laboratório de Gastroenterologia Clínica e Experimental (LIM 7) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Os ensaios de avaliação macroscópica da lesão intestinal foram realizados para os compostos HIndo, Cu-Indo, QTBPM_vazia_sd2, QTBPM_HIndo_sd2, QTBPM_Cu-Indo_sd2 e também para as misturas físicas MF1 (QTBPM_vazia_sd2 + HIndo) e MF2

(QTBPM_vazia_sd2 + Cu-Indo) que simularam respectivamente as composições dos materiais QTBPM_HIndo_sd2 e QTBPM_Cu-Indo_sd2.

Os experimentos foram realizados utilizando grupos de ratos machos Wistar com peso médio entre 210 - 320 g. Durante todo o tempo que antecedeu os testes os animais foram alimentados normalmente com ração e água. Os animais de cada grupo foram submetidos a 3 períodos diferentes de interação com as drogas: 24 h, 48 h e 72 h. Os animais receberam por gavagem as soluções ou suspensões dos referidos compostos em estudo e também das referidas misturas físicas, sendo os volumes administrados proporcionais à massa corpórea de cada animal. As soluções e suspensões dos compostos em estudo e das misturas físicas foram preparadas com o auxílio de soluções 1% w/w de carboximetilcelulose (CMC) preparadas previamente.

Após sacrifício por asfixia em câmara de gás carbônico, os animais foram submetidos à laparotomia mediana com extirpação de todo o intestino delgado. Este foi aberto em sua borda contramesentérica, corado com azul de Evans e observado ao microscópico estereotáxico com aumento de 25 a 50 vezes. Todas as lesões ulceradas encontradas foram contadas e divididas conforme a medida do seu maior eixo em quatro grupos assim denominados: a) lesões ulceradas menores que 1 mm; b) lesões ulceradas maiores ou iguais a 1 e menores que 3 mm; c) lesões ulceradas maiores ou iguais a 3 e menores que 5 mm; d) lesões ulceradas maiores ou iguais a 5 e menores que 10 mm; e) lesões ulceradas maiores ou iguais a 10 mm. Para comparação estatística entre os grupos foi utilizado um sistema de escore para representação quantitativa de todas as lesões intestinais presentes em cada grupo. Este sistema de escore consistiu na somatória do número de úlceras de cada grupo, multiplicada pelo limite máximo aproximado do tamanho da úlcera em cada grupo (Tabela 7)⁴³.

| Aspecto da mucosa | Escore |
|---|--------|
| N° total de úlceras < 1 mm | x 1 |
| N° total de úlceras $\geq 1 \text{ e} < 3 \text{ mm}$ | n x 3 |
| N° total de úlceras $\geq 3 \text{ e} < 5 \text{ mm}$ | n x 5 |
| N° total de úlceras $\geq 5 \text{ e} < 10 \text{ m}$ | m x 10 |
| N° total de úlceras $\geq 20 \text{ mm}$ | x 20 |

 Tabela 7 - Escore macroscópico para as lesões intestinais analisadas.

3.3. Técnicas e instrumentação

3.3.1. Análise elementar

Os experimentos de análise elementar (CHN) e de espectroscopia de emissão atômica de plasma (ICP-AES) (Cu e Zn) para amostras sólidas dos materiais foram realizados pela Central Analítica do IQ-USP. Para as análises de CHN e ICP-AES foram utilizados respectivamente os aparelho Perkin Elmer CHN 2400 e Spectro Analytical Instruments.

3.3.2. Espectroscopia de absorção eletrônica (UV-vis)

Os espectros eletrônicos de absorção das amostras foram registrados em um espectrofotômetro Shimadzu UV-VÍSIVEL, modelo UV-1650 PC, utilizando-se cubetas de quartzo de caminho óptico igual a 1,0 cm. Os espectros eletrônicos das amostras sólidas foram registrados no espectrofotômetro de fibra ótica (Field Spec) da Analytical Spectral

Devices (ASD) na região do visível e infravermelho próximo, de 30000 a 4000 cm⁻¹, com a colaboração do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Henrique Eise Toma do IQ-USP.

3.3.3. Espectroscopia vibracional no infravermelho (FTIR)

Os espectros vibracionais empregando-se dispersão dos compostos em KBr foram registrados por refletância difusa na região do infravermelho, de 4000 a 400 cm⁻¹, utilizando-se um espectrofotômetro FTIR ABB Bomen, mod. 120, com resolução de 4 cm⁻¹ (média de 64 varreduras por espectro).

3.3.4. Difratometria de raios X (DRX)

Os difratogramas de raios X das amostras na forma de pó foram obtidos em um difratômetro Rigaku Miniflex, com radiação Cu K α (1,541 Å, 30 kV, 15 mA, passo de 0,02°, no intervalo de valores de 2 θ de 1,5 a 70°).

3.3.5. Secagem por spray-dryer

As secagens foram realizadas empregando-se um Mini Spray-Dryer Buchi B-290. As condições de temperatura inlet e outlet, potência do aspirador, potência da bomba e pressão do ar sintético são descritas juntamente com os devidos procedimentos de secagens.

3.3.6. Análise térmica (TG/DTG/DSC)

As medidas de TG-DSC-MS foram realizadas utilizando-se uma termobalança STA 409 PC Luxx NETZSCH para a análise simultânea de TG-DSC, sendo este equipamento acoplado ao QMS 403C Aëolos (espectrômetro de massa) NETZSCH para detecção dos gases liberados da amostra. As análises das amostras sólidas foram realizadas usando-se cadinho de alumina, sob atmosferas de ar sintético e de nitrogênio (fluxo de 50 mL min⁻¹), entre 25 - 1000 °C e 25 - 850 °C (10 °C min⁻¹), respectivamente.

3.3.7. Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

Os espectros de EPR das amostras sólidas foram obtidos com a colaboração do Prof. Dr. Wendel A. Alves do Centro de Ciências Naturais e Humanas da UFABC e de sua aluna Rondes F. Silva. Utilizou-se um espectrofotômetro Bruker modelo BioSpin, operando na banda X (frequência igual 9,86 GHz, potência de 6,33 mW, frequência de modulação igual a 100 KHz e amplitude de modulação de 1G) e à temperatura ambiente.

3.3.8. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

As medidas foram obtidas a partir de um Cromatógrafo Shimadzu HPLC Prominence, contendo degaseificador DGU-20, 2 bombas LC-20AT, auto injetor SIL 20A, detector SPD M20A, forno CTO-20A, coluna Lichrospher 100 RP-18 (5 μ , 250 x 4 mm), software LC solution 1.21 SP1. A análise foi isocrática, com fase móvel metanol: tampão acetato pH 4 (70:30, v/v), volume da injeção 25 μ L, fluxo de 1 mL min⁻¹, forno com temperatura de 35 °C e detector ajustado para 254 nm.

3.3.9. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens de MEV das microesferas/microcápsulas de quitosana obtidas via spraydryer foram obtidas no equipamento JSM-7401F Scanning Electron Microscope, da Central analítica do IQ-USP. O recobrimento das amostras para análise em MEV foi realizado no equipamento Edwards S 150 Sputter Coater, com a colaboração do Prof. Pedro K. Kiyohara, do IF-USP. O recobrimento foi realizado em atmosfera de argônio, a uma voltagem de 5 mA, durante o tempo de 120 s.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Síntese e caracterização dos complexos metálicos de Cu e Zn

4.1.1. Sínteses

Ao observar a tabela abaixo, nota-se que todos os resultados de análise elementar (C, H e N) são coerentes com as fórmulas propostas para os complexos metálicos sintetizados.

| Composto | %C _{calc} | %C _{exp} | %H _{calc} | %H _{exp} | %N _{calc} | %N _{exp} |
|---|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| $[Cu_{2}(Ceto)_{4}(H_{2}O)_{2}]$ $[Cu_{2}(C_{16}H_{13}O_{3})_{4}(H_{2}O)_{2}]$ | 65,4 | 65,5 | 4,8 | 4,6 | | |
| $[Cu_{2}(Indo)_{4}(DMF)_{2}] \cdot DMF \cdot 2H_{2}O$ $[Cu_{2}(C_{19}H_{15}ClNO_{4})_{4}(C_{3}H_{18}O_{2})_{2}] \cdot C_{3}H_{18}O_{2} \cdot 2H_{2}O$ | 56,7 | 55,5 | 4,9 | 4,6 | 4,8 | 4,7 |
| $[Cu_{2}(Ibp)_{4}]$ $[Cu_{2}(C_{13}H_{17}O_{2})_{4}]$ | 65,9 | 65,8 | 7,2 | 6,8 | | |
| $[Cu_{2}(Napx)_{4}(DMSO)_{2}]$ $[Cu_{2}(C_{14}H_{13}O_{3})_{4}(C_{2}H_{6}OS)_{2}]$ | 60,0 | 59,4 | 5,5 | 5,3 | | |
| $[Zn(Hmelox)_{2}(H_{2}O)_{2}]\cdot 2H_{2}O$ $[Zn(C_{14}H_{12}N_{3}O_{4}S_{2})_{2}(H_{2}O)_{2}]\cdot 2H_{2}O$ | 40,1 | 39,9 | 3,8 | 3,6 | 10,0 | 9,7 |
| $[Zn(Indo)_2(MeOH)_2]$ $[Zn(C_{19}H_{15}CINO_4)_2(CH_4O)_2]$ | 57,0 | 56,4 | 4,5 | 4,0 | 3,3 | 3,5 |
| $[Zn_{2}(Indo)_{4}(DMA)_{2}]\cdot 1/2DMA \cdot 1/2H_{2}O$ $[Zn_{2}(C_{19}H_{15}CINO_{4})_{4}(C_{4}H_{9}NO)_{2}]\cdot 1/2C_{4}H_{9}NO \cdot 1/2H_{2}O$ | 57,9 | 57,7 | 4,7 | 5,0 | 5,1 | 5,7 |
| $[Zn_2(Ibp)_4] \cdot 2MeOH \cdot H_2O$ $[Zn_2(C_{13}H_{17}O_2)_4] \cdot 2CH_4O \cdot H_2O$ | 62,7 | 63,8 | 7,5 | 7,0 | | |

Tabela 8 - Resultados de análise elementar para os complexos Cu-Ceto, Cu-Indo, Cu-Ibp, Cu-Napx, Zn-Hmelox, Zn-Indo_1, Zn-Indo_2 e Zn-Ibp.

Os esquemas a seguir representam as reações de formação dos complexos de Cu(II) e Zn(II) com FAINEs sintetizados no presente trabalho (Cu-Indo, Cu-Ibp, Cu-Ceto, Cu-Napx, Zn-Indo_1, Zn-Indo_2 e Zn-Ibp). $[Cu_2(CH_3CO_2)_4(H_2O)_2] + 4 \text{ HIndo} + 2 \text{ DMF} \rightarrow [Cu_2(Indo)_4(DMF)_2] + 4 \text{ CH}_3CO_2H + 2H_2O_2H +$

$$[Cu_2(CH_3CO_2)_4(H_2O)_2] + 4 \text{ Hibp } \rightarrow [Cu_2(Ibp)_4] + 4 CH_3CO_2H + 2 H_2O_2H + 2 H$$

$$[Cu_2(CH_3CO_2)_4(H_2O)_2] + 4 \text{ Hceto } \rightarrow [Cu_2(Ceto)_4(H_2O)_2] + 4 CH_3CO_2H_2O_2 + 4 CH_3CO_2H_2O_2] + 4 CH_3CO_2H_2O_2 + 4 CH_3CO_2 + 4 CH_3CO_2 + 4 CH_3CO_2H_2O_2 + 4 CH_3CO_2 + 4 CH_3CO_3 + 4 CH_3C$$

 $[\mathrm{Cu}_2(\mathrm{CH}_3\mathrm{CO}_2)_4(\mathrm{H}_2\mathrm{O})_2] + 4 \ \mathrm{HNapx} + 2 \ \mathrm{DMSO} \ \rightarrow \ [\mathrm{Cu}_2(\mathrm{Napx})_4(\mathrm{DMSO})_2] + 4 \ \mathrm{CH}_3\mathrm{CO}_2\mathrm{H} + 2 \ \mathrm{H}_2\mathrm{O}$

 $[Zn(CH_3CO_2)_2(H_2O)_2] + 2 HIndo + 2 MeOH \rightarrow [Zn(Indo)_2(MeOH)_2] + 2 CH_3CO_2H + 2 H_2O$

 $2 \left[Zn(CH_3CO_2)_2(H_2O)_2 \right] + 4 HIndo + 2 DMA \rightarrow \left[Zn_2(Indo)_4(DMA)_2 \right] + 4 CH_3CO_2H + 2H_2O$

$$2 \left[Zn(CH_3CO_2)_2(H_2O)_2 \right] + 4 HIbp \rightarrow \left[Zn_2(Ibp)_4 \right] + 4 CH_3CO_2H + 2 H_2O$$

Ao comparar as sínteses dos complexos metálicos descritas anteriormente, nota-se que os maiores rendimentos são para complexos de Cu(II), em que as sínteses dos complexos Cu-Indo, Cu-Ibp e Cu-Napx apresentaram rendimentos de 78%, 94% e 79%, respectivamente. A síntese do complexo Cu-Ceto é a única dentre as descritas para os complexos de cobre em questão que apresentou um rendimento abaixo da média. Provavelmente, o principal fator responsável por esse menor rendimento tenha sido a dificuldade de isolar o complexo, uma vez que o mesmo apresentou-se numa forma muito viscosa e com alta aderência às paredes dos recipientes durante o processo sintético.

Sabe-se que geralmente as sínteses de complexos metálicos de Zn(II) apresentam rendimentos menores quando comparadas às sínteses de complexos de $Cu(II)^7$. Dentre as sínteses de complexos de Zn(II), a que apresentou melhor rendimento (70%) foi a do complexo Zn-Ibp. Talvez, a síntese do complexo Zn-Indo_2 seja a que requer maiores rigores sintéticos, visto que demanda agitação e aquecimento muito bem controlados por 24 h. Esses rigores refletiram de forma negativa no rendimento da síntese de obtenção do Zn-Indo_2, levando ao menor rendimento dentre as sínteses envolvendo o zinco (43,5%).

As sínteses dos complexos Zn-Indo_1 e Zn-Indo_2 foram realizadas de acordo com os intuitos já ambicionados em alguns trabalhos reportados na literatura, nos quais tais intentos se amparam na necessidade de sondar as características e propriedades dos referidos complexos (mononucleares e dinucleares). Alguns complexos de Zn-Indo já possuem atividades anti-inflamatórias comprovadas e também patentes para utilização farmacológica na área veterinária, mas os mecanismos de ações biológicas ainda não foram desvendados. Para isto, é necessário estabelecer suas estruturas e investigar a estabilidade das mesmas (mononucleares e dinucleares)³⁷.

Foi possível constatar que o complexo Zn-Indo_1 apresenta-se na forma dinuclear e o Zn-Indo_2 na forma mononuclear. Tais complexos foram obtidos por rotas sintéticas com muitas semalhanças e ao mesmo tempo com expressivas diferenças que são as chaves para o entendimento das estruturas desses complexos. Anteriormente, foi mencionado que a síntese do Zn-Indo_2 é mais sensível que a do Zn-Indo_1. Tal característica se deve à exigência do maior tempo reacional, à manutenção da temperatura de aquecimento e ao uso dos diferentes solventes (DMA e DMF).

A estrutura do acetato de cobre, $[Cu_2(CH_3COO)_4(H_2O)_2]$, o tetracarboxilato de cobre(II) de estrutura mais simples (R = CH₃), é mostrada na Figura 5. Nesta, cada íon Cu(II) encontra-se em um ambiente octaédrico distorcido e quatro moléculas do ligante carboxílico atuam como ligante de ponte unindo dois íons cobre(II) pela coordenação através do grupo carboxilato (COO⁻). Os átomos de oxigênio ocupam quatro posições de coordenação do Cu(II) num arranjo quadrado planar, a quinta posição é ocupada pelo oxigênio da molécula de água e a sexta posição de coordenação é ocupada pelo outro íon Cu(II). A distância Cu – Cu é da ordem de 2,64 Å, consideravelmente mais longa do que no caso do cobre metálico, que é da ordem de 2,55 Å³⁶.



Figura 5 - Estrutura genérica de um tetracarboxilato de Cu(II) do tipo $[Cu_2(RCOO)_4(L)_2]$, em que R = ácido aril/fenil alcanóico e L = ligante axial O'ou N'³⁶.

Os complexos de Zn(II)-FAINEs de fórmula $[Zn_2(RCOO)_4(L)_2]$ apresentam-se como estruturas dinucleares semelhantes às do acetato de cobre, enquanto que os complexos $[Zn(RCOO)_2(L)_2]$ apresentam-se como estruturas monucleares do tipo quelato, onde dois ligantes carboxilatos se coordenam de maneira bidentada ao íon Zn(II) (R = FAINE) do tipo ácido carboxílico como aspirina, indometacina, diclofenaco, ibuprofeno, etc, e L = ligante axial, geralmente moléculas do solvente utilizado na síntese, como DMSO, DMF, H₂O, etc)³⁶.

A estrutura do complexo formado, dinuclear ou mononuclear vai depender das propriedades eletrônicas e estéricas dos ligantes carboxilatos e da basicidade dos ligantes axiais. O tipo da estrutura do Zn(II)-FAINE exerce um papel importante nas propriedades eletrônicas e magnéticas dos complexos, bem como em sua atividade biológica. No caso dos complexos Cu(II)-Asp são observadas diferenças nas atividades dos complexos, sendo a ação antitumoral mais pronunciada para a espécie mononuclear. No caso da atividade anti-inflamatória ocorre o contrário, a espécie dimérica mostra-se mais efetiva³⁶.

A síntese do complexo Zn-Hmelox foi a de maior rendimento (76%). Ao contrário do trabalho reportado na literatura, em que a síntese de complexos de Co(II), Ni(II), Zn(II) e Cd(II) com H_2 melox¹⁰ é realizada em solvente orgânico (MeOH), neste trabalho o complexo de Zn(II) foi obtido em meio aquoso, o que é bastante interessante considerando que o complexo obtido apresenta potencial aplicação farmacológica.

O esquema proposto para a formação do complexo Zn-Hmelox de acordo com o procedimento sintético descrito é sumarizado no Esquema 1. O fármaco meloxicam (H₂melox) (1) é um sólido amarelo, praticamente insolúvel em água; em meio alcalino o H₂melox se dissolve devido à desprotonação do hidrogênio ácido do grupo fenol, levando à formação da espécie aniônica Hmelox⁻ (2). Sabe-se que os íons Hmelox⁻ atuam como quelato de íons metálicos através dos átomos O (*a*) do grupo amídico e do N (*b*) do anel tiazólico. De

acordo com a literatura⁸, nos complexos de Co(II), Ni(II), Zn(II) e Cd(II) dois íons Hmelox⁻ coordenam-se ao centro metálico nas posições equatoriais, em um arranjo *trans* pelos átomos indicados por *(a)* e *(b)* no Esquema 1 (2), sendo as posições axiais ocupadas por ligantes neutros, como DMSO. Com base nesses dados da literatura, e considerando que na síntese foi utilizado somente água como solvente propõe-se que o complexo Zn-Hmelox apresenta uma estrutura contendo dois ânions Hmelox⁻ ocupando as posições equatoriais do Zn(II) pelos sítios *(a)* e *(b)* e duas moléculas de água nas posições axiais, coordenadas ao centro metálico pelos átomos de oxigênio, como mostrado no Esquema 1 (3)³⁹.





66

4.1.1. Espectroscopia de absorção eletrônica (UV-vis)

Na Figura 6 são apresentados os espectros do fármaco HIndo e dos complexos metálicos Zn-Indo_1, Zn-Indo_2 e Cu-Indo em solução. O espectro eletrônico do sólido Cu-Indo é mostrado na Figura 6.



Figura 6 - Espectros eletrônicos do fármaco HIndo (em DMF) e dos complexos metálicos Zn-Indo_1 (em DMF), Zn-Indo_2 (em EtOH) e Cu-Indo (em DMF).



Figura 7 - Espectro eletrônico do sólido Cu-Indo.

Na Figura 6, observa-se que o espectro eletrônico da HIndo em DMF exibe uma banda de absorção na região do UV, em 320 nm. O espectro do Zn-Indo_1 em DMF apresenta banda do ligante no mesmo comprimento de onda (320 nm). Já o espectro do Zn-Indo_2 em etanol mostra além desta, mais outras duas bandas em aproximadamente 267 e 232 nm. O Cu-Indo também exibe as bandas do ligante Indo.

Os complexos de Cu(II) apresentam transições d-d na região do visível, sendo que intensidades das bandas d-d dos complexos mononucleares de Cu(II) são usualmente menores que as bandas correspondentes nos complexos dinucleares de Cu(II) e as cores são normalmente azul escuro e azul-esverdeado quando se compara à cor dos complexos dinucleares que são geralmente verde claro; é válido lembrar que isso não é uma regra⁸. A banda característica da transição $d_{xy,yz} \rightarrow d_{x2-y2}$ dos íons Cu(II) do complexo Cu-Indo é observada em λ_{max} 710 nm, tanto para o complexo em solução (Figura 6) quanto para o complexo no estado sólido (Figura 7). No sólido, no entanto, a banda é alargada e aparecem dois ombros, sendo um por volta de 750 nm e outro por volta de 1010 nm.

O Zn(II) por se tratar de um íon d^{10} , ou seja, por ser um íon que apresenta a camada totalmente preenchida, não apresenta transições d-d como ocorre em íons Cu, na região visível do espectro, o que leva os complexos de zinco a serem geralmente brancos, ou apresentarem as cores características dos ligantes a eles coordenados⁸. Para os complexos de Zn(II) com a HIndo, estes apresentaram a coloração amarela que é característica da HIndo.

Na Figura 8 são apresentados os espectros do fármaco HIbp e dos complexos Zn-Ibp e Cu-Ibp. O espectro eletrônico do sólido Cu-Ibp é mostrado na Figura 9. O espectro eletrônico do fármaco HIbp exibe bandas na região UV em 252, 258, 264 e 273 nm, sendo que as duas primeiras aparecem como ombros. O complexo Zn-Ibp (Figura 8) apresenta bandas de absorção na região UV em 252, 258, 264 e 273 nm, características do ligante Ibp.



Figura 8 - Espectros eletrônicos do fármaco HIbp (em EtOH) e dos complexos metálicos Zn-Ibp (em EtOH) e Cu-Ibp (em EtOH e DMF).

O espectro eletrônico do Cu-Ibp (Figura 8) em solução de etanol apresenta bandas do ligante em 250 nm e uma banda em 310 nm. Em solução mais concentrada, em DMF, é possível observar a transição d-d dos íons Cu em 700 nm. No espectro eletrônico do sólido Cu-Ibp (Figura 9) é verificada a banda larga com λ_{max} em 660 nm e dois ombros, sendo um por volta de 750 nm e outro por volta de 1010 nm.



Figura 9 - Espectro eletrônico do sólido Cu-Ibp.

Na Figura 10 são apresentados os espectros do fármaco HCeto e na Figura 11 são apresentados os espectros eletrônicos do complexo Cu-Ceto. O espectro eletrônico do sólido Cu-Ceto é mostrado na Figura 12.


Figura 10 - Espectros eletrônicos do fármaco HCeto (em etanol).

O espectro eletrônico do fármaco HCeto exibe uma banda de absorção em 254 nm, em solução diluída de etanol, e uma série bandas entre 320 e 390 nm, em solução concentrada de etanol. No espectro eletrônico do Cu-Ceto a banda do ligante aparece em 254 nm. Em solução mais concentrada, também em etanol, é possível observar e uma série absorções na região UV entre 320 e 390 nm e banda referente à transição d-d dos íons Cu em 703 nm. No espectro eletrônico do sólido Cu-Ceto (Figura 12) a banda d-d é observada em λ_{max} em 678 nm, com dois ombros, sendo um por volta de 830 nm e outro por volta de 1000 nm.



Figura 11 - Espectros eletrônicos do Cu-Ceto (em etanol).



Figura 12 – Espectro eletrônico do sólido Cu-Ceto.

Na Figura 13 são apresentados os espectros do fármaco H_2 Melox e do complexo Zn-Hmelox.



Figura 13 - Espectros eletrônicos do fármaco H₂melox e do complexo Zn-Hmelox (em DMF).

O espectro eletrônico do fármaco meloxicam (H₂melox) apresenta uma banda em ~ 376 nm. No espectro eletrônico do complexo Zn-Hmelox, a banda é deslocada para ~ 367 nm. O deslocamento observado pode ser atribuído a mudanças eletrônicas ocorridas devido à complexação do metal.

4.1.2. Espectroscopia Vibracional no Infravermelho (FTIR)

Para o estudo de complexos de metais de transição com ligantes carboxílicos, a espectroscopia na região do infravermelho é uma ferramenta poderosa na identificação dos modos vibracionais de estiramento simétricos (v_s) e assimétricos (v_a) dos ligantes carboxilatos, além das vibrações características dos grupos orgânicos^{1,38}. Os íons carboxilato podem se coordenar a um íon metálico de modo monodentado ou bidentado. Neste último caso o ligante pode atuar como quelato, ou como ponte entre unidades dimetálicas. De um modo geral, a estrutura do complexo vai depender das propriedades eletrônicas e estéricas do ligante carboxílico. O modo de coordenação do carboxilato ao metal pode ser identificado pelos valores das diferenças entre as freqüências dos modos vibracionais dos estiramentos assimétricos (v_a) e simétricos (v_s) dos grupos (-COO⁻) dos ligantes, $\Delta v_{(COO)} = [v_{a(COO)} - v_{s(COO)}]^{44,45}$.

Para os complexos de Cu(II) e Zn(II) com os fármacos anti-inflamatórios são possíveis dois modos de coordenação: tipo quelato bidentado ou tipo ponte, que é característico da estrutura gaiola. Estudos de complexos de Cu(II) e Zn(II) com estruturas cristalinas conhecidas mostram que as estruturas em gaiola apresentam valores de $\Delta v_{(COO)}$ que se encontram na faixa de 170 a 220 cm⁻¹, enquanto que complexos com $-COO^-$ do tipo quelato apresentam valores de $\Delta v_{(COO)} < 130$ cm^{-1 37}. A Figura 13 traz a estrutura dos complexos Zn-Indo_2 (Figura 14 - A) e Zn-Indo_1 (Figura 14 - B), em que o composto Zn-Indo_2 é um típico exemplo de estrutura gaiola (complexo dinuclear) e o composto Zn-Indo_1 é um típico exemplo de quelato bidentado (complexo mononuclear).



[Zn(Indo)₂(MeOH)₂]

Figura 14 - Estrutura dos complexos Zn-Indo_2 (Figura 13 - A) e Zn-Indo_1 (Figura 13 - B). Em que $L = DMA e L_1 = MeOH^{40}$.

No presente trabalho são discutidas as principais bandas que caracterizam os fármacos e suas coordenações aos íons metálicos nos complexos de interesse.

Os espectros vibracionais do fármaco HIndo e dos complexos metálicos Zn-Indo_1, Zn-Indo_2 e Cu-Indo são mostrados na Figura 15, em que estão assinaladas as principais bandas de interesse.



Figura 15 - Espectros vibracionais FTIR da HIndo e dos complexos Zn-Indo_1, Zn-Indo_2 e Cu-Indo.

No espectro FTIR da HIndo (Figura 15) observa-se uma banda larga e intensa em aproximadamente 3000 cm⁻¹ referente ao modo v(O-H) do grupo COOH. Ainda nessa mesma região (3000 a 2500 cm⁻¹) encontram-se as bandas dos estiramentos v(C-H). Outras duas bandas que têm grande relevância aparecem em 1718 e 1693 cm⁻¹, sendo referentes respectivamente ao estiramento v(C=O) da carbonila e ao v(C=O) do grupo amida.

Os complexos Zn-Indo_1 e Zn-Indo_2 (Figura 15) apresentam bandas intensas na região de 1680 - 1700 cm⁻¹, que correspondem ao modo de estiramento v(C=O) do grupo amida do ligante Indo.

No espectro do complexo Zn-Indo_1, a inexistência da banda em 1718 cm⁻¹ (v(C=O) da carbonila) indica ausência do ácido HIndo, enquanto que o surgimento de duas novas bandas intensas, que podem ser atribuídas aos modos vibracionais de estiramento assimétrico (v_a) (1437 cm⁻¹) e simétrico (v_s) (1402 cm⁻¹) do grupo COO⁻, mostram que ocorreu a coordenação dos ligantes ao metal por meio dos grupos carboxilato. O Δv , que é igual a 35 cm⁻¹ sugere coordenação do ligante como quelato^{5,16}. A presença de uma banda em aproximadamente 3380 cm⁻¹, que pode ser atribuída ao modo v(O-H) evidencia a presença do metanol na estrutura do complexo¹⁶.

No espectro do complexo FTIR dos complexos Zn-Indo_2 e Cu-Indo (Figura 15), a ausência de bandas em 3000 cm⁻¹ (v(O-H)) e 1716 cm⁻¹ (v(C=O)) do ácido carboxílico e o surgimento de duas novas bandas intensas que podem ser atribuídas aos modos vibracionais de estiramento assimétrico (v_a) e simétrico (v_s) do grupo COO⁻ mostram que ocorreu a coordenação dos ligantes ao metal por meio dos grupos carboxilato. Para o complexo Zn-Indo_2, os modos de v_a e v_s do grupo COO⁻ foram atribuídos às bandas em 1595 e 1403 cm⁻¹, respectivamente, sendo o valor de Δv igual a 192 cm⁻¹. Já para o complexo Cu-Indo, os modos de v_a e v_s do grupo COO⁻ foram atribuídos às bandas em 1620 e 1404 cm⁻¹, respectivamente, sendo o valor de Δv igual a 216 cm⁻¹. Estes valores sugerem a formação de complexos com estrutura do tipo gaiola^{5,16}.

Os espectros FTIR do HIbp e dos complexos Zn-Ibp e Cu-Ibp são mostrados na Figura 16. Sendo o ibuprofeno um ácido carboxílico, as suas principais bandas são as correspondentes ao modo de estiramento da carbonila (v(C=O)) em 1720 cm⁻¹, as dos modos vibracionais v(C-H) e v(O-H), ambos na região de 3000 cm⁻¹; e a dos modos δ (C-H) que aparecem abaixo de 1000 cm⁻¹. Ao comparar o espectro FTIR do ligante livre, HIbp, com os dos respectivos complexos metálicos, Zn-Ibp e Cu-Ibp, é possível observar algumas importantes alterações.

Nos espectros dos complexos Zn-Ibp e Cu-Ibp, também se notam a ausência da banda em 1720 cm⁻¹ e o surgimento de duas novas bandas intensas que podem ser atribuídas, aos modos vibracionais de estiramentos assimétricos (v_a) e simétricos (v_s) do grupo COO⁻ do ligante ibuprofenato. Para o Zn-Ibp, estas bandas aparecem em 1549 (v_a) e 1416 cm⁻¹ (v_s), e para o Cu-Ibp em 1587 (v_a) e 1408 cm⁻¹ (v_s). O valor de Δv para os complexos Zn-Ibp e Cu-Ibp são respectivamente 133 e 179 cm⁻¹, indicando a formação de complexos com estrutura gaiola. Para o complexo Zn-Ibp, a presença de uma banda larga que se estende de 3000 a 3500 cm⁻¹, confirma a presença de moléculas de água e metanol (v(O-H)), o que está de acordo com a composição ou fórmula proposta [Zn₂(Ibp)₄]·2MeOH·H₂O.



Figura 16 - Espectros vibracionais FTIR do fármaco HIbp e dos complexos Zn-Ibp e Cu-Ibp.

O espectro vibracional do fármaco HCeto é mostrado na Figura 17 e o do complexo Cu-Ceto na Figura 18.



Figura 17 - Espectro vibracional FTIR do fármaco cetoprofeno (HCeto).

No espectro FTIR do fármaco HCeto observa-se uma banda larga e intensa em ~ 3000 cm⁻¹ referente ao modo v(O-H) do grupo COOH. Na região de 3000 a 2500 cm⁻¹ encontramse as bandas dos estiramentos v(C-H). As bandas em 1697 e 1655 cm⁻¹ pode ser atribuídas aos modos de estiramento v(C=O) da carbonila e v(C=O) do grupo cetona, respectivamente.

No espectro do complexo Cu-Ceto, observa-se a ausência da banda em 1697 cm⁻¹ e o surgimento de duas novas bandas intensas que podem ser atribuídas aos modos vibracionais de estiramento assimétrico (v_a) (1607 cm⁻¹) e simétrico (v_s) (1408 cm⁻¹) do grupo COO⁻ do ligante cetoprofenato. O valor de Δv para o complexo Cu-Ceto é 199 cm⁻¹, indicando a formação de complexo com estrutura gaiola. A presença de uma banda larga e intensa que se estende de aproximadamente 3270 a 3700 cm⁻¹, confirma a presença de moléculas de água

(v(O-H)), o que está de acordo com a composição e fórmula proposta para o complexo: $[Cu_2(Ceto)_4(H_2O)_2].$



Figura 18 - Espectro vibracional FTIR do complexo Cu-Ceto.

O espectro do HNapx (Figura 19) apresenta uma banda intensa em 1728 cm⁻¹ referente ao modo de estiramento v(C=O) da carbonila, e em 1265 e 1030 cm⁻¹ é observado o par de bandas característico do modo v(C-O) do grupo éster presente na fármaco em questão. Ao redor de 3000 cm⁻¹ são observadas as bandas referentes aos modos de estiramentos v(C-H) e v(O-H), e as bandas relativas aos modos de deformações δ (C-H) são observadas abaixo de 1000 cm⁻¹. Com a formação do complexo Cu-Napx é verificada a ausência da banda de estiramento da carbonila do HNapx, em 1728 cm⁻¹, e o surgimento de duas novas bandas, em 1620 e 1408 cm⁻¹, que podem ser atribuídas aos estiramentos assimétricos (v_a) e simétricos (v_s) do grupo COO⁻ dos ligantes naproxenato, respectivamente. O valor de Δv destas bandas é igual a 208 cm⁻¹ sugerindo que ocorreu a formação do complexo do tipo gaiola. Uma nova banda observada em 960 cm⁻¹ pode ser atribuída ao modo de estiramento v(S=O) do ligante DMSO coordenado aos íons Cu(II) via átomo de oxigênio, indicando que ocorreu a coordenação de moléculas de DMSO nas posições axiais do complexo. As frequências observadas no espectro FTIR do Cu-Napx estão de acordo com os resultados previamente reportados na literatura, e são coerentes com a fórmula proposta [Cu₂(Napx)₄(DMSO)₂], indicando que foi obtido o complexo de interesse¹⁰.



Figura 19 - Espectros vibracionais FTIR do HNapx e do Cu-Napx.

Os espectros vibracionais do fármaco meloxicam (H₂melox) e do complexo Zn-Hmelox são mostrados na Figura 20, onde estão assinaladas as principais bandas de interesse.

Quando se compara o espectro do ligante livre (H_2 melox) com o espectro do respectivo complexo metálico é possível verificar algumas mudanças nos valores de frequências. Primeiramente, no espectro do complexo Zn-Hmelox, a ausência da banda

intensa em 3292 cm⁻¹, que é atribuída ao estiramento da ligação $N_{(c)}$ -H do fármaco meloxicam, comprova a formação da ligação de hidrogênio intramolecular $O_{(d)}$."H-N na estrutura do complexo (Esquema 1). A banda em 1616 cm⁻¹ no espectro do complexo de zinco pode ser atribuída ao modo de estiramento vC= $O_{(a)}$ do grupo amida. O deslocamento da banda da carbonila para uma frequência mais baixa em relação à do fármaco H₂melox (1620 cm⁻¹) fornece evidência de que a coordenação do Hmelox⁻ ocorre através do $O_{(a)}$. O deslocamento de frequência pode ser atribuído à delocalização eletrônica após a complexação do fármaco (H₂melox) ao íon metálico (Zn(II)).



Figura 20 - Espectros vibracionais FTIR do fármaco meloxicam (H_2 melox) e do complexo metálico Zn-Hmelox.

4.1.3. Análise Térmica (TG/DTG/DSC)

Nas últimas décadas, as técnicas termoanalíticas adquiriram importância crescente em todas as áreas de conhecimento na química básica e aplicada. Em diferentes áreas da ciência aplicada, pesquisadores e técnicos especializados, de diferentes segmentos do setor produtivo, têm recorrido aos métodos termoanalíticos para desenvolver estudos relacionados a: (i) estabilidade térmica de materiais, (ii) caracterização de materiais, (iii) mecanismos e cinética de decomposição térmica, visando a definir a vida útil de produtos, (iv) otimização das condições de síntese de novos materiais, (v) determinação do grau de pureza ou composição de algumas misturas, (vi) desenvolvimento de métodos termoanalíticos de análise etc⁴⁶.

Na área de fármacos e medicamentos são técnicas muito adequadas para a caracterização de fármacos sólidos e excipientes; determinação da pureza de uma dada espécie por DSC a partir da avaliação da endotermia de fusão; caracterização de polimorfos em fármacos empregando a associação das técnicas de TG/DTG e DSC; estudos da estabilidade térmica de produtos farmacêuticos por TG/DTG aplicando métodos cinéticos isotérmicos e/ou não isotérmicos (dinâmicos); estudos de pré-formulação visando a obtenção de informação acerca das características físicas ou interações químicas entre o ingrediente ativo e os excipientes; determinação de umidade etc⁴⁷.

As curvas TG, DTG e DSC para os fármacos HIndo, HIbp, HCeto, Hnapx, H₂melox, e para os complexos Zn-Indo_1, Zn-Indo_2, Cu-Indo, Zn-Ibp, Cu-Ibp, Cu-Ceto, Cu-Napx e Zn-Hmelox foram obtidas com o objetivo de se conhecer a estabilidade térmica e o processo de termodecomposição destes compostos, verificar as fórmulas moleculares propostas através de cálculos em relação às perdas de massa experimentais e ainda observar as transições físicas e/ou químicas ocorridas no processo de decomposição térmica. As análises foram feitas em atmosfera de ar sintético, com uma razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹ de 25 a 1000 °C, ou de 25 a 850 °C. Utilizou-se cadinho de alumina.

4.1.4.1. Fármaco HIndo e os Complexos Zn-Indo_1, Zn-Indo_2 e Cu-Indo

As curvas TG e DTG para a HIndo (Figura 21) mostram que o composto perde aproximadamente 100% de massa em duas principais etapas. A principal perda de massa ocorre na primeira etapa (57%) entre 180 e 360 °C, com pico na curva DTG em 292 °C. A massa restante decompõe-se entre 360 e 670 °C, com um pico na curva DTG em 463 °C.

A curva DSC em atmosfera de ar sintético mostra um processo endotérmico no intervalo de temperatura de 148 - 172 °C com pico em 160 °C e entalpia igual a 69,85 J g⁻¹. Este processo ocorre sem perda de massa, podendo-se assim associá-lo ao processo de fusão do fármaco. O processo seguinte, de termodecomposição do HIndo ocorre na faixa de 172 - 725 °C, e é exotérmico, com a maior liberação de energia ocorrendo entre 400 e 600 °C.



Figura 21 - Curvas TG (linha verde), DTG (linha vermelha) e DSC (linha azul) para o fármaco HIndo (atmosfera de ar sintético).

As curvas TG e DTG para o complexo Zn-Indo_1 (Figura 22) monstram que o composto perde aproximadamente 93% de massa em quatro principais etapas. A principal perda de massa (36%) ocorre entre 189 e 378 °C, com pico DTG em 319 °C. A massa restante sofre decomposição em duas etapas posteriores, entre 378 e 668 °C. A perda de massa total (experimental 93%), é coerente (calculado 91%) com a total decomposição dos ligantes orgânicos (2 ligantes Indo e 2 moléculas de metanol) e com a formação de 1 mol de óxido de zinco (ZnO) como resíduo. O resultado de perda de massa experimental para o Zn-Indo_1 está coerente com a fórmula proposta, [Zn(Indo)₂(MeOH)₂].

A curva DSC do complexo Zn-Indo_1 mostra um processo endotérmico no intervalo de temperatura de 73 - 189 °C, com pico em 139 °C e entalpia de 102,7 J g⁻¹. Este processo ocorre com perda de massa de 4,8 %, podendo ser atribuído à perda dos ligantes metanol. O processo de termodecomposição do complexo Zn-Indo_1 no intervalo de temperatura de 252 - 668 °C é exotérmico.



Figura 22 - Curvas TG (linha verde), DTG (linha vermelha) e DSC (linha azul) para o complexo Zn-Indo_1 (atmosfera de ar sintético).

As curvas TG e DTG para o complexo Zn-Indo_2 (Figura 23) mostram que, no intervalo de temperaturas investigado (até 850 °C) o composto perde aproximadamente 71% de massa em três principais etapas, com picos na curva DTG entre 25 e 236 (~ 13%) e entre 236 e 773 °C (58%). A primeira etapa de perda de massa, 3,36%, com pico DTG em 95 °C pode ser associada à perda das moléculas de água e de DMA não coordenadas (calculado = 3,2%). A curva DSC mostra um evento endotérmico com pico em ~ 99 °C e entalpia de 46,53 J g⁻¹ para esta etapa. No intervalo de temperaturas de ~ 120 a 240 °C, ocorre uma perda de massa de 9,3%. Este valor é muito próximo do calculado (9,7%) para a perda dois 2 ligantes DMA.

A perda de massa total calculada (91%) considerando-se a formação de 2 mol de óxido de zinco (ZnO) seria maior, mas não foi possível confirmar a formação desse resíduo pelos cálculos uma vez que a massa ainda não havia se estabilizado na temperatura em que a análise foi interrompida.



Figura 23 - Curvas TG (linha verde), DTG (linha vermelha) e DSC (linha azul) para o complexo Zn-Indo_2 (atmosfera de ar sintético).

As curvas TG e DTG para o complexo Cu-Indo (Figura 24) mostram pelo menos 5 etapas distintas A primeira etapa que ocorre com pico DTG em 126 °C corresponde a 13,7% de perda de massa, valor próximo do calculado (14%) para a perda das moléculas de DMF e de água não-coodernadas e também dos dois ligantes DMF coordenados ao cobre(II). Em seguida, ocorrem 4 etapas principais, resultando num total de perda de massa de aproximadamente 91% para o complexo, que é coerente com a total decomposição dos ligantes orgânicos e formação de 2 mol de óxido de cobre (CuO) de acordo com a fórmula proposta, [Cu₂(Indo)₄(DMF)₂]·DMF·2H₂O.

A curva DSC no intervalo de temperatura de 108 - 144 °C mostra que a perda das moléculas de DMF e água constituintes do complexo Cu-Indo é um processo endotérmico, que ocorre com pico em 127 °C e entalpia de 39,6 J g⁻¹.



Figura 24 - Curvas TG (linha verde), DTG (linha vermelha) e DSC (linha azul) para o complexo Cu-Indo (atmosfera de ar sintético).

4.1.4.2. Fármaco HIbp e os Complexos Zn-Ibp e Cu-Ibp

As curvas TG e DTG (Figura 25) para o ibuprofeno demonstram que o fármaco perde aproximadamente 100% de massa em uma única etapa, entre 113 e 315 °C, com pico DTG em 223 °C.

Pela análise do perfil calorimétrico do fármaco HIbp em atmosfera de ar sintético, verifica-se inicialmente uma transição endotérmica que ocorre no intervalo de temperatura de 64 - 90 °C, com pico DSC em 74 °C e entalpia de 74,8 J g⁻¹. Este processo ocorre sem perda de massa, podendo-se assim associá-lo à fusão do fármaco. A etapa única de termodecomposição do HIbp é associada a um processo endotérmico no intervalo de temperatura de 160 - 236 °C e pico DTG em 222,2 °C, com entalpia de 321,2 J g⁻¹.



Figura 25 - Curvas TG (linha verde), DTG (linha vermelha) e DSC (linha azul) para o fármaco ibuprofeno (HIbp) (atmosfera de ar sintético)..

A Figura 26 traz as curvas TG e DTG para o complexo Zn-Ibp. É possível observar que há pelo menos três etapas de perda de massa distintas.

A primeira etapa de perda de massa (7,3%) que ocorre com pico DTG em 79 °C, pode ser atribuída à perda das moléculas de MeOH e água não-coordenadas (calculado = 7,9%). A decomposição dos ligantes Ibp ocorre entre 347 e 551 °C em duas etapas principais, com picos na curva DTG em 324 e 432 °C. A perda de massa total (86%) é coerente com o valor calculado (84%) para a decomposição dos ligantes orgânicos e formação de 2 mols de óxido de zinco (ZnO) e está de acordo com a fórmula proposta, [Zn₂(Ibp)₄]·2MeOH·H₂O.

O perfil calorimétrico do Zn-Ibp no intervalo de temperatura de 50 - 105 °C mostra que o processo de saída das moléculas de metanol e água é endotérmico, com pico em 84 °C e entalpia de 145,8 J g⁻¹. O processo de termodecomposição dos ligantes é um evento altamente exotérmico.



Figura 26 - Curvas TG (linha verde), DTG (linha vermelha) e DSC (linha azul) para o complexo Zn-Ibp (atmosfera de ar sintético).

As curvas TG e DTG do complexo Cu-Ibp (Figura 27) evidencia pelo menos 2 etapas de perda de massa distintas. A perda de massa total (83%) é coerente com a total decomposição dos ligantes orgânicos e com a formação de 2 mols de óxido de cobre (CuO) (calculado 84%) O resultado de perda de massa experimental para o complexo Cu-Ibp está coerente com a fórmula proposta, $[Cu_2(Ibp)_4]$. Ao analisar o perfil calorimétrico do complexo Cu-Ibp, verifica-se que a primeira e principal etapa de perda de massa é acompanhada por um evento endotérmico que ocorre entre 240 e 295 °C. Já a segunda etapa de perda de massa acontece junto a um processo altamente exotérmico que ocorre entre 295 e 350 °C.



Figura 27- Curvas TG (linha verde), DTG (linha vermelha) e DSC (linha azul) para o complexo Cu-Ibp (atmosfera de ar sintético).

4.1.4.3. Fármaco HCeto e o Complexo Cu-Ceto

As curvas TG e DTG (Figura 28) para o cetoprofeno demonstram que o fármaco perde aproximadamente 99% de sua massa em uma única etapa, entre 165 e 590 °C, com pico na curva DTG em 284 °C.



Figura 28 - Curvas TG (linha verde), DTG (linha vermelha) e DSC (linha azul) para o fármaco Hceto (atmosfera de ar sintético).

A análise do perfil calorimétrico do fármaco HCeto (Figura 28) mostra que ocorre inicialmente uma transição endotérmica no intervalo de temperatura de 80 - 110 °C, com pico em 95 °C e entalpia de 75,33 J g⁻¹. Este processo ocorre sem perda de massa, podendo-se assim associá-lo ao processo de fusão do fármaco. A etapa única de termodecomposição do fármaco HCeto é caracterizada por um processo constituído por dois principais eventos exotérmicos no intervalo de temperatura de 250 - 595 °C com picos em 288 °C e 492 °C e entalpias de - 181,5 J g⁻¹ e - 1.963,0 J g⁻¹ respectivamente.

As curvas TG e DTG do complexo Cu-Ceto (Figura 29) mostra 2 etapas principais de perda de massa. A perda de massa total (77%) é próxima do valor calculado (87%) considerando-se total decomposição dos ligantes orgânicos e com a formação de 2 mols de óxido de cobre (CuO). A diferença observada pode ser em razão de a massa ainda não ter se estabilizado até a temperatura registrada. O resultado de perda de massa experimental para o complexo Cu-Ceto está coerente com a fórmula proposta, $[Cu_2(Ceto)_4(H_2O)_2]$.



Figura 29 - Curvas TG (linha verde), DTG (linha vermelha) e DSC (linha azul) para o complexo Cu-Ceto (atmosfera de ar sintético).

A curva DSC do complexo Cu-Ceto mostra verifica-se inicialmente um evento endotérmico que ocorre no intervalo de temperatura de 35 - 110 °C e com pico em 71 °C com entalpia de 12,94 J g⁻¹. Este processo ocorre com perda de massa, sendo assim associado ao processo endotérmico de perda das moléculas de água constituintes do complexo Cu-Ceto.

4.1.4.4. Fármaco H₂melox e o Complexo Zn-Hmelox

As curvas TG e DTG para o H_2 melox (Figura 30) mostram que o fármaco perde aproximadamente 75% de sua massa em uma única etapa, entre 225 e 442 °C, com pico na curva DTG em 266 °C.



Figura 30 - Curvas TG (linha verde), DTG (linha vermelha) e DSC (linha azul) para o fármaco H₂melox (atmosfera de ar sintético).

Não há nenhuma transição endotérmica sem perda de massa que possa ser associada à fusão. A principal etapa de termodecomposição do H₂melox envolve dois processos endotérmicos no intervalo de temperatura de 240 - 300 °C com picos em 259 °C e 273 °C e uma entalpia total de 160 J g⁻¹.

Ao examinar as curvas TG e DTG para o complexo Zn-Hmelox (Figura 31) observase que há pelo menos três etapas de perda de massa. A primeira perda (8,75%) é coerente com a perda de 2 moléculas de H₂O (calculado = 8,58%). A perda de massa total (73%) é mais baixa do que o valor calculado (90%) para a total decomposição dos ligantes orgânicos e formação de 1 mol de óxido de zinco (ZnO), o que pode ser atribuído ao fato de a massa não ter se estabilizado ate a temperatura investigada (850 °C).

A curva DSC do complexo Zn-Hmelox (Figura 31) mostra um evento endotérmico no intervalo de temperatura de 55 - 155 °C com pico em 134 °C e entalpia de 174,1 J g⁻¹, que pode ser associado à perda das moléculas de água. Ainda pela curva de DSC, pode-se notar um evento exotérmico que acompanha a segunda etapa de perda de massa, ocorre no intervalo de temperatura de 250 - 290 °C com pico em 266 °C com entalpia de 60,66 J g⁻¹.



Figura 31 - Curvas TG (linha verde), DTG (linha vermelha) e DSC (linha azul) para o complexo Zn-Hmelox.

4.2. Determinação da massa molar viscosimétrica média (M_v) das quitosanas de alta massa molar (QTAPM), de média massa molar (QTMPM) e baixa massa molar (QTBPM)

A viscosidade é uma medida de resistência de um líquido à deformação sob tensão de cisalhamento. Descreve a resistência interna de um líquido ao fluxo e é uma medida de fricção fluida. Os polímeros aumentam a viscosidade de um líquido em que estão dissolvidos, porque possuem cadeias muito longas. Este aumento é devido ao fluxo das macromoléculas junto com o solvente. O valor do aumento na viscosidade depende do tamanho e da forma do polímero. Na solução, os polímeros ou biomoléculas existem como partículas pseudo-ordenadas, permitindo que se movam através da solução e permanecendo ainda aproximadamente esféricas. A esfericidade de uma molécula depende da estrutura da própria molécula bem como do solvente em que é dissolvida⁴⁸.

A viscosimetria, embora seja um método não absoluto, é um dos processos mais utilizados para a determinação da massa molar de polímeros em soluções diluídas. Não exige uma aparelhagem muito complexa e de custo elevado. As medidas são feitas com base nos tempos de escoamento do solvente e das soluções diluídas do polímero, utilizando-se um viscosímetro²⁷. A viscosidade de uma solução de polieletrólito pode ser descrita como função de sua viscosidade intrínseca e de sua concentração se não ocorrerem interações entre as macromoléculas (sistema diluído). Neste caso, a equação de Huggins (2) pode ser usada⁵¹.

$$\underline{\eta}_{sp} = [\eta] + K_{\rm H} [\eta]^2 C$$
(2)

C

Sendo: η_{sp} é a viscosidade específica; η_{sp}/C é a viscosidade reduzida (mL g⁻¹); $[\eta]$ é a viscosidade intrínseca (mL g⁻¹); K_H é a constante de Huggins e C é a concentração⁴⁹ da solução (g mL⁻¹). Dessa forma, o termo que é linear com a concentração é a viscosidade intrínseca $[\eta]$; o termo quadrático inclui o coeficiente de Huggins $K_H^{31,51}$.

A massa molar viscosimétrica média, M_v , foi determinada através da Equação de Mark-Houwink-Sakurada (3).

$$[\eta] = K.M_v^{a}$$
(3)

Em que, "K" e "a" são as constantes para um dado sistema soluto-solvente a uma determinada temperatura. Para o sistema utilizado aqui, os valores considerados foram: K = 0,076 e a = 0,76. Para quitosana, esses coeficientes são influenciados pelo grau de desacetilação, o pH e a força iônica do solvente⁵⁰.

Nesse ensaio, foram determinadas as massas molares viscosimétricas médias (M_v) das três quitosanas de massas molares diferentes (QTAPM, QTMPM e QTBPM). Os dados e os cálculos da M_v para cada quitosana são apresentados a seguir.

4.2.1. Quitosana de baixa massa molar (QTBPM)

Os tempos de escoamento do solvente e das soluções diluídas de QTBPM bem como os valores de viscosidade intrínseca (η_{sp}) e de viscosidade reduzida (η_{sp} /C) para cada solução de QTBPM são mostrados na Tabela 9. Os valores de viscosidade intrínseca (η_{sp}) foram calculados pela fórmula $\eta_{sp} = (t-t_0)/t_0$, em que t é o tempo de escoamento da solução de QTBPM e t_0 é o tempo de escoamento da solução tampão utilizada no preparo da solução de quitosana em questão.

Tabela 9 - Valores dos tempos de escoamento para as soluções diluídas de QTBPM e valores de η_{sp} , η_{sp}/C das soluções poliméricas.

| Solução/ C (g mL ⁻¹) | Tempo de Escoamento (s) | η_{sp} | η _{sp} /C |
|---|----------------------------|----------------------|--------------------|
| Solução de QT/ 5,0 x $10^{-4} * g/mL^*$ | 287 | 0,1526 | 305,2 |
| Solução de QT/ 1,0 x 10 ⁻³ * * | 345 | 0,3424 | 342,4 |
| Solução de QT/ 1,5 x 10^{-3} * g/mL* | 396 | 0,5904 | 393,6 |
| Solução de QT/ 2,0 x 10^{-3} * g/mL* | 470 | 0,8876 | 443,8 |
| Solução de QT/ 2,5 x 10^{-3} * g/mL* | 546 | 1,1928 | 477,1 |
| Solução de QT/ 3,0 x 10^{-3} * g/mL* | 625 | 1,5100 | 503,3 |
| Solução Tampão 1 | 249 | | |
| Solução Tampão 2 | 257 | | |

* solução de QTBPM no Tampão 1.

** solução de QTBPM no Tampão 2.

A Figura 32 mostra a curva de viscosidade reduzida (η_{sp}/C) em função da concentração da solução de QTBPM. A viscosidade intrínseca, [η], foi determinada pela extrapolação dos dados de viscosidade à diluição infinita, de acordo com a Equação 2. A reta obtida apresenta excelente coeficiente de correlação entre os pontos experimentais (r > 0,9). A partir do gráfico da Figura 32 obteve-se o valor da [η], uma vez que o coeficiente linear do gráfico é a própria viscosidade intrínseca cujo valor é 266 mL g⁻¹. A partir deste valor de [η], calculou-se a massa molar viscosimétrica média (M_v) da QTBPM, através da Equação de Mark-Houwink-Sakurada (3). O valor da massa molar viscosimétrica média (M_v) da QTBPM obtido foi 4,6 x 10⁴ g mol⁻¹.



Figura 32 - Curva de viscosidade reduzida (η_{sp}/C) em função da concentração (C) das amostras de quitosana de baixa massa molar (QTBPM).

4.2.2. Quitosana de média massa molar (QTMPM)

Os tempos de escoamento do solvente e das soluções diluídas de QTBPM bem como os valores de viscosidade intrínseca (η_{sp}) e de viscosidade reduzida (η_{sp} /C) para cada solução de QTMPM são mostrados na Tabela 10. Os valores de viscosidade intrínseca (η_{sp}) foram calculados pela fórmula $\eta_{sp} = (t-t_0)/t_0$.

Tabela 10 - Valores dos tempos de escoamento para as soluções diluídas de QTMPMe valores de η_{sp} , η_{sp}/C das soluções poliméricas.

| Solução/ C (g mL ⁻¹) | Tempo de Escoamento (s) | η_{sp} | η _{sp} /C |
|---------------------------------------|----------------------------|----------------------|--------------------|
| Solução de QT/ 9,0 x 10 ⁻⁴ | 649 | 0,9489 | 1054,3 |
| Solução de QT/ 1,2 x 10^{-3} | 782 | 1,3483 | 1123,6 |
| Solução de QT/ 1,5 x 10^{-3} | 978 | 1,9369 | 1291,3 |
| Solução de QT/ 1,8 x 10 ⁻³ | 1190 | 2,5736 | 1429,8 |
| Solução de QT/ 2,1 x 10^{-3} | 1430 | 3,2943 | 1568,7 |
| Solução Tampão | 333 | | |

A Figura 33 mostra a curva de viscosidade reduzida (η_{sp}/C) em função da concentração da solução de QTMPM. A viscosidade intrínseca, [η], foi determinada pela extrapolação dos dados de viscosidade à diluição infinita, de acordo com a Equação 2. A reta obtida apresenta excelente coeficiente de correlação entre os pontos experimentais (r > 0,9). A partir do gráfico da Figura 33 obteve-se o valor de [η] = 626 mL g⁻¹. A massa molar viscosimétrica média (M_v) calculada para a QTMPM foi 14,2 x 10⁴ g mol⁻¹.



Figura 33 - Curva de viscosidade reduzida (η_{sp}/C) em função da concentração (C) das amostras de quitosana de média massa molar (QTMPM).

4.2.3. Quitosana de alta massa molar (QTAPM)

Os tempos de escoamento do solvente e das soluções diluídas de QTBPM bem como os valores de viscosidade intrínseca (η_{sp}) e de viscosidade reduzida (η_{sp} /C) para cada solução de QTMPM são mostrados na Tabela 11. Os valores de viscosidade intrínseca (η_{sp}) foram determinados pela seguinte fórmula $\eta_{sp} = (t-t_0)/t_0$.

Tabela 11 - Valores dos tempos de escoamento para as soluções diluídas de QTMPMe valores de η_{sp} , η_{sp}/C das soluções poliméricas.

| Solução/ C (g mL ⁻¹) | Tempo de Escoamento (s) | η_{sp} | η _{sp} /C |
|--|----------------------------|----------------------|--------------------|
| Solução de QT/ 9,0 x $10^{-4} * \text{g/mL}^*$ | 723 | 1,3248 | 1471,9 |
| Solução de QT/ 2 x 10^{-3} * | 898 | 1,8875 | 1572,9 |
| Solução de QT/ 5 x $10^{-3} * * g/mL**$ | 1197 | 2,5946 | 1729,7 |
| Solução de QT/ 1,8 x 10^{-3} * g/mL* | 1413 | 3,5434 | 1968,6 |
| Solução de QT/ 2,1 x $10^{-3} * g/mL*$ | 1647 | 4,2958 | 2045,6 |
| Solução Tampão 1 | 311 | | |
| Solução Tampão 2 | 333 | | |

* solução de QTAPM no Tampão 1.

** solução de QTAPM no Tampão 2.

A Figura 34 mostra a curva de viscosidade reduzida (η_{sp}/C) em função da concentração da solução de QTAPM. A viscosidade intrínseca, [η], foi determinada pela extrapolação dos dados de viscosidade à diluição infinita, de acordo com a Equação 2. A reta obtida apresenta excelente coeficiente de correlação entre os pontos experimentais (r > 0,9). A partir do gráfico da Figura 34 obteve-se o valor de [η] = 986 mL g⁻¹. A massa molar viscosimétrica média (M_v) calculada para a QTMPM foi 25,8 x 10⁴ g mol⁻¹.



Figura 34 - Curva de viscosidade reduzida (η_{sp}/C) em função da concentração (C) das amostras de quitosana de alta massa molar (QTAPM).

4.3. Determinação do grau médio de desacetilação (GMD) das quitosanas de alta e baixa massa molecular (QTAPM e QTBPM)

O grau médio de desacetilação (GMD) mede o percentual de grupos amino disponíveis nas cadeias da quitosana e é um dos principais parâmetros que afetam as propriedades de adsorção. Grandes diferenças são observadas nas propriedades de interação metalquitosana, para o mesmo metal, utilizando-se quitosanas com diferentes GMD. Esta propriedade afeta também o grau de cristalinidade e de hidrofobicidade, devido às mudanças nas interações hidrofóbicas. Diferentes técnicas têm sido utilizadas para medir o GMD, tais como espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) ou de carbono (RMN ¹³C), espectroscopia UV-Visível ou Infravermelho, titulação potenciométrica, análise elementar, dicroísmo circular etc. Entretanto, a escolha do método parece ser dependente da conveniência da análise e frequentemente as diferentes técnicas apresentam resultados distintos. Vários estudos mostram que não é o número total de grupos amino o responsável pelas propriedades de adsorção, mas sim o percentual de grupos amino disponíveis. Esta acessibilidade é controlada principalmente pelo grau de cristalinidade e pelas propriedades de difusão⁴¹.

As Figuras 35 e 36 mostram as curvas de titulação potenciométrica e sua derivada primeira para a quitosana de baixa massa molecular (QTBPM) em duplicata. É possível, através das inflexões destas curvas, determinar V₁ e V₂ (volumes de NaOH empregados para neutralizar o excesso de HCl e a amostra de quitosana protonada, respectivamente) e, utilizando a Equação 1, determinar a percentagem dos grupos amino presentes na quitosana. Pode-se observar que a QTBPM apresentou um grau de desacetilação médio de 79%, estando dentro da faixa fornecida pela Sigma-Aldrich de 75 - 85%. Já pelas curvas de titulação potenciométrica apresentadas nas Figuras 37 e 38 calculou-se da mesma forma que para a QTBPM (Figura 35 e 36) o grau de desacetilação médio para a QTAPM, que foi de 73%, também estando muito próximo ao valor fornecido pela Sigma-Aldrich (75%).



Figura 35 - Curvas de titulação potenciométrica e sua derivada primeira para a quitosana de baixa massa molecular (QTBPM) - amostra 1.



Figura 36 - Curvas de titulação potenciométrica e sua derivada primeira para a quitosana de baixa massa molecular (QTBPM) - amostra 2.


Figura 37 - Curvas de titulação potenciométrica e sua derivada primeira para a quitosana de alta massa molecular (QTAPM) - amostra 1.



Figura 38 - Curvas de titulação potenciométrica e sua derivada primeira para a quitosana de alta massa molecular (QTAPM) - amostra 1.

4.4. Estudo das interações dos fármacos HIbp e HCeto e dos complexos Cu-Ceto e Zn-Ibp com esferas de QTAPM obtidas pela técnica de coacervação - Ensaios de Adsorção 1

As esferas de quitosana de alta massa molar (QTAPM) foram preparadas de acordo com procedimentos descritos na literatura^{25,26,27,28,29,51,52}, pelo método de separação de fases, via coacervação simples. Segundo este método a formação das esferas resulta de um fenômeno de superfície e ocorre devido a interação entre a solução polimérica (solução de quitosana) e um meio coagulante (solução de NaOH 2 mol L⁻¹) o qual induz a separação de fases, precipitando a membrana polimérica.

As esferas de quitosana apresentaram-se com estrutura quase esférica, com superfície aparentemente uniforme a olho nu, tamanho aproximado de 3 mm e coloração brancoamarelada. Após o processo de reticulação as esferas foram armazenadas em erlenmeyers fechados e com água deionizada.

Essas esferas foram então usadas para estudo da interação com os fármacos e os complexos. Ao final do experimento em que as esferas de QTAPM/0,1%GA foram mantidas em contato com as soluções dos compostos, verificou-se que as esferas apresentaram cores diferentes para cada caso. As que estavam em contato com as soluções de HIbp e HCeto apresentaram-se com cor bege muito clara. Já as que estiveram em contato com as soluções dos complexos Zn-Ibp e Cu-Ceto apresentaram cores branca e azul, respectivamente. Outro fato relevante é que as esferas que estiveram em contato com as soluções dos complexos metálicos ficaram visivelmente menores, o que pôde ser examinado pela diminuição da altura inicial demarcada no frasco de vidro transparente que as esferas ocupavam durante o ensaio de adsorção.

Após a secagem em estufa, as esferas apresentaram ganho de dureza, redução de tamanho (< 1 mm) e colorações diferentes. As cores e as massas das esferas de quitosana obtidas após a secagem na estufa estão relacionadas na Tabela 12.

 Tabela 12 - Massas e cores das esferas após ensaio de adsorção seguido de secagem

 em estufa a 40 °C por 7 h.

| Material | Massa (g) | Cor |
|----------------------|-----------|----------------|
| QTAPM/0,1%GA_vazia | 0,0684 | Bege |
| QTAPM/0,1%GA_HIbp | 0,2615 | Caramelo claro |
| QTAPM/0,1%GA_HCeto | 0,1920 | Caramelo claro |
| QTAPM/0,1%GA_Zn-Ibp | 0,2728 | Bege claro |
| QTAPM/0,1%GA_Cu-Ceto | 0,1724 | Azul |

Os cinco materiais obtidos foram investigados por meio de análise elementar (ICP-AES), DRX, FTIR e análise térmica (TG. DTG e DSC). A análise de ICP-AES indicou 1,3% de Cu no material QTAPM/0,1%GA_Cu-Ceto e 1,8% de Zn para o material QTAPM/0,1%GA_Zn-Ibp.

A Figura 39 traz os difratogramas para os materiais obtidos neste ensaio de adsorção. O difratograma do material QTAPM/0,1%GA_vazia (Figura 39 (A)) apresenta um pico intenso em $2\Theta \sim 20^{\circ}$ outro picos pouco intenso em ~ 10°. Este difratograma é muito semelhante ao apresentado pela QTAPM⁵¹. Os difratogramas dos materiais (Figuras 39 e 40) apresentam semelhanças com o difratograma do material QT_vazia (Figura 39 (A)). Para os difratogramas destes materiais observa-se que ocorre uma perda de cristalinidade, sendo que o pico principal encontrado no difratograma do material QT_vazia sofre um alargamento. O pico novo em $2\Theta \sim 4^{\circ}$ que aparece no difratograma do QTAPM/0,1%GA_Zn-Ibp pode ser associado ao pico intenso observado no difratograma do complexo Zn-Ibp (Figura 39), que o sólido cristalino ou parte dele em sua forma cristalina está interagindo com a quitosana. No caso do material QTAPM/0,1%GA_HIbp aparece um pico novo em $2\Theta \sim 3^{\circ}$ que não estava presente no difratograma do HIbp, mas este pico não pôde ser explicado com base apenas nos dados aqui obtidos.

Diferentemente para os materiais QTAPM/0,1%GA_Hceto e QTAPM/0,1%GA_Cu-Ceto, não se observaram novos picos adicionais o que indica que os compostos não estão interagindo com a quitosana em sua forma cristalina.

É preciso lembrar, no entanto, que em razão da menor solubilidade, as quantidades de HIbp e Zn-Ibp usadas no experimento foram maiores do que as quantidades de HCeto e Cu-Ceto, o que pode ter contribuído para favorecer a presença do material cristalino nos primeiros casos.



Figura 39 - Difratogramas dos materiais QTAPM/0,1%GA_vazia (A), HIbp (B), QTAPM/0,1%GA_HIbp (C), Zn-Ibp (D) e QTAPM/0,1%GA_Zn-Ibp (E).



Figura 40 - Difratogramas dos materiais QTAPM/0,1%GA_vazia (A), HCeto (B), QTAPM/0,1%GA_HCeto (C), Cu-Ceto (D) e QTAPM/0,1%GA_Cu-Ceto (E).

Os espectros FTIR para os materiais são mostrados na Figura 41.



Figura 41 - Espectros vibracionais FTIR dos materiais QTAPM (após secagem em estufa) (A), QTAPM/0,1%GA_vazia (B), QTAPM/0,1%GA_HIbp (C), QTAPM/0,1%GA_Zn-Ibp (D), QTAPM/0,1%GA_Hceto (E) e QTAPM/0,1%GA _Cu-Ceto (F).

O espectro FTIR do material QTAPM/0,1%GA_vazia (Figura 41 (B)), é muito semelhante ao espectro da QTAPM (Figura 41 (A)) e também de outros espectros de quitosanas reportados na literatura⁵³. Na região de 2310 a 3840 cm⁻¹ são encontradas as bandas referentes aos modos de estiramentos v(OH), v(NH) e v(CH). Observam-se ainda a banda v(C=O) de amida em 1663 cm⁻¹; deformação angular de N-H em 1600 cm⁻¹; estiramento v(CN) de amida em ~ 1429 cm⁻¹; deformação angular simétrica de CH₃ em 1381 cm⁻¹ e bandas de estruturas polissacarídicas na região entre 920 a 1230 cm⁻¹. O deslocamento observado na frequência da banda de v(OH) sobreposta à banda de v(N-H), em 3508 cm⁻¹, pode ser atribuído à interação com o crosslinker glutaraldeído (GA), na qual os grupos –NH₂, -OH e –NHCOCH₃ da QT interagem com os grupos aldeídos do GA^{57,54}.

Os espectros dos materiais com os fármacos HIbp e HCeto (Figuras 41 (C) e (E)) apresentam perfis muito semelhantes entre si e com o das microesferas reticuladas (QTAPM/0,1%GA_vazia). Nota-se o deslocamentos de algumas bandas nos dois espectros (QTAPM/0,1%GA_HIbp e QTAPM/0,1%GA_HCeto), o que sugere possíveis interações desses fármacos com a QT. Tais fármacos sendo ácidos carboxílicos possuem uma banda característica muito intensa referente ao estiramento v(C=O) da carbonila em torno de 1700 cm⁻¹. Esta banda não é observada nos espectros das Figuras 41 (C) e (E), dando indícios de que os fármacos podem estar interagindo em sua forma desprotonada com as microesferas de quitosana.

Para entender o tipo de interação que se estabeleceu entre os complexos metálicos (Zn-Ibp e Cu-Ceto) e as microesferas de QT reticuladas é preciso fazer uma análise minuciosa dos espectros dos materiais QTAPM/0,1%GA_Zn-Ibp e QTAPM/0,1%GA_Cu-Ceto. É importante lembrar que diferentemente dos materiais QTAPM/0,1%GA_HIbp e QTAPM/0,1%GA_HCeto os materiais QTAPM/0,1%GA_Zn-Ibp e QTAPM/0,1%GA_Cu-

Ceto apresentam em sua estrutura metais e estes podem estabelecer interações especiais com a quitosana. Observa-se que as bandas relativas aos modos v(C=O) (amida) e v(N-H) sofrem deslocamentos consideráveis nos espectros dos materiais QTAPM/0,1%GA_Zn-Ibp (1622 cm⁻¹ e 1597 cm⁻¹) e QTAPM/0,1%GA_Cu-Ceto (1655 cm⁻¹ e 1578 cm⁻¹) em comparação com o espectro da QTAPM/0,1%GA_vazia (1663 cm⁻¹ e 1600 cm⁻¹. Estes deslocamentos e o fato dos espectros desses apresentarem bandas mais finas são coerentes com estudos relatados na literatura que explicam a interação entre a quitosana e íons de Cu(II)⁵⁵. Outra evidência que indica a interação dos complexos com as microesferas de QT são os deslocamentos das bandas de estiramento do CH₃ do grupo acetil (-NHCOCH₃). No espectro da Figura 41 (B) (QT_vazia), observa-se que tal banda se encontra em 1381 cm⁻¹ sendo que nos espectros das Figuras 41 (D) e (F) se localiza respectivamente em 1385 e 1387 cm^{-1 61}.

As curvas TG, DTG e DSC dos materiais, mostradas na Figura 42, tem perfis semelhantes, mas algumas diferenças nos valores de temperaturas e porcentagens de perdas de massa indicam que diferentes materiais foram formados. A primeira etapa de perda de massa refere-se à perda de moléculas de solvente, sendo que os materiais contendo os fármacos e os complexos apresentam perda de solvente em temperaturas mais baixas do que as microesferas vazias.



Figura 42 - Curvas TG (linha verde), DTG (linha vermelha) e DSC (linha azul): QTAPM/0,1%GA_vazia (A), QTAPM/0,1%GA_Hibp (B), QTAPM/0,1%GA_HCeto (C), QTAPM/0,1%GA_Zn-Ibp (D) e QTAPM/0,1%GA_Cu-Ceto (E).

A principal etapa de perda de massa ocorre no intervalo de temperatura de 160-550 °C e pode ser atribuída à decomposição das ligações cruzadas do polímero e das unidades de glucosamina⁵³. Os materiais perdem aproximadamente 67% de massa. O espectro do sólido QT_Cu-Ceto (Figura 43) mostra a presença de uma banda larga, com máximo em 700 nm, que pode ser atribuída a transição d-d do cobre(II). Evidenciando desta forma a presença do referido metal no material QT_Cu-Cet0.



Figura 43 - Espectro eletrônico do sólido QTAPM/0,1%GA_Cu-Ceto.

4.5. Estudo das interações dos fármacos HIbp e HCeto e dos complexos Zn-Ibp, Cu-Ibp e Cu-Ceto com esferas de QTAPM obtidas pela técnica de coacervação - Ensaio de adsorção 2

Neste ensaio as microesferas de QT foram reticuladas com 0,1%, 0,5% e 1,0% GA. Repetiram-se alguns procedimentos com a reticulação 0,1% GA porque as microesferas obtidas no ensaio 1 haviam se degradado antes se finalizar todos os estudos. As esferas obtidas no final do ensaio de adsorção apresentaram cores diferentes para cada caso: bege claro para HIbp e Hceto, azul para Cu-Ibp e Cu-Ceto e branca para Zn-Ibp. As microesferas que estiveram em contato com as soluções dos complexos metálicos ficaram visivelmente menores, o que pôde ser examinado pela diminuição da altura inicial demarcada no frasco de vidro transparente que as esferas ocupavam durante o ensaio de adsorção. As cores e as massas das microesferas obtidas após a secagem na estufa estão relacionadas na Tabela 13.

| Material | Massa (g) | Cor |
|-----------------------|-----------|------------------------|
| QTAPM/0,1 %GA_vazia | 0,2918 | Bege |
| QTAPM/0,5 %GA_vazia | 0,2936 | Bege-esverdeado |
| QTAPM/1,0%GA_vazia | 0,3065 | Bege-esverdeado escuro |
| QTAPM/0,1 %GA_HIbp | 0,3289 | Caramelo claro |
| QTAPM/0,5 %GA_HIbp | 0,3290 | Caramelo |
| QTAPM/1,0%GA_HIbp | 0,2918 | Caramelo escuro |
| QTAPM/0,1 %GA_Cu-Ibp | 0,2912 | Azul |
| QTAPM/0,5 %GA_Cu-Ibp | 0,3057 | Azul-esverdeado |
| QTAPM/1,0%GA_Cu-Ibp | 0,3313 | Verde-musgo escuro |
| QTAPM/0,1 %GA _Zn-Ibp | 0,3531 | Bege claro |
| QTAPM/0,5 %GA _Zn-Ibp | 0,3304 | Bege |
| QTAPM/1,0%GA_Zn-Ibp | 0,3103 | Bege escuro |
| QTAPM/0,1 %GA_HCeto | 0,3183 | Caramelo claro |
| QTAPM/0,5 %GA_HCeto | 0,3477 | Caramelo |
| QTAPM/1,0%GA_HCeto | 0,3804 | Caramelo escuro |
| QTAPM/0,1 %GA_Cu-Ceto | 0,3434 | Azul |
| QTAPM/0,5 %GA_Cu-Ceto | 0,3347 | Azul-esverdeado |
| QTAPM/1,0%GA_Cu-Ceto | 0,3642 | Verde escuro |

 Tabela 13 - Massas e cores das microesferas no ensaio de adsorção 2.

Os resultados obtidos por ICP-AES (Tabela 14) mostram que as quantidades de metal incorporadas nos materiais para cada complexo não apresentam dependência significativa com o grau de reticulação da quitosana com o crosslinker glutaraldeído.

Tabela 14 - Resultados de ICP-AES (Zn e Cu) para os materiais QTAPM/0,1 %GA _Zn-Ibp, QTAPM/0,5 %GA _Zn-Ibp, QTAPM/1,0%GA _Zn-Ibp, QTAPM/0,1 %GA _Cu-Ibp, QTAPM/0,5 %GA _Cu-Ibp, QTAPM/1,0%GA _Cu-Ibp, QTAPM/0,1 %GA _Cu-Ceto, QTAPM/0,5 %GA _Cu-Ceto e QTAPM/1,0%GA _Cu-Ceto.

| Material | % |
|------------------------|------|
| QTAPM/0,1 %GA _Zn-Ibp | 1,81 |
| QTAPM/0,5 %GA _Zn-Ibp | 1,77 |
| QTAPM/1,0%GA _Zn-Ibp | 1,93 |
| QTAPM/0,1 %GA _Cu-Ibp | 0,76 |
| QTAPM/0,5 %GA _Cu-Ibp | 0,75 |
| QTAPM/1,0%GA _Cu-Ibp | 0,66 |
| QTAPM/0,1 %GA _Cu-Ceto | 1,71 |
| QTAPM/0,5 %GA _Cu-Ceto | 1,51 |
| QTAPM/1,0%GA _Cu-Ceto | 1,78 |

Os espectros dos materiais contendo os complexos de cobre (Figura 44) mostram a presença de uma banda larga, com máximo em torno de 700 nm, que pode ser atribuída a transição d-d do cobre(II). Esta banda apresenta dois componentes e no caso do material com Cu-Ibp observa-se mais claramente uma intensificação do primeiro componente em relação

aos segundo para as microesferas com graus de reticulações 0,5% e 1,0% GA, o que indica que a reticulação deve estar afetando o ambiente de coordenação do Cu(II).



Figura 44 - Espectros eletrônicos dos materiais QTAPM/0,1%GA_Cu-Ibp, QTAPM/0,5%GA_Cu-Ibp, QTAPM/1,0%GA_Cu-Ibp, QTAPM/0,1%GA_Cu-Ceto, QTAPM/0,5%GA_Cu-Ceto e QTAPM/1,0%GA_Cu-Ceto.

Os difratogramas das quitosanas reticuladas (Figura 45) mostram um alargamento do pico em $2\Theta = 20^{\circ}$ com o aumento do grau de reticulação, sendo o material com reticulação 1,0% GA o de menor cristalinidade. Durante o maceramento para o preparo das amostras foi verificada uma maior dureza para as microesferas de maior grau de reticulação, o que está de acordo com o esperado devido à aproximação e interligação das cadeias poliméricas com uma maior concentração de glutaraldeído⁵⁶.



Figura 45 - Difratogramas dos materiais QTAPM (A), QTAPM/0,1%GA_vazia (B), QTAPM/0,5%GA_vazia (C), QTAPM/1,0%GA_vazia (D).

Os difratogramas dos materiais contendo HIbp e HCeto (Figura 46) tem perfis muito semelhantes entre si e são também muito parecidos com os difratogramas das correspondentes microesferas vazias. Não são observados picos que poderiam ser dos compostos cristalinos HIbp e Hceto indicando que não se tratam de misturas físicas.



Figura 46 - Difratogramas dos materiais QTAPM/0,1%GA_HIbp (A), QTAPM/0,5%GA_HIbp (B), QTAPM/1,0%GA_HIbp (C), QTAPM/0,1%GA_HCeto (D), QTAPM/0,5%GA_HCeto (E) e QTAPM/1,0%GA_HCeto (F).

Os difratogramas dos materiais contendo os complexos Zn-Ibp, Cu-Ibp e Cu-Ceto (Figura 47) também são muito semelhantes aos difratogramas das correspondentes microesferas vazias. Também não aparecem picos que poderiam ser dos complexos cristalinos Zn-Ibp, Cu-Ibp e Cu-Ceto indicando que não se tratam de misturas físicas.



Figura 47 - Difratogramas dos materiais QTAPM/0,1%GA_Zn-Ibp (A), QTAPM/0,5%GA_Zn-Ibp (B), QTAPM/1,0%GA_Zn-Ibp (C), QTAPM/0,1%GA_Cu-Ibp (D), QTAPM/0,5%GA_Cu-Ibp (E) e QTAPM/1,0%GA_Cu-Ibp (F), QTAPM/0,1%GA_Cu-Ceto (G), QTAPM/0,5%GA_Cu-Ceto (H) e QTAPM/1,0%GA_Cu-Ceto (I).

A Figura 48 mostra o espectro FTIR do material QTAPM/0,1%GA_Cu-Ibp, que pode ser comparado aos espectros apresentados na Figura 41 para as microesferas vazias e os correspondentes materiais contendo HIbp e Zn-Ibp e Cu-Ibp. A banda relativa ao modo v(C=O) (amida) sofreu deslocamento para menor número de onda (1647 cm⁻¹) quando comparada com o espectro da QTAPM/0,1%GA_vazia (1663 cm⁻¹).



Figura 48 - Espectro vibracional FTIR do material QTAPM/0,1%GA_Cu-Ibp.

4.6. Determinação das curvas de adsorção do complexo Cu-Napx em esferas de QTAPM obtidas pela técnica de coacervação

As curvas de adsorção do complexo Cu-Napx foram investigadas para os experimentos realizados com esferas de QTAPM de graus de reticulação 0,1% e 1,0% GA. As três fotos apresentadas na Figura 47 ilustram o ensaio realizado, onde nota-se que em soluções menos concentradas de Cu-Napx (ordem crescente de concentração das soluções da esquerda para a direita na Figura 49 - A, B e C) a adsorção do complexo se deu mais rapidamente. Já na Figura 48 - B capturada no quinto dia do ensaio, pode-se observar que o fim da turvação das soluções se dá à medida que o complexo foi sendo adsorvido pelas esferas de QT. A Figura 49 - C é uma foto obtida no décimo e último dia do ensaio, em que se verifica que todas as soluções ficaram incolores e as esferas de QT azuis.



Figura 47 - Fotos registradas durante o ensaio de obtenção das curvas de adsorção para o complexo Cu-Napx com esferas de QTAPM: segundo dia (A); quinto dia (B) e décimo dia (C).

Os resultados de ICP-AES apresentados na Tabela 15 mostram que a QT adsorveu quase todo o cobre presente no sistema no início do ensaio. Ainda é possível verificar que os valores encontrados (% Cu) para os cinco últimos materiais de cada grupo de esferas reticuladas (0,1 e 1,0% GA) indicaram valores de % de Cu muito próximos do que indica a saturação da matriz polimérica, ou seja, trata-se da quantidade máxima de Cu que ela consegue adsorver nas condições experimentais utilizadas.

| Material QTAPM/0,1%GA_CuNapx | % Cu | Material QTAPM/1,0%GA_CuNapx | % Cu |
|---------------------------------|------|---------------------------------|------|
| 1 | 0,22 | 1 | 0,26 |
| 2 | 0,29 | 2 | 0,30 |
| 3 | 0,44 | 3 | 0,49 |
| 4 | 5,27 | 4 | 0,73 |
| 5 | 9,29 | 5 | 0,73 |
| 6 | 1,07 | 6 | 0,91 |
| 7 | 1,30 | 7 | 1,30 |
| 8 | 1,66 | 8 | 1,26 |
| 9 | 1,71 | 9 | 1,68 |
| 10 | 1,94 | 10 | 1,53 |
| 11 | 2,20 | 11 | 1,59 |
| 12 | 2,42 | 12 | 1,99 |
| 13 | 2,48 | 13 | 2,59 |
| 14 | 1,80 | 14 | 2,56 |
| 15 | 3,15 | 15 | 2,72 |
| 16 | 3,25 | 16 | 3,16 |
| 17 | 3,38 | 17 | 3,00 |
| 18 | 3,65 | 18 | 3,22 |
| 19 | 4,29 | 19 | 3,99 |
| 20 | 4,77 | 20 | 4,17 |
| 21 | 4,53 | 21 | 3,99 |
| 22 | 4,54 | 22 | 5,34 |
| 23 | 5,27 | 23 | 4,79 |
| 24 | 5,45 | 24 | 4,54 |
| 25 | 5,01 | 25 | 4,81 |
| 26 | 5,10 | 26 | 5,18 |
| 27 | 5,57 | 27 | |

Tabela 15 - Resultados de ICP-AES para os materiais obtidos no ensaio de obtençãodas curvas de adsorção para o complexo metálico Cu-Napx.

O difratograma do material QTAPM/1,0%GA_vazia (Figura 49) apresenta um único pico intenso ao redor de $2\Theta = 20^{\circ}$ e é muito semelhante ao reportado na literatura^{32,41,47,57} conforme já discutido. Os difratogramas dos materiais isolados das amostras 21 (QTAPM/0,1%GA_CuNapx_21 e QTAPM/1,0%GA_CuNapx_21) são semelhantes ao do material QTAPM/1,0%GA_vazia, mas observa-se que ocorre perda de cristalinidade, sendo que o pico principal sofre um alargamento. Também nota-se o aparecimento de dois picos novos em $2\Theta = 6,7^{\circ}$ e $2\Theta = 10,8^{\circ}$. O pico novo em $2\Theta = 10,8^{\circ}$ pode ser atribuído à quitosana. O pico em $2\Theta = 6,7^{\circ}$ é um pico que é próximo dos picos que aparecem também nos difratogramas do fármaco HNapx (6,7^o) e do Cu-Napx (5,7^o) (Figura 48), mas é difícil afirmar se este pico poderia indicar a presença de um destes compostos no estado cristalino, ou se é um pico do novo material, o que é mais provável.



Figura 48 - Difratogramas do fármaco naproxeno (HNapx) e do complexo Cu-Napx.



Figura 49 - Difratogramas dos materiais QTAPM/1,0%GA_vazia, QTAPM/0,1%GA_CuNapx_21 e QTAPM/1,0%GA_CuNapx_21.

Existem quatro principais possibilidades para a interação do complexo com a QT: a) o Cu-Napx foi adsorvido na QT sem perder sua estrutura original (gaiola); b) o Cu-Napx perdeu apenas seus ligantes axiais (DMSO) mantendo sua estrutura central com quatro Napxs; c) o Cu-Napx quebrou e o Cu se ligou aos grupos –NH₂ da QT e o Napx interagiu separadamente com a QT; d) apenas uma parte do Cu-Napx teve sua estrutura original quebrada, desta forma a QT estabeleceu interações com a parte do complexo que não perdeu sua estrutura gaiola e também com átomos livres de Cu(II) e com o HNapx.

Para tentar elucidar essa interação, foram registrados os espectros de EPR do complexo Cu-Napx e dos materiais QTAPM/0,1%GA_CuNapx_21 e QTAPM/1,0% GA_CuNapx_21. O espectro EPR do complexo Cu-Napx (Figura 50) apresenta um sinal largo na região 4500 – 5000 G, em virtude do estado de spin tripleto do complexo dinuclear, um pequeno sinal por volta de 3300 G atribuído à impurezas do complexo monuclear e ainda um sinal pouco intenso em 500 G também característico de complexos dinucleares⁵⁰. Os materiais com QT não apresentam os sinais característicos de complexos dinucleares, mas apenas o sinal intenso por volta de 3300 G típico de monucleares³⁹. Este resultado propõe que o complexo Cu-Napx não interagiu com toda a sua inteireza estrutural com a matriz polimérica tendo se quebrado para dar origem a várias novas espécies que interagiram com a QT. Dentre essas novas espécies, pode estar o Cu, o HNapx e talvez fragmentos do Cu-Napx.



Figura 50 - Espectros EPR obtidos a temperatura ambiente para Cu-Napx e para os materiais QTAPM/0,1%GA_21 e QTAPM/1,0%GA_21.

As imagens de MEV (Figuras 51 e 52) mostram que a forma das partículas do material obtido não é perfeitamente esférica, apresentando formatos ovais e/ou bastante irregulares.



Figura 51 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para o material QTAPM/0,1%GA_21.



Figura 52 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para o material QTAPM/1,0%GA_21.

Os gráficos de mol Cu / 100g QT em função da concentração de Cu- Napx, construídos com base na análise de cobre (resultados de ICP-AES – Tabela 15) e, mostrados na Figura 53, indicam que ambos os materiais apresentam capacidades similares para adsorção de cobre.



Figura 53 - Curvas de adsorção para as esferas de quitosana de alta massa molecular reticuladas com glutaraldeído em dois graus diferentes de reticulação: 0,1% GA e 1,0% GA.

Analisou-se por HPLC (detecção em $\lambda = 254$ nm) algumas das soluções sobrenadantes dos ensaios de adsorção com a finalidade de quantificar o naproxeno. Os resultados apresentados na Tabela 16 indicam a presença de naproxeno nestas soluções. Verifica-se que a porcentagem de fármaco detectada no sobrenadante diminui com o aumento da concentração inicial do complexo Cu-Napx usada nos experimentos. Os valores de % naproxeno são maiores para as amostras menos concentradas (1 e 4, no caso da reticulação 0,1% GA; e 1,4 e 7, no caso da reticulação 1,0% GA) e depois de certa concentração variam muito pouco, ficando abaixo de 10%. Este resultado indica que o naproxeno que ficou na solução sobrenadante e não interagiu com a quitosana pode ser proveniente de um equilíbrio de dissociação do complexo, uma vez que a dissociação do ligante seria favorecida em soluções mais diluídas.

Estes resultados dão evidências de que tanto o cobre quando o naproxeno foram incorporados à matriz. A perda da estrutura gaiola do Cu-Napx foi comprovada anteriormente pela análise dos espectros EPR das microesferas de QT_CuNapx secas. Então, existem as possibilidades de a incorporação ter ocorrido na forma de espécies monoméricas de Cu-Napx ou individualmente, ou seja, o cobre interagiu diretamente se ligando à quitosana e o naproxeno foi incorporado separadamente.

Tabela 16 - Concentrações do fármaco naproxeno (HNapx) detectadas por HPLC em algumas das soluções sobrenadantes do ensaio de curvas de adsorção e porcentagens calculadas em relação às soluções iniciais.

| | Reticulação / [HNapx] (mg mL ⁻¹) | % HNapx que não interagiu com QT | Reticulação / [HNapx] (mg mL ⁻¹) | % Hnapx que não interagiu com QT |
|---------|--|---|--|---|
| Amostra | 0,1% GA | | 1,0% GA | |
| 1 | 0,09958 | 27,0 | 0,07816 | 31,8 |
| 4 | 0,18769 | 19,0 | 0,23509 | 19,0 |
| 7 | 0,30536 | 10,6 | 0,33616 | 14,8 |
| 11 | 0,46177 | 9,9 | 0,41847 | 9,9 |
| 15 | 0,53116 | 8,0 | 0,50544 | 8,7 |
| 18 | 0,77325 | 8,8 | 0,72985 | 8,3 |

4.7. Ensaio de liberação a partir do material QTAPM/0,1%GA_Cu-Napx_27

Ensaios foram realizados para monitorar a liberação do fármaco HNapx a partir do material QTAPM/0,1%GA_Cu-Napx_27 e as curvas de concentração de naproxeno (determinada por HPLC) em função do tempo para três pHs diferentes (1,2; 6,8 e 9,8) são mostradas na Figura 54. Em pH 1,2, que simula o trânsito estomacal, ocorre importante liberação de HNapx nas primeiras 7h, com um máximo liberado de ~ 0,03 mg mL⁻¹ de Hnapx, durante o período investigado de 12h.

Em pH 6,8, que simula o trânsito intestinal, o estudo se estendeu também por 12 horas e nesse intervalo foi observado que se deu uma liberação máxima de aproximadamente de 0,025 mg mL⁻¹ de HNapx. Finalmente a pH 9,8 (simulando o trânsito cecal) e também num intervalo de 12 h, a liberação do fármaco HNapx alcançou uma liberação máxima de aproximadamente 0,075 mg mL⁻¹ de Hnapx⁴¹.

Os dados de liberação do HNapx impregnado nas microesferas durante as 12 h no pH 1,2, confirmam que apesar da pequena permeabilidade das microesferas de quitosana neste meio, é possível a liberação do fármaco nessas condições. O biopolímero é esperado intumescer em pH acima de 6,3, que é o pKa da quitosana. No pH 6,8 praticamente a metade dos grupos amino da quitosana estariam protonados, mas apesar disso a concentração de HNapx liberada não alcança níveis mais elevados que os alcançados em pH 1,2. No entanto, a pH 9,8 todos os grupos carboxílicos apresentam-se ionizados e os grupos amino completamente desprotonados. A grande liberação do HNapx neste meio, depende principalmente da sensibilidade da QT ao pH e também das características de intumescimento deste biopolímero reticulado pelo GA^{41,58}.



Figura 54 - Curvas de liberação do HNapx em função do tempo.

4.8. Estudo dos materiais QTBPM_Cu-Ibp_sd1, QTBPM/GA_Cu-Ibp_sd1, QTBPM/GA_Zn-Ibp_sd1 e QTBPM/GA_Zn-Ibp_sd1

Os resultados de ICP-AES indicaram a presença de 0,60% de metal nos materiais preparados com os complexos metálicos, QTBPM_Cu-Ibp_sd1, QTBPM/GA_Cu-Ibp_sd1, QTBPM/GA_Zn-Ibp_sd1 e QTBPM/GA_Zn-Ibp_sd1.

A Figura 55 mostra os difratogra-mas dos materiais QTBPM_vazia_sd1, QTBPM/GA_vazia_sd1, QTBPM_Cu-Ibp_sd1, QTBPM/GA_Cu-Ibp_sd1, QTBPM_Zn-Ibp_sd1 e QTBPM/GA_Zn-Ibp_sd1. Todos possuem perfis muito semelhantes ao da quitosana. Não aparecem picos novos que poderiam ser associados aos dos complexos cristalinos Cu-Ibp e Zn-Ibp.



Figura 55 - Difratogramas dos materiais QTBPM_Cu-Ibp_sd1 (A), QTBPM/GA_Cu-Ibp_sd1 (B), QTBPM_Zn-Ibp_sd1 (C) e QTBPM/GA_Zn-Ibp_sd1 (D), QTBPM_vazia_sd1 (E) e QTBPM/GA_vazia_sd1 (F).

O espectro eletrônico do sólido QTBPM_Cu-Ibp_sd1 (Figura 56), mostra uma banda larga com λ_{max} em torno de 700 nm, que pode ser atribuída a transição d-d do Cu(II), dando evidência da presença do Cu no material obtido. No caso do material QTBPM/GA_Cu-Ibp_sd1, as bandas do GA podem estar encobrindo a banda d-d do Cu(II). De fato, observa-se que a banda em ~ 658 nm referente ao GA está mais intensa do que no espectro do material QTBPM/GA_vazia_sd1, o que indica haver contribuição da transição d-d do metal.



Figura 56 - Espectros eletrônicos dos materiais QTBPM_vazia_sd1, QTBPM/GA_vazia_sd1, QTBPM_Cu-Ibp_sd1 e QTBPM/GA_Cu-Ibp_sd1.

Ao analisar o espectro FTIR do material QTBPM_vazia_sd1 (Figura 57), nota-se um perfil muito parecido aos da QT reportados na literatura^{59,59}. Este apresenta as bandas características da biopolímero QT: v(OH) sobreposto à banda v(N-H) em 3490 cm⁻¹; estiramento v(C=O) de amida em ~ 1651 cm⁻¹; deformação angular de N-H em ~ 1575 cm⁻¹; estiramento v(CN) de amida por volta de 1414 cm⁻¹; deformação angular simétrica de CH₃ em 1383 cm⁻¹ e bandas de estruturas polissacarídicas na região de 890 a 1156 cm⁻¹.

No espectro do material QTBPM/GA_vazia_sd1 observa-se deslocamento da banda do modo v(OH) sobreposto à banda v(N-H) para 3445 cm⁻¹; o estiramento v(C=O) de amida aparece por volta de 1653 cm⁻¹; a banda de deformação angular de N-H também se desloca para ~ 1564 cm⁻¹. As outras bandas não se deslocam (v(CN), ~ 1409 cm⁻¹; deformação angular simétrica de CH₃, 1383 cm⁻¹ e bandas de estruturas polissacarídicas na região de 920 a 1230 cm⁻¹). Os deslocamentos podem ser atribuídos ao processo de reticulação com GA que envolve os grupos –NH₂, -OH e –NHCOCH₃. Um forte indício da interação entre a QT e o GA é o fato da banda de deformação angular de N-H em aproximadamente 1564 cm⁻¹ ter se tornado mais intensa do que no espectro da QT não reticulada, o que indica a formação do grupo imina (C=O)⁶⁰. Ainda como indício de que a reticulação ocorreu tem-se o surgimento do ombro em torno de 1705 cm⁻¹ referente ao estiramento do grupo imina.

Os espectros dos materiais OTBPM Cu-Ibp sd1, OTBPM/GA Cu-Ibp sd1, QTBPM_Zn-Ibp_sd1 e QTBPM/GA_Zn-Ibp_sd1 (Figura 57) apresentam perfis semelhantes si também aos dos espectros dos materiais **QTBPM** vazia sd1 entre e e QTBPM/GA_vazia_sd1. As principais alterações são os deslocamentos das bandas v(C=O) e N-H em relação aos espectros das quitosanas, o que sugere possíveis interações desses complexos metálicos com a quitosana.





Figura 57 - Espectros vibracionais FTIR dos compostos QTBPM_vazia_sd1, QTBPM/GA_vazia_sd1, QTBPM_Cu-Ibp_sd1, QTBPM/GA_Cu-Ibp_sd1, QTBPM_Zn-Ibp_sd1 e QTBPM/GA_Zn-Ibp_sd1.

Para os materiais QTBPM_vazia_sd1, QTBPM/GA_vazia_sd1, QTBPM_Cu-Ibp_sd1, QTBPM/GA_Cu-Ibp_sd1, QTBPM/GA_Cu-Ibp_sd1 e QTBPM/GA_Zn-Ibp_sd1 também foram obtidas imagens (Figura 58) através de microscopia eletrônica de varredura com a finalidade de analisar as suas morfologias específicas.

Os materiais contendo quitosana não reticulada são constituídos por partículas esféricas, com superfícies rugosas e acentuadas depressões. Já para os materiais contendo QT reticulada as superfícies são menos rugosas e com menos depressões. A presença do agente reticulante favoreceu, neste caso, a formação de microesferas mais lisas e homogêneas o que nem sempre ocorre, uma vez que o excesso de agente reticulante pode propiciar a redução esfericidade das partículas de interesse⁶¹.

A Figura 59 traz algumas microcápsulas parcialmente rompidas (ropturas indicadas por setas amarelas) que permitem ver núcleos internos vazios. Tal propriedade morfológica revela que os materiais podem ser entendidos como sistemas de microencapsulamento do tipo reservatório⁶². Tais microcápsulas parcialmente rompidas comportam outras partículas dentro de si, como é mostrado de forma elucidativa na Figura 59 (F).


Figura 58 - Imagens obtidas por MEV para os materiais QTBPM_vazia_sd1 (A), QTBPM/GA_sd1 (B), QTBPM_Cu-Ibp_sd1 (C), QTBPM/GA_Cu-Ibp_sd1 (D), QTBPM_Zn-Ibp_sd1 (E) e QTBPM/GA_Zn-Ibp_sd1 (F).



Figura 59 - Imagens obtidas por MEV para os materiais QTBPM_vazia_sd1 (A), QTBPM/GA_sd1 (B), QTBPM_Cu-Ibp_sd1 (C), QTBPM/GA_Cu-Ibp_sd1 (D), QTBPM_Zn-Ibp_sd1 (E) e QTBPM/GA_Zn-Ibp_sd1 (F).

As imagens de MEV dos complexos Cu-Ibp e Zn-Ibp são mostradas respectivamente nas Figuras 60 e 61. O sólido do complexo Cu-Ibp é constituído por partículas em forma de bastonetes, o que pode estar associado à sua estrutura polimérica, em que as posições axiais de uma gaiola são ocupadas pelos átomos de oxigênio de uma gaiola vizinha, formando ponte do tipo Cu ---- O³⁹. Por outro lado, o sólido de Zn-Ibp é constituído por partículas em forma de placas. Estas morfologias são muito diferentes daquelas observadas para os correspondentes materiais, indicando que estes últimos não são misturas físicas dos complexos e o biopolímero quitosana.



Figura 60 - Imagens obtidas por MEV para o complexo Cu-Ibp.



Figura 61 - Imagens obtidas por MEV para o complexo Zn-Ibp.

Realizou-se também uma análise da distribuição de tamanho destes materiais com o auxílio do software Image J[®] e das imagens de MEV anteriormente mostradas (Figuras 58 e 59) e de outras imagens que não estão expostas no presente trabalho. Levou-se em consideração todas as partículas que compunham as imagens de MEV analisadas. Os histogramas das distribuições de tamanho são representados nas Figuras 62, 63 e 64.

Todos os materiais apresentaram uma distribuição de tamanho de partículas na faixa de 0,2 - 0,8 μ m, o que permite classifica-los como nanomateriais (tamanho de partícula < 1 μ m). Também é possível dizer que em todas as secagens ocorreu a geração de microesferas/micropartículas com semelhantes perfis de distribuição de tamanho. Essa semelhança pode estar associada ao fato de se ter utilizado os mesmos parâmetros durante os processos de secagens como, por exemplo, temperatura, diâmetro do bico de atomização, viscosidade da suspensão de QT, velocidade de aspersão da suspensão a ser seca, velocidade do fluxo de gás de arraste, dentre outros^{29,30}.



Figura 62 - Histogramas da distribuição de tamanho dos materiais QTBPM_vazia_sd1 e QTBPM/GA_vazia_sd1.



Figura 63 - Histogramas da distribuição de tamanho dos materiais QTBPM_Cu-Ibp_sd1 e QTBPM/GA_Cu-Ibp_sd1.



Figura 64 - Histogramas da distribuição de tamanho dos materiais QTBPM_Zn-Ibp_sd1 e QTBPM/GA_Zn-Ibp_sd1.

As Figuras de 65 a 76 mostram as curvas TG/DTG/DSC e os espectros de massa dos principais fragmentos formados nos processos de degradação térmica. O material QTBPM_vazia_sd1 (Figura 65) apresenta uma pequena perda de massa (~ 3,8%) abaixo de 100 °C, que corresponde à saída de parte das moléculas de água de hidratação. A partir desta temperatura e até 530 °C ocorre perda de massa em 3 etapas principais com picos DTG em 130 °C (18,6% perda de massa), 267 °C (51,0%) e 501 °C (58,0%). Acima desta temperatura, ocorre mais 27% de perda de massa totalizando uma perda de 99%. Os processos são exotérmicos. A primeira etapa envolve principalmente a saída de fragmentos contendo grupos -COOH; a segunda envolve liberação de H₂O e fragmentos OH⁻, e a terceira CO₂ (Figura 66).



Figura 65 - Curvas TG (linha preta), DTG (linha vermelha) e DSC (linha azul) para o material QTBPM_vazia_sd1.



Figura 66 - Espectros de massa obtidos dos principais produtos gasosos da decomposição térmica do material QTBPM_vazia_sd1.

As curvas TG/DTG/DSC do material QTBPM/GA_vazia_sd1 (Figura 67) apresentam diferenças em relação às do material não-reticulado. Ocorre uma perda de massa (~ 2,4%) um pouco menor abaixo de 100 °C, que corresponde à saída de parte das moléculas de água de hidratação. A partir desta temperatura e até 500 °C ocorre perda de massa em 3 etapas principais com picos DTG em 135 °C (3,4% perda de massa), 275 °C (14,6%) e 501 °C (33,2%). Acima desta temperatura, ocorre mais 34,7% de perda de massa totalizando uma perda de 99,3%. Os dois picos DTG mais intensos, que correspondem a processos exotérmicos, ocorrem em temperaturas diferentes em comparação com o material QTBPM_vazia_sd1. O pico DTG da segunda etapa, que envolve saída de H₂O e fragmentos OH, não é tão largo e tem máximo em temperatura um pouco maior (275 °C). A terceira etapa, em que predomina a liberação de CO₂, ocorre em temperatura um pouco menor. A presença do GA, portanto, afeta o processo de degradação do material principalmente no que diz respeito à saída de fragmentos H₂O, OH e CO₂.



Figura 67 - Curvas TG (linha preta), DTG (linha vermelha) e DSC (linha azul) para o material QTBPM/GA_vazia_sd1.



Figura 68 – Espectros de massa obtidos dos principais produtos gasosos da decomposição térmica do material QTBPM/GA_vazia_sd1.

As curvas TG/DTG/DSC e os espectros de massas dos principais produtos gasosos para QTBPM_Cu-Ibp_sd1 e QTBPM/GA_Cu-Ibp_sd1 estão nas Figuras de 69 a 72. Para o material QTBPM_Cu-Ibp_sd1, ocorre uma perda de massa (~ 3,6%) abaixo de 100 °C (saída de parte das moléculas de água de hidratação). Entre 100 °C e 500 °C ocorre perda de massa em 3 etapas principais com picos DTG em 135 °C (18,0%), 275 °C (51,6%) e 450 °C (26,9%). Acima desta temperatura, ocorre mais ~ 3,0% de perda de massa totalizando uma perda de ~ 99%. Vê-se uma alteração importante na terceira etapa (saída principal de CO₂) que é o pico DTG em temperatura ~ 50 °C mais baixa do que a observada para o QTBPM_vazia_sd1. Já para o QTBPM/GA_Cu-Ibp_sd1, ocorre perda de parte das moléculas de água de hidratação (~ 2,5%) abaixo de 100 °C, seguida de 3 etapas principais com picos DTG em 135 °C (12,5%), 235 °C (49,0%) e 485 °C (31,9%), totalizando ~ 96% de perda de massa.



Figura 69 - Curvas TG (linha preta), DTG (linha vermelha) e DSC (linha azul) para o material QTBPM_Cu-Ibp_sd1.



Figura 70 - Espectros de massa obtidos dos principais produtos gasosos da decomposição térmica do material QTBPM_Cu-Ibp_sd1.



Figura 71 - Curvas TG (linha preta), DTG (linha vermelha) e DSC (linha azul) para o material QTBPM/GA_Cu-Ibp_sd1.



Figura 72 - Espectros de massa obtidos dos principais produtos gasosos da decomposição térmica do material QTBPM/GA_Cu-Ibp_sd1.

As curvas TG/ DTG/DSC e os espectros de massas dos principais produtos gasosos para os materiais QTBPM_Zn-Ibp_sd1 e QTBPM/GA_Zn-Ibp_sd1 são mostrados nas Figuras de 73 a 76. Para o material QTBPM_Zn-Ibp_sd1, ocorre uma perda de massa (~ 3,0%) abaixo de 100 °C, que corresponde à saída de parte das moléculas de água de hidratação. A partir desta temperatura e até 500 °C ocorre perda de massa em 3 etapas principais com picos DTG em 135 °C (17,0%), 245 °C (49,0%) e 485 °C (22,8%). Acima desta temperatura, ocorre mais ~ 2,2% de perda de massa totalizando uma perda de ~ 95%. Já para QTBPM/GA_Zn-Ibp_sd1, ocorre perda de parte das moléculas de água de hidratação (~ 4,3%) abaixo de 100 °C, seguida de 3 etapas principais com picos DTG em 137 °C (12,9%), ~ 267 °C (49,0%) e 507 °C (30,2%), totalizando uma perda de ~ 98%.



Figura 73 - Curvas TG (linha preta), DTG (linha vermelha) e DSC (linha azul) para o material QTBPM_Zn-Ibp_sd1.



Figura 74 - Espectros de massa obtidos dos principais produtos gasosos da decomposição térmica do material QTBPM_Zn-Ibp_sd1.



Figura 75 - Curvas TG (linha preta), DTG (linha vermelha) e DSC (linha azul) para o material QTBPM/GA_Zn-Ibp_sd1.



Figura 76 - Espectros de massa obtidos dos principais produtos gasosos da decomposição térmica do material QTBPM/GA_Zn-Ibp_sd1.

4.9. Estudo dos materiais QT/BPM_Cu-Ibp_sd2, QTBPM/GA_Cu-Ibp_sd2, QTBPM_Cu-Indo_sd2 e QTBPM/GA_Cu-Indo_sd2

Nesses experimentos, buscou-se reduzir tanto a quantidade de ácido como o tempo reacional, em comparação aos experimentos anteriores, na tentativa de promover de tentar encapsular partículas dos metalofármacos na QT. Os complexos escolhidos foram aqueles para os quais já existem resultados de atividade biológica (Cu-Ibp e Cu-Indo) e também se utilizou o fármaco HIndo, o qual foi requerido para testes biológicos efetuados no presente trabalho.

A análise de ICP-AES indicou cerca de 0,5% de metal para todos os materiais. Tais resultados estão de acordo com os apresentados no ensaio anterior e também com o esperado, visto que as proporções entre quitosana e metalofármacos foram mantidas praticamente as mesmas.

difratogramas materiais QTBPM_vazia_sd2, Figura 77, traz os dos А QTBPM/GA_vazia_sd2, QTBPM_Cu-Ibp_sd2, QTBPM/GA_Cu-Ibp_sd2 e do metalofármaco Cu-Ibp. Os difratogramas dos materiais QTBPM_vazia_sd2 (B) e QTBPM/GA_vazia_sd2 (C) apresentam um único pico intenso ao redor de $2\Theta = 20^{\circ}$, conforme os já apresentados anteriormente. Comparando-se os difratogramas dos materiais QTBPM_Cu-Ibp_sd2 (D) e QTBPM/GA_Cu-Ibp_sd2 (E) com o do Cu-Ibp, verifica-se picos característicos do Cu-Ibp em $2\Theta = 6,5^{\circ}$ e $2\Theta = 5,7^{\circ}$, o que evidencia o encapsulamento de partículas do Cu-Ibp na QT.



Figura 77 - Difratogramas do Cu-Ibp (A), QTBPM_vazia_sd2 (B), QTBPM/GA_vazia_sd2 (C), QTBPM_Cu-Ibp_sd2 (D) e QTBPM/GA_Cu-Ibp_sd2 (E).

A Figura 78 apresenta os difratogramas dos novos materiais QTBPM_vazia_sd2 (B), QTBPM/GA_vazia_sd2 (C), QTBPM_Cu-Indo_sd2 (D), QTBPM/GA_Cu-Indo_sd2 (E) e do complexo Cu-Indo. Comparando-se os difratogramas dos materiais QTBPM_Cu-Indo_sd2 (D) e QTBPM/GA_Cu-Indo_sd2 (E) com o do complexo Cu-Indo, verifica-se para o primeiro a presença de um pico em $2\Theta = 5,9^{\circ}$ que é característicos do Cu-Indo, o que dá evidências de encapsulamento de partículas do complexo na QT neste material. No caso do material reticulado não se obeservou este pico.



Figura 78 - Difratogramas de Cu-Indo (A), QTBPM_vazia_sd2 (B), QTBPM/GA_vazia_sd2 (C), QTBPM_Cu-Indo_sd2 (D) e QTBPM/GA_Cu-Indo_sd2 (E).

O difratograma do material QTBPM_HIndo_sd2 não apresenta picos do fármaco HIndo (Figura 79).



Figura 79 - Difratograma do material QTBPM_HIndo_sd2.

Os espectros eletrônicos dos sólidos Cu-Ibp (A), QTBPM_Cu-Ibp_sd2 (B), QTBPM/GA_Cu-Ibp_sd2 (C), Cu-Indo (D), QTBPM_Cu-Indo_sd2 (E) e QTBPM/GA_Cu-Indo_sd2 (F) (Figura 80), mostram a presença de uma banda com máximo em torno de 660 - 700 nm que pode ser atribuída a transição d-d do Cu(II), evidenciando a presença do metal Cu nos materiais.



Figura 80 - Espectros eletrônicos dos sólidos Cu-Ibp (A), QTBPM_Cu-Ibp_2_sd (B), QTBPM/GA_Cu-Ibp_sd2 (C), Cu-Indo (D), QTBPM_Cu-Indo_sd (E) e QTBPM/GA_Cu-Indo_sd2 (F).

As Figuras 81 e 82 trazem as imagens obtidas por MEV para os materiais em questão. Esses são constituídos por partículas esféricas, com paredes rugosas e com acentuadas depressões. No presente ensaio, a presença do GA não atuou de forma tão influenciável na morfologia dos materiais como nos ensaios anteriores. Isto pode ser devido à menor proporção de GA em relação à matriz polimérica à qual ele foi adicionado. Observa-se, no entanto que os materiais que apresentam em sua constituição o Cu-Ibp apresentam esferas menos rugosas do que os materiais sem o complexo. Já no caso do Cu-Indo e do material contendo o HIndo, se dá uma perda de esfericidade, em que as esferas parecem ter colapsado, consequentemente ficando com superfícies altamente rugosas.



Figura 81 - Imagens MEV dos materiais QTBPM_vazia_2_sd (A), QTBPM_GA_2_sd (B), QTBPM_Cu-Ibp_2_sd (C), QTBPM_Cu-Ibp_GA_2_sd (D), QTBPM_Cu-Indo_sd (E) e QTBPM_Cu-Indo_GA_sd (F).



Figura 82 - Imagens MEV do material QTBPM_HIndo_sd2.

A análise das Figuras 83 e 84 permite verificar perfis de curvas TG, DTG e DSC muito semelhantes para todos os materiais em questão e ao mesmo tempo é possível notar detalhes ímpares em cada uma das análises. As curvas TG e DTG demonstram que os materiais perdem aproximadamente 80% de massa em quatro principais etapas. A primeira etapa de perda de massa refere-se à perda de moléculas de solvente adsorvidas nas microesferas de QT. A principal etapa de perda de massa ocorre no intervalo de temperatura entre 160 e 550 °C e refere-se à decomposição das ligações cruzadas do polímero e das unidades de glucosamina^{52,53}.



Figura 83 - Curvas TG (linha verde), DTG (linha vermelha) e DSC (linha azul) para os materiais QTBPM_vazia_sd2 (A), QTBPM/GA_sd2 (B), QTBPM_Cu-Ibp_sd2 (C) e QTBPM/GA_Cu-Ibp_sd2 (D).



Figura 84 - Curvas TG (linha verde), DTG (linha vermelha) e DSC (linha azul) para os materiais QTBPM_vazia_sd2 (A), QTBPM/GA_sd2 (B), QTBPM_Cu-Indo_sd2 (C) e QTBPM/GA_Cu-Indo_sd2 (D).



Figura 85 - Curvas TG (linha verde), DTG (linha vermelha) e DSC (linha azul) para o materia QTBPM_HIndo_sd2.

4.10. Ensaios biológicos preliminares de avaliação macroscópica da lesão intestinal

Sabe-se que o fármaco HIndo pode gerar sérios problemas de efeitos colaterais, particularmente lesões ulcerativas sobre o trato gastrointestinal. Estas lesões geradas durante um tratamento específico pode levar em alguns casos a sérios problemas de saúde e até mesmo à morte³⁹. Imagens do intestino dos animais obtidas neste trabalho (Figura 86) mostram exemplos destas lesões.



Figura 86 - Lesões intestinais causadas pelo fármaco HIndo.

O principal objetivo desse ensaio foi fazer um estudo preliminar comparativo da avaliação macroscópica da lesão intestinal que poderia ser causada pela administração oral dos compostos HIndo, Cu-Indo, e dos materiais QTBPM_vazia_sd2, QTBPM_HIndo_sd2,

QTBPM_Cu-Indo_sd2 e também das suas respectivas misturas físicas MF1 (QTBPM_vazia_sd2 + HIndo) e MF2 (QTBPM_vazia_sd2 + Cu-Indo), estas últimas simulando as suas respectivas composições.

Para tanto, o ensaio foi realizado com animais sujeitos a três situações específicas, em que grupos diferentes receberam uma única dose num período de 24 h, uma única dose num período de 48 h e por fim duas doses dos compostos em análise num período de 72 h. As doses administradas dos compostos foram calculadas com base na dose terapêutica estabelecida para a indometacina livre, ou seja, 7,5 mg HIndo/kg animal⁴⁵. Sendo a média do peso dos animais utilizados igual a 250 g, cada animal recebeu aproximadamente 3,4 mg de indometacina suspensos em solução aquosa de carboximetilcelulose 1% (w/w). Os valores são apresentados na Tabela 17.

 Tabela 17 - Doses dos compostos administradas nos testes *in vivo* de avaliação

 macroscópica da lesão intestinal.

| Composto | Dose terapêutica | Dose administrada |
|-------------------|-------------------------------|-------------------------|
| | (mg de composto/kg de animal) | (mg de composto/animal) |
| HIndo | 7,50 | 1,90 |
| Cu-Indo | 8,90 | 2,25 |
| QTBPM_vazia_sd2 | 59,2 | 14,8 |
| QTBPM_HIndo_sd2 | 66,1 | 16,5 |
| QTBPM_Cu-Indo_sd2 | 82,0 | 20,5 |
| MF1 | 66,1 | 16,5 |
| MF2 | 82,0 | 20,5 |

Os resultados apresentados na Figura 87 para os ensaios de 24 h mostram que o número de lesões causadas pelo complexo Cu-Indo é menor do que o número de lesões geradas pelo fármaco HIndo, o que está de acordo com dados da literatura¹³. Os resultados inéditos obtidos para os materiais QT_HIndo_sd2 e QT_Cu-Indo_sd2, mostram que a administração oral destes praticamente não provocou o aparecimento de lesões intestinais nas condições experimentais do atual ensaio.



Grupos

Figura 87 - Valores individuais do escore macroscópico dos testes *in vivo* de avaliação macroscópica da lesão intestinal. Dados obtidos após 24 h seguidas da administração dos compostos.

Foram também realizados ensaios em que os animais foram expostos a um tempo maior de contato, ou seja, 48 h, com os compostos e materiais (Figura 88). Os resultados mostraram que o número de lesões aumentou para todos os compostos estudados exceto para o fármaco indometacina (HIndo), para o qual o número de lesões se manteve praticamente igual ao número apresentado pelos os animais expostos ao tempo de 24 h. Dados de 48 h ainda não haviam sido reportados na literatura para o complexo Cu-Indo e e os resultados se mostraram surpreendentes uma vez que depois de 48 h o complexo Cu-Indo causa maior número de lesões do que o fármaco HIndo.

Uma possível explicação é que no caso do Cu-Indo e dos materiais QTBPM_HIndo_sd2 e QTBPM_Cu-Indo_sd2, o fármaco possa estar sendo liberados da matriz polimérica ficando disponível no meio fisiológico a ponto de gerar as lesões estudadas. Mas, mesmo assim, é interessante observar que nessas condições (48 h) os materiais contendo HIndo e Cu-Indo na matriz de quitosana apresentaram uma menor capacidade de gerar lesões intestinais.

Ensaios também foram realizados para o material QTBPM_sd2 e constatou-se que o mesmo não gerou lesões em animais expostos a este material num período de 24 e 48 h.

Os ensaios realizados em 72 h (duas doses dos compostos nesse período) apresentaram resultados muito parecidos com os que foram obtidos para o período de 48 h.

As misturas físicas de QT + HIndo e QT + Cu-Indo geraram números de lesões intestinais iguais aquelas observadas para os animais submetidos a quantidades iguais de HIndo e Cu-Indo respectivamente. Tal resultado é muito interessante e dá mais um indício de que os materiais QTBPM_HIndo_sd2 e QTBPM_Cu-Indo_sd2 são ímpares, dotados de características próprias e capazes de minimizar os efeitos colaterais do FAINE HIndo.

Estudos posteriores serão requeridos para sondar se esses novos materiais QTBPM_HIndo_sd2 e QTBPM_Cu-Indo_sd2 além de apresentarem redução nos efeitos colaterais também são capazes de manter o potencial farmacológico, ou seja, a atividade anti-inflamatória.



Figura 88 - Valores individuais do escore macroscópico dos testes *in vivo* de avaliação macroscópica da lesão intestinal. Dados obtidos após 48 h seguidas da administração dos compostos.

5. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com o que foi apresentado, o presente trabalho teve como principal objetivo o estudo da interação de complexos de cobre e de zinco contendo fármacos antiinflamatórios não-esteróides (FAINEs) (metalofármacos) com o biopolímero quitosana. Os estudos foram realizados empregando-se as técnicas de coacervação e de secagem via spraydryer.

Foram sintetizados cinco complexos metálicos com FAINEs já existentes na literatura (Zn-Indo_1, Zn-Indo_2, Cu-Indo, Cu-Napx e Cu-Ibp) e também desenvolveu-se metodologias sintéticas para a obtenção complexos metálicos inéditos: Zn-Ibp, Zn-Hmelox e Cu-Ceto. Os métodos de síntese utilizados levaram à obtenção de complexos metálicos dinuclares do tipo gaiola para os seguintes complexos: Cu-Ceto, Cu-Napx, Zn-Indo_2, Cu-Indo, Zn-Ibp e Cu-Ibp. Estes complexos metálicos apresentaram estruturas em que quatro íons carboxilatos derivados dos fármacos atuam como ligantes de ponte unindo dois íons Zn(II) ou dois íons Cu(II). Os complexos Zn-Indo_1 e Zn-Hmelox formaram estruturas mononucleares, com os carboxilatos coordenados em modo quelato.

Estudou-se a interação dos compostos HIbp, HCeto, Zn-Ibp, Cu-Ibp, Cu-Ceto e Cu-Napx com microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído, elaboradas pela técnica de coacervação. De acordo com o que era esperado, a coacervação mostrou-se simples, rápida, eficiente e também com baixo custo. Os materiais inéditos obtidos por tal técnica foram parcialmente caracterizados, sendo que os resultados provenientes destas caracterizações já foram suficientes para evidenciarem o existência de interações com a quitosana sob as condições experimentais utilizadas. Para o complexo metálico Cu-Napx foram realizados estudos mais detalhados, com o intuito de averiguar possíveis interações estabelecidas entre o metalofármaco em questão e a quitosana reticulada com glutaraldeído. Com base nas curvas de adsorção, um dos materiais foi selecionado para realizar estudos de liberação. Nestes estudos verificou-se que a interação com o biopolímero não se dá com o complexo em sua forma dinuclear. Mas é importante ressaltar que tanto o cobre quanto o fármaco naproxeno são incorporados à matriz polimérica e o material resultante é capaz de liberar o naproxeno de forma gradual em diferentes pHs.

Também foi possível o desenvolvimento de uma metodologia para o encapsulamento via spray-drying dos metalofármacos Cu-Ibp e Cu-Indo e também do fármaco HIndo utilizando como matriz polimérica a quitosana. Os materiais gerados a partir dessa nova metodologia foram devidamente caracterizados e também testados em ensaios de avaliação macroscópica da lesão intestinal. Os materiais obtidos pela técnica de spray-drying apresentaram melhoras no âmbito da redução das lesões intestinais. Estudos futuros serão necessários para a averiguação da manutenção da atividade farmacológica dos compostos encapsulados (HIndo, Cu-Indo e Cu-Ibp) na matriz polimérixa (QT).

5. **BIBLIOGRAFIA**

¹ J. E. Weder, C. T. Dillon, T. W. Hambley, B. J. Kennedy, P. A. Lay, J. R. Biffin, H. L. Regtop, N. M. Davies, *Copper Complexes of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs: an Opportunity yet to be Realized*, Coord. Chem. Rev., **2002**, 232, 95-126.

² M. Lazzaroni, G. B. Porro, *Gastrointestinal Side-effects of Traditional Non-steroidal Antiinflammatory Drugs and New Formulations, Aliment. Pharmacol. Ther.*, **2004**, 20 (Suppl. 2) 48-58.

³ M. R. Griffin, J. M. Sheiman, Am. J. Med., 2001, 110(1A), 33S.

⁴ G. Tamasi, F. Serinelli, M. Consumi, A. Magnani, M. Casolaro, R. Cini, *Release Studies from Smart Hydrogels as Carriers for Piroxicam and Copper(II)-Oxicam Complexes as Anti-Inflammatory and Anti-Cancer Drugs. X-Ray Structures of New Copper(II)-Piroxicam and – Isoxicam Complex Molecules*, J. Inorg. Biochem., **2008**, 102, 1862-1873.

⁵ G. Ribeiro, *Síntese e Caracterização de Complexos Contendo Núcleos Dimetálicos de Rutênio e Ligantes Dicarboxilatos*, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química da Universidade de São Paulo, **2001**.

⁶ Z. Guo and P. J. Sadler, *Metals in Medicine*, Angew. Chem. Int. Ed., **1999**, 38, 1512 – 1531.

⁶ A. Fini, G. Feroci, G. Fazio, *Interaction Between Indomethacin and Heavy Metal Ions in Aqueous Solution*, European Journal of Pharmaceutical Sciences, **2001**, 13, 213-217.

⁷ C. T. Dillon, T. W. Hambley, B. J. Kennedy, P. A. Lay, J. E. Weder, Q. D. Zhou, *Copper and Zinc Complexes as Antiinflammatory Drugs*, Metal Ions in Biological Systems, **2004**, 41, 253-277.

⁸ N. E. A. El-Gamel, Uranyl Binary and Ternary Chelates of Tenoxicam Synthesis, Spectroscopic and Thermal Characterization of Ternary Chelates of Tenoxicam and Alanine with Transition Metals, Spectrochimica Acta Part A, **2007**, 68, 860–866.

⁹ S. Defazio, R. Cini, Synthesis, X-ray and Molecular Modeling Analysis of Cobalt(II), Nickel(II), Zinc(II) and Cadmium(II) Complexes of the Widely Used Anti-inflammatory Drug Meloxicam, J. Chem. Soc., Dalton Trans., **2002**, 1888–1897.

¹⁰ A. Andrade, S.F. Namora, R.G. Woisky, G. Wiezel, R. Najjar, J.A.A. Sertié, D. de Oliveira Silva. *J. Inorg. Biochem.*, **2000**, 81, 23.

¹² D. Kovala-Demertzi, *Transition metal complexes of diclofenac with potentially interesting anti-inflammatory activity*, J. Inorg. Biochem., **2000**, 79, 153 -157.

¹¹ R. J. Christie, D. W. Grainger, Adv. Drug Delivery Rev., 2003, 55, 421.

¹² R. G. Strickley, *Pharm. Res.*, **2004**, 21, 201.

¹³ V. V. Ranade, M. A. Hollinger, *Drug Delivery Systems*. 2004. CRC Press, 2nd. Ed., New York; A. M. Hillery; A. W. Lloyd; J. Swarbrick *Drug Delivery and Targeting*, **2001**, Taylor & Francis, New York.

¹⁴ T. Loftsson, M. E. Brewster, M. Másson, Am. J. Drug Deliv., 2004, 2, 1.

¹⁵ E. O. Çetin, N. Buduneli, E. Athhan, L. Kirilmaz, J. Clinical Periodontology, 2004, 31, 1117.

¹⁶ R. Hejazi, M. Amiji, J. Control. Rel., 2003, 89, 151.

¹⁷ A. C. Pio Santos, *Preparação e caracterização de materiais híbridos bioinorgânicoorgânicos contendo metalofármacos de cobre-naproxeno e de cobre-sulindaco em acetato de celulose*, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química da Universidade de São Paulo, **2011**.

¹⁸ S. Senel, S. J. McClure, Adv. Drug Del. Rev., **2004**, 56, 1467.

¹⁹ V. R. Sinha, A. K. Singla, S. Wadhawan, R. Kaushik, R. Kumria, K. Bansal, S. Dhawan, *Chitosan Microspheres as a Potencial Carrier for Drugs*, Int. J. Pharmaceutics, **2004**, 274, 1-33.

²⁰ K. S. V. K. Rao, B. V. K. Naidu, M. C. S. Subha, M. Sairam, T. M. Aminabhavi, *Novel Chitosan-based pH-Sensitive Interpenetrating Network Microgels for the Controlled Release of Cefadroxil*, Carbohydr. Polym., **2006**, 66, 333-344.

²¹ C. L. Ronqui, M. C. Pinto Cruz, L. H. Innocentini-Mei, *Liberação Controlada da Oxitetraciclina no Sistema Quitosana/Alginato/PEG*, VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, **2005**, 1-6.

²² A. Josué, M. C. M. Laranjeira, V. T. Fávere, I. Y. Kimura, R. C. Pedrosa, *Liberação Controlada da Eosina Impregnada em Microesferas de Copolímero de Quitosana e Poli(Ácido Acrílico)*, Polímeros: Ciênc. Tecnol., **2000**, 10(3), 116-121.

²³ M. N. V. Ravi Kumar, R. A. A. Muzzarelli, C. Muzzarelli, H. Sashiwa, A. J. Domb, *Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives*, Chem. Rev., **2004**, 104, 6017-6084.

²⁴ M. I. Ré, *Formulating Drug Delivery Systems by Spray Drying*, Dry. Technol., 2006, 24, 433-446.

²⁵ M. I. Ré, *Microencapsulation by Spray Drying*, Dry. Technol., **1998**, 16, 1195-1236.

²⁶ G. K. Braga, W. P. Oliveira, *Manufacturing Drug Loaded Chitosan Microspheres by Spray Drying: Development, Characterization, and Potential Use in Dentistry, Dry. Technol.*, 2007,
25, 303-310.

²⁷ I. R. W. Z. de Oliveira, O. Fatibello-Filho, S. C. Fernandes, I. C. Vieira, *Imobilização da Lacase em Micropartículas de Quitosana Obtidas por Spray Drying e Usadas na Construção de Biossensores*, Quím. Nova, **2009**, 32(5), 1195-1201.

²⁸ L. Wang, Y. Gu, Q. Zhu, G. Ma, Y. Wan, Z. Su, *Preparation and Characterization of Uniform-Sized Chitosan Microspheres Containing Insulin by Membrane Emulsification and a Two-Step Solidification Process*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, **2006**, 50, 126-135.

²⁹ J. E. Santos, J. P. Soares, E R. Dockal, S. P. Campana Filho, E. T. G. Cavalheiro, *Caracterização de Quitosanas Comerciais de Diferentes Origens*, Polímeros: Ciênc. Tecnol., **2003**, 13(4), 242-249.

³⁰ J. Z. Knaul, M. R. Kasaai, V. T. Bui, K. A. M. Creber, *Characterization of Deacetylated Chitosan and Chitosan Molecular Weight Review*, Can. J. Chem., **1998**, 76, 1699-1706.

³¹ K. G. Desai, H. J. Park, *Effect of Manufacturing Parameters on the Characteristics of Vitamin C Encapsulated Tripolyphosphate-Chitosan Microespheres Prepared by Spray-Drying*, J. Microencapsul., **2006**, 23(1), 91-103. ³² M. C. M. Laranjeira, V. T. Fávere, *Quitosana: Biopolímero Funcional com Potencial Industrial Biomédico*, Quím. Nova, **2009**, 32(3), 672-678.

³³ B. C. Janegitz, B. C. Lourenção, K. O. Lupetti, O. Fatibello-Filho, *Desenvolvimento de um Método Empregando Quitosana para a Remoção de Íons Metálicos de Águas Residuárias*, Quím. Nova, **2007**, 30(4), 879-884.

³⁴ S. Verbych, M. Bryk, G. Chornokur, B. Fuhr, *Removal of Copper (II) from Aqueous Solutions by Chitosan Adsorption*, Separation Science and Technology, **2005**, 40, 1749-1759.

³⁵ J. E. weder, T. W. Hambley, B. J. Kennedy, P. A. Lay, D. MacLachlan, R. Bramley, C. D. Delfs, K. S. Murray, B. Moubaraki, B. Warwick, J. R. Biffin, H. L. Regtop, *Anti-inflammatory Dinuclear Copper(II) Complexes with Indomethacin. Synthesis, Magnetism and EPR Spectroscopy. Crystal Structure of the N,N-Dimethylformamide Adduct,* Inorg. Chem., **1999**, 38, 1736-1744.

³⁶ C. R. Gordijo, Estudo de metalofármacos Antiinflamatórios de Cobre e dos Materiais Híbridos Resultantes de suas Imobilizações no Hidróxido Duplo Lamelar Hidrotalcita: Síntese, Caracterização e Avaliação da Atividade Farmacológica, Tese de Doutorado, Instituto de Química da Universidade de São Paulo, **2007**.

³⁷ Q. Zhou, T. W. Hambley, B. J. Kennedy, P. A. Lay, P. Turner, B. Warwick, J. R. Biffin, H. L. Regtop, *Syntheses and Characterization of Anti-inflammatory Dinuclear and Mononuclear Zinc Indomethacin Complexes, Crystal Structures of* $[Zn_2(Indomethacin)_4(L)_2]$ (L=N,N-Dimethylacetamida, Pyridine, 1-Methyl-2-Pyrrolidinone) and $[Zn(Indomethacin)_2(L_1)_2]$ ($L_1 = Ethanol, Methanol$), Inorg. Chem., **2000**, 39, 3742-3748.
³⁸ R. S. Vieira, Adsorção Competitiva dos Íons Cobre e Mercúrio em Membranas de Quitosana Natural e Reticulada, Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, **2008**.

³⁹ USP, United States Pharmacopeial Conv., *Buffers Solutions/Solutions*, 2011, 34, 964-965.

⁴⁰ <http://www.liv.ac.uk/buffers/buffercalc.html>. Acesso em: 11 de abril de **2012**.

⁴¹ A. Josué, M. C. M. Laranjeira, V. T. Fávere, I. Y. Kimura, R. C. Pedrosa, *Liberação Controlada da Eosina Impregnada em Microesferas de Copolímero de Quitosana e Poli(ácido acrílico)*, Polímeros: Ciência e Tecnologia, **2000**, vol. 10, nº 03, 116-121.

⁴² Institute of Laboratory Animal Resources. Commission on Life Sciences. National Research Council. National Academy Press. Washington, D.C. Copyright © by the National Academy of Sciences, 1996.

⁴³ A. Z. A. Leite, Ação do Metronidazol Sobre a Fisioterapia da Lesão Intestinal Induzida por Antiinflamatório Não Esteróide, Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **1999**.

⁴⁴ G. Ribeiro, *Síntese e Caracterização de Complexos Contendo Núcleos Dimetálicos de Rutênio e Ligantes Dicarboxilatos*, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química da Universidade de São Paulo, **2001**.

⁴⁵ A. Trinchero, S. Barbosa, A. Tinti, G. Fini, *Spectroscopic Behavior of Copper Complexes* of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs, Biopolymers, **2004**, 74, 120-124.

⁴⁶ S. Storpirtis, J. E. Gonçalves, C. Chian, M. N. Gai, *Ciências Farmacêuticas – Biofarmacotécnica*, Guanabara Koogan, **2009**, 1^a ed., cap. 4.

⁴⁷ A. C. V. Negrón, *Síntese, Caracterização e Investigação da Potencialidade Biológica de Carboxilatos Dinucleares de Ru, Rh e Cu com Nitroimidazóis*, Tese de Doutorado, Instituto de Química da Universidade de São Paulo, **2005.**

⁴⁸ A. J. C. Brant, Preparação e Caracterização de Hidrogéis a partir de Misturas de Soluções de Quitosana e Poli(N-Vinil-2-Pirrolidona), Tese de Doutorado, Instituto de Química da Universidade de São Paulo, **2008**.

⁴⁹ M. L. Tsaih, R. H. Chen, *Molecular Weight Determination of 83% Degree of Decetylation Chitosan with Non-Gaussian and Wide Range Distribution by High Performace Size Exclusion Chromatography and Capillary Viscometry*, J. Appl. Polym. Sci., **1999**, 71, 1905-1913.

⁵⁰ M. L. Tsaih, R. H. Chen, *Molecular Weight Determination of* 8⁵⁰ R. S. Vieira, *Adsorção Competitiva dos Íons Cobre e Mercúrio em Membranas de Quitosana Natural e Reticulada, Tese de Doutorado*, Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, **2008**.

⁵¹ V. L. Gonçalves, M. C. M. Laranjeira, V. Fávere, V. Drago, *Liberação de Ferro (III) de Microesferas Reticuladas de Quitosana*, Visão Acadêmica, Curitiba, **2005**, 6(1), 15-24.

⁵² K. G. Desai, H. J. Park, *Effect of Manufacturing Parameters on the Characteristics of Vitamin C Encapsulated Tripolyphosphate-Chitosan Microespheres Prepared by Spray-Drying*, J. Microencapsul., **2006**, 23(1), 91-103.

⁵³ F. C. F. Barros, R. M. Cavalcante, T. V. Carvalho, F. S. Dias, D. C. Queiroz, L. C. G. Vasconcellos, R. F. Nascimento, *Produção e Caracterização de Esfera de Quitosana Modificada Quimicamente*, Rev. Iberoamer. Polím., **2006**, 7(4), 232-246.

⁵⁴ R. M. Silverstein, *Identificação Espectroscópica de Compostos Orgânicos*, Guanabara Koogan, **1994**, 5^a ed., cap. 3.

⁵⁵ L. Qi, Z. Xu, X. Jiang, C. Hu, X. Zou, *Preparation and Antibacterial Activity of Chitosan Nanoparticles*, Carbohydr. Res., **2004**, 339, 2693-2700.

⁵⁶ G. A. F. Roberts, *Chitin Chemistry*, The Macmillan Press Ltda, **1992**, 1^a ed., cap. 3 e 5.

⁵⁷ G. A. F. Roberts, *Chitin Chemistry*, The Macmillan Press Ltda, **1992**, 1^a ed., cap. 3 e 5.

⁵⁸ G. A. F. Roberts, *Chitin Chemistry*, The Macmillan Press Ltda, **1992**, 1^a ed., cap. 3 e 5.

⁵⁹ K. M. N. C. Canella, R, B, Garcia, *Caracterização de Quitosanas por Cromatografia de Permeação em Gel - Influência do Método de Permeação e do Solvente*, Quím. Nova, 2001, 1, 13-17.

⁶⁰ P. V. Kulkarni, J. Keshavayya, V. H. Kulkarni, *Effect of Method of Preparation and Process Variables on Controlled Release of Insoluble Drug from Chitosan Microspheres*, Polym. Adv. Technol., **2007**, 18, 814-821.

⁶¹ K. G. H. Desai, H. J. Park, *Encapsulation of Vitamin C in Tripoliphosphate Cross-Linked Chitosan Microspheres by Spray Drying*, J. Microencapsul., **2005**, 22 (2), 179-192.

⁶² M. F. S. Ramos, *Desenvolvimento de Micropartículas Contendo a Fração Volátil de Copaíba por Spray-Drying: Estudo de Estabilidade e Avaliação Farmacológica*, Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo - USP, **2006**.