

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PÓS – GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Desenvolvimento de Sistemas de Liberação de Ferro a partir
de Complexos Orgânicos – Minerais a base de Quitosanas a
serem aplicados no tratamento de Anemia Ferropriva**

Vanessa Lima Gonçalves

Florianópolis – SC

2005

VANESSA LIMA GONÇALVES

**Desenvolvimento de Sistemas de Liberação de Ferro a partir
de Complexos Orgânicos – Minerais a base de Quitosanas a
serem aplicados no tratamento de Anemia Ferropriva**

Tese submetida à Universidade Federal
de Santa Catarina para obtenção do grau
de Doutor em Química

Orientador: Prof. Dr. Mauro César
Marghetti Laranjeira

Florianópolis – SC

2005

1. Introdução

Cada vez mais se tem encontrado metais desenvolvendo papéis vitais na manutenção e regulação de muitos processos biológicos. Alguns destes processos são específicos de acordo com as propriedades dos íons metálicos, ou seja, dependendo do estado de oxidação podem atuar na condição catalítica, estrutural ou transportadora de elétrons; enquanto outros processos são menos específicos, sendo possível a troca de um íon metálico por outro, embora a atividade possa ser reduzida (KAIM & SCHWEDERSKI, 1991).

O papel dos íons metálicos, assim como os mecanismos de extração, transporte e incorporação biológica estão diretamente relacionados com sua natureza química. Eles refletem, em primeiro plano, propriedades que tem origem na configuração eletrônica e espacial, influenciando na afinidade por centros coordenantes e no comportamento redox e espectroscópico (TOMA, 1984)

A importância dos metais alcalinos e alcalinos terrosos (sódio, potássio, magnésio e cálcio) e fósforo é reconhecida há muito tempo. Mais recentemente, no entanto, outros elementos inorgânicos como vanádio, cromo, molibdênio, manganês, ferro, cobalto, níquel, cobre e zinco, presentes em quantidades de traços, foram reconhecidos como essenciais à vida (REEDIJK, 1993; WILKINS & WILKINS, 1997).

Um elemento é considerado essencial quando uma deficiência na concentração deste produz uma diminuição da função biológica e quantidades fisiológicas do elemento previnem ou suavizam o dano. Os elementos essenciais são específicos para as suas funções *in vivo*, não podendo ser efetivamente substituídos por elementos químicos similares. Interação com átomos doadores de elétrons, tais como nitrogênio, enxofre e oxigênio, sendo que os tipos de interações dependem da configuração preferencial do elemento e dos tipos de ligações (BURTIS & ASSHWOOD, 1999).

Na deficiência absoluta do elemento, ocorre a morte. Com quantidades limitadas, o organismo pode sobreviver, mas as funções biológicas são danificadas. Quando quantidades do elemento são dadas em excesso, níveis tóxicos são alcançados, seguidos de ação letal.

Mecanismos que asseguram uma ótima distribuição dos elementos essenciais no organismo constituem um sistema de regulação homeostática. Isto inclui absorção, reserva e excreção. Entretanto, muitos detalhes dos processos de absorção ainda estão sendo elucidados. Sabe-se que a velocidade de absorção de um elemento essencial geralmente diminui com o aumento da sua concentração na luz intestinal e em tecidos vizinhos. Mecanismos de transporte ativo envolvendo absorção por ligações específicas do metal e *feedback* inibitório tem sido proposto para ferro, zinco e cobre. Proteínas de reserva tais como metalotioneína e ferritina são importantes na regulação de zinco, cobre e ferro através de sua capacidade de atuar contra o excesso de metal livre. A principal via de eliminação da maioria dos metais é a fecal (MILNE, 1999; RANG & DALE, 2001).

A disponibilidade biológica de um elemento em uma dieta, em sua forma particular, e a presença de fatores que afetam esta disponibilidade, como alimentos, fármacos e condições fisiológicas são determinantes importantes da disponibilidade de uma dieta capaz de fornecer o elemento requerido (CHIBA, 1996).

No estudo da química dos elementos inorgânicos em sistemas biológicos, a compreensão das propriedades e do papel desses elementos constitui ponto fundamental para o entendimento de certos mecanismos de reações biológicas.

1.1.Ferro

1.1.2. Química do ferro

O ferro é o segundo metal em abundância, depois do alumínio, e o quarto elemento mais presente na crosta terrestre. Está disponível em uma variedade de minerais e óleos minerais tanto na forma Fe (II) como também Fe (III). O Fe (II) é exigido para transporte e armazenamento de oxigênio na forma de hemoglobina e mioglobina enquanto que suas formas oxidadas, metahemoglobina e metamioglobina, as quais contêm Fe (III) não se ligarão ao oxigênio (SAFAVI & ABDOLLAHI, 1999). O

ferro tem função essencial na fotossíntese e é um nutriente de crescimento para fitoplanctons em algumas partes do oceano (KIEBER et al., 2001; NGAH et al, 2005) Tanto o Fe (II) como Fe (III) são importantes na biosfera servindo como centro reacional de enzimas como oxidases, redutases e desidrogenases. É sem dúvida, o elemento metálico mais importante nos sistemas biológicos, sendo encontrado em todas as células dos seres vivos, tanto animais como vegetais (OCHIAI, 1977)

O ferro é considerado um elemento de transição, ou seja, contém uma subcamada d parcialmente preenchida. Os elementos de transição possuem várias propriedades características sendo todos metais, bons condutores de calor e eletricidade. Todos formam ligas uns com os outros e com os elementos representativos metálicos. Em sua maioria os elementos do bloco d exibem vários estados de oxidação.

Como os elementos de transição possuem subcamadas d ou f parcialmente preenchidas, alguns dos seus íons contêm números ímpares de elétrons e, assim, seus compostos possuem propriedades magnéticas. Além disso, vários deles formam compostos coloridos, sendo a absorção da luz no visível associada ao preenchimento parcial das subcamadas d ou f (JONES, 2002).

Na forma sólida, o ferro existe na forma livre, nas ligas metálicas ou como parte de compostos. Em solução aquosa, existe em um dos dois estados de oxidação: Fe(II), a forma ferrosa e Fe(III), a forma férrica, sendo uma notável propriedade do ferro em solução seu potencial redox intermediário.

O ferro puro é muito reativo. Sob atmosfera e umidade oxida-se com rapidez, gerando óxido férrico hidratado (ferrugem) que não oferece proteção ao metal, pois descama e expõe continuamente a superfície metálica (SHRIVER et al., 1994; MARTI et al., 1998).

O ferro metálico apresenta ferromagnetismo, uma atração muito forte dentro de um campo magnético. O ferromagnetismo ocorre quando os átomos com spins desemparelhados estão colocados a uma distância tal, que permite que os spins individuais se alinhem dentro de uma região relativamente grande, chamado domínio. Em virtude dos spins individuais atuarem cooperativamente dentro do domínio, o efeito magnético se torna grande.

Fe (II) – o íon ferroso, verde pálido, é na realidade um hexaaquocomplexo octaédrico em água. Precipita hidróxido ferroso, $\text{Fe}(\text{OH})_2$ quando tratado com base. Este é um precipitado branco, quando puro, mas sempre aparece como um precipitado verde-claro devido a existência de um intermediário na oxidação razoavelmente rápida de $\text{Fe}(\text{OH})_2$ para $\text{Fe}(\text{OH})_3$ pelo O_2 . O íon ferroso é oxidado a Fe (III) muito lentamente, mesmo em solução ácida. O hidróxido ferroso é levemente anfótero, dissolvendo-se em NaOH concentrado, a quente. O comportamento ácido-base do Fe (II) se encontra na Figura 1.

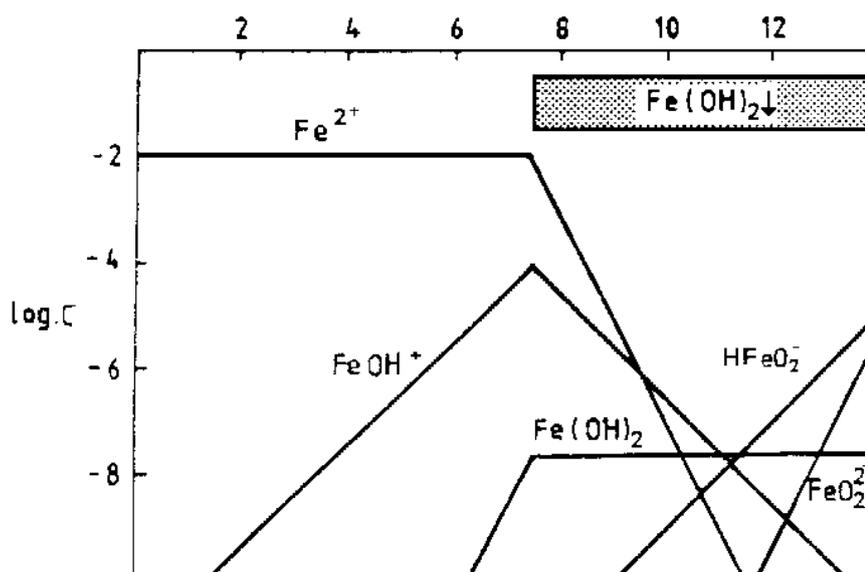


Figura 1. Diagrama log C vs pH para Fe (II) $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$
 Fonte: MARTI et al., 1998

Os íons ferrosos formam muitos complexos, a maioria deles com estrutura octaédrica: $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, $\text{Fe}(\text{OH})_2$. Outro íon ferroso com estrutura octaédrica muito importante é a hemoglobina.

O $\text{Fe}(\text{II})$ apresenta configuração eletrônica d^6 e complexos octaédricos com ligantes fracos apresentam estrutura de spin alto (campo ligante fraco), com 4 elétrons desemparelhados, sendo assim paramagnético, Figura 2a .

Ligantes fortes, como íons cianeto provocam o pareamento de spins (Figura 2b) e, com conseqüência, diamagnetismo. Estes complexos são mais estáveis que os de spin alto, pois apresentam maiores energias de estabilização no campo cristalino (ORGEL, 1970; SHRIVER et al., 1994; MARTI et al., 1998).



Figura 2. (a) campo ligante fraco, spin alto
 Fonte: SHRIVER et al., 1994

(b) campo ligante forte, spin baixo

Fe (III) – o íon férrico é essencialmente incolor em água, embora as soluções de sais férricos sejam vistas geralmente amarelas ou amarelo-acastanhadas devido a hidrólise que forma complexos tais como $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$ e $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$. A adição de base ao íon férrico precipita um material gelatinoso marrom-avermelhado chamado hidróxido férrico, $\text{Fe}(\text{OH})_3$, mas na verdade é um óxido hidratado. Este é muito menos solúvel do que o hidróxido ferroso e não é anfótero. O comportamento ácido-base do $\text{Fe}(\text{III})$ está representado na Figura 3 (ORGEL, 1970; WILKINS & WILKINS, 1997; MARTI et al., 1998).

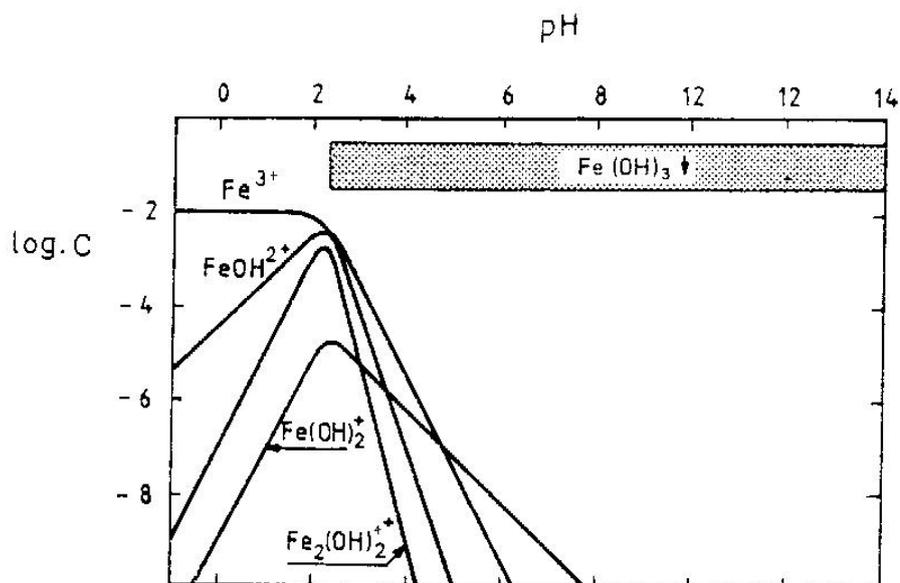


Figura 3. Diagrama log C vs pH para Fe(III) $10^{-2} \text{mol.L}^{-1}$
 Fonte: MARTI et al., 1998

O íon Fe(III) forma muitos complexos através de átomos de oxigênio, incluindo-se o íon fosfato e o oxalato. Tem configuração d^5 e, portanto ligantes fracos levam a uma estrutura de spin alto, sendo proibidas transições d-d, que são em conseqüências muito fracas, Figura 4a. Já ligantes fortes como íon cianeto, tiocianato e o oxalato levam a uma estrutura com spins emparelhados, surgindo cores intensas de transições eletrônicas d-d. (Figura 4b) (ORGEL, 1970; WILKINS & WILKINS, 1997; MARTI et al., 1998).



Figura 4. (a) campo ligante fraco, spin alto
 Fonte: SHRIVER et al., 1994

(b) campo ligante forte, spin baixo

Estas propriedades provavelmente têm exercido influência na seleção do íon ferro para muitos processos biológicos, sendo ideal para os papéis que desempenha, os quais incluem o transporte e armazenagem de oxigênio, transferência de elétrons, catálise enzimática e redox (OCHIAI, 1997; TOMA, 1984; HUGHES, 1985; KAIM & SCHWEDERSKI, 1991)

1.2.Relevância Biológica

1.2.1. Anemia Ferropriva

A deficiência de ferro é o distúrbio nutricional mais comum no mundo e a principal causa de anemia da primeira e segunda infância e durante a gravidez. É prevalente na maior parte do mundo em desenvolvimento, cerca de 12 a 43%, sendo provavelmente a única deficiência nutricional importante nos países industrializados. Nos países em desenvolvimento, a incidência da anemia por carência de ferro, também chamada ferropriva, é alta, devida principalmente à baixa ingestão de ferro biodisponível. Entretanto, neste contexto, a anemia ferropriva muitas vezes coexiste com outras patologias como desnutrição, deficiência de vitamina A, deficiência de folato

e infecções. Nas regiões tropicais, a infestação parasitária e as hemoglobinopatias são outras causas comuns de anemia (OLIVARES et al., 1999).

1.2.2. Papel biológico do Ferro

O ferro é um metal de transição com duas propriedades importantes para seu papel biológico:

- a capacidade de existir em vários estados de oxidação;
- a tendência a formar complexos de coordenação estáveis.

O corpo de um homem de 70 Kg contém aproximadamente 4g de ferro, 65% do qual circula no sangue sob a forma da molécula que transporta o oxigênio, a hemoglobina. Aproximadamente metade do restante é armazenada no fígado, baço e medula óssea, principalmente como ferritina e hemossiderina. O ferro dessas moléculas é disponível para a síntese de nova hemoglobina. O restante, está presente na mioglobina, citocromos e várias enzimas. Como a maior parte do ferro no organismo é parte da hemoglobina nas hemácias, ou destinado a ser parte dela, o resultado clínico mais óbvio da deficiência de ferro é a anemia (STRYER, 1996; WALTER et al., 1997; AHSAN, 1998).

1.2.3. Hemoglobina e Mioglobina

A arquitetura molecular das proteínas transportadoras de oxigênio é fascinante, e no curso da evolução biológica, a natureza tem desenvolvido vários mecanismos moleculares alternativos para servirem como transportadores de oxigênio.

A hemoglobina é uma proteína constituída de 4 subunidades de cadeia protéica chamadas globinas, cada uma contendo uma porção heme. O grupo heme consiste de um anel de porfirina tetrapirrol contendo íon ferroso (Fe(II)), Figura 5 (STRYER, 1996; MATTHEUS et al., 1997).

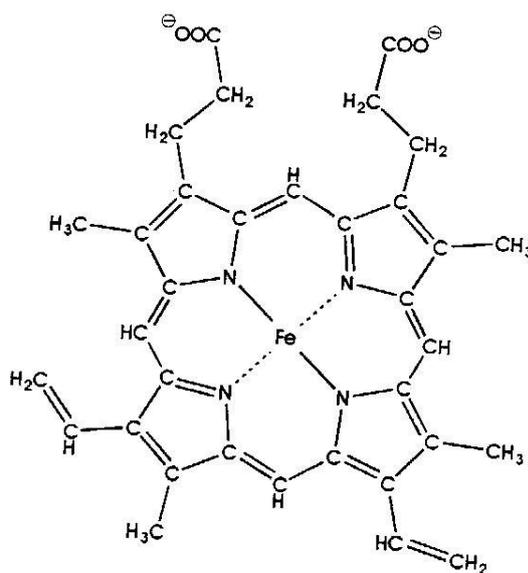


Figura 5. Estrutura do grupo heme
Fonte: MATTHEUS et al., 1997

A estrutura da hemoglobina é praticamente esférica e muito compacta, exceto por uma profunda fenda hidrofóbica, sendo esta o sítio de ligação do ferro no grupamento heme. Este é revestido com resíduos hidrofóbicos para fornecer o meio hidrofóbico para o heme, o qual se adapta na molécula com seus grupos carboxilatos carregados, revestindo o exterior da molécula. Além do revestimento hidrofóbico, o sítio de ligação do heme contém dois resíduos de histidina que disputam posição na ligação do oxigênio. A primeira, Histidina F8, é conhecida como histidina proximal e seu anel imidazólico está próximo do átomo de ferro e covalentemente ligado para a quinta posição de coordenação do ferro. A segunda histidina, Histidina E7, está no lado oposto do grupo heme e o mais afastado deste. É conhecida como histidina distal e não faz ligação com o átomo de ferro (MATTHEUS et al., 1997; RANG & DALE, 2001; VOET & VOET, 2001).

Cada grupo heme pode transportar uma molécula de O₂, que se liga de forma reversível ao Fe(II) e a histidina F8 ou proximal. Esta ligação reversível é a base do transporte de oxigênio.

A mioglobina é uma proteína que reserva e transporta oxigênio nos mamíferos, sendo encontrada nos músculos. É o pigmento vermelho necessário à utilização do oxigênio a nível muscular (MATTHEUS et al., 1997; RANG & DALE, 2001).

1.2.4. Mecanismo de absorção do ferro

A necessidade diária normal de ferro é de aproximadamente 5 mg para o homem e 15 mg tanto para a mulher durante o período reprodutivo como para crianças em crescimento. Uma gestante requer quantidade duas a dez vezes maior que esta em virtude das demandas do feto e do aumento das necessidades da mãe.

O ferro na carne geralmente está presente como heme e cerca de 20 a 40% do ferro do heme é disponível para absorção, isto não é alterado por outros fatores da dieta. O corpo humano parece estar especificadamente adaptado ao ferro absorvido na forma de heme (CRISPIN & VAREY, 2002).

O ferro não-heme no alimento apresenta-se principalmente no estado férrico, e tanto este ferro quanto as preparações de ferro na forma férrico usadas terapêuticamente devem ser convertidos em ferro na forma ferroso para sua absorção. O ferro na forma férrico e em menor extensão o ferro na forma ferroso possuem baixa solubilidade no pH neutro do intestino, mas no estômago o ferro dissolve-se e liga-se a uma mucoproteína que funciona como um transportador, levando o ferro para o intestino. (RANG & DALE, 2001).

As diferenças de solubilidade dependem se na dieta o ferro se encontra na forma inorgânica, como ferroso (Fe(II)) ou férrico (Fe(III)), ou na forma orgânica, como ferro do heme. Ferro na forma férrico é solúvel em soluções de pH até 5 e ferro na forma ferroso em soluções até pH 8, entretanto o ferro heme é mais solúvel em meio alcalino (HAEN, 1995; HUDSON & COMSTOCK, 2001).

Conseqüentemente, ferro ferroso e ferro do heme permanecem solúveis, pela formação de complexos solúveis de baixo massa molecular e são bem absorvidos em variações de pH encontradas no duodeno e jejuno (pH 4-8), sendo este o primeiro local de absorção ativa. O ácido ascórbico estimula a absorção de ferro parcialmente pela formação de complexos ferro-ascorbato solúveis e parcialmente pela redução do ferro férrico para a forma ferrosa mais solúvel (HUEBERS et al., 1983).

A quantidade de ferro na dieta e os vários fatores que afetam sua disponibilidade (CRISPIN & VAREY, 2002) são, portanto, importantes determinantes na absorção, mas a regulação da absorção de ferro é uma função da mucosa intestinal, influenciada pelas reservas de ferro do organismo. Na verdade, o mecanismo de absorção possui um papel central no balanço do ferro já que é o único mecanismo pelo qual o ferro corporal pode ser controlado. O mecanismo de absorção está esquematizado na Figura 6.

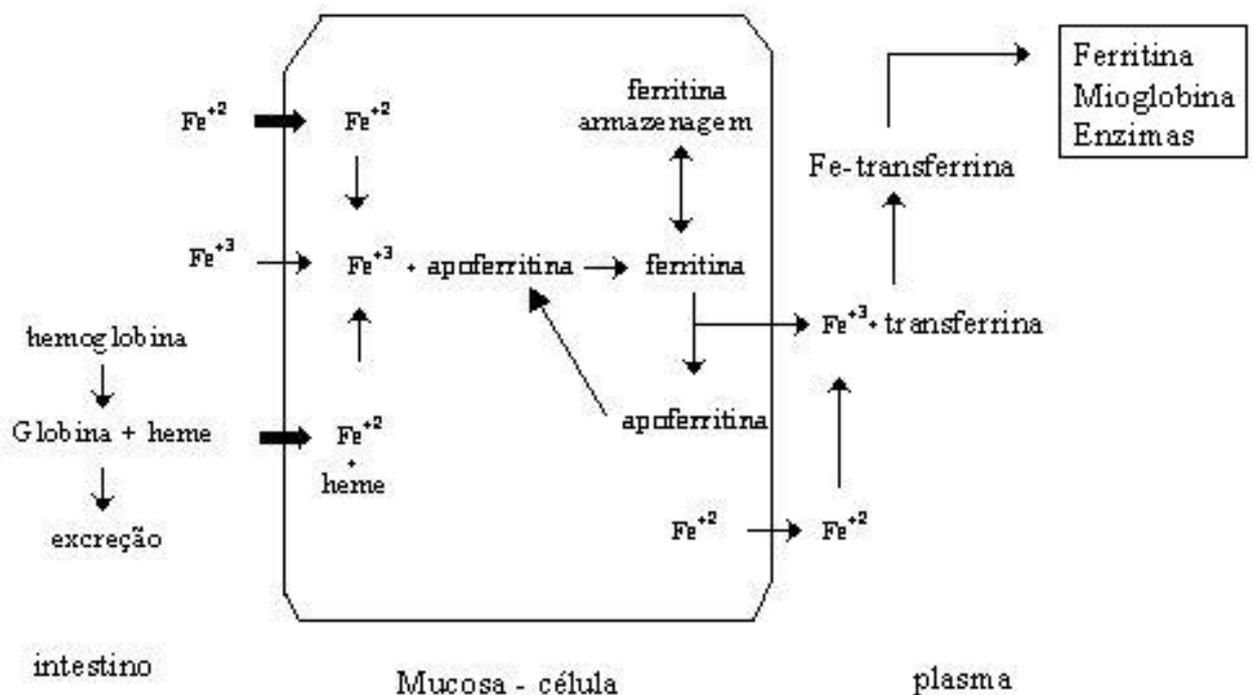


Figura 6. Mecanismo de absorção do ferro
Fonte: RANG & DALE, 2001

A absorção do ferro é feita no duodeno e na porção superior do jejuno, sendo este processo realizado em dois estágios que envolvem inicialmente uma rápida absorção através da borda em escova, difusão passiva e depois transferência do interior da célula para o plasma. O segundo estágio, que é limitador de velocidade, depende de energia. O ferro do heme é absorvido como heme intacto e é liberado na célula da mucosa pela ação da heme-oxidase. O ferro não-heme é absorvido no estado ferroso. No interior da célula, o ferro ferroso é oxidado em ferro férrico que se liga a um transportador intracelular, uma proteína semelhante à transferrina; o ferro é então armazenado na célula da mucosa como ferritina (se as reservas orgânicas de ferro são elevadas) ou levado para o plasma (se as reservas de ferro são baixas) (BORBOLLA et al., 2000; HUDSON & COMSTOCK, 2001).

O ferro é transportado no plasma ligado a transferrina, uma β -globulina com dois locais de ligação para o ferro férrico, que normalmente apresenta saturação de apenas 30%. A afinidade da transferrina pelo ferro é dependente do valor de pH, com forte ligação no pH plasmático (aproximadamente 7,4) e totalmente ausente de ligação em pH abaixo de 4,5.

A maior parte do ferro que chega ao plasma é obtida após a degradação de hemácias velhas. A absorção intestinal e mobilização de ferro dos depósitos contribuem apenas com pequena quantidade. A maior parte do ferro que deixa o plasma diariamente é usada para síntese de hemoglobina pelos precursores das hemácias. Tais células possuem receptores que se ligam a moléculas de transferrina, liberando-as após a captação do ferro. Este processo pode envolver a interiorização do complexo (KAPLAN & PESCE, 1996).

O ferro é armazenado de duas formas, ferritina solúvel e hemossiderina insolúvel. A ferritina é encontrada em todas as células, porém em concentrações mais elevadas em fagócitos mononucleares do baço, fígado e medula óssea. Também está presente no plasma. Apresenta a forma de armazenamento primário do ferro e tem sobrevida de apenas alguns dias. A ferritina no plasma praticamente não possui ferro associado a ela. Apresenta-se em equilíbrio com a ferritina de depósito nas células e sua concentração no plasma fornece uma estimativa do total das reservas de ferro no organismo. A hemossiderina é uma forma degradada da ferritina, na qual foram

agregados os centros de ferro de várias moléculas desta. O corpo não tem capacidade de excretar o ferro ativamente. Pequenas quantidades deixam o corpo através da descamação de células da mucosa contendo ferritina e quantidades ainda menores saem na bile, suor e urina. Há perda de um total de cerca de 1mg diariamente (KAPLAN & PESCE, 1996; BAUMGARTENER, 1997; BORBOLLA et al. 2000).

A absorção na mucosa é um processo seletivo dependente da quantidade de ferro no organismo, especialmente excesso ou deficiência de ferro, e da quantidade de ferritina nas células da mucosa intestinal. Na presença de grandes quantidades de ferro estocado, ocorre um processo conhecido como obstrução da mucosa, diminuindo a absorção de ferro (CRAWFORD, 1995).

Este mecanismo que controla a transferência do ferro da mucosa intestinal para o plasma ainda não é bem entendido. Foi sugerido que a quantidade de ferritina na mucosa intestinal pode ser importante na regulação da absorção, assim como o equilíbrio entre ferritina e a molécula transportadora tipo transferrina nestas células, representado na Figura 7 (RANG & DALE, 2001).

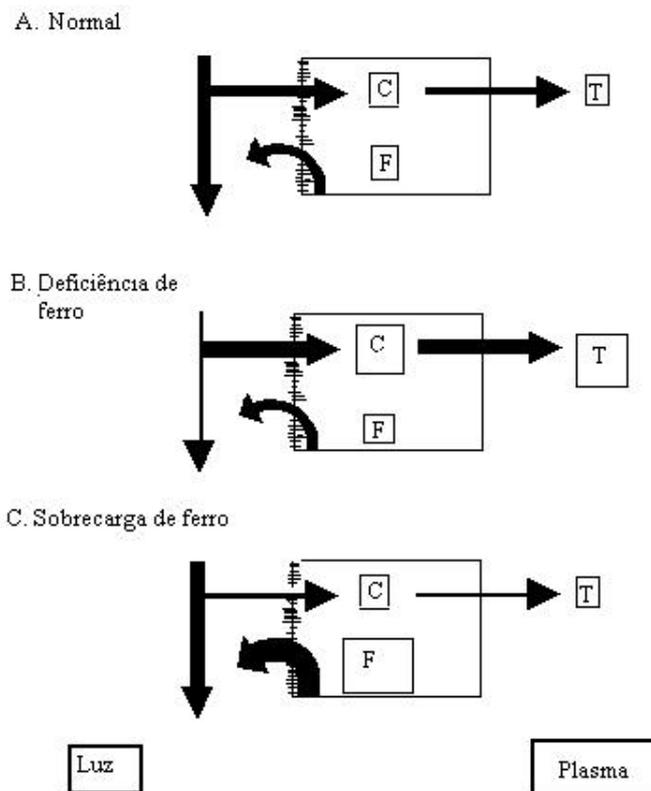


Figura 7. Ilustração esquemática de uma das principais teorias da absorção de ferro (regulação do balanço do ferro) pelas células da mucosa intestinal. (C: molécula transportadora, T: transferrina, F: ferritina)

Fonte: RANG & DALE, 2001

1.2.5. Uso clínico

Suplementações farmacêuticas contendo ferro são geralmente indicadas para o tratamento ou a prevenção da anemia ferropriva, que pode resultar do aumento de perda, da demanda, ingestão dietética inadequada ou má absorção do ferro.

Se as reservas de ferro são normais, o corpo é capaz de repor com relativa facilidade o ferro perdido durante uma hemorragia aguda súbita isolada, mas se a perda for constante e até 3 a 4 mL de sangue / dia pode resultar em um balanço de ferro

negativo e anemia ferropriva a qual requer tratamento com ferro (KAPLAN & PESCE, 1996; RANG & DALE, 2001).

O ferro é geralmente administrado por via oral, mas pode ser administrado por via parenteral e intramuscular em circunstâncias especiais.

Suplementos de ferro não heme são geralmente disponíveis como sais ferrosos (cloridrato, fumarato, gluconato, succinato, sulfato) os quais são mais rapidamente absorvidos que os sais férricos. Succinato e sulfato são os mais comuns e mais facilmente absorvidos, porém mais propensos a causar irritação gastrointestinal. Gluconato e fumarato são, segundo estudos, melhor tolerados (KALTWASSER et al., 1987).

Sais férricos geralmente apresentam menor disponibilidade que sais ferrosos, entretanto dois modelos foram desenvolvidos, complexos polimaltose-ferro e isomaltose-ferro (MAXTON et al., 1994), sendo biodisponíveis e também bem tolerados. Carbonil-ferro é uma partícula pequena de ferro metálico altamente puro a qual é dada por via oral sendo menos tóxica que formas iônicas de ferro tal como o sulfato ferroso. Encontra-se também a forma de complexo protéica, chamada ferritina, porém esta forma é pobremente absorvida (SKINE et al., 1997).

Os efeitos colaterais da administração oral de ferro incluem náuseas, cólicas abdominais, diarreia e constipação. Casos graves como intoxicação aguda e crônica podem ser observados pela administração de grandes doses, podendo levar a óbito (VAN WYCK et al., 2000).

1.3. Quitosana e Carboximetilquitosana

1.3.1. Quitosana

A quitina é um polissacarídeo natural presente no exoesqueleto de insetos, crustáceos e animais invertebrados em geral (OKUYAMA, 2000). Entretanto, sua

utilização é muito difícil devido sua insolubilidade em água e em muitos solventes orgânicos.

A quitosana, ou β -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glicose, é um biopolímero hidrofílico obtido industrialmente por hidrólise dos grupos aminoacetila da quitina por tratamento alcalino (KO et al., 2002). É solúvel em vários solventes ácidos diluídos como ácido acético, fórmico, clorídrico, ascórbico. A presença de grupos amino na cadeia polimérica permite ao polímero atuar como polieletrólito, confere propriedades quelantes e é o ponto de partida para inúmeras modificações químicas (OGAWA et al., 1993; FÁVERE, 1994; KAS, 1997; LU et al., 2001 EVANS, 2002) A estrutura da quitosana está representada na Figura 8.

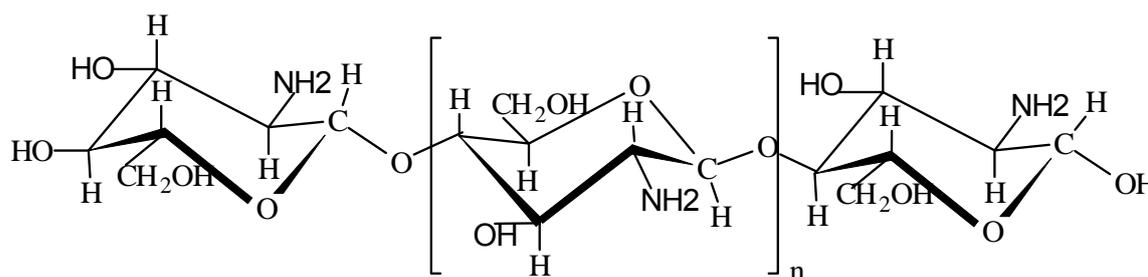


Figura 8. Estrutura química da quitosana
Fonte: ROBERTS, 1992

Embora a estrutura seja representada como um homopolímero, o processo de desacetilação raramente é completo e a maioria dos produtos comerciais são copolímeros de unidades repetidas de quitosana e unidades repetidas de quitina (CHANDY & SHARMA, 1993).

Importantes características da quitosana são sua massa molar, viscosidade, grau de desacetilação, cristalinidade, grau de polimerização, hidrofiliicidade, pKa e energia de hidratação (KAS, 1997; HEJAZI & AMIJI, 2003).

É um polissacarídeo biodegradável e biocompatível, solúvel apenas em meio aquoso em baixo pH e com DL₅₀ oral em camundongos de 16 mg/Kg (MI et al., 2000, EL-GIBALY, 2002; DENKBAŞ, 2002), sendo que o seu processo de biodegradação ocorre via hidrólise enzimática através de um mecanismo de despolimerização semelhante ao das paredes celulares de bactérias e fungos (TOZAKI et al., 1997).

Modificações químicas com a quitina e quitosana são principalmente realizadas com o uso de dialdeídos tais como glioxal, malonaldeído e glutaraldeído, os quais reagem com grupos amino livres formando base de Schiff (FÁVERE, 1994; MI, et al., 2000). Para reações com os grupos hidroxila, a epícloridrina tem sido muito utilizada (NGAH, et al., 2005; KUMBAR, 2002).

Uma das mais interessantes vantagens da quitosana é sua versatilidade. Este material pode ser facilmente modificado fisicamente, resultando em diferentes formas poliméricas tais como pó, nanopartículas, microesferas, membranas, esponjas e fibras usados em um variado campo de aplicações (OKUYAMA et al., 2000; LIU et al., 2001; GUIBAL, 2004; NGAH, et al., 2005) .

1.3.2. Carboximetilquitosana (CMQ)

A carboximetilquitosana é um derivado hidrofílico da quitosana, no qual ocorre processo de carboximetilação nos grupos reativos da quitosana, ou seja, nos grupos hidroxila e amino. Sendo assim a carboximetilação pode levar a derivados O- e N-carboximetilados podendo a dissubstituição no grupo amino também ocorrer. Isto dependerá das condições e dos reagentes a serem empregados nessas derivatizações (CAMPANA & DESBRIERES, 2000; DIAMOND et al., 2002).

A carboximetilquitosana não é apenas solúvel em água, mas tem propriedades químicas, físicas e biológicas únicas, tais como alta viscosidade, baixa toxicidade, biocompatibilidade e capacidade de formar géis e filmes (CHEN & PARK, 2003; CHEN et al., 2003).

A carboximetilquitosana é solúvel em intervalos de pH 2-6, ocorrendo a formação de uma solução gelatinosa. Tem a propriedade de formar complexos com metais pesados e com diversos cátions, formando precipitados (ROBERTS, 1992;

CHEN & PARK, 2003; CHEN et al., 2003; CHEN et al., 2004a; CHEN et al., 2004b)
 Figura 9.

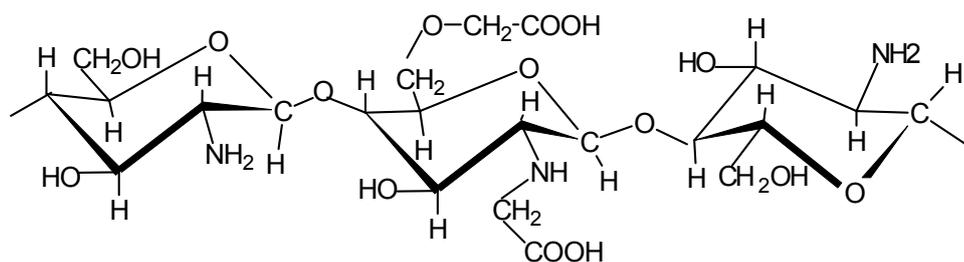


Figura 9. Resultado da carboximetilação da quitosana
 Fonte: CHEN et al., 2004b

1.4. Agentes Reticulantes

A molécula da quitosana contém os grupos funcionais, OH e NH₂ que podem ser modificados quimicamente. Essas modificações aumentam a resistência química e mecânica, a estabilidade, assim como a resistência contra a degradação bioquímica e microbiológica (GUIBAL, 1999, YANG et al., 2002). Aumenta-se a estabilidade química em meios ácidos e especialmente, diminui a solubilidade na maior parte dos ácidos orgânicos e minerais (NGAH et al., 2002, NGAH et al., 2005).

1.4.1. Glutaraldeído

Apresenta a fórmula molecular $C_5H_8O_2$ e tem massa molar 100,11. É solúvel em água e volátil. Sua DL_{50} é de 25%, oral em ratos 2,38mL/ Kg, e penetração através da pele em coelhos 2,56 mL/ Kg (CHIBA, 1996).

O glutaraldeído pode ser usado para inibir a solubilização da quitosana, através da formação da base de Schiff (iminas) com os seus grupos aldeído e os grupos amino livres da unidade glicosamina da quitosana, resultando em uma cadeia polimérica reticulada (WALTER et al., 1997, MI et al., 2000). A estrutura da reticulação da quitosana com glutaraldeído está representada na Figura 10 (GONÇALVES et al.,2005)

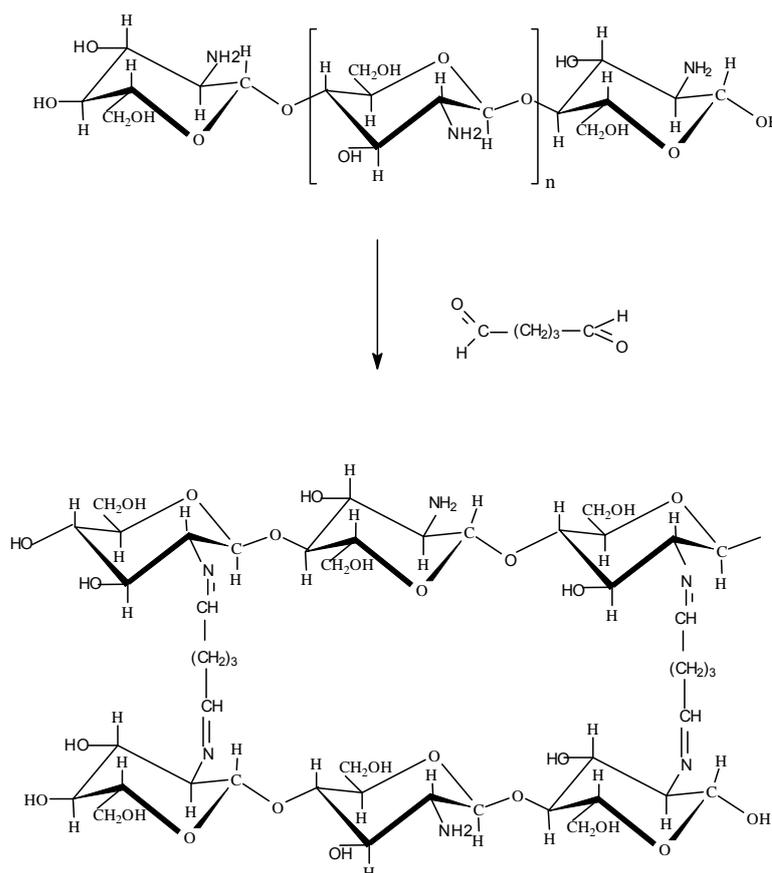


Figura 10 – Representação da reticulação da quitosana com glutaraldeído
Fonte: GONÇALVES et al., 2005

A Figura 11 representa a reticulação da N,O-CMQ com o glutaraldeído.

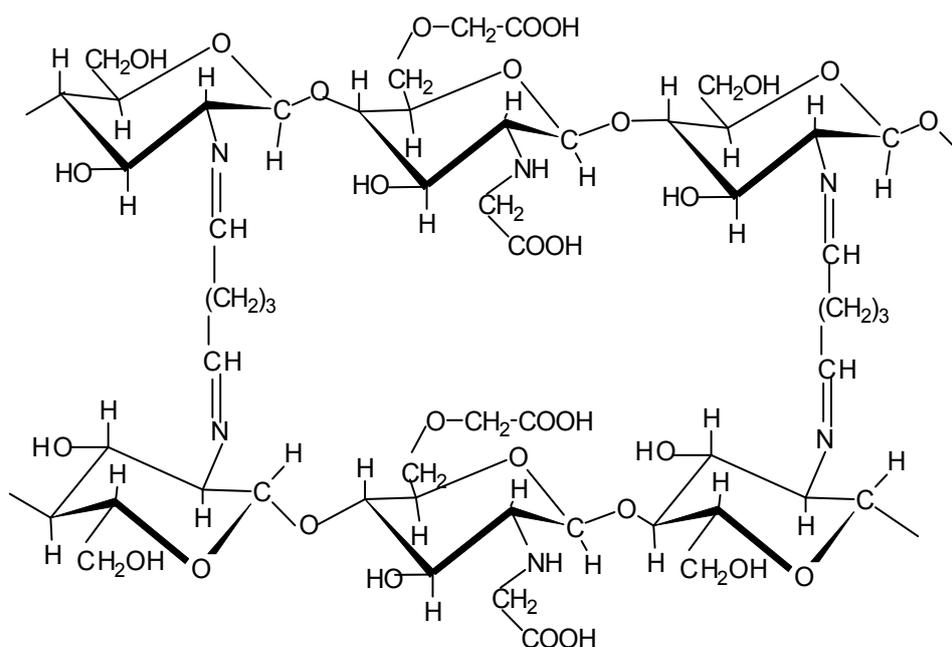


Figura 11. Representação da reticulação da N,O, Carboximetilquitosana com glutaraldeído

1.4.2. Epicloridrina

Apresenta a fórmula molecular C_3H_5ClO e tem massa molar 92,53. É insolúvel em água. Miscível em álcool, éter, clorofórmio, tricloroetileno e imiscível em hidrocarbonetos de petróleo.

Sua DL_{50} oral em ratos é 0,09g/ Kg (CHIBA, 1996). A epicloridrina pode ser usada para a insolubilização da quitosana através da formação de uma rede tridimensional polimérica. A reação com a quitosana envolve a abertura do anel

epóxido. A epícloridrina então reage apenas com os grupos hidroxila sob condições alcalinas, mantendo os grupos amino livres (KALTWASSER et al., 1987).

Membranas de quitosana reticuladas com epícloridrina em condições alcalinas foram preparadas para o estudo do controle do tamanho de poros nessas membranas (KALTWASSER et al., 1987). A estrutura da reticulação da quitosana com a epícloridrina está representada na Figura 12.

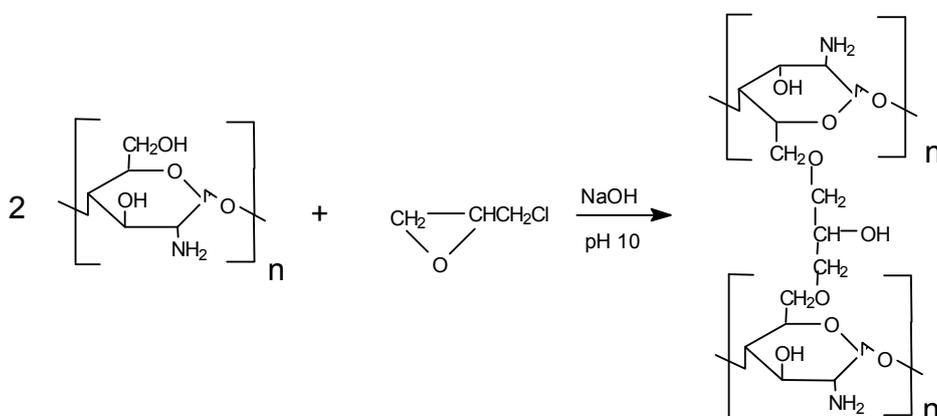


Figura 12 – Representação da reticulação da quitosana com epícloridrina
Fonte: GONÇALVES et al., 2005

1.5. Ácido ascórbico

Ácido L- ascórbico, também chamado de ascorbato ou vitamina C, é uma vitamina hidrossolúvel necessária para o metabolismo humano. Apresenta a fórmula molecular $C_6H_8O_6$. É reversivelmente oxidado com a perda de um elétron para formar o radical livre, ácido semideidroascorbato, o qual, por sua vez, é oxidado a ácido deidroascórbico (TOLBERT & WARD, 1982; JUNG & WEELS, 1998).

O ácido deidroascórbico pode ser reduzido a ascorbato através do mesmo radical intermediário ou a estrutura do anel do ácido deidroascórbico pode irreversivelmente ser hidrolizado até ácido dicetogulônico. O ácido deidroascórbico é instável em solução aquosa com um tempo de meia-vida a 37° C, de aproximadamente 6-20 minutos, Figura 13 (RUMSEY & LEVINE, 1998).

Em termos químicos é simplesmente um reflexo das propriedades redox onde atua como um agente redutor. Em termos fisiológicos, o ascorbato fornece elétrons para enzimas, para compostos químicos que são oxidantes ou para outros aceptores de elétrons. Além do seu potencial redox, outras propriedades do ascorbato o fazem um excelente doador de elétrons em sistemas biológicos.

Primeiro, o seu radical livre intermediário é relativamente não reativo, especialmente com oxigênio. Segundo, o produto de oxidação do ascorbato, ácido deidroascórbico, é reduzido a ascorbato nas células, o qual se torna disponível para ser usado novamente (TOLBERT & WARD, 1982; JUNG & WEELS, 1998; RUMSEY & LEVINE, 1998).

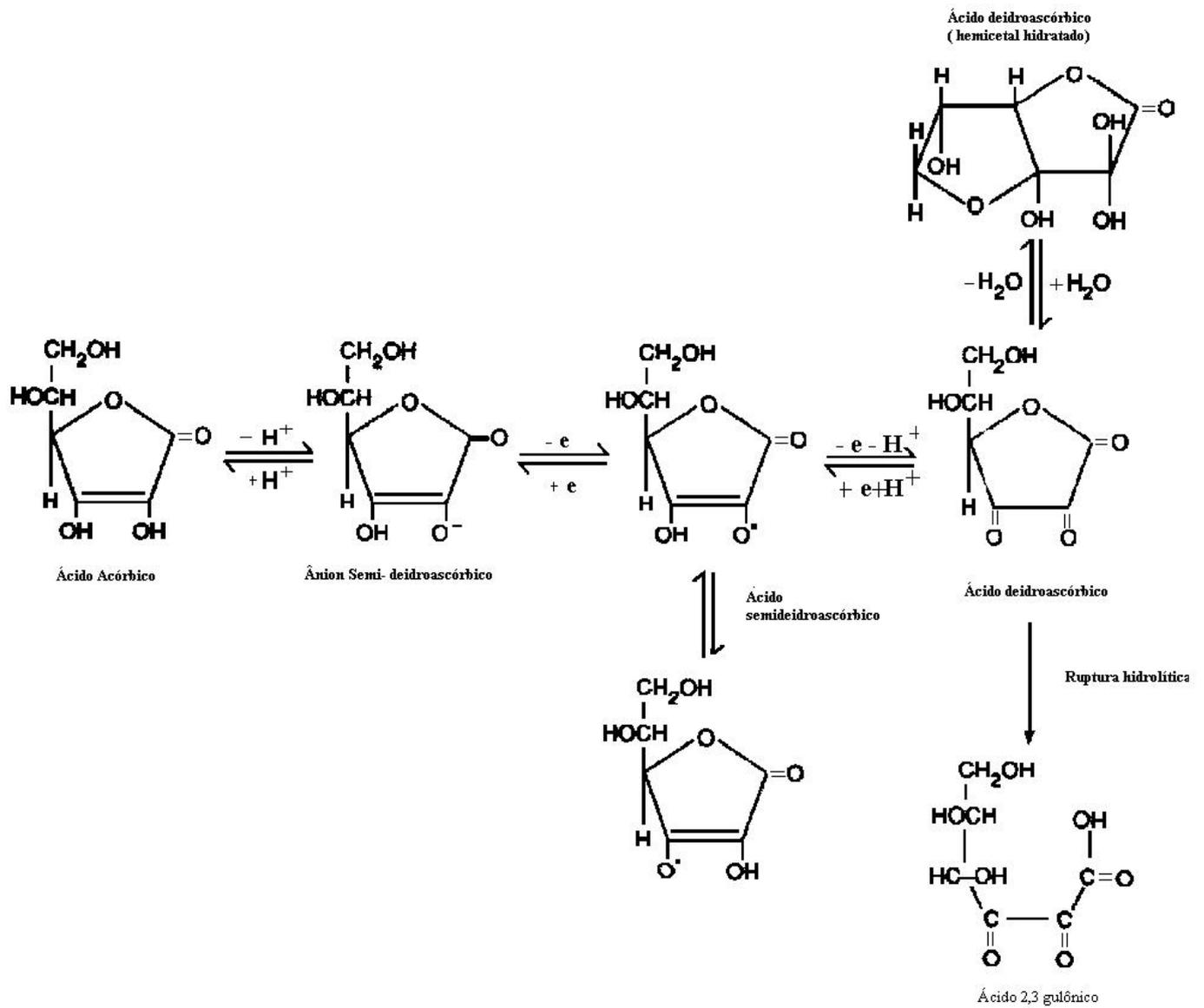


Figura 13. Ácido Ascórbico e os produtos da oxidação
 Fonte: RUMSEY & LEVINE, 1998

Além disso, o ácido ascórbico é considerado como o maior promovedor da absorção de ferro não heme, pois aumenta a solubilidade do ferro convertendo-o ao estado ferroso (EL-HAWARY et al., 1975; CHRISTENSEN et al., 1984; CRAWFORD, 1995).

A absorção de ferro *in vivo* na forma de ascorbato ferroso é comparada ao sulfato ferroso. É descrita tanto como prevenção como retardamento da oxidação do Fe (II) pelo ascorbato e na existência do Fe (II) como quelato com o ascorbato. Constatase também que entre pH 6 e pH 8 ocorre o aumento da absorção do Ferro (II) provavelmente, devido a ligação ascorbato ferroso (PLUG et al., 1984).

1.6. Sistemas de liberação

Sistemas de liberação controlada de fármacos são, idealmente, dispositivos que distribuem um fármaco quando e onde ele é necessário e num nível de concentração capaz de gerar o efeito esperado (DUNN, 1990).

Inúmeros métodos permitem microencapsular um material ativo. Dependem da natureza deste material, da aplicação e do mecanismo de liberação, podendo ainda, influenciar nas suas características morfológicas. De acordo com o tipo de envolvimento do material do agente encapsulante e do material ativo, os métodos usados podem ser de natureza física, química ou físico-química (KAS, 1997; SINHA, et al., 2004)

Entre os métodos físicos estão o *spray drying* (secagem de gotículas) (MI et al., 1999; HUANG et al., 2002), *spray cooling* (solidificação de gotículas por resfriamento) e a extrusão-esferonização (modelamento de microesferas por meios mecânicos) (SÄKKINEN et al., 2002; SANTOS et al., 2002.) Já nos métodos químicos temos a polimerização interfacial, ou seja, reação de polimerização no limite de duas soluções, uma delas contendo o material ativo em suspensão (SPARKS, 1990).

Os métodos físico-químicos consistem, de maneira geral, em transformar substâncias inicialmente solúveis, tais como polímeros e ceras, em materiais insolúveis

no mesmo meio. Incluem os processos de envolvimento lipossômico (encapsulamento por membranas lipídicas), evaporação do solvente (emulsificação e volatilização do solvente) (HASSAN et al., 1992; AKBUGA & BERGISADI, 1996) e a coacervação ou separação de fases. Essa pode ser dividida em simples e complexa. Enquanto a coacervação simples envolve a formação do coacervado por mudança de pH, temperatura, força iônica, etc. a coacervação complexa resulta da complexação entre dois polieletrólitos de cargas opostas (FILHO & OLIVEIRA, 1999; SPARKS, 1990; NEWTON, 1991). Quando o agente indutor é um eletrólito, presente em altas concentrações, denomina-se de *salting out* (KARSA & STEPHENSON, 1993; FILHO & OLIVEIRA, 1999; SINHA et al., 2004).

Um dos métodos mais simples de obter um sistema de liberação controlada de um agente ativo é misturá-lo fisicamente com um polímero. Devido a essa imobilização ou incorporação do fármaco no polímero, sua disponibilidade para o sistema biológico diminui em relação ao seu estado livre. Para que ocorra a liberação deste fármaco é necessário que o polímero dissolva, ou seja desintegrado, ou que o fármaco dissolva ou que possa difundir através da matriz. Em ambos os casos, a liberação do fármaco para o meio externo ocorre num período de tempo maior quando comparado ao uso do fármaco livre (DUNN, 1990; LANGER, 1990).

1.6.1. Micropartículas (microesferas e microcápsulas)

Em relação as suas estruturas, as microcápsulas podem ser definidas como partículas esféricas nas quais o encapsulado (sólido, líquido ou vapor) é recoberto por membranas semi-permeáveis formadas por um ou mais polímeros atuando como fator limitante na liberação, apresentando núcleo bem definido (SPARKS, 1990).

Denominam-se microesferas, sistemas cujos diâmetros variam de micrômetros a alguns milímetros e em que o encapsulado encontra-se disperso ou dissolvido homogeneamente no interior da matriz polimérica ou cerosa. Dessa forma, obtém-se um sistema monolítico, onde não é possível identificar um núcleo diferenciado. Também

nesse caso um ou mais polímeros pode constituir a matriz estrutural (KYDONIEUS, 1980; SPARKS, 1990). A obtenção do tipo de micropartícula depende da técnica de preparação.

1.6.2. Sistemas poliméricos de liberação de fármacos

Os sistemas poliméricos liberam fármacos a uma velocidade e tempos pré-determinados determinando assim o mecanismo de liberação, (Figura 14) (LANGER, 1990).

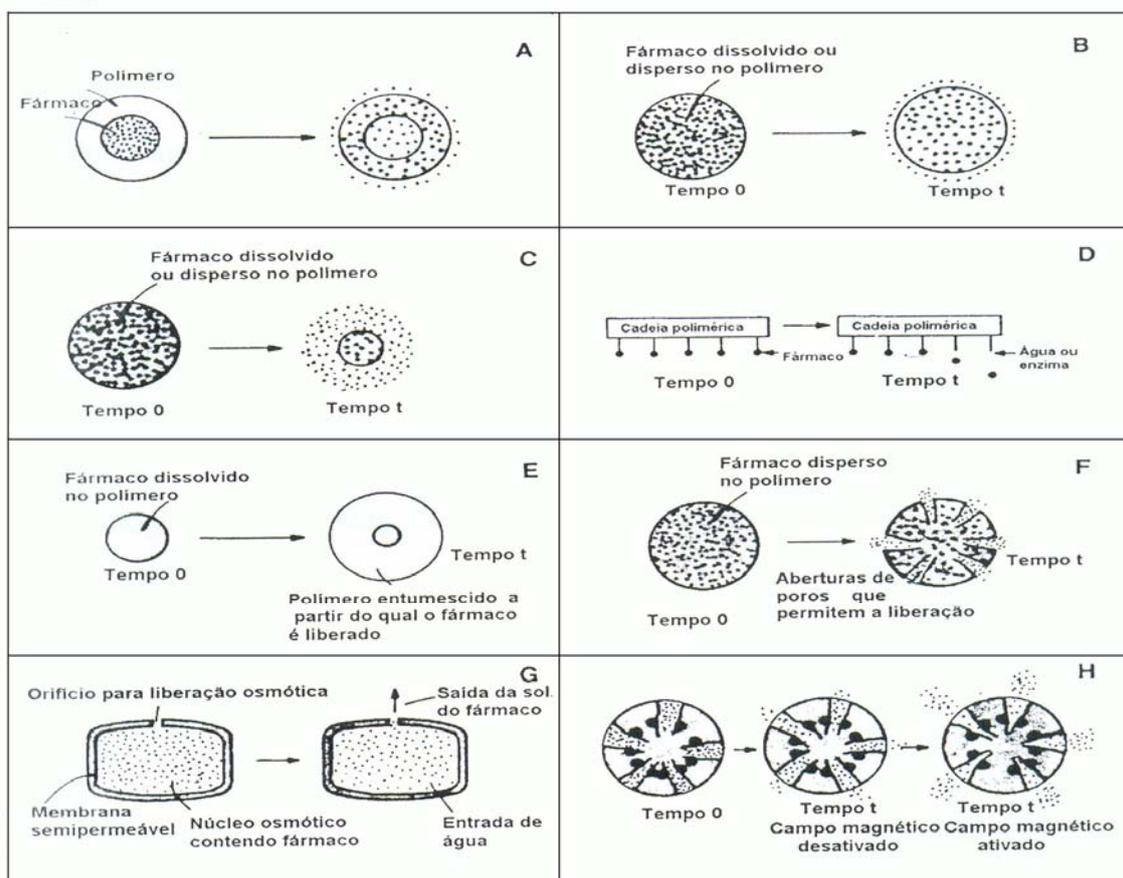


Figura 14. Mecanismo de liberação de fármacos a partir de matriz polimérica (A e B: difusão; C: degradação do polímero; D: clivagem do fármaco; E: intumescimento; F: abertura de poros por pressão osmótica; G: pressão osmótica; H: campo magnético)

Fonte: LANGER, 1990

Geralmente os sistemas poliméricos liberam o fármaco através dos mecanismos de difusão, reação química (degradação ou clivagem) ou ativação de solventes (intumescimento ou pressão osmótica). Entretanto, o mecanismo de liberação mais comum é a difusão, no qual o fármaco migra da posição inicial no polímero para a superfície e depois para o local de atuação (LANGER, 1990).

Inúmeras equações foram desenvolvidas para descrever o perfil de liberação de um agente ativo, levando em consideração a forma física do sistema de liberação de fármacos (cilindro, esferas, filmes, etc.), o modo de difusão (estático ou dinâmico), as características da matriz polimérica (porosa ou densa), etc (LINDNER et al., 1996).

A equação mais utilizada para descrever a liberação de fármacos a partir de sistemas poliméricos é a chamada *power law*, ou lei da potência (PEPPAS, 1985; SIEPMANN & PEPPAS, 2001)

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n \quad (1)$$

onde M_t e M_∞ representam a quantidade de fármaco liberada num tempo t e em tempo infinito, k a constante característica do sistema e n é o expoente que indica o mecanismo de liberação do fármaco (PEPPAS, 1985; SIEPMANN & PEPPAS, 2001).

Os valores de n para microesferas estão representados na Tabela 1 (RITGER & PEPPAS, 1987).

Tabela 1. Interpretação do mecanismo de liberação de fármacos a partir de dados obtidos para esferas.

| Valor de n | Mecanismo de transporte do fármaco |
|-------------------|--------------------------------------|
| 0,43 | Difusão Fickiana |
| $0,43 < n < 0,85$ | Transporte anômalo ou não - Fickiano |
| 0,85 | Transporte do caso II |

Fonte : Ritger & Peppas, 1987

Quando n for igual a 0,43, trata-se de um sistema Fickiano normal (controlado apenas por difusão). Para $n = 0,85$, o sistema libera uma cinética de Caso II (controlado por relaxamento e intumescimento). E para $0,43 < n < 0,85$, considera-se que seja um caso de transporte anômalo ou não – Fickiano. Neste caso, o valor de n indica que ambos os modos de liberação difusão e erosão estão contribuindo para a velocidade de liberação do fármaco a partir da matriz polimérica.

Comercialmente, os sistemas de liberação controlada de fármacos podem apresentar-se de diversas maneiras, como comprimidos, microesferas ou microcápsulas, nanoesferas, membranas ou filmes, suspensão, pastas, etc.

1.7. Estudos de caracterização e biodisponibilidade de complexos orgânico-minerais usados como sistemas de liberação

Quelação não é uma idéia nova. Em 1960, agentes quelantes, tais como EDTA, eram usados como veículos para incorporar agentes sintéticos, os quais poderiam, caso contrário, ser rejeitados pelo organismo como estranhos. Infelizmente, esses tipos de quelatos foram ineficazes, pois não liberavam o composto ou o metal para a absorção.

Alguns metais devem estar na forma de quelatos nos seres vivos para que estes possam ser absorvidos e naturalmente aceitos pelos organismos. Os metais usados na forma de quelatos são, na maioria, elementos essenciais como manganês, ferro, cobalto, cobre e zinco. Um bom exemplo é a quelação entre ferro e hemoglobina a qual auxilia no transporte de oxigênio.

O objetivo da formação de quelatos desses elementos nutricionalmente importantes é aumentar a biodisponibilidade do metal no organismo. A solubilidade é um fator crítico para a absorção dos elementos essenciais, pois mudanças químicas durante a digestão (pH, potencial redox) e várias reações entre os produtos da digestão alteram a solubilidade dos metais (SELIGMAN et al., 2000).

Em particular, metais de transição, ligam-se diferentemente do que outros elementos, como sódio, potássio, cálcio e fósforo. Ao invés de formar ligações iônicas ou covalentes, metais de transição preferem formar ligações covalentes coordenadas. Esta forma híbrida de ligação fornece aos metais de transição uma capacidade única de formar complexos estáveis (quelatos).

Certos aminoácidos e produtos da digestão de proteínas tais como peptídeos, são agentes quelantes úteis, pois eles contêm ao menos dois grupos funcionais (amino e hidroxila) que podem formar a estrutura em anel com o metal de transição.

Proteinatos e quelatos são exemplos de complexos, porém é importante ressaltar que nem todo complexo é um quelato. Complexos metálicos podem ser formados simplesmente pela mistura de um sal metálico e um aminoácido, porém a formação da estrutura em anel e ligações covalentes coordenadas em um quelato verdadeiro é um processo químico que requer algumas condições para a reação. Ácidos orgânicos como fumárico, cítrico e glucônico também podem formar complexos metálicos, mas não formam a estrutura em anel característica dos quelatos, pois nestes faltam grupamentos amino (SELIGMAN et al., 2000; CASAL-GARCIA & LAYRISSE, 2001).

Bisglicinato ferroso e trisglicinato férrico possuem um equivalente molar de Fe(II) ou Fe(III) e 2 ou 3 equivalentes molares de glicina, respectivamente. São, segundo alguns estudos, eficazes no tratamento da anemia por deficiência de ferro. Teoricamente, a forma quelato previne a ligação do ferro com agentes inibidores,

presentes em alimentos, ou a precipitação como hidróxido férrico no intestino delgado onde o pH é básico (BOVELL-BENJAMIN et al., 2000).

Olivares e colaboradores, determinaram a absorção de ferro em mulheres após a administração de leite fortificado com bisglicinato ferroso e concluíram que, apesar do leite inibir a biodisponibilidade do ferro, esta forma de ferro foi 2-2,5 vezes mais biodisponível que o sulfato ferroso adicionado ao leite. Eles também comprovaram que o bisglicinato ferroso é mais bem tolerado resultando em poucos efeitos colaterais quando comparado ao sulfato ferroso (OLIVARES et al., 1997).

O efeito de uma variação do pH de 2 a 6 foi testado na solubilidade do sulfato ferroso, fumarato ferroso, bisglicinato ferroso e NaFeEDTA. Os resultados sugerem que a solubilidade do ferro do bisglicinato ferroso e NaFeEDTA não é afetada pelas variações no pH, provavelmente porque o ferro permanece associado aos seus respectivos compostos (CASAL-GARCIA & LAYRISSE, 2001).

Complexos sintéticos de ferro-polissacarídeos têm sido sugeridos como "biomiméticos", isto é, uma cópia de moléculas biologicamente naturais. A química, estrutura e solução química destes complexos foram examinadas por uma variedade de técnicas (BEREMAN & BERG, 1989; KNIGHT et al., 1996; MOHIE-ELDIN et al., 1994).

Recentemente, a ligação entre quitosana e Fe (III) tem recebido uma atenção considerável. Esta interação é utilizada para o tratamento de sobrecarga de ferro, remoção de Fe (III) de resíduos hídricos, atividade catalítica, cromatografia, tratamento da hiperfosfatemia e suportes magnéticos (CASAL-GARCIA & LAYRISSE, 2001, SIPOS et al., 2003).

A quitosana parece possuir uma excelente capacidade para quelar metais de transição, assim como seu derivado, a carboximetilquitosana. Esta capacidade poderia representar preocupação em termos de depleção de ferro após aplicação oral. Porém, estudos mostram que após a administração de quitosana em ratos não houve a redução da concentração de ferro sérico e tampouco da hemoglobina (MUZZARELLI, 1996). A forma que o Fe (III) interage com a quitosana não é bem conhecida ainda.

Por medidas de espectroscopia Mössbauer e Infravermelho, Nieto e colaboradores concluíram que o íon férrico está coordenado com dois resíduos de

quitosana e quatro posições de coordenação estão ocupadas por três moléculas de água e um íon cloro (NIETO, et al., 1992).

Bhatia e Ravi chegaram a conclusões semelhantes indicando que tanto grupos amino como hidroxila coordenam aos íons metálicos e mais que uma cadeia polimérica é envolvida na formação do complexo (BHATIA & RAVI, 2000).

As propriedades estruturais e magnéticas de complexos Fe-quitosana foram investigadas por espectroscopia Mössbauer. Os valores do deslocamento isomérico indicam que o metal no complexo Fe- quitosana se encontra no estado alto spin Fe(III) e estes valores também sugerem que a ligação ao redor do ferro é penta ou hexa coordenada com ligantes N/O (BHATIA & RAVI, 2000, AIEDEH & TAHA, 2001), Figura 15.

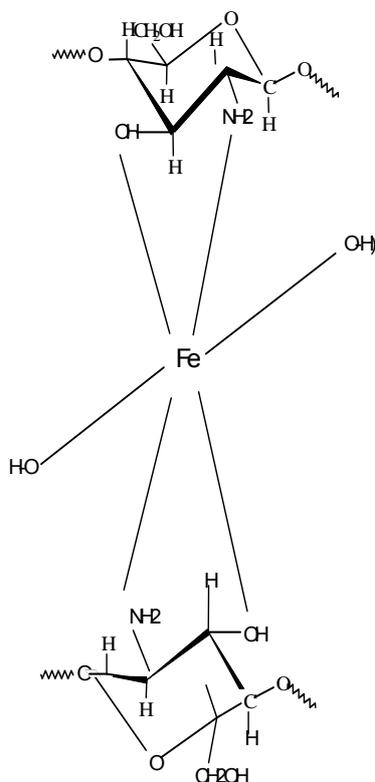


Figura 15. Representação esquemática proposta para complexo Fe-quitosana
Fonte: BHATIA & RAVI, 2000

Gamblin e colaboradores estabeleceram uma diminuição na importância da ligação dos grupos amino com o ferro e sugeriram a formação de aglomerados férricos (*clusters*) nestes compostos (GAMBLIN et al., 1998). Estes resultados também foram relatados por Sipos e col. (SIPOS et al., 2003).

Derivados de quitosana, na forma de complexos coordenados com Fe (II) foram preparados a partir de sulfato de quitosana e sulfato ferroso com a formação de complexos nos quais as ligações estão estabelecidas entre Fe (II) e dois grupos amino e três grupos hidroxila do anel da glicosamina (MARINONI & CONTI, 1986).

Compostos de complexos de ferro têm sido usados como suplementos de ferro e biodisponibilidade deste ferro foi testada através de vários parâmetros.

Um estudo biológico e profilático em ratos foi simultaneamente realizado com três desses complexos: ortofosfato férrico, NaFeEDTA, e o bisglicinato ferroso, sendo que a biodisponibilidade foi comparada com a do sulfato ferroso. Após 5 semanas de administração de 20 mg Fe/Kg diariamente na forma de ração, os testes de ferro com ratos provaram ser um modelo prático para testar e comparar a biodisponibilidade de sais de ferro. NaFeEDTA e bisglicinato ferroso produziram resultados parecidos com os do sulfato ferroso e seus átomos de ferro tem um alto valor biológico para ratos. O ortofosfato férrico tem menor valor biológico quando comparado com o padrão referência e com os outros complexos estudados (OLIVEIRA et al., 1995).

Compostos de ferro usados na fortificação de alimentos também devem obedecer a certos requisitos quanto a sua biodisponibilidade, mecanismo de absorção e toxicidade. Levando-se isso em consideração, a biodisponibilidade de sulfato ferroso microencapsulado foi por diversas vezes avaliada em inúmeros produtos e finalmente em ratos e camundongos utilizando-se como padrão o sulfato ferroso e o ascorbato ferroso (BOCCIO et al., 1997; BOCCIO et al., 1998; UICICH et al., 1999; LYSIONEK et al., 2002).

Diversos produtos fortificados com sulfato ferroso microencapsulado foram administrados durante 15 dias, tempo em que o ferro é absorvido e distribuído por diferentes tecidos e órgãos de acordo com suas funções metabólicas e bioquímicas. Após, os animais foram sacrificados e a biodistribuição do ferro foi determinada. Como bem observado, uma grande percentagem de ferro absorvido é encontrada no sangue

porque o ferro torna-se parte da hemoglobina presente nas hemácias (BOCCIO et al., 1997).

2. Justificativa

O tratamento da anemia ferropriva com formulações administradas por via oral é o escolhido na maioria dos casos por ser altamente efetivo, seguro e de baixo custo.

Entre os compostos de ferro se encontram os sais, que contém este metal na sua forma ferrosa e alguns complexos, que contém o ferro na forma férrica ou ferrosa.

A diferença principal entre estes compostos está na sua biodisponibilidade, ou seja, a maneira pela qual o ferro após ser liberado será absorvido e distribuído pelo organismo. Isto está diretamente relacionado com a ligação do ferro nestes compostos, seu estado de oxidação e a ação do organismo sobre o material polimérico.

Sendo assim, buscando alternativas para minimizar os efeitos colaterais e favorecer a absorção do ferro, foram desenvolvidas formas farmacêuticas diversas para a liberação do ferro por via oral utilizando como materiais a quitosana, a carboximetilquitosana e o sulfato ferroso. Poucos trabalhos foram encontrados na literatura utilizando quitosana e ferro (II) e ferro (III) para esta finalidade, destacando-se limitações na metodologia (SO_3 , pirimidina e atmosfera de nitrogênio) (MARINONI & CONTI, 1986). A dificuldade da obtenção da forma ferrosa na reação com a quitosana, nos levou a utilização do ácido ascórbico como coadjuvante.

O estudo comparativo das propriedades químicas, da biodisponibilidade e efeitos colaterais do sulfato ferroso com os complexos ferro-quitosana e ferro-carboximetilquitosana, permitiu estabelecer se os mesmos apresentam ou não, capacidade para a suplementação oral do ferro com diminuição dos efeitos colaterais.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo principal preparar e caracterizar complexos de ascorbato de quitosana-ferro (II) e quitosana – ferro (III) e N,O- carboximetilquitosana – ferro (III), na forma de microesferas, microcápsulas, pó e suspensão, bem como avaliar *in vitro* seus perfis de liberação e *in vivo* sua biodisponibilidade, distribuição e aplicação no tratamento de anemia por deficiência de ferro.

3.2. Objetivos específicos

- Preparar complexo orgânico-mineral a base de quitosana, carboximetilquitosana e ferro na forma de microesferas reticuladas com glutaraldeído e epícloridrina pelo método de coacervação simples, spray dryer e microcápsulas por coacervação salina;
- Preparar complexo ascorbato de quitosana - ferro na forma de suspensão e microesferas;
- Determinar a massa de ferro incorporada por grama do polímero nos diferentes sistemas de liberação;
- Avaliar o grau de intumescimento das microesferas / microcápsulas em soluções tampão simulando o trato gastrointestinal;
- Caracterizar as propriedades dos complexos orgânico-minerais através de espectroscopia Mössbauer, FT-IR, TGA, RAMAN e possíveis interações entre quitosana - ferro - ácido ascórbico, carboximetilquitosana - ferro assim como o estado de oxidação do ferro coordenado;

- Caracterizar a estrutura morfológica dos complexos através de microscopia eletrônica de Varredura (MEV);
- Estudar o perfil de liberação *in vitro* das microesferas / microcápsulas, levando-se em consideração valores de pH e tempo, simulando o trato gastrointestinal;
- Estudar a biodisponibilidade do ferro, *in vivo* avaliando concentração, tempo (horas e dias) e formas farmacêuticas de administração em animais sadios e anêmicos.

4. Parte Experimental

4.1. Instrumental

As pesagens foram realizadas em uma balança analítica marca Shangping Eletronic Balance, modelo FAI 6045. As medidas de pH foram feitas com o pH-metro marca Corning, modelo pH/ion analyser 350. O moinho para trituração das amostras foi da marca Analysenmühle, modelo A 10.

As determinações espectrofotométricas foram realizadas utilizando-se um espectrofotômetro modelo U 3000, marca Hitachi.

As micropartículas (microesferas e microcápsulas) foram obtidas utilizando-se uma bomba peristáltica Ismatec Reglo modelo 78016-30 e agitador magnético, modelo AMA 102 com velocidade controlada, da Microquímica Ind. Com. Repr. Ltda, agulha de diâmetro 0,5 mm e também um Mini Spray Dryer B-191, da marca Büchi. Para a liberação *in vitro*, utilizou-se Incubadora Mini Shaker MA 832 com rotação e temperatura ajustáveis.

4.1.1. Espectroscopia Infravermelho

Os espectros de infravermelho foram obtidos dos compostos pastilhados em brometo de potássio – grau espectroscópico, na faixa de 4000 – 400 cm^{-1} em um espectrofotômetro FT Perkin Elmer, modelo 16 PC para observação dos grupos funcionais.

4.1.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono – RMN ^{13}C

Os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono – 13 (RMN ^{13}C) foram obtidos no espectrofotômetro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C Bruker, modelo AC-200 F.

4.1.3. Espectroscopia Mössbauer

Os espectros Mössbauer foram coletados a 298 K (a não ser quando ressaltado) em um equipamento Wissel operando em velocidade constante, o qual utiliza um cartão ORTEC MCS-plus acoplado a um microcomputador.

A fonte radioativa de ^{57}Co em matriz de ródio com atividade inicial de 25 mCi foi adquirida da firma Du Pont, tendo apresentado largura de linha de apenas 0,22 mm/s em relação a um absorvedor de nitroprussiato de sódio.

Os espectros foram ajustados por composição de curvas lorentzianas utilizando o programa "NORMOS" versão PC. Os valores de deslocamento isomérico dos espectros Mössbauer de todos os complexos deste trabalho são apresentados em relação à escala do α -ferro a temperatura ambiente.

Nesta seção contamos com a colaboração do Prof. Dr. Valderes Drago do Departamento de Física/ CFM da UFSC.

4.1.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O tamanho médio, morfologia interna e externa das microesferas (três micrografias contendo cada uma aproximadamente 20-25 micropartículas) e a análise através da microsonda de energia dispersiva de raio - X (EDX) foram realizadas usando um Microscópio Eletrônico de Varredura, marca Philips, modelo XL 30, do Laboratório de Materiais do Departamento de Engenharia Mecânica da UFSC. As amostras foram colocadas em suportes e recobertas com ouro sob vácuo.

4.1.5. Espectroscopia Raman

Uma das principais aplicações dos espectros Raman é na identificação de grupos característicos, onde moléculas relativamente grandes estão envolvidas.

Os espectros Raman foram obtidos no Laboratório de Estrutura e Espectroscopia Molecular - LEEM do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, utilizando um

microscópio Renishaw System 3000 com excitação de laser hélio/neon no comprimento de onda 632,8 nm e excitação a laser de Nd-YAG no comprimento de onda de 1064 nm; com velocidade de varredura de 128 e potência de 250W, com resoluções de 4,0 cm^{-1} .

4.1.6. Análise Termogravimétrica (TGA)

As amostras foram submetidas a temperatura de 0 – 800 °C com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min em um aparelho Shimadzu Termogravimetric Analyser (TGA 50, Kyoto, Japan).

4.1.7. Titulação por condutometria

O grau de desacetilação (%GD) da quitosana e a porcentagem de grupos amino livres no ascorbato de quitosana foi determinado por titulação condutimétrica com auxílio de um condutivímetro Micronal (modelo B330) e um titulador automático Schott Geräte (modelo T80/20). Uma amostra de 200 mg de amostra foi transferida para um béquer contendo 450 mL de NaCl 0,001 mol/L e 5 mL de HCl 1 mol/L e agitada até completa dissolução. A titulação foi conduzida com adição de NaOH 0,1 mol/L a cada 20 segundos. O mesmo procedimento foi adotado para a amostra de ascorbato de quitosana.

4.2. Reagentes

Os reagentes utilizados foram adquiridos das seguintes empresas: quitosana (Purifarma), sulfato ferroso (Merck), ácido monocloroacético (Nuclear), glutaraldeído (Vetec), epícloridrina (Merck), ácido acético (Merck), ácido ascórbico (Nuclear), álcool etílico (Nuclear), hidróxido de sódio (Synth). N,O, carboximetilquitosana foi preparada

segundo o método descrito na literatura (GLOSSER & JAIN, 1999). Os demais reagentes são de grau analítico.

4.3. Animais

Os ratos utilizados nos ensaios *in vivo* foram obtidos do biotério da Universidade Federal de Santa Catarina. Os diferentes ensaios foram realizados com 165 animais de linhagem *wistar* com média de idade de 2 meses e do sexo masculino. Os estudos foram conduzidos com a colaboração da Prof^a Dr^a Rozângela Curi Pedrosa do Departamento de Bioquímica – UFSC.

4.4. Soluções

4.4.1. Solução de Quitosana (QTS)

Para a preparação desta solução, foi dissolvido 4 g de QTS em 100 mL de ácido acético 5%(v/v) e mantido sob agitação constante até completa dissolução da QTS, resultando em uma solução viscosa com aproximadamente 4% (m/v) de QTS.

4.4.2. Solução de ascorbato de quitosana

Para a preparação desta solução, foram misturados 8,05g de QTS e 8,8g de ácido ascórbico (AA). Em seguida, foram acrescentados 5 mL de água destilada. Esta mistura permaneceu em ausência da luz e vedada por 3 horas. Após este tempo, 200 mL de água foram acrescentados e a solução foi mantida sob agitação até completa dissolução e obtenção de uma solução viscosa com aproximadamente 4% (m/v) de ascorbato de quitosana.

4.4.3. Preparação de N,O- Carboximetilquitosana (N,O- CMQ)

Para a preparação da N,O-carboximetilquitosana foi suspenso 1 g de QTS em 21,6 mL de etanol (anidro) e mantida esta suspensão em agitação por 20 minutos. Em seguida, foram adicionados 6,8 g de NaOH 40% e 4,8 g de ácido monocloroacético solubilizado em etanol (1:1), permanecendo em contato a 60 °C por 3 horas. O resíduo frio foi filtrado e suspenso em 50 mL de etanol 80% e neutralizado com ácido acético glacial (pH 7,0). O produto foi então lavado com etanol 80%, etanol absoluto e seco em temperatura ambiente. A Figura 16 esquematiza a obtenção da N,O-CMQ.

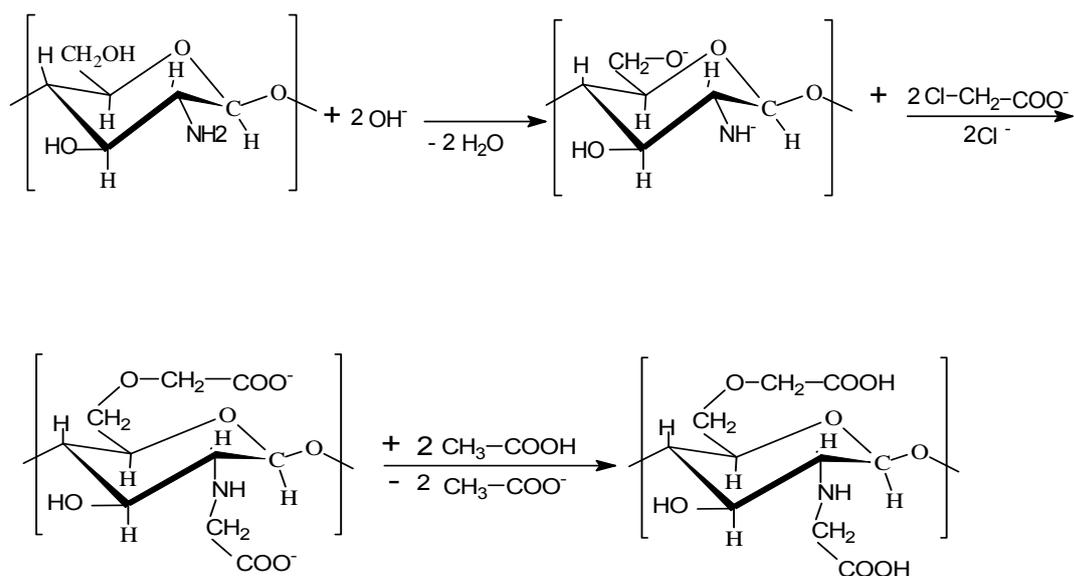


Figura 16. Síntese de obtenção da N,O-Carboximetilquitosana
Fonte: GLOSSER & JAIN, 1999

4.4.4. Solução de N,O-carboximetilquitosana (N,O-CMQ)

Para a obtenção de uma solução 3%, foram dissolvidos 3g de N,O-CMQ em 100mL de água destilada e mantida sob agitação constante até completa dissolução.

4.4.5.Solução de Impregnação

Para a impregnação do ferro nas microesferas foi utilizada uma solução saturada de sulfato ferroso.

4.4.6.Soluções tampão

As soluções tampão Clark - Lubs - pH 1,2; Macllvaine - pH 6,8 e 8,0; e de H_3BO_3 - KCl - NaOH - pH 9,0 foram preparadas conforme Morita (MORITA, 1983) e usadas para a determinação do grau de intumescimento. O ferro foi liberado das micropartículas em solução tampão Clark - Lubs - pH 1,2.

4.5. Metodologia

4.5.1.Preparação dos complexos orgânico-minerais

4.5.1.1. Microesferas dos complexos de Ferro (III) –quitosana reticulada

As microesferas foram preparadas pelo método de separação de fases, via coacervação simples. Segundo este método, a formação das microesferas resulta de um fenômeno de superfície e ocorre devido a interação entre a solução polimérica (solução de quitosana) e um meio coagulante o qual induz a separação de fases, precipitando a membrana polimérica.

A solução quitosana 4% (m/v) em ácido acético 5% (v/v) foi gotejada com o auxílio de uma bomba peristáltica de marca Ismatec em um banho de precipitação

contendo solução NaOH 2 mol/L ocorrendo a formação das microesferas. Após trinta minutos nesta solução as microesferas foram lavadas até pH neutro e reticuladas com epícloridrina ou glutaraldeído. Em ambos os casos, a reticulação é realizada com a finalidade de aumentar a resistência mecânica das microesferas e torná-las insolúveis em soluções ácidas.

- reticulação com epícloridrina: para 10 g de microesferas úmidas em 100 mL de água, foram adicionados 4,9 mL de epícloridrina e aquecido por 1 hora. Após, adicionou-se 70 mL de NaOH 0,1 mol/L e aquecido por 2 horas. As microesferas foram lavadas com água, ácido clorídrico 0,1 mol / L seguido de NaOH 0,1 mol/L (Qts-Epi)
- reticulação com glutaraldeído: para 1 g de microesferas úmidas foram adicionados 1,5 mL de solução de glutaraldeído 2,5% (v/v), permanecendo em contato por 24 horas. (Qts-Glu)

As microesferas foram lavadas após cada processo de reticulação e colocadas em contato com uma solução saturada de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (solução de impregnação), permanecendo por 24 horas, sob agitação, sendo que após este período todo ferro (II) impregado é convertido a ferro (III) na presença de ar atmosférico.

4.5.1.2. Microesferas/Microcápsulas do complexo de Ferro(III)-N,O-carboximetilquitosana (N,O-CMQ)

Para a preparação das micropartículas de Fe (III)-(N,O-CMQ), uma solução aquosa de N,O-CMQ 3% (m/v) foi gotejada com o auxílio de uma bomba peristáltica em solução saturada de sulfato ferroso sob agitação. As microcápsulas formadas pelo método de coacervação salina (*salting out*) foram lavadas rapidamente com água destilada resultando nas microcápsulas codificadas de CMQ-Fe(III). Microcápsulas obtidas inicialmente foram reticuladas com glutaraldeído 2,5% (v/v) e permaneceram por 24 horas, resultando na formação de microesferas codificadas de CMQ-Glu-Fe(III).

As figuras 17 e 18 representam os esquemas das preparações dos complexos de ferro com a quitosana e N,O-carboximetilquitosana, respectivamente.

4.5.1.3. Suspensão do complexo de ascorbato de Ferro (II)- quitosana

Para a preparação da suspensão do complexo de ascorbato de Ferro (II)- quitosana foi utilizado a solução descrita no item 4.4.2. Um volume de 200 mL de solução de ascorbato de quitosana 4% foram adicionados a 200 mL de água destilada. Em seguida para 200 mL desta solução a 2% foram adicionados 200 mL de solução de sulfato ferroso 20%. Mantida sob agitação e ao abrigo da luz. Uma solução de coloração verde foi obtida apresentando 1% de ascorbato de quitosana e 10% de sulfato ferroso (2% ferro elementar).

4.5.1.4. Microesferas do complexo de ascorbato de Ferro(II) – quitosana

A metodologia empregada para a obtenção de microesferas do complexo ascorbato de ferro (II) – quitosana foi a aplicação da técnica de secagem a vapor, com a utilização do sistema de desidratação Spray-Dryer Büchi B-191. Parâmetros de ajuste do aparelho spray-dryer foram otimizados experimentalmente de acordo com a temperatura de ebulição do solvente, concentração da solução viscosa, tamanho das microesferas e formas desejadas monitoradas por microscopia eletrônica de varredura.

A primeira condição a ser controlada é a temperatura de entrada do aparelho spray-dryer a qual é definida como a temperatura de remoção do líquido pela rápida evaporação e, em seguida a temperatura de saída, responsável pela formação do ciclone. A vazão da solução a ser propelida depende da viscosidade da solução.

As microesferas do complexo ascorbato de ferro (II) – quitosana foram preparadas a partir da suspensão do item 4.5.1.3. com temperatura *inlet* 160 °C, aspiração 20 mL / min, fluxo 600 e temperatura *outlet* 70°C. O resultado foi a obtenção de um pó fino de coloração bordô com partículas de tamanho médio 10-18 µm.

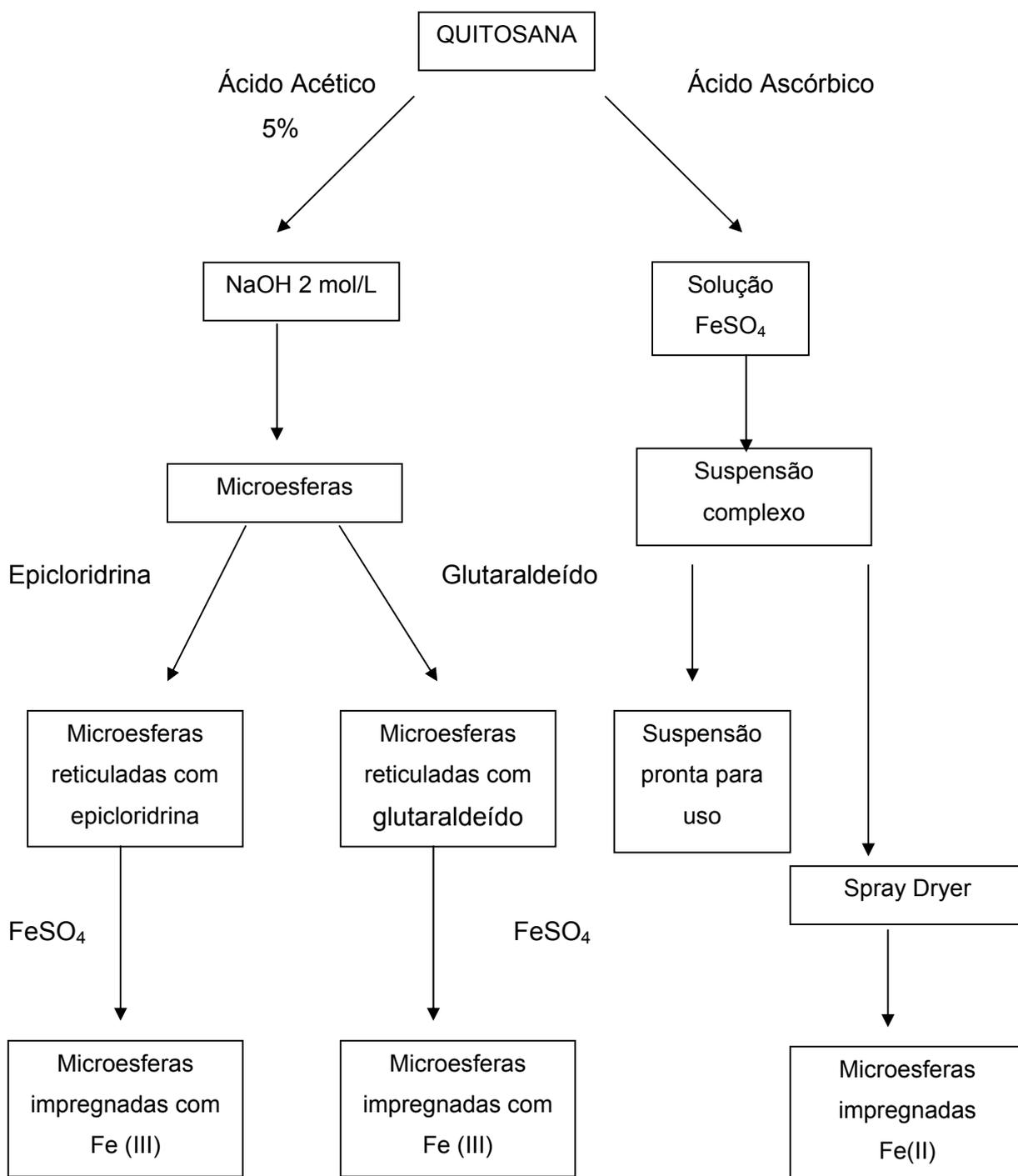


Figura 17. Representação esquemática da metodologia com a quitosana

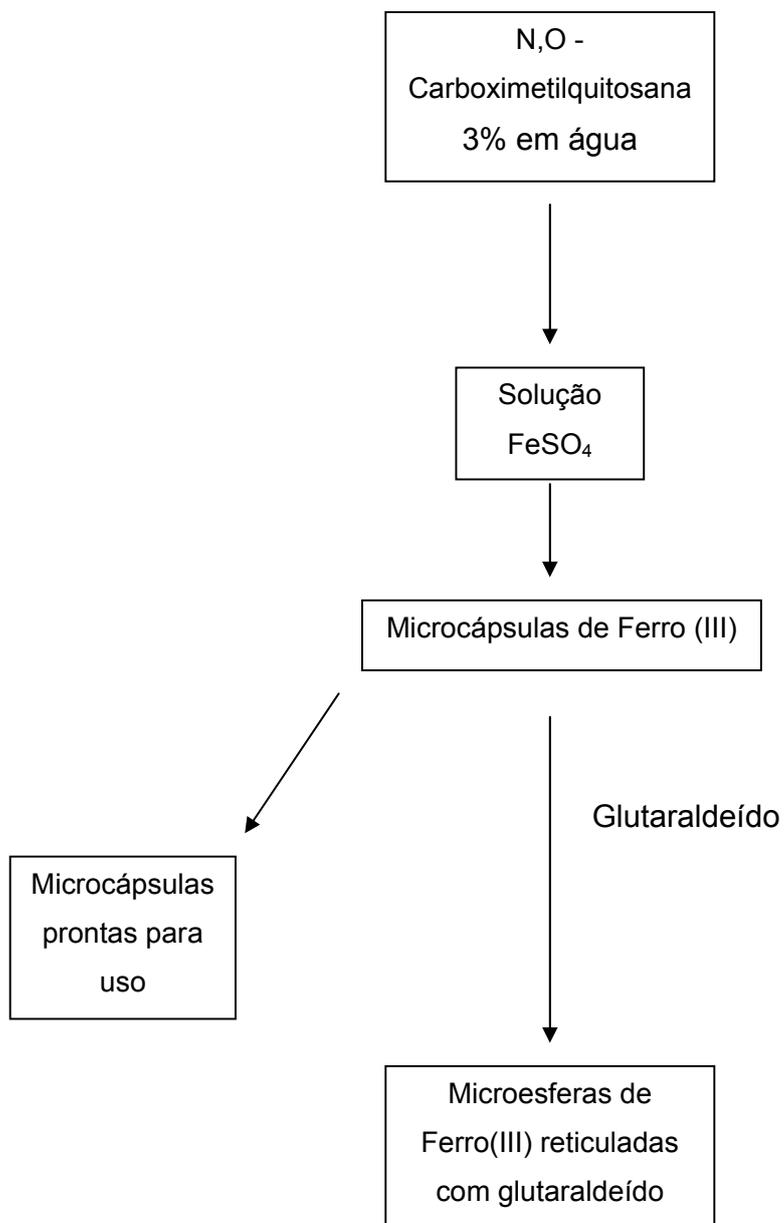


Figura 18. Representação esquemática da metodologia com a N,O-Carboximetilquitosana

4.5.2. Determinação do grau de reticulação (GR) antes da impregnação com ferro (III)

O grau de reticulação foi realizado pesando-se 1 g de microesferas / microcápsulas não reticuladas úmidas e 1 g de microesferas/ microcápsulas reticuladas úmidas. Estas, a seguir, foram secas em estufa a 50°C e pesadas novamente. O grau de reticulação foi calculado pela Equação 2.

$$GR = (m_2 - m_1) / m_1 \times 100 \quad (2)$$

Onde m_2 e m_1 correspondem às massas das micropartículas reticuladas secas e das micropartículas não reticuladas secas, respectivamente.

4.5.3. Determinação do Grau de Intumescimento (GI)

A determinação do grau de intumescimento foi realizada em soluções tampão pH 1,2, pH 6,8 e pH 9,0.

Inicialmente as microesferas foram secas em estufa, pesadas (100 mg) e mantidas nas soluções tampão de pH, a 37°C. A cada 10 minutos foram retiradas, secas em papel filtro e pesadas novamente. O grau de intumescimento de cada amostra no tempo t foi calculado pela Equação 3.

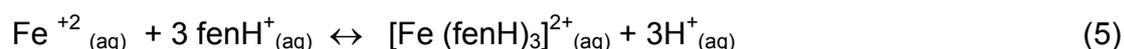
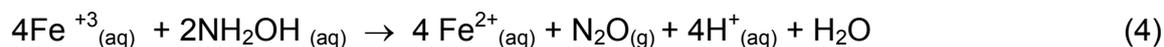
$$GI = (m_t - m_o) / m_o \quad (3)$$

onde m_t e m_o são as amostras pesadas no tempo t e no estado seco, respectivamente.

4.5.4. Determinação da concentração de ferro (II) e ferro (III) nas amostras

As microesferas foram trituradas e em seguida colocadas em ácido nítrico 0,1 mol/L sob agitação e aquecimento. O Fe(III) foi reduzido com cloridrato de hidroxilamina a Fe(II) e complexado com a 1,10 - fenantrolina (“fen”) para a formação do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ de estequiometria 1:3. O complexo absorve fortemente na região do visível ($\lambda_{\text{max}}=510\text{nm}$) e a concentração foi determinada através da curva de calibração previamente realizada com sulfato ferroso.

A reação de formação do complexo é descrita pelas reações:



A determinação da concentração sérica do ferro das amostras coletadas da cinética de liberação *in vivo* foi realizada através do método de Goodwin modificado (Labtest). Esta metodologia tem como princípio a dissociação dos íons férricos da transferrina por ação de um tampão de pH ácido que são reduzidos a íons ferrosos por ação da hidroxilamina. Após adição do Ferrozine[®] forma-se um complexo magenta brilhante cuja absorbância medida entre 540-580 nm, é proporcional a quantidade de ferro na amostra.

4.5.5. Estudos de Liberação

4.5.5.1. Estudo de Liberação *in vitro*

Este estudo foi realizado em um banho termostático a 37°C, com agitação horizontal em 100 rpm, onde foram colocados os sistemas contendo as microesferas/microcápsulas e volumes conhecidos de soluções tampão referente ao sistema trato gastrointestinal (TGI). As micropartículas permaneceram por 2 horas em pH 1,2. Alíquotas foram retiradas em tempos determinados sendo quantificadas por UV – vis mediante curva de calibração. As análises foram realizadas em triplicata.

4.5.5.2. Estudo de Liberação *in vivo*

4.5.5.2.a Animais

Nos ensaios biológicos foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos (250 ± 50 g de peso), com aproximadamente 70 dias. Os animais foram pesados e distribuídos em grupos de 6 indivíduos. Os mesmos permaneceram no laboratório por um período mínimo de 5 dias para adaptação, antes da realização dos experimentos, mantidos em gaiolas plásticas, sob temperatura ambiente controlada (± 25°C), com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo dieta comercial e água *ad libitum*. Antes do início de cada experimento, os animais permaneceram em jejum de 12 horas.

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)/UFSC sob o número n ° 23080.009607/2002 - 88, para a utilização dos animais, com o ofício de aprovação nº 149/CEUA/DAP/PRPG.

4.5.5.2.b Preparação das formulações

Preparação das suspensões

As suspensões de ascorbato de quitosana Fe(II) 7 mg/Kg e 20 mg/Kg foram preparadas conforme o item 4.5.1.3.

Preparação das pastas

As pastas de ascorbato de quitosana-Fe (II) foram preparadas a partir da suspensão do item 4.5.1.3, através da precipitação em acetona e conseqüente evaporação do solvente. Após, o ferro foi quantificado conforme item 4.5.4.

4.5.5.2.c Estratégia experimental

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a biodisponibilidade de diferentes preparações de ferro. Para dar início a esta investigação, foram feitos ensaios em ratos tratados com diferentes concentrações das formulações e escolha da formulação mais adequada (Fase I). A partir dos dados obtidos, foram realizados ensaios tempo/dependentes com uma concentração fixa do fármaco. Tais ensaios foram divididos em cinética curta (1 a 8 horas, Fase II) e longa (7, 14 e 28 dias, Fase III). Posteriormente, os tratamentos foram repetidos, porém utilizando animais anêmicos (Fase IV).

4.5.5.2.d Protocolo experimental

Fase I

Nesta fase grupos de 6 animais foram tratados por via oral durante 15 dias com: sulfato ferroso 20 mg / Kg (controle positivo), ascorbato de quitosana Fe (II) 20 mg / Kg na forma de suspensão, ascorbato de quitosana Fe (II) 20 mg / Kg na forma de pasta, ascorbato de quitosana Fe (II) 7 mg / Kg na forma de suspensão e um grupo sem tratamento (controle negativo) (Tabela 2). Após o período de tratamento, os animais foram anestesiados e 3 mL de sangue foi coletado por punção ocular, centrifugado em aparelho de marca Sigma laborzentrifugen GmH 3600 Osterode, modelo 2-15, rotor 11192 (2500 rpm, 8 minutos) e o soro separado para determinação da concentração de ferro.

Tabela 2. Protocolo do tratamento *in vivo* fase I

| Grupos (6 animais) | Complexo | Concentração | Forma de Administração |
|-----------------------|--------------------------|--------------|---------------------------|
| 1 | Controle negativo | - | - |
| 2 | Sulfato ferroso | 20 mg / Kg | Solução |
| 3 | Ascorbato de QTS-Fe (II) | 20 mg / Kg | Suspensão |
| 4 | Ascorbato de QTS- Fe(II) | 7 mg / Kg | Suspensão |
| 5 | Ascorbato de QTS-Fe (II) | 20 mg / Kg | Pasta |

Fase II

Nesta fase grupos de 6 animais foram tratados por via oral com: sulfato ferroso 20 mg / Kg (controle positivo), ascorbato de quitosana Fe (II) 20 mg / Kg na forma de pasta e um grupo sem tratamento (controle negativo). Após 1,2,3,4,5,6 e 8 horas de tratamento, os animais foram anestesiados e 1 mL de sangue foi coletado por punção ocular, centrifugado (2500 rpm, 8 minutos) e o soro separado para determinação da concentração de ferro.

Fase III

Nesta fase grupos de 6 animais foram tratados por via oral com: sulfato ferroso 20 mg / Kg (controle positivo), ascorbato de quitosana Fe (II) 20 mg / Kg na forma de pasta e um grupo sem tratamento (controle negativo) (Tabela 3). Após 7,14,e 28 dias de tratamento, os animais foram anestesiados e 3 mL de sangue foi coletado por punção ocular, centrifugado (2500 rpm, 8 minutos) e o soro separado para determinação da concentração de ferro.

Tabela 3. Protocolo do tratamento *in vivo* fase III

| Grupos (6 animais) | Concentração (mg / Kg) | Tempo (dias) |
|-----------------------|---------------------------|-----------------|
| 1 | Controle negativo | 7 |
| 2 | Controle Negativo | 28 |
| 3 | 10 | 14 |
| 4 | 20 | 14 |
| 5 | 20 | 28 |
| 6 | 20 | 7 |

Fase IV

Nesta fase grupos de 6 animais anêmicos foram tratados por via oral durante 15 dias com: sulfato ferroso 20 mg / Kg (controle positivo), ascorbato de quitosana Fe (II) 20 mg / Kg na forma de pasta e um grupo sem tratamento (controle negativo). As gaiolas foram trocadas duas vezes ao dia para evitar a coprofagia. Ao término do tratamento, os animais foram anestesiados e 3 mL de sangue foram coletados por punção ocular, centrifugado (2500 rpm, 8 minutos) e o soro separado para determinação da concentração de ferro. Foram determinados o teor de hemoglobina e o hematócrito dos animais para acompanhar o processo de anemia.

A anemia foi induzida nos animais por um pré-tratamento de 45 dias com uma dieta com ausência em ferro conforme metodologia proposta pelo Instituto Americano de Nutrição (AIN 93-G) (Tabelas 4,5 e 6) (REEVES et al., 1993).

Tabela 4 – Composição da dieta AIN – 93 G

| COMPONENTES | g / Kg de RAÇÃO |
|----------------------------------|------------------------|
| Amido de Milho | 397,5 |
| Caseína | 200 |
| Dextrina | 132 |
| Sucrose | 100 |
| Óleo de Soja | 70 |
| Fibra | 50 |
| Mistura Mineral (AIN 93 – MX) | 35 |
| Mistura Vitamínica (AIN -93 –VX) | 10 |
| Cistina | 3 |
| Bitartrato de colina | 2,5 |
| Tert-butilhidroquinona | 0,014 |

Fonte: REEVES et al., 1993

Tabela 5- Composição da mistura mineral (AIN-93 – MX)

| MISTURA MINERAL | mg / Kg de RAÇÃO |
|------------------------|-------------------------|
| Cálcio | 5000 |
| Fósforo | 1561 |
| Potássio | 3600 |
| Enxofre | 300 |
| Sódio | 1019 |
| Cloro | 1571 |
| Magnésio | 507 |
| Ferro * | 35 |
| Zinco | 30 |
| Manganês | 10 |
| Cobre | 6 |
| Iodo | 0,2 |
| Molibdênio | 0,15 |
| Selênio | 0,15 |
| Silício | 5 |
| Cromo | 1 |
| Flúor | 1 |
| Níquel | 0,5 |
| Bório | 0,5 |
| Lítio | 0,1 |
| Vanadium | 0,1 |

*Na preparação da ração para os ratos anêmicos, a concentração de ferro da mistura mineral foi 0,0 mg /Kg.

Fonte: REEVES et al., 1993

Tabela 6 – Composição da mistura vitamínica (AIN-93 VX)

| VITAMINA | U / Kg de RAÇÃO |
|-------------------------------|------------------------|
| Ácido nicotínico, mg | 30 |
| Pantotenato, mg | 15 |
| Piridoxina, mg | 6 |
| Tiamina, mg | 5 |
| Riboflavina, mg | 6 |
| Ácido fólico, mg | 2 |
| Vitamina K, µg | 750 |
| D-Biotina, µg | 200 |
| Vitamina B ₁₂ , µg | 25 |
| Vitamina A, UI | 4000 |
| Vitamina D ₃ , UI | 1000 |
| Vitamina E, UI | 75 |

Fonte: REEVES et al., 1993

4.5.5.2.e Determinação de ferro no sangue

A concentração de ferro no soro foi avaliada conforme metodologia proposta por Malley e col. Neste método, o ferro ligado a transferrina, em meio ácido, se dissocia em íon férrico que é reduzido à forma de íon ferroso por ação da hidroxilamina. Após adição de ferrozina, forma-se um composto magenta, medido espectrofotometricamente em 560 nm, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de ferro presente na amostra (MALLEY et al., 1970).

4.5.5.2.f Análise estatística

As análises estatísticas dos dados obtidos foram realizadas através de análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste de Tukey-Kramer. Para tal utilizou-se o software INSTAT (GrahPad, San Diego, CA, USA) admitindo níveis de significância de $p < 0,05$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$.

5. Resultados e Discussão

5.1. Caracterização da quitosana e carboximetilquitosana

5.1.1. Espectroscopia de Infravermelho

A Figura 19 mostra uma comparação dos espectros de infravermelho da quitosana (a) e da carboximetilquitosana (b).

A quitosana apresenta banda característica na região de 3423 cm^{-1} que corresponde ao estiramento O-H e 2876 cm^{-1} do estiramento C-H. As bandas 1650 cm^{-1} e 1598 cm^{-1} correspondem às vibrações de estiramento C=O de amida e às deformações N-H da amina primária, respectivamente. A banda de 1381 cm^{-1} é atribuída ao C-H do grupo CH_3 referente a acetamida, indicando que a quitosana não é totalmente desacetilada. Em 1077 cm^{-1} , apresenta-se a banda característica da vibração de estiramento de CH-OH (CHEN & PARK, 2003; CHEN et al., 2004).

Em contraste, a carboximetilquitosana apresenta um espectro com bandas na região de 1592 e 1418 cm^{-1} características do grupo carboxil ($\nu_{\text{as}}\text{ COO}^-$ e $\nu_{\text{s}}\text{ COO}^-$) indicando que a carboximetil está inserido na quitosana. Estes resultados concordam com Po e col (Zhao et al., 2002; PO et al., 2004).

Além disso, nos espectros da quitosana e carboximetilquitosana, os picos observados em 1070 cm^{-1} e 1027 cm^{-1} são correspondentes ao estiramento CH-OH e $\text{CH}_2 - \text{OH}$, respectivamente. Sendo que o grupo hidroxila secundária não foi influenciado pela modificação na quitosana, a intensidade do pico de 1070 cm^{-1} pode atuar como um controle interno.

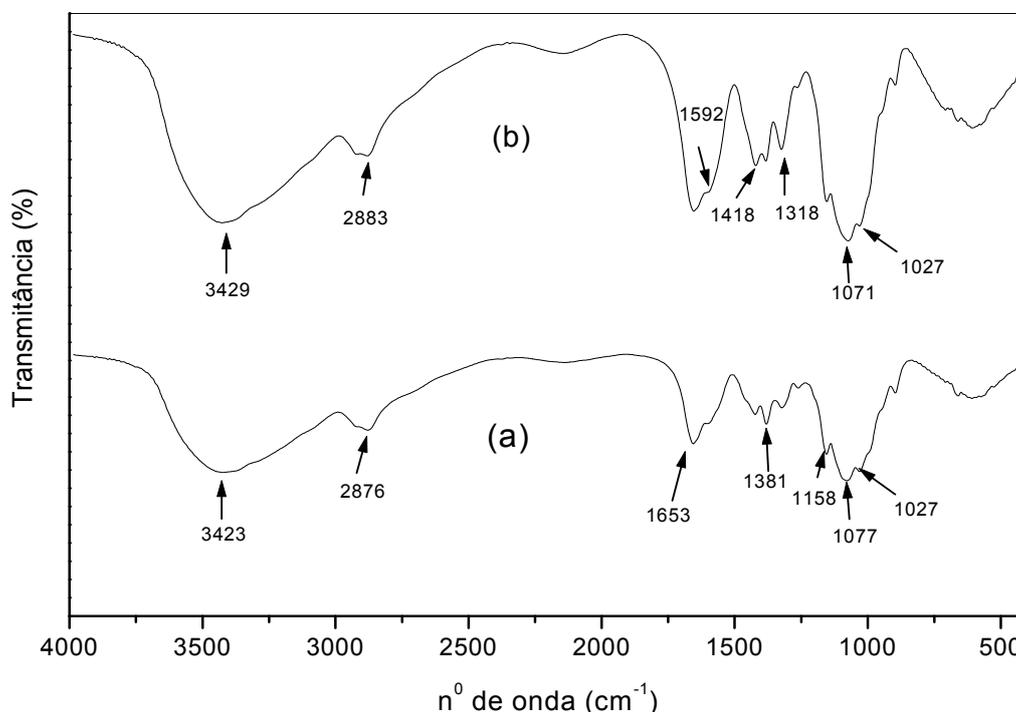


Figura 19. Espectros na região de Infravermelho, em pastilha de KBr : a - Quitosana; b – N,O-Carboximetilquitosana

5.1.2. Espectroscopia de ressonância nuclear de carbono -13 (RMN ^{13}C)

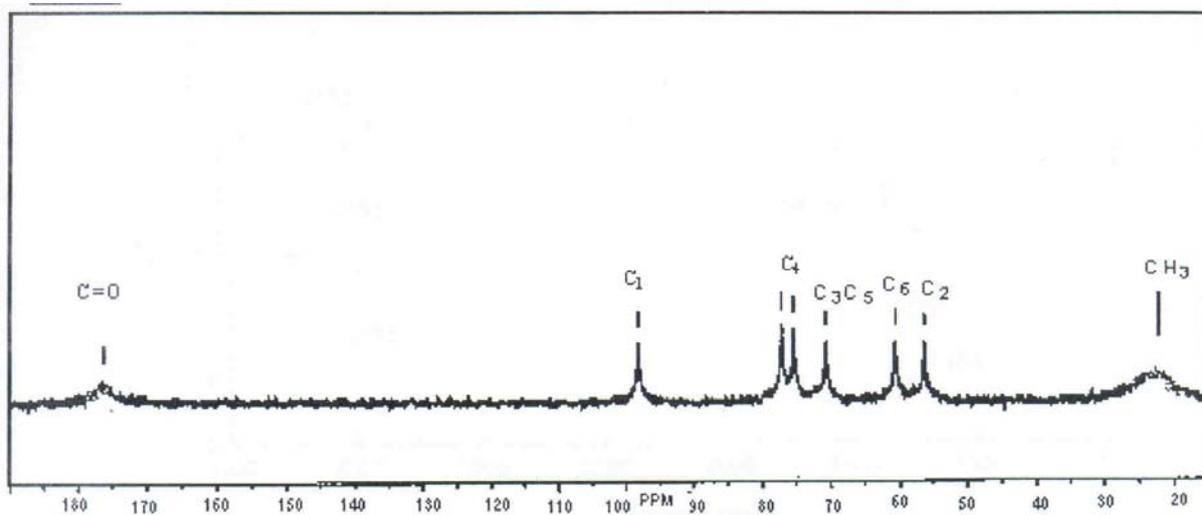
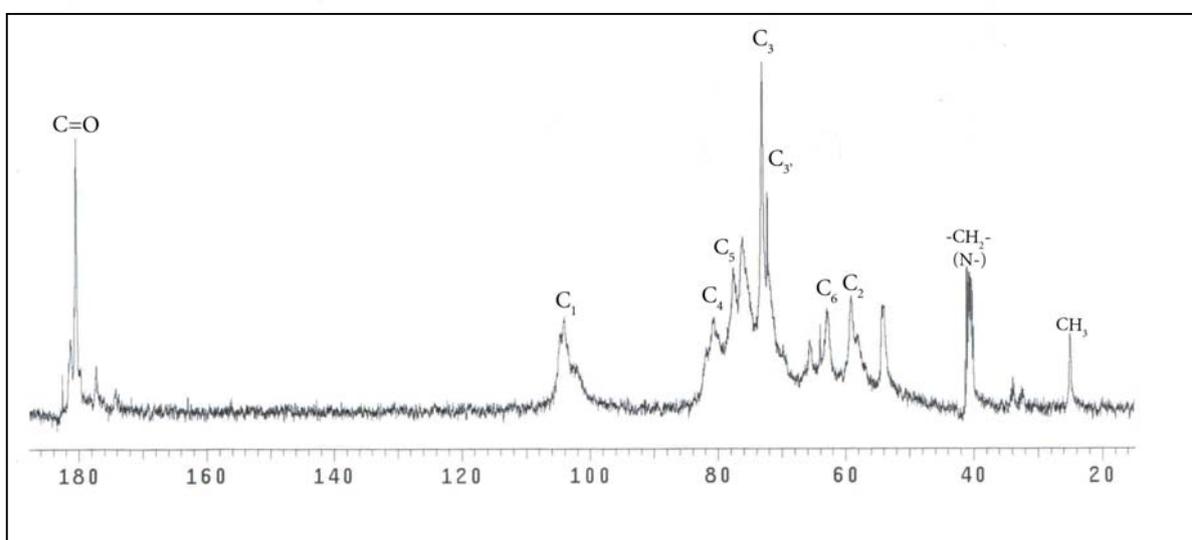
As Figuras 20 e 21 mostram os espectros de RMN ^{13}C da carboximetilquitosana em D_2O comparada com a quitosana original em $\text{CD}_3\text{COOD}/\text{D}_2\text{O}$.

Na Figura 20 foi observado um deslocamento químico do carbono anomérico C_1 em 98 ppm estando bem afastado dos demais sinais. Os dois sinais próximos de 77 ppm estão relacionados ao C_4 . O deslocamento na faixa de 70 ppm é relacionado aos carbonos C_3 e C_5 . O sinal de 60 ppm é característico do carbono primário do álcool e os sinais ao redor de 56 ppm são atribuídos ao carbono C_2 .

Os sinais com deslocamento em torno de 178 ppm e 20 ppm estão relacionados ao carbono do grupo $\text{C}=\text{O}$ e ao grupo CH_3 , respectivamente, corroborando com os dados obtidos pelo Infravermelho que a quitosana não é totalmente desacetilada (LONGHINOTTI et al., 1996).

A confirmação da carboximetilação da quitosana é fornecida pelo espectro de RMN ^{13}C representado na Figura 21. O sinal para o carbono C_1 tem deslocamento de 98 ppm para 104 ppm devido ao efeito da retirada de elétrons dos grupos hidroxilas substituintes. Os sinais 59,1 (C_2), 73,1 (C_3), 72,3 (C_3'), 80,6 (C_4), 77,6 (C_5), e 64 (C_6) ppm são detectados. Os três deslocamentos químicos em torno de 73,1, 72,3 e 41,2 ppm estão assinalando a substituição de grupos $-\text{CH}_2\text{COOH}$ na OH do carbono 6, OH do carbono 3 e NH-2 indicando que há três possíveis locais para a carboximetilação da quitosana. O deslocamento em torno de 180 ppm está relacionado ao $\text{C}=\text{O}$. O sinal em 54,3 ppm assinala a presença de $-\text{CH}_2-$. O sinal em 73,1 ppm (C_3) está dividido em dois picos devido provavelmente a reação de carboximetilação com a hidroxila ($-\text{OH}$) do carbono 3.

Estas evidências suportam que a reação de carboximetilação ocorreu em parte nos grupos hidroxilas assim como nos grupos amino (ZHAO, et al., 2002; CHEN et al., 2003)

Figura 20: Espectro de RMN ^{13}C da quitosanaFigura 21. Espectro de RMN ^{13}C da carboximetilquitosana

5.2. Caracterização dos complexos orgânico – minerais.

5.2.1. Complexos de Fe (III)

5.2.1.1. Grau de reticulação

Os agentes reticulantes usados ligam - se em diferentes grupos da quitosana. Os grupos aldeídos do glutaraldeído formam iminas com os grupos amino da quitosana devido a ressonância estabelecida com ligações etilênicas adjacentes via reação de base de Schiff enquanto que, a epicloridrina liga-se através dos átomos de carbono, resultantes da ruptura do anel epóxi e da remoção do cloro, com os grupos hidroxila do carbono 6 da quitosana (NAGH et al., 2002; BERGER et al., 2004; GONÇALVES et al., 2005).

Após o processo de reticulação com epicloridrina (QTS-Epi) ou glutaraldeído (QTS-Glu) o grau de reticulação foi determinado, obtendo-se valores de 27% e 63% para as microesferas QTS-Epi e QTS-Glu, respectivamente.

Para as microesferas CMQ-Glu-Fe(III) formadas o grau de reticulação foi de 23%. Quando o grau de reticulação é comparado em relação ao das microesferas de quitosana verificamos que o valor obtido para as CMQ-Glu-Fe(III) é inferior devido a menor disponibilidade de grupos amino livres pela presença da carboximetilação e do ferro incorporados nas cadeias poliméricas.

5.2.1.2. Grau de intumescimento

O mecanismo de intumescimento em $\text{pH} < 6$ envolve a protonação dos grupos amino da quitosana e relaxamento da estrutura devido à repulsão das cadeias poliméricas e a dissociação de interações secundárias (ligações de hidrogênio) seguido do intumescimento (HEJAZI & AMIJI, 2003; KIM, et al., 2000).

As microesferas QTS-Epi e QTS-Glu permaneceram em soluções tampão similares ao TGI (pH 1,2, 6,8 e 9,0) por 60 minutos a 37°C e foram rapidamente secas e pesadas para a determinação do grau de intumescimento. Os gráficos do intumescimento das microesferas reticuladas, QTS-Epi e QTS-Glu, estão representados nas Figuras 22 e 23, respectivamente.

Podemos observar que há um maior intumescimento em pH 1,2 das microesferas QTS-Epi devido a sua preferência por ligação em grupos hidroxila, deixando os grupos amino livres para protonação, sendo seguido do pH 6,8 e 9,0, o que confirma que a estrutura de reticulação com a epícloridrina é quimicamente estável.

Para as microesferas reticuladas com glutaraldeído (QTS-Glu), verificamos um comportamento diferente. Ocorre um aumento gradativo do grau de intumescimento em pH 1,2 enquanto que para os demais valores de pH o intumescimento é constante. Isto, provavelmente, é devido a hidrólises parciais das ligações imino das bases de Schiff resultando em grupos amino livres novamente. Os mecanismos de hidrólises da base de Schiff em meios ácidos ou básicos são conhecidos. Gráficos que relacionam pH e velocidade de hidrólise mostram uma menor velocidade para pH >8,9 e mais rápida e forte para pH < 3,5 (EL- TAHER et al., 2001; GONÇALVES et al., 2005).

Outro fator importante que influencia negativa ou positivamente no intumescimento é o grau de reticulação. Um maior grau de reticulação leva a uma diminuição da capacidade da quitosana de formar pontes de hidrogênio com a água e também da capacidade de relaxamento da estrutura (BERGER et al., 2004). Porém, considerando os efeitos da hidrólise ácida das microesferas QTS-Glu, o grau de reticulação é essencial para manutenção da integridade das microesferas evitando erosão das mesmas e liberação dos fármacos em locais indesejáveis para a absorção e conseqüentes efeitos adversos.

O grau de intumescimento para as microesferas de CMQ- Fe(III) foi realizado como já descrito anteriormente. A Figura 24 apresenta o grau de intumescimento das microesferas CMQ-Glu-Fe(III). As microesferas intumescem em pH 1,2 e também em pH 6,8 e 9,0 por causa da presença tanto de grupos amino e carboxilas e deste modo formam uma rede com estruturas carregadas opostamente as quais podem mudar a carga de grupos iônicos variando o pH. No caso do pH 1,2 as cargas dominantes são

os grupos aminos protonados. No caso de pH 6,8 e 9,0 as cargas dominantes são os grupos carboxilatos desprotonados.

Sendo assim a N,O-CMQ intumescce devido ao aumento da mobilidade de íons dentro do polímero e uma maior pressão osmótica causa o intumescimento. Para as microcápsulas CMQ-Fe(III) o grau de intumescimento não foi realizado devido a dissolução da CMQ em pH 1,2, 6,8 e 9,0.

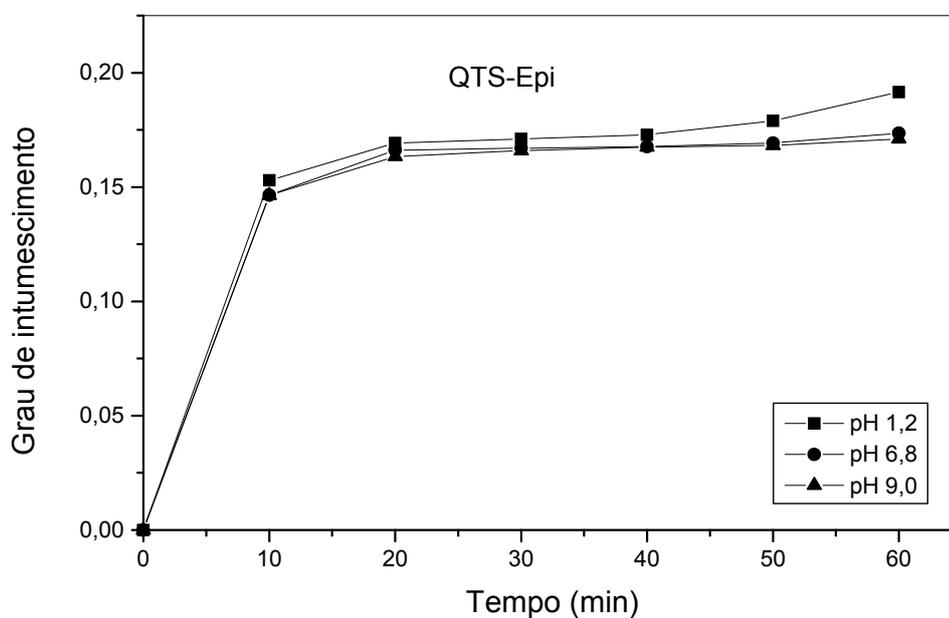


Figura 22. Grau de intumescimento das microesferas de quitosana reticuladas com epiclorigrina em diferentes valores de pH, realizado em triplicata

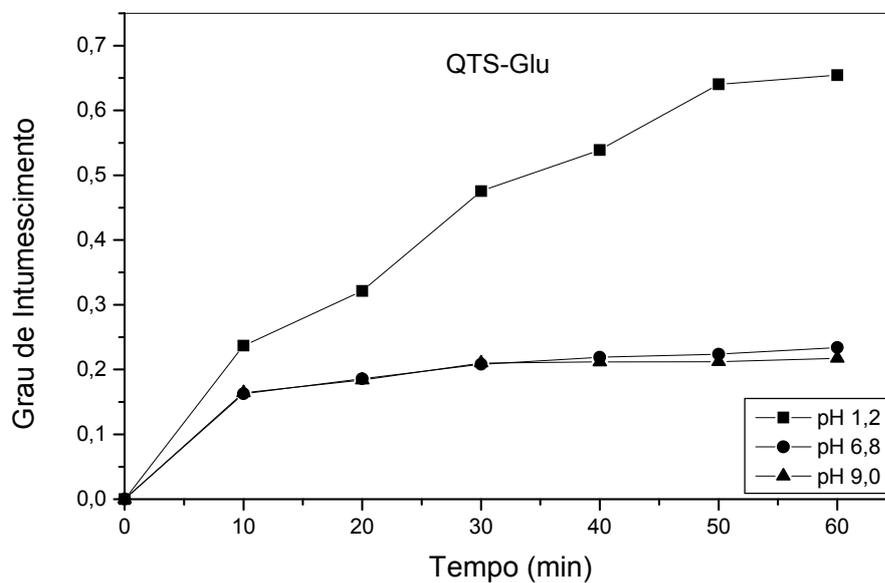


Figura 23. Grau de intumescimento das microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído em diferentes valores de pH, realizado em triplicata.

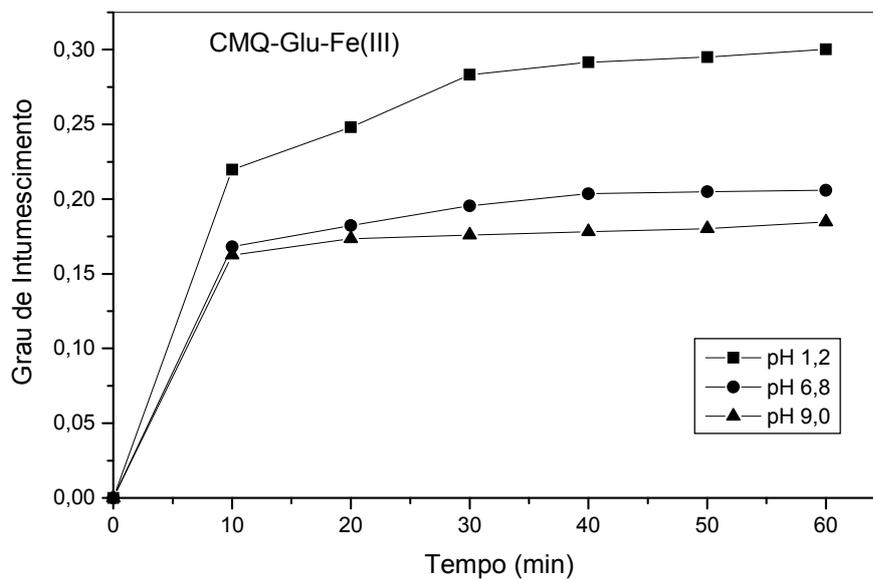


Figura 24. Grau de intumescimento das microesferas N,O-CMQ reticuladas com glutaraldeído em diferentes valores de pH, realizado em triplicata.

5.2.1.3. Determinação da concentração de ferro nas micropartículas dos complexos QTS-Epi-Fe(III), QTS –Glu- Fe(III), CMQ-Fe(III) e CMQ-Glu-Fe(III)

Depois de preparadas, as microesferas reticuladas permaneceram por 24 horas em solução saturada de sulfato ferroso para o processo de impregnação resultando as microesferas QTS-Epi- Fe(III) e QTS –Glu - Fe(III).

As micropartículas CMQ- Fe(III) foram preparadas pelo processo de coacervação salina a partir da adição de uma solução aquosa de N,O-CMQ 3% (m/v) em solução saturada de sulfato ferroso. As microcápsulas formadas foram posteriormente reticuladas com glutaraldeído resultando nas microcápsulas CMQ-Glu-Fe(III). A concentração de ferro das micropartículas foi determinada após abertura das amostras e leitura espectrofotométrica em UV-vis a 510 nm. Os resultados obtidos foram de 25,6 mg / g seca para QTS-Epi-Fe(III), 31,3mg / g seca para QTS-Glu-Fe(III), 91,4 mg / g seca para CMQ-Fe(III) e 67 mg / g seca para CMQ-Glu-Fe(III).

Realmente, a introdução dos grupos carboxilatos na cadeia da quitosana traz novos grupos funcionais muito reativos para os íons de metais via mecanismo de quelação, além das amins primárias e secundárias. Portanto, o aumento na concentração de ferro nas microesferas de carboximetilquitosana pode ser atribuído a um processo de adsorção de íon metálico envolvendo ligações coordenadas com ligantes carboxilatos, aminos e hidroxilas do polímero (PENICHE-COVAS et al., 1992; VON WIRÉN et al., 2000).

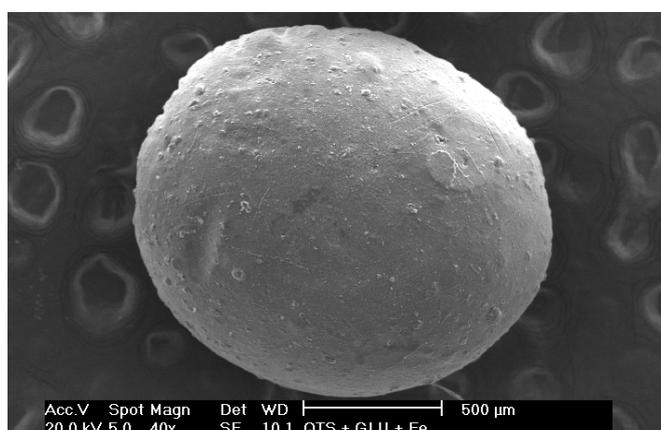
A teoria de ácidos e bases moles e duros fornece a descrição das capacidades dos íons de preferir ligantes de algum tipo (macio-macio, duro-duro) a aqueles tipos diferentes quando formando ligações coordenadas. Íons moles geralmente vão pela sua polarizabilidade e duros com seus campos eletrostáticos (GUIBAL, 2004).

Muitos estudos de quelação envolvendo íons de metais, principalmente cobre, e quitosana utilizam mecanismos tipo “bridge model” e “pendant model”. No primeiro os íons estão ligados com muitos grupos amino da mesma cadeia ou diferentes cadeias, via complexação inter- intra molecular. O oposto “pendant model”, o metal é ligado ao grupo amino de maneira pendente.

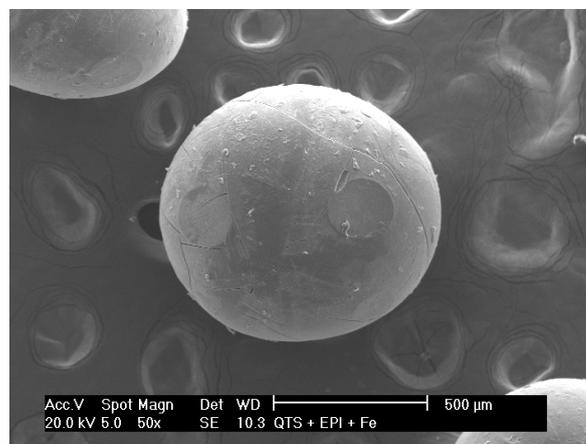
Grupos amino são extremamente reativos com íons metálicos, pois os átomos de nitrogênio apresentam pares de elétrons livres que podem reagir com os cátions metálicos. Metais catiônicos podem ser adsorvidos por quelação nos grupos amino da quitosana em soluções de pH próximo a neutro. Na verdade, o número total de grupos amino livres não está necessariamente acessível à interação com o metal. Alguns desses sítios estão envolvidos em pontes de hidrogênio (intra ou intermolecular) (GUIBAL, 2004).

5.2.1.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos complexos de Ferro (III)

A superfície e morfologia externa e interna das microesferas de QTS-Glu-Fe (III) estão apresentadas na Figura 25a e das microesferas de QTS-Epi-Fe (III) na Figura 25b em ampliação de 40 e 50 vezes, respectivamente. As microesferas QTS-Glu-Fe (III) e QTS-Epi-Fe (III) formadas são estruturas monolíticas esféricas e apresentam tamanho médio, calculado a partir da média de três micrografias contendo cada uma aproximadamente 20-25 microesferas, de 0,790 μm e 1,344 μm , respectivamente conforme parâmetros tais como: tamanho da agulha de gotejamento, tempo e velocidade de gotejamento.



(a)



(b)

Figura 25. Fotomicrografias das microesferas de QTS-Glu-Fe(III) (a) e da microesferas de QTS-Epi-Fe(III)(b).

A Figura 26a mostra as fotomicrografias das micropartículas do complexo CMQ-Fe(III) e a Figura 26b do CMQ-Glu-Fe(III) em ampliação de 25 e 50 vezes, respectivamente. Uma estrutura externa homogênea é observada para as microesferas CMQ-Glu-Fe(III), enquanto que uma superfície rugosa e porosa com forma esférica deformada é revelada para as microcápsulas CMQ-Fe(III). Os tamanhos médios foram 0,841 e 0,816 mm, para as micropartículas CMQ-Fe(III) e CMQ-Glu-Fe(III), respectivamente. A diferença na morfologia entre as micropartículas CMQ-Fe(III) e CMQ-Glu-Fe(III) confirma o processo de reticulação, tornando a microesfera reticulada mais resistente mecanicamente e conseqüente fechamento do núcleo.

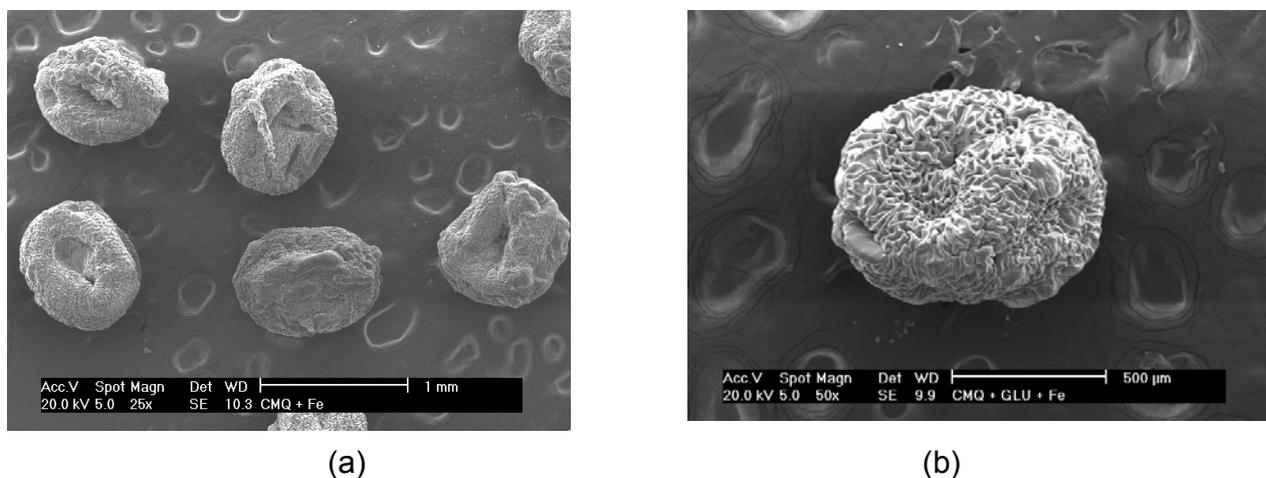


Figura 26. Fotomicrografias das microcápsulas de CMQ-Fe(III) (a) e da microsferas de CMQ-Glu-Fe(III)(b).

A Figura 27a mostra a secção cruzada da micropartícula de QTS-Glu-Fe(III) com ampliação de 50 vezes, onde se pode observar claramente a estrutura sólida compacta e homogênea de uma microsfera monolítica, enquanto a micropartícula seccionada de CMQ-Glu-Fe(III) (Figura 27b) ampliada 60 vezes, evidencia a formação de uma microcápsula com núcleo bem definido. Em ambas micropartículas o ferro encontra-se impregnado internamente e externamente nos materiais poliméricos coacervados.

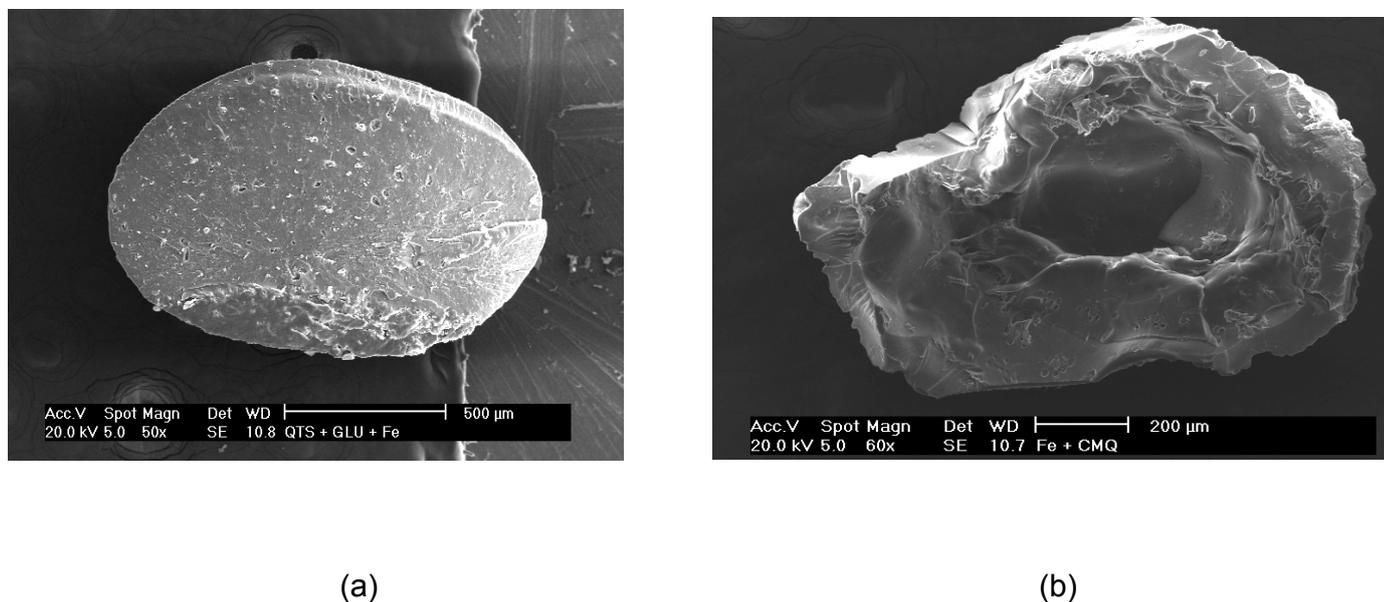


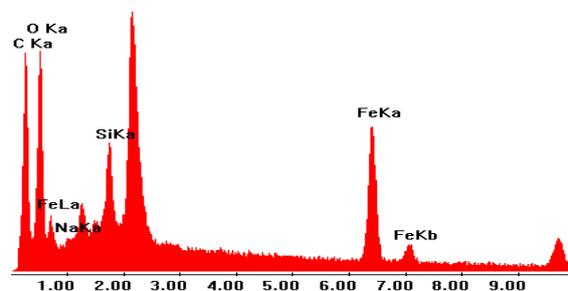
Figura 27. Fotomicrografias das micropartículas seccionadas de ferro(III)-QTS reticulada com glutaraldeído (a) e de ferro(III)-N,O-CMQ (b).

5.2.1.5. Energia Dispersiva de Raios-X (EDX) dos complexos de Ferro(III)

A incorporação do íon Ferro (III) nas microesferas de quitosana reticuladas e nas micropartículas de N,O-carboximetilquitosana foi confirmada de forma qualitativa pela técnica de Energia Dispersiva de Raios-X (EDX).

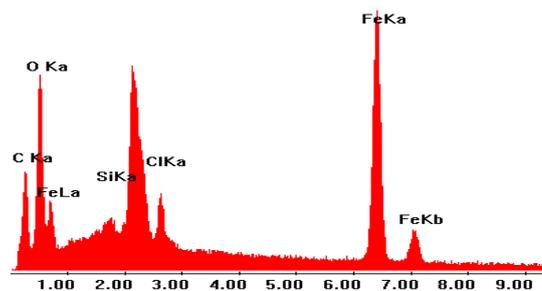
A composição química da superfície da amostra de microesferas QTS-Glu-Fe(III) e QTS-Epi-Fe(III) foi analisada pela técnica de EDX, cujos espectros referentes à microanálise química pontual são ilustrados nas Figuras 28 a-b.

Label A: QTS + GLU + Fe



(a)

Label A: QTS + EPI + Fe

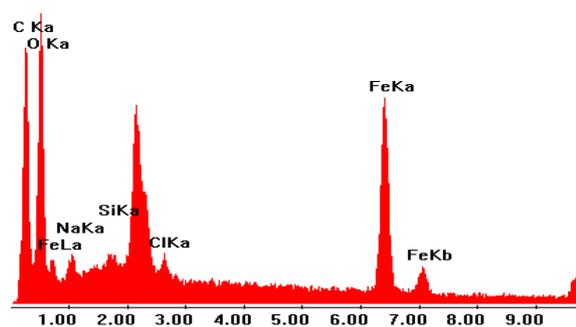


(b)

Figura 28. Microanálise química pontual das microesferas QTS – Fe(III) reticuladas com glutaraldeído (a) e microesferas QTS – Fe(III) reticuladas com epícloridrina (b).

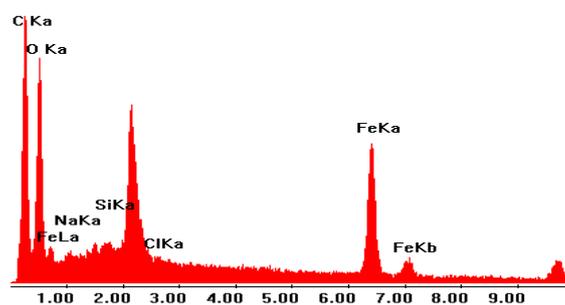
Similarmente, a composição química da superfície da amostra de micropartículas CMQ-Fe(III) e CMQ-Glu-Fe(III) foi analisada por EDX através dos espectros ilustrados nas Figuras 29 a-b.

Label A: CMQ + Fe



(a)

Label A: CMQ + GLU + Fe



(b)

Figura 29. Microanálise química pontual das microcápsulas de N,O-CMQ – Fe(III) (a) e microesferas N,O-CMQ – Fe(III) reticuladas com glutaraldeído (b)

5.2.1.6. Espectroscopia de Infravermelho

As Figuras 30, 31 e 32 apresentam os espectros de infravermelho da quitosana e dos complexos QTS-Epi-Fe (III) e QTS-Glu-Fe(III).

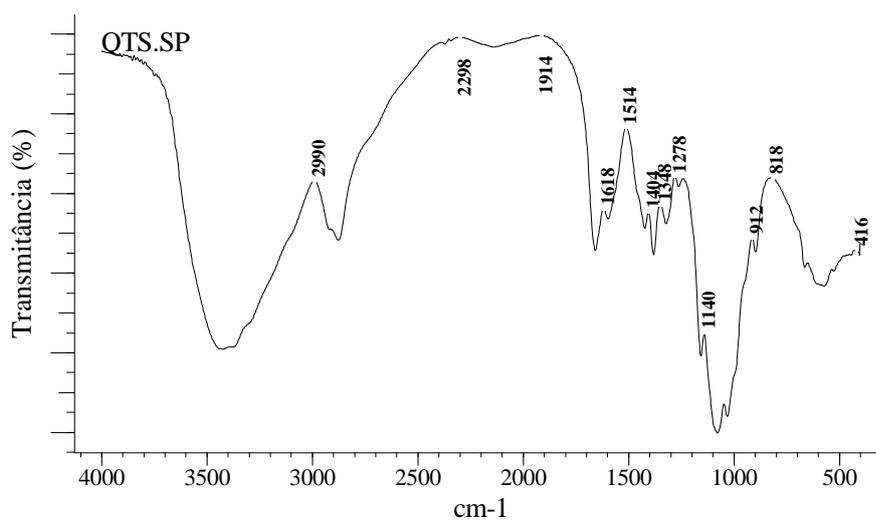


Figura 30. Espectro na região de Infravermelho da quitosana em pastilha de KBr.

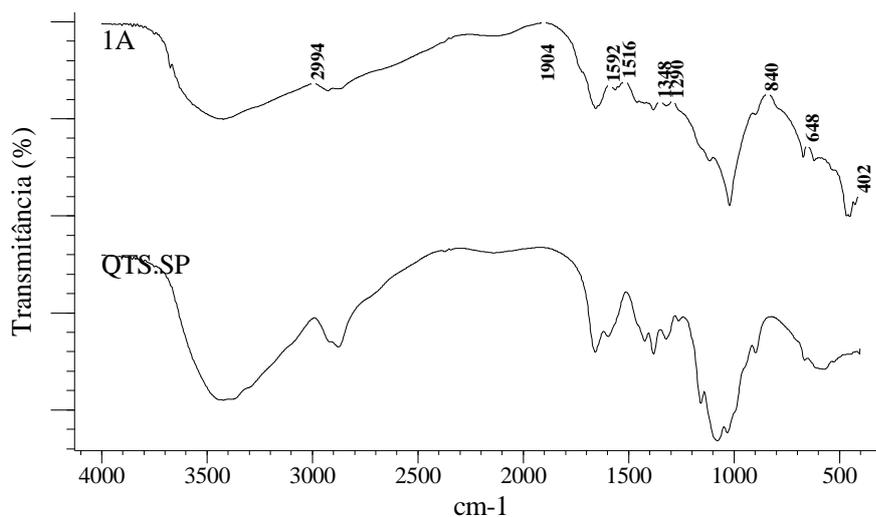


Figura 31. Espectro na região de Infravermelho da quitosana e das microesferas de QTS-Fe(III) reticuladas com epiclorigrina em pastilha de KBr.

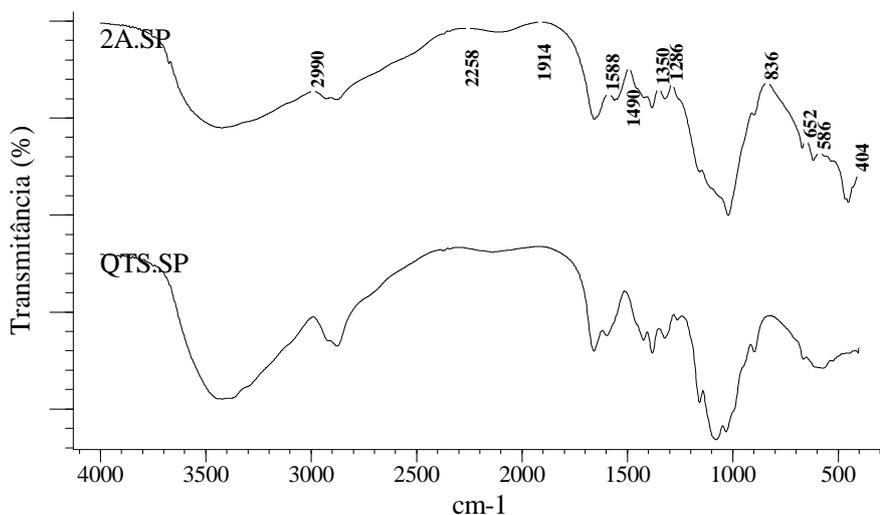


Figura 32. Espectro na região de Infravermelho da quitosana e das microesferas de QTS-Fe(III) reticuladas com glutaraldeído em pastilha de KBr.

Os grupos OH presentes na QTS são claramente vistos em 3423 cm^{-1} e estão presentes também no caso das microesferas reticuladas.

A complexação de grupos amida ao íon ferro(III) pode ser verificada através dos espectros infravermelho das microesferas de quitosana reticulada-ferro (III). Estes espectros mostram que a complexação não induziu grandes mudanças nas bandas de absorção no infravermelho da quitosana reticulada. Entretanto, os espectros das microesferas QTS-ferro (III) mostram bandas de absorção em 1592 e 1588 cm^{-1} para as microesferas QTS-Epi-Fe(III) e QTS-Glu-Fe(III), respectivamente. Em contraste, o espectro da quitosana reticulada mostra uma banda de carbonila de amida em 1650 cm^{-1} . Assim, pode-se concluir que a banda de carbonila da amida foi deslocada para menor frequência sob complexação, sugerindo que este deslocamento indica que o grupo amida está possivelmente coordenado ao íon férrico (MARLIN, D.S. & MASCHARAK, 2000).

As Figuras 33, 34 e 35 apresentam os espectros de infravermelho da N,O-carboximetilquitosana e dos complexos N,O-CMQ – Fe (III) e N,O-CMQ – Glu- Fe (III).

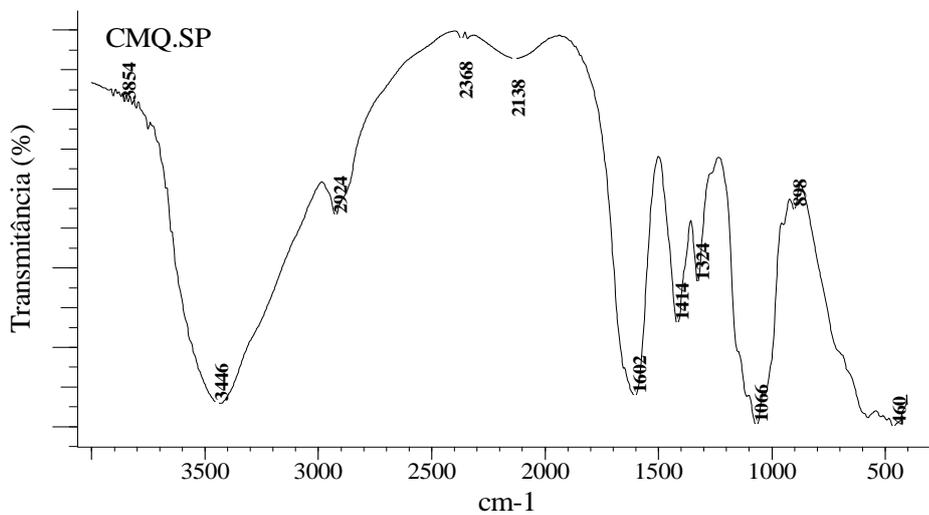


Figura 33. Espectro na região de Infravermelho da N,O- carboximetilquitosana em pastilha de KBr

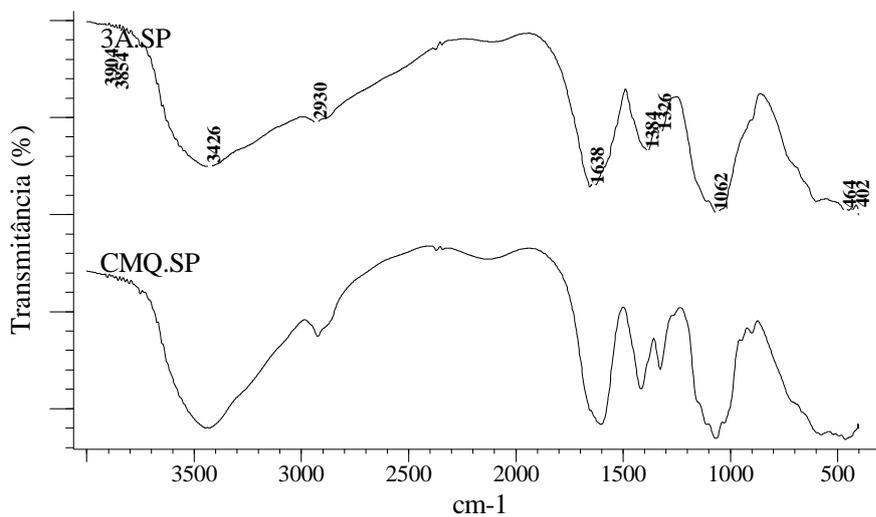


Figura 34. Espectro na região de Infravermelho da N,O- carboximetilquitosana e das microcápsulas de N,O-CMQ Fe(III) em pastilha de KBr

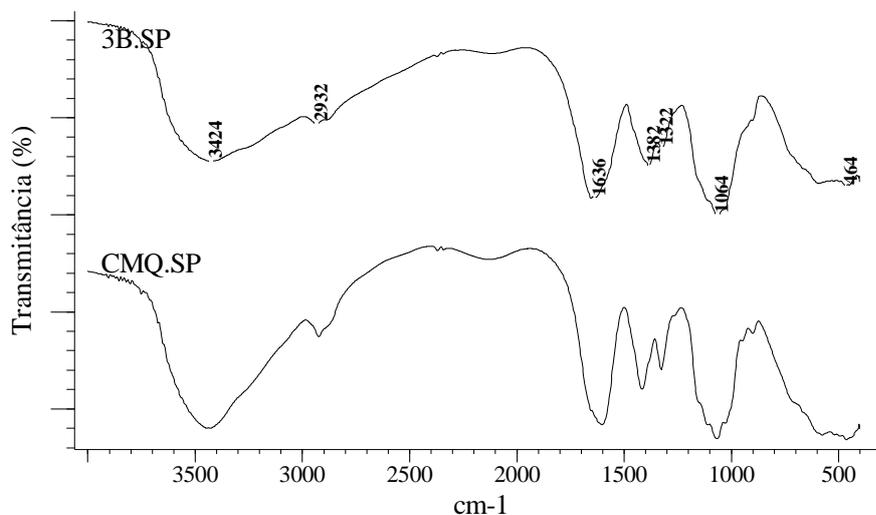


Figura 35. Espectro na região de Infravermelho da N,O- carboximetilquitosana e das microesferas de N,O-CMQ Fe(III) reticuladas com glutaraldeído em pastilha de KBr

Essas figuras mostram alterações significativas nos espectros da N,O-CMQ e das amostras CMQ-Fe(III) e CMQ-Glu-Fe(III), nas regiões $1460-1300\text{ cm}^{-1}$ (COO^-), $1300-1200$ e $1120 - 1020\text{ cm}^{-1}$ (C-O) sugerindo interações Fe-carboxilato.

Os espectros para as amostras CMQ-Fe(III) e CMQ-Glu-Fe(III), apresentam similaridade indicando que o glutaraldeído não compete pelo grupo amino, sendo o sítio de ligação do ferro os grupos carboxilatos da CMQ. Apesar dos espectros indicarem o envolvimento dos carboxilatos livres para a complexação com o Fe (III), é antecipado que tal coordenação forneça pequena influência na formação de micropartículas resistentes mecanicamente o que justifica a posterior reticulação com o glutaraldeído para a formação das microesferas CMQ-Glu-Fe(III) (AIEDEH & TAHA, 2001).

A exemplo dos espectros infravermelho das microesferas de quitosana reticulada-ferro (III), a complexação da carboximetilquitosana com o íon ferro (III) também não provocou grandes mudanças no espectro de absorção da N,O-CMQ.

No entanto, a complexação de grupo carboxilato ao íon ferro(III) pode ser observada pelas bandas de absorção em 1638 e 1636 cm^{-1} para as micropartículas

CMQ-Fe(III) e CMQ-Glu-Fe(III), respectivamente, enquanto que o espectro da N,O-carboximetilquitosana mostra uma banda de grupo carboxilato em 1602 cm^{-1} (SHIN et al., 2003; OUIOMET et al., 2003). Assim, pode-se afirmar que a banda de vibração de grupo carboxilato foi deslocada para menor frequência sob complexação, sugerindo que este deslocamento indica que o grupo carboxilato está coordenado ao íon férrico (OUIOMET et al., 2003; MIN et al., 2004).

5.2.1.7. Análise Termogravimétrica (TGA)

A inclusão de novos grupos funcionais na quitosana pode afetar a estabilidade térmica. Atualmente, muitos estudos têm mostrado conclusões dependentes da natureza do grupo inserido (VARMA et al., 2004). Por exemplo, no caso de derivados mercaptanas é visto que essas modificações químicas aumentam ligeiramente a estabilidade térmica, enquanto as bases de Schiff diminuem (GUIBAL, 2004).

Segundo Screenivasan, o comportamento térmico de polímeros incorporados com metais depende da natureza do metal. A adição de novas ligações através dos íons metálicos levaria ao aumento da estabilidade térmica, em compensação alterações na estrutura do polímero levaria a diminuição da estabilidade, sendo forças antagonistas com predomínio de uma ou outra (SCREENIVASAN, 1996).

As análises termogravimétricas da quitosana e dos complexos QTS – Fe (III) das microesferas reticuladas QTS-Epi-Fe(III) e QTS-Glu-Fe(III) estão representadas nas Figuras 36, 37 e 38.

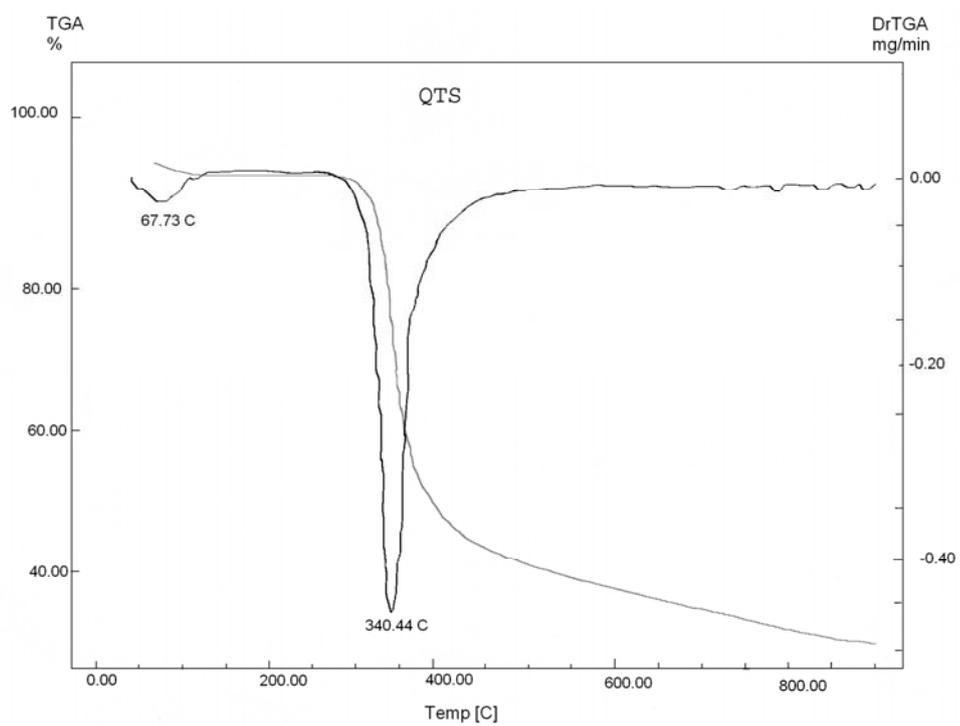


Figura 36. TGA e DrTGA da quitosana

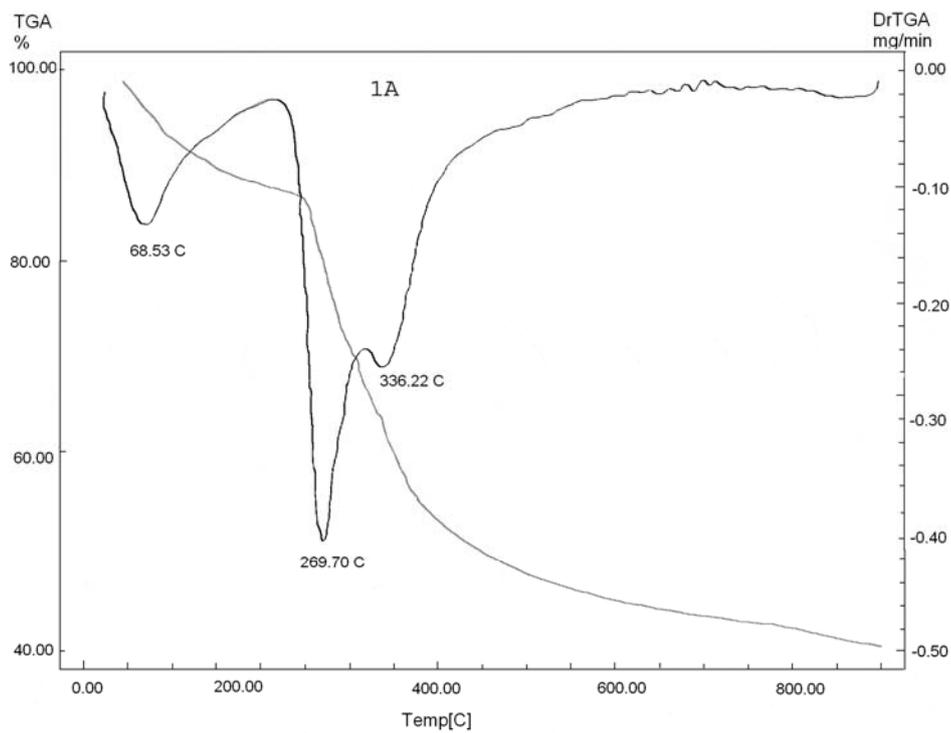


Figura 37. TGA e DrTGA das microsferas de QTS – Fe (III) reticuladas com epicloridrina

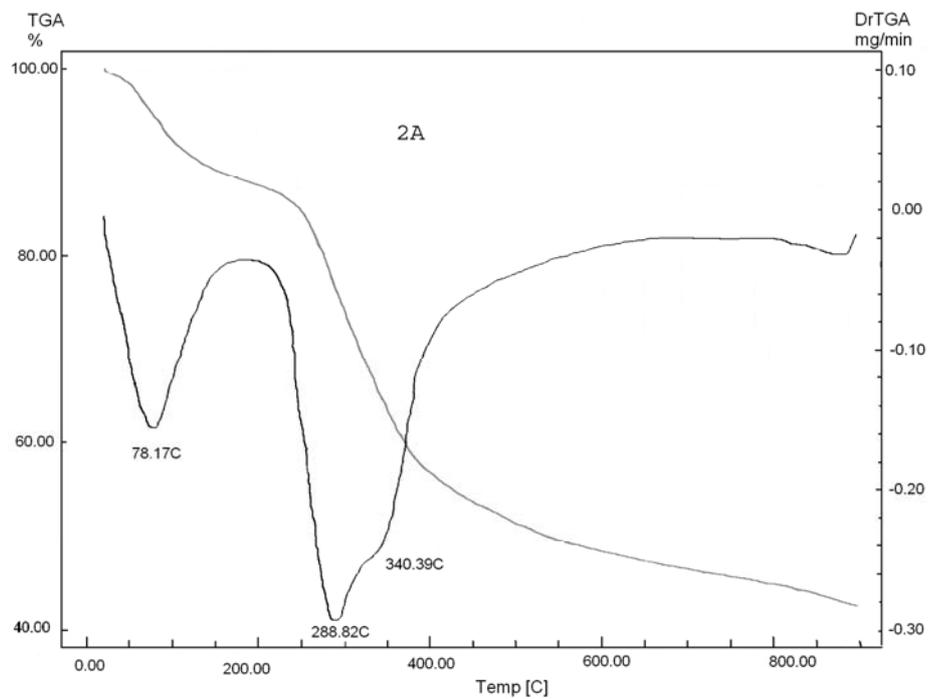


Figura 38. TGA e DrTGA das microsferas de QTS – Fe (III) reticuladas com glutaraldeído

A quitosana começa a perder massa de água de hidratação em $\cong 68^{\circ}\text{C}$ e apresenta um pico de decomposição em $\cong 340^{\circ}\text{C}$, este pico corresponde ao estágio da pirólise (despolimerização e decomposição das unidades acetiladas e desacetiladas do polímero).

As microesferas reticuladas com epícloridrina (QTS-Epi-Fe(III)) apresentam 3 picos: o primeiro corresponde a perda de massa por desidratação em $\cong 68^{\circ}\text{C}$ e outros dois picos em $\cong 270^{\circ}\text{C}$ e 336°C correspondem a decomposição das ligações cruzadas do polímero e das unidades monoméricas da quitosana (glicosamina), respectivamente. Para as microesferas reticuladas com glutaraldeído (QTS-Glu-Fe(III)) os 3 picos também são observados em $\cong 78^{\circ}\text{C}$ referente a perda de água em, $\cong 289^{\circ}\text{C}$ e 340°C com a mesma atribuição de decomposição (NIETO et al., 1992).

As Figuras 39, 40 e 41 apresentam as análises termogravimétricas da N,O-carboximetilquitosana e dos complexos N,O-CMQ – Fe (III) e N,O-CMQ-Glu-Fe(III).

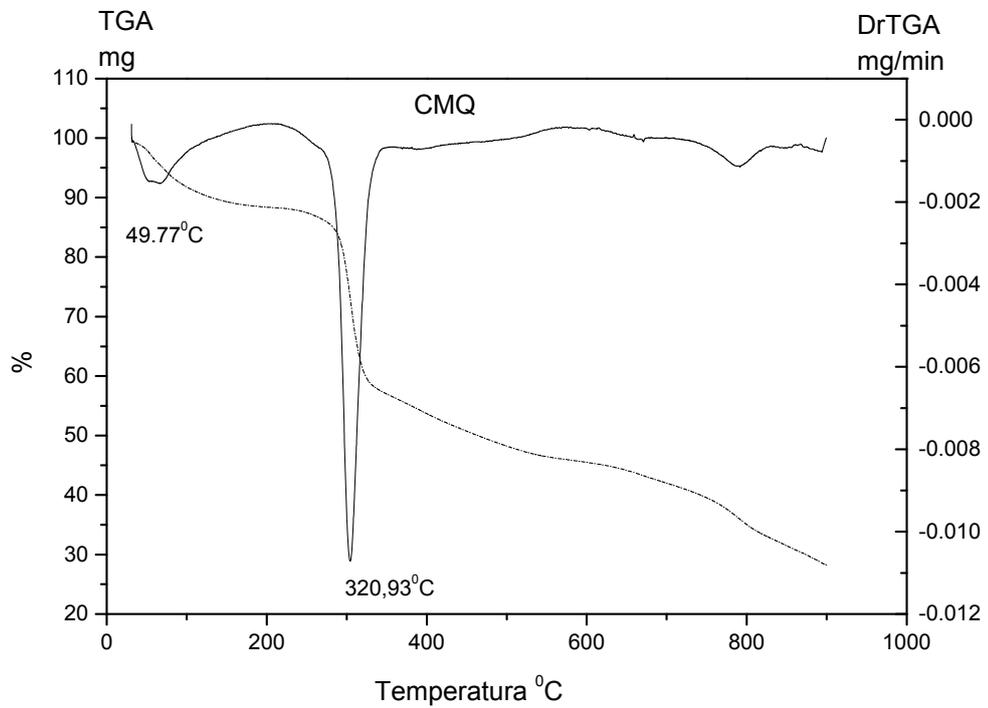


Figura 39. TGA e DrTGA da N,O-Carboximetilquitosana

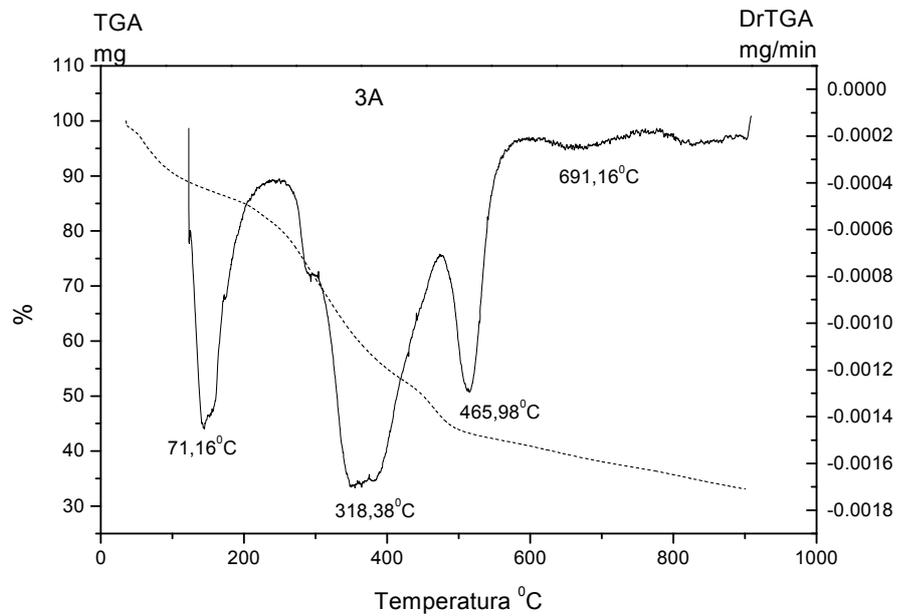


Figura 40. TGA e DrTGA das microcápsulas de N,O-CMQ- Fe (III)

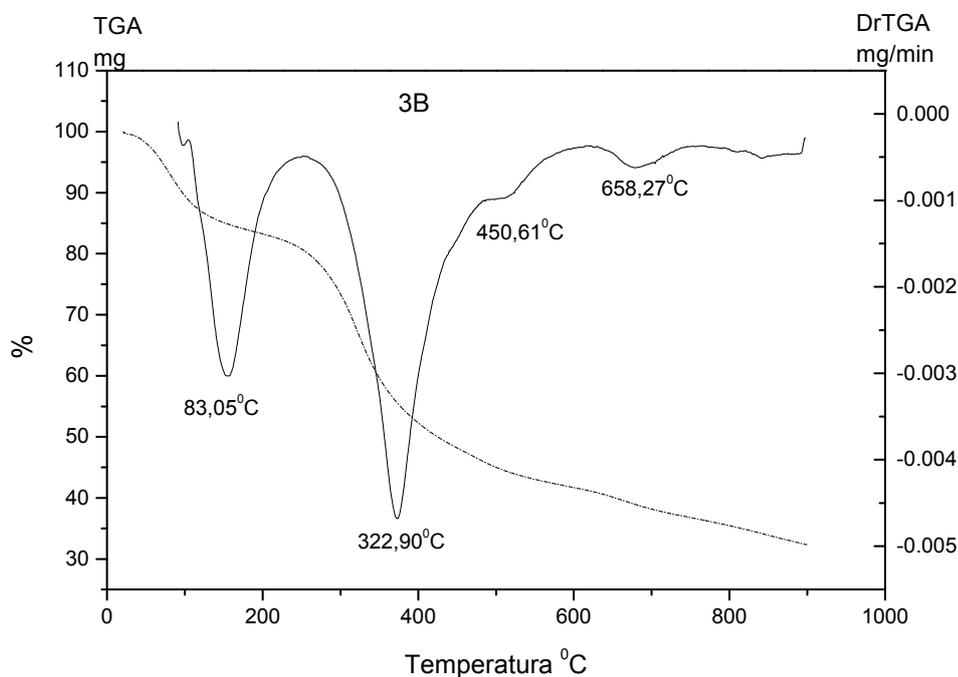


Figura 41. TGA e DrTGA das microesferas de N,O -CMQ -Glu- Fe (III)

A N,O-carboximetilquitosana exibe um pequeno pico em $\cong 50^{\circ}\text{C}$, relacionado principalmente a umidade adsorvida. O DrTGA mostra um pico de decomposição em $\cong 321^{\circ}\text{C}$ correspondente a decomposição das unidades de glicosamina da cadeia polimérica (CÁRDENAS et al., 2004). No entanto, um pico em $\cong 240^{\circ}\text{C}$ esperado para a decomposição de grupo carboxílico não é detectado no termograma, devido ao baixo grau de substituição para a carboximetilquitosana.

As microcápsulas do complexo N,O-CMQ-Fe(III) apresentam 4 picos principais: o primeiro corresponde a perda de massa por desidratação em $\cong 71^{\circ}\text{C}$ e outros 3 picos em $\cong 318^{\circ}\text{C}$, 466°C e 691°C . O pico em 318°C corresponde a decomposição das unidades de monoméricas da cadeia polimérica e os picos em elevadas temperaturas $\cong 466^{\circ}\text{C}$ e 691°C podem ser atribuídos à decomposição de prováveis ligações covalentes

coordenadas da CMQ com o ferro (III) e liberação de grupos hidroxilas para formação de óxido de ferro (DE BOER & DEKKERS, 2001).

Para as microesferas CMQ-Glu-Fe(III) os 4 picos também são observados: o pico em $\cong 83$ °C refere-se à perda de água, e os outros 3 picos em $\cong 323$ °C, 451 °C e 658 °C correspondem as mesmas atribuições de decomposição observadas para as microcápsulas CMQ-Fe(III) (NIETO, et al., 1992).

5.2.1.8. Espectroscopia Mössbauer

A espectroscopia Mössbauer tem sido uma importante ferramenta para elucidação estrutural de muitos complexos contendo ferro. Esta técnica investiga o sítio metálico diretamente para a obtenção de informações sobre o estado de oxidação, geometria ao redor do íon metálico e suas propriedades magnéticas (BHATIA & RAVI, 2000; GYURCSIK & NAGY, 2000).

Dois parâmetros Mössbauer demonstram as propriedades relacionadas com os ligantes: deslocamento isomérico, δ /mm s⁻¹ e desdobramento quadrupolar, ΔE_q /mm s⁻¹.

Os valores do parâmetro hiperfino δ medem diretamente a densidade eletrônica ao redor do átomo Mössbauer, sendo muito sensível ao seu estado de oxidação bem como ao número de coordenação e a natureza dos ligantes ao redor do metal.

Os valores do parâmetro hiperfino de ΔE_q quantificam a anisotropia da distribuição eletrônica ao redor do átomo Mössbauer. Para complexos de Fe (III) alto spin d⁵ (ou seja, com cinco elétrons d, portanto sem efeitos de covalência), como os que aparecem neste trabalho, existe proporcionalidade entre a magnitude ΔE_q e o afastamento da simetria cúbica ao redor do metal. Portanto, ΔE_q indica uma medida da distorção da simetria puntual do complexo.

Os valores das larguras de linha aumentam com a perda da cristalinidade e com a diminuição do tamanho do grão do material.

Já a presença de um dubleto com seus picos de absorção com diferentes intensidades, pode estar relacionado à quimissorção do complexo na matriz polimérica.

Isto porque quando ocorre esta quimissorção, ela em geral estabelece uma ligação química mais fraca com o polímero do que com os demais ligantes, o que irá determinar o chamado “Efeito Goldanskii-Kariagin”.

Entretanto, deve-se considerar que os parâmetros extraídos dos espectros Mössbauer dependem de condições experimentais tais como temperatura e força do campo magnético aplicado (BHATIA & RAVI, 2000).

Os espectros Mössbauer registrados a 298 K das amostras QTS-Epi-Fe(III) e QTS-0Glu-Fe(III) são apresentados nas Figuras 42 e 43 (valores dos parâmetros hiperfinos desses espectros estão apresentados na Tabela 7). O espectro Mössbauer para as microesferas QTS-Fe (III) reticuladas com epicloridrina, Figura 44, apresentou deslocamento isomérico, $\delta = 0,34$ mm/s e desdobramento quadrupolar, $\Delta E_q = 0,30$ mm/s o que evidencia a presença de Ferro (III) de configuração alto spin. Os íons ferro aparentemente não estão complexados ao polímero e sim dispersos na forma de núcleos de óxido de ferro (III) (“clusters”). Estes núcleos são constituídos basicamente por magnetita (Fe_3O_4) superparamagnética com uma distribuição larga de diâmetro dos grãos podendo ir de 5 a 20 nm (GYURCSIK & NAGY, 2000). Os grupos doadores dos polissacarídeos atuam como sítios de nucleação para os íons metálicos, os quais os ligam através da formação de pontes de hidrogênio e uma variedade de nanoestruturas é formada *in situ*, com tamanho e formas que dependem do tipo do polímero e propriedades da solução (pH, temperatura, etc.) (SIPOS et al., 2003; BHATIA & RAVI, 2003; SREERAM et al, 2004).

As demais bandas do espectro apresentam dubletos mal resolvidos de Fe (III) o que pode indicar que a formação da “super estrutura” de magnetita ainda não se completou.

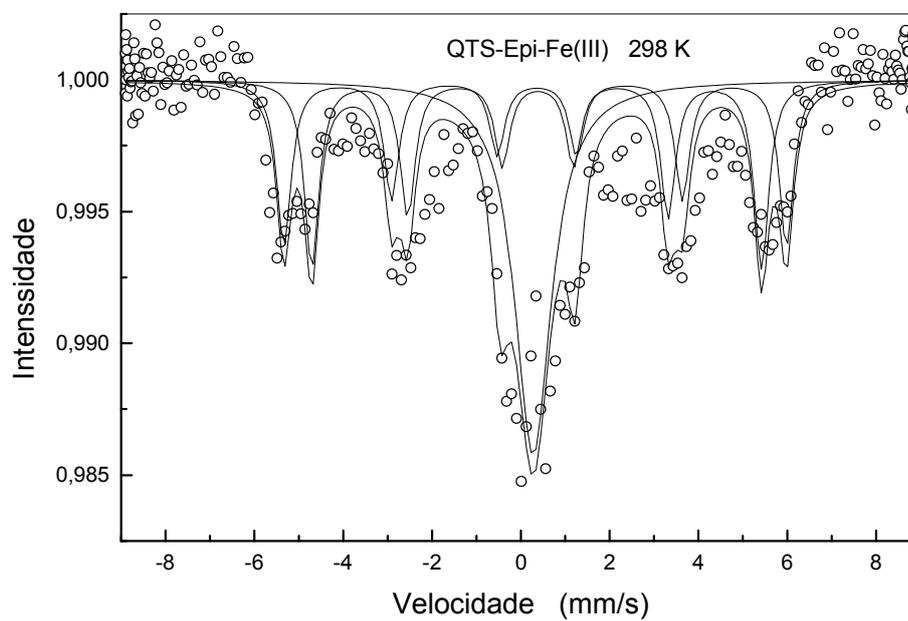


Figura 42. Espectro Mössbauer das microesferas de QTS-Fe(III) reticuladas com epícloridrina, obtido a 298 K

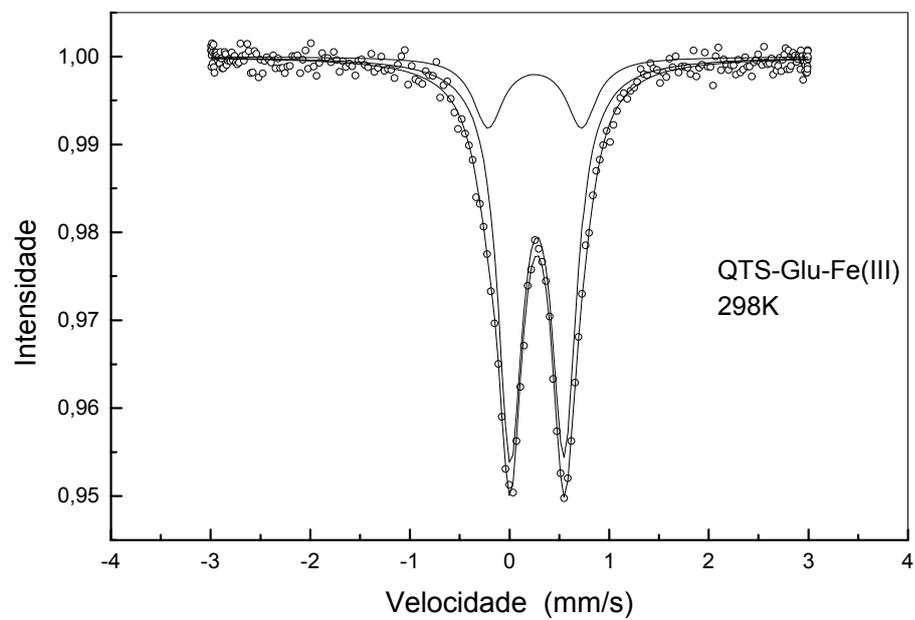


Figura 43. Espectro Mössbauer das microesferas de QTS-Fe(III) reticuladas com glutaraldeído, obtido a 298K

O espectro Mössbauer para as microesferas QTS-Fe (III) reticuladas com glutaraldeído, Figura 44, mostrou deslocamento isomérico, $\delta = 0,34$ mm/s típico de complexo Fe (III) alto spin com σ doadores. Entretanto, o dubleto com desdobramento quadrupolar, $\Delta E_q = 0,54$ mm/s indica a existência de distorção na estrutura do complexo octaédrico produzido pela presença de ligantes de diferente natureza (NIETO, et al., 1992). Este espectro sugere ao menos quatro ligantes e no máximo 6 coordenações para o complexo com ligantes N/O. Entretanto, o deslocamento isomérico não prova realmente que o N amínico está ligado ao metal (GAMBLIN et al., 1998). O fato de o espectro apresentar linhas de largura fina, 0,30 mm/s indica um ambiente de coordenação mais simétrico e sugere pequenas variações locais, com menor distorção da estrutura. Ainda pode-se sugerir a presença de núcleos de magnetita em menor quantidade.

Tabela 7 – Parâmetros Mössbauer de Fe obtidos a 298 K para amostras QTS-Epi-Fe(III) e QTS-Glu-Fe(III). δ = deslocamento isomérico relativo ao α Fe; ΔE_q = desdobramento quadrupolar, AR= área relativa subspectral Γ = largura de linha a meia altura

| Amostra | $\delta / \text{mm s}^{-1}$ | $\Delta E_q / \text{mm s}^{-1}$ | AR/ % | $\Gamma / \text{mm s}^{-1}$ |
|-----------------|-----------------------------|---------------------------------|-------|-----------------------------|
| QTS-Epi-Fe(III) | 0,34 | 0,30 | 38 | 0,60 |
| QTS-Glu-Fe(III) | 0,34 | 0,54 | 82 | 0,30 |

Os valores de deslocamento isomérico, observado para ambos os espectros são coerentes com os detectados para compostos de Fe (III) na configuração alto spin (KNIGHT et al., 1996; BHATIA & RAVI, 2000; GYURCSIK & NAGY, 2000; BHATIA & RAVI, 2003) sendo que esta atribuição está de acordo com as medidas magnéticas de Nieto e col. (NIETO et al., 1992).

Por fim, muitos trabalhos envolvendo o estudo da interação da quitosana com Fe (III) foram desenvolvidos e comparados. Com o processo de reticulação da quitosana

realizado neste trabalho, microambientes alternativos foram criados para a formação de estruturas diversas.

O espectro Mössbauer para o complexo CMQ-Fe (III) a 298K é apresentado na Figura 45 (valores dos parâmetros hiperfinos desses espectros estão apresentados na Tabela 8). Os parâmetros de deslocamento isomérico, $\delta = 0,33$ mm/s e desdobramento quadrupolar, $\Delta E_q = 0,91$ mm/s encontrados para o complexo sugerem Fe (III) de configuração alto spin e paramagnético, estando o ferro ancorado na estrutura pelos grupos carboxilatos gerando distorção leve entre as ligações, $\Gamma = 0,50$ mm/s, típico de precipitados rápidos quando não há tempo do íon escolher a melhor configuração.

Para o complexo CMQ-Glu-Fe(III) a Figura 50 apresenta os parâmetros $\delta = 0,35$ mm/s e $\Delta E_q = 0,65$ mm/s, indicando a presença de Fe (III) de configuração alto spin e paramagnético. O ferro também se encontra ancorado na estrutura e os grupos ligantes são provavelmente da mesma natureza, ou seja, σ - doadores. A ligação com o grupo NH_2 não é esperada, porém não pode ser totalmente descartada. Como neste caso ocorreu a reticulação dos grupos amino com o glutaraldeído limitando o acesso do metal, verifica-se que os espectros para CMQ-Fe(III) e CMQ-Glu-Fe(III) não se alteram, o que sugere que não há deslocamento de ferro para a reticulação.

Tabela 8 – Parâmetros Mössbauer de Fe obtidos a 298 K para amostras CMQ-Fe(III) e CMQ-Glu-Fe(III) e 115 K para amostra CMQ-Glu-Fe(III). δ = deslocamento isomérico relativo ao αFe ; ΔE_q = desdobramento quadrupolar, AR= área relativa subspectral Γ = largura de linha a meia altura

| Amostra | $\delta / \text{mm s}^{-1}$ | $\Delta E_q / \text{mm s}^{-1}$ | AR/ % | $\Gamma / \text{mm s}^{-1}$ |
|---------------------------|-----------------------------|---------------------------------|-------|-----------------------------|
| CMQ-Fe(III) | 0,33 | 0,91 | 80 | 0,50 |
| CMQ-Glu-Fe(III) | 0,35 | 0,65 | 63 | 0,34 |
| CMQ-Glu-Fe(III)- 115 K | 0,47 | 0,69 | 68 | 0,43 |

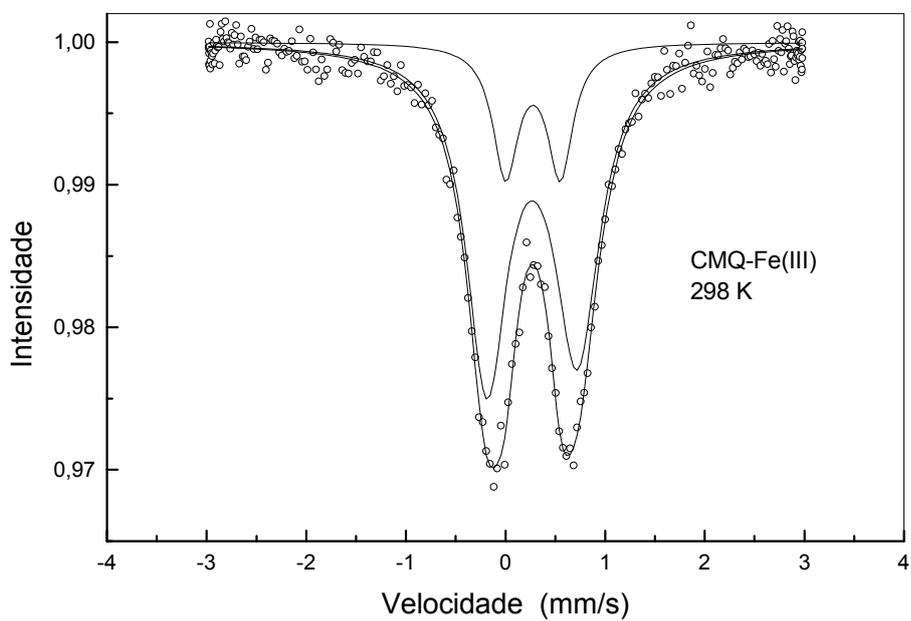


Figura 44. Espectro Mössbauer das microcápsulas de N,O-CMQ –Fe (III), obtido a 298K

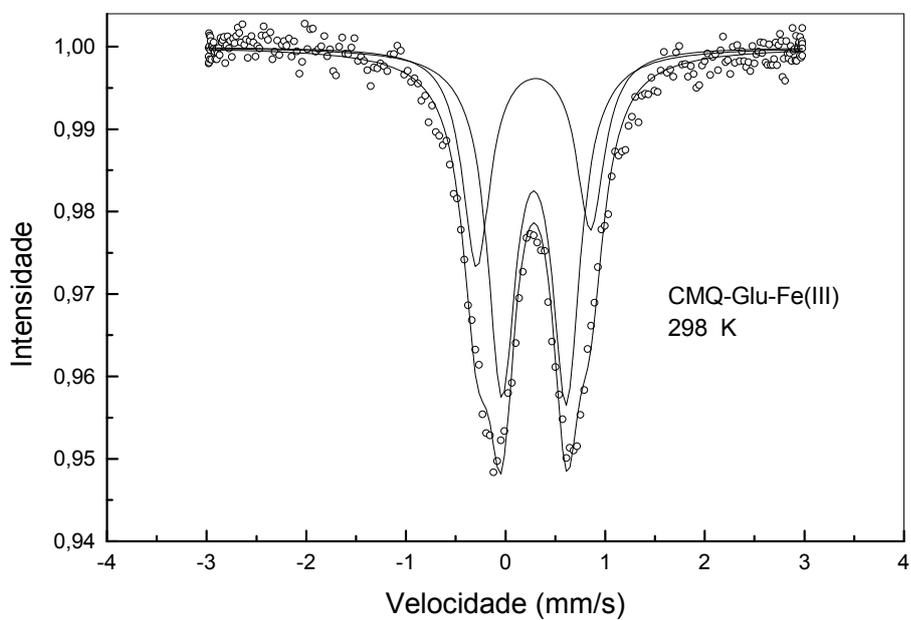


Figura 45. Espectro Mössbauer das microesferas de CMQ –Glu-Fe (III) , obtido a 298 K

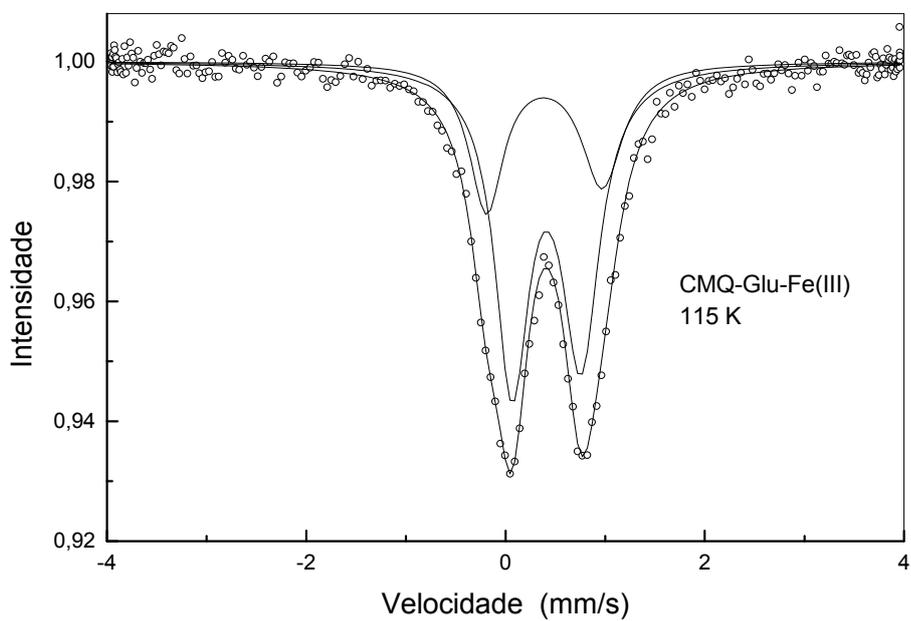


Figura 46. Espectro Mössbauer das microesferas de CMQ –Glu-Fe (III) , obtido a 155 K

A Figura 46 apresenta o espectro Mössbauer a 115 K, confirmando o ajuste baseado em dois dubletos ficando a separação dos dubletos mais explícita em 115 K com garantia de que o ajuste está bem fundamentado.

5.2.1.9. Propostas de estruturas para os complexos de QTS- Fe (III)

As Figuras 47 e 48 representam as prováveis estruturas para as microesferas de QTS-Fe (III) reticuladas com epícloridrina e com glutaraldeído .

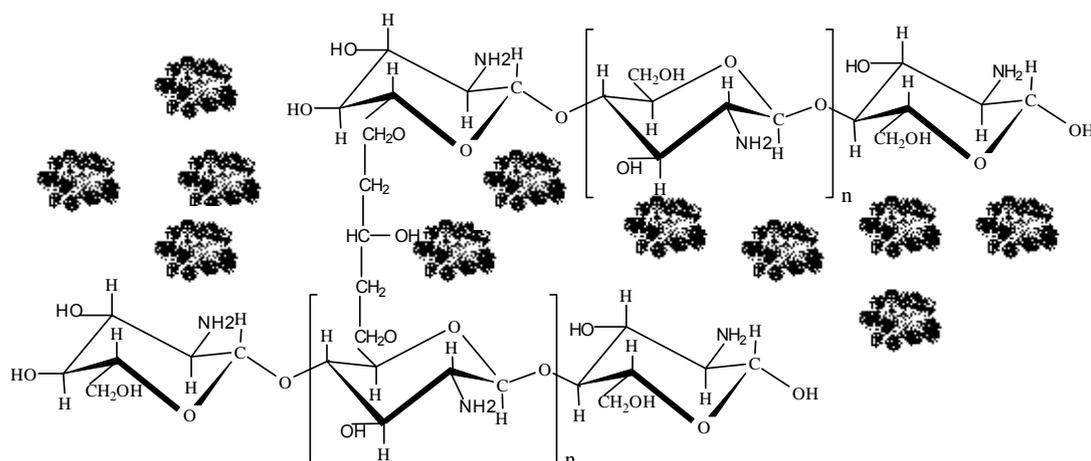


Figura 47. Estrutura proposta para as microesferas QTS-Fe (III) reticuladas com epícloridrina

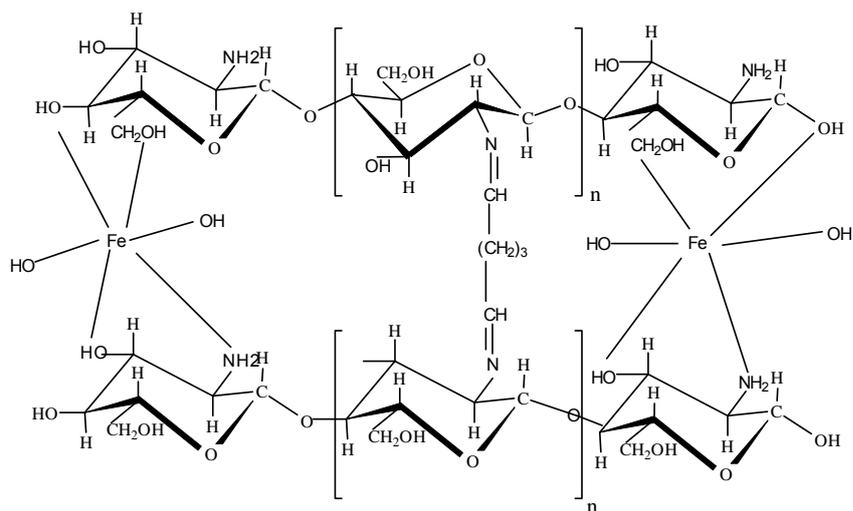


Figura 48. Estrutura proposta para as microesferas QTS-Fe (III) reticuladas com glutaraldeído

As Figuras 49 e 50 representam as prováveis estruturas para as microcápsulas de N,O-CMQ -Fe (III) e microesferas de N,O-CMQ-Glu-Fe (III).

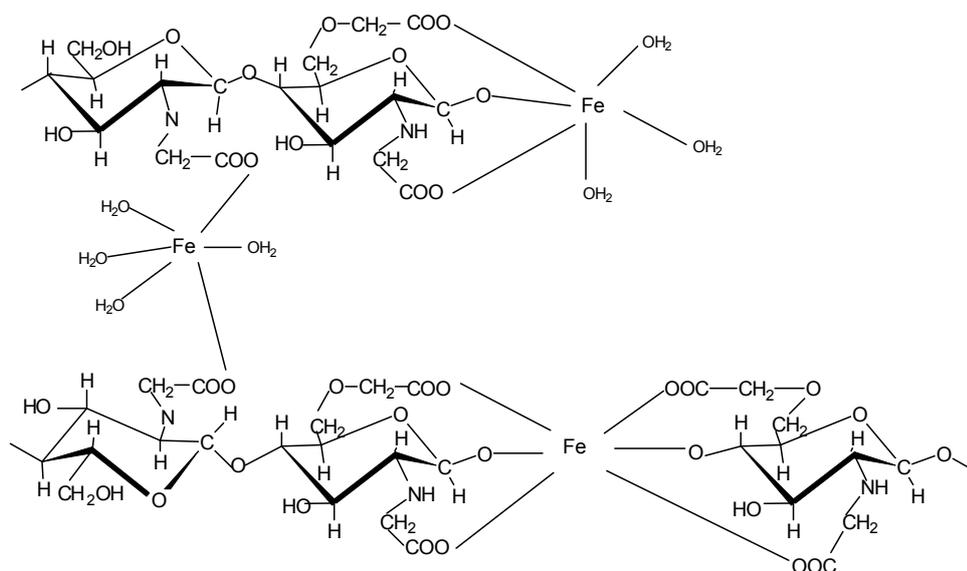


Figura 49. Estrutura proposta para as microcápsulas de N,O-CMQ -Fe (III)

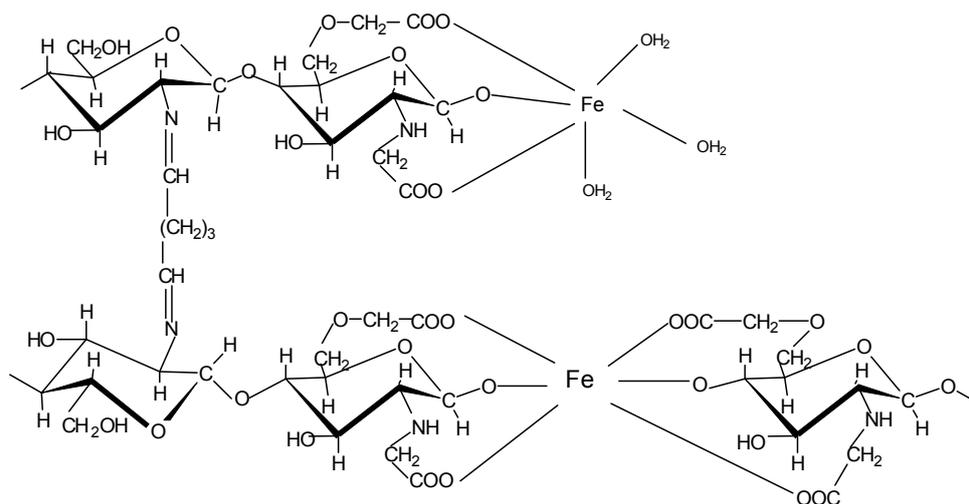


Figura 50. Estrutura proposta para as microesferas de N,O-CMQ -Fe (III) reticuladas com glutaraldeído

5.2.1.10. Liberação *in vitro* de Ferro(III) a partir de microesferas de Ferro(III)-QTS – Glu, Ferro(III)-QTS-Epi

A Figura 51 mostra o perfil de liberação de ferro (III) em pH 1,2 a partir de microesferas de QTS –Glu-Fe(III) e QTS-Epi-Fe(III).

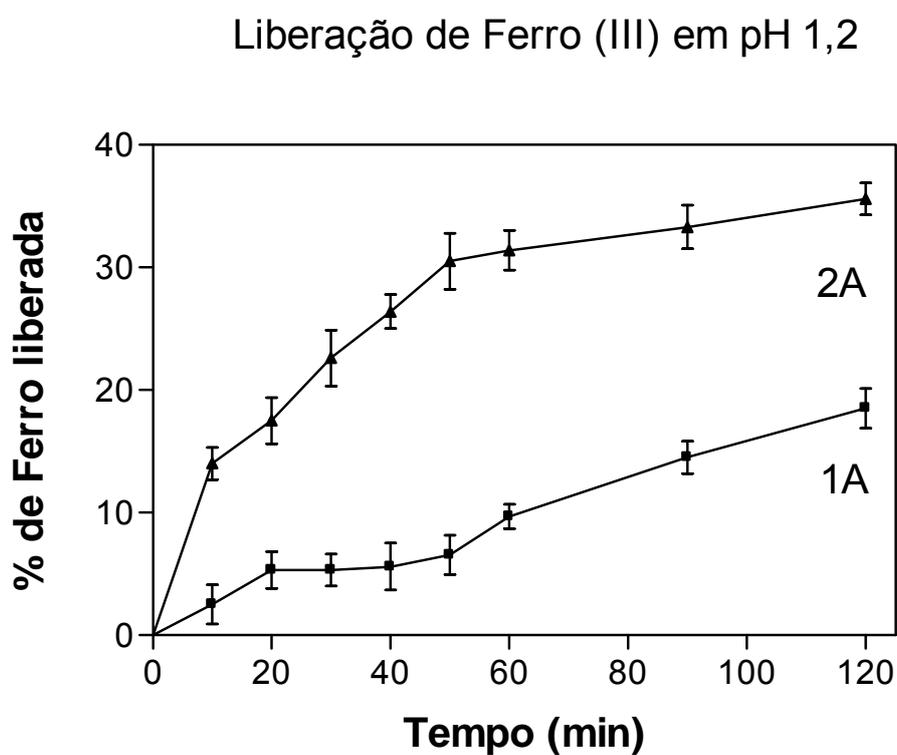


Figura 51. Perfil de liberação de ferro (III) em pH 1,2 a partir de microesferas de QTS –Glu-Fe(III) e QTS-Epi – Fe(III).

Quando analisado o perfil de liberação para fármacos contendo ferro, deve-se levar em consideração a dependência da solubilidade em função do pH. O ferro (III) inicia a sua precipitação em pH próximo de 3. Portanto os estudos de liberação foram realizados em pH 1,2 simulando o suco gástrico e onde ocorre maior absorção do metal, o que justifica o perfil realizado apenas neste pH.

Após 90 minutos em pH 1,2, ocorre a liberação de cerca de 20% e 36% para as microesferas QTS-Epi-Fe(III) e de QTS-Glu-Fe(III), respectivamente. O grau de reticulação juntamente com o grau de intumescimento de cada matriz polimérica são fatores determinantes para o processo de liberação.

O perfil da curva de liberação de ferro (III) pelas microesferas de QTS – Fe (III) reticuladas em função do tempo de contato no pH 1,2, mostrou ser exponencial. A análise da liberação de ferro (III) se comporta de acordo com a equação de Ritger e Peppas (RITGER & PEPPAS, 1987).

Para as microesferas QTS-Epi-Fe(III) e QTS-Glu-Fe(III) os valores de “n” em pH 1,2 foram 0,66 e 0,72 com um coeficiente de correlação próximo a 0,99, respectivamente. No caso de microesferas, valores de “n” $0,43 < n < 0,85$ mostram um transporte tipo difusão não Fickiana enquanto que para “n” igual a 0,43 a difusão é Fickiana, podendo ser concluído que a liberação para as microesferas QTS-Epi-Fe(III) e QTS-Glu-Fe(III) aproxima –se da ordem zero.

5.2.1.11. Liberação *in vitro* de Ferro(III) a partir de micropartículas de CMQ-Fe(III) e CMQ-Glu-Fe(III)

O perfil de liberação de ferro(III) a partir das micropartículas de CMQ-Fe(III) e CMQ-Glu-Fe(III) são mostrados na Figura 52. A dependência da solubilidade em relação ao pH foi levada em conta no estudo de liberação do ferro.

Devido a sua grande solubilidade em pH ácido, o perfil de liberação foi realizado apenas em pH 1,2 onde ocorre maior solubilização e absorção de ferro. A quantidade de ferro liberada pelas micropartículas CMQ –Fe(III) e CMQ-Glu-Fe(III) foi

de 83,1% e 78,5%, respectivamente. A diferença marcante está na liberação inicial lenta e gradativa pelas microesferas CMQ-Glu-Fe(III).

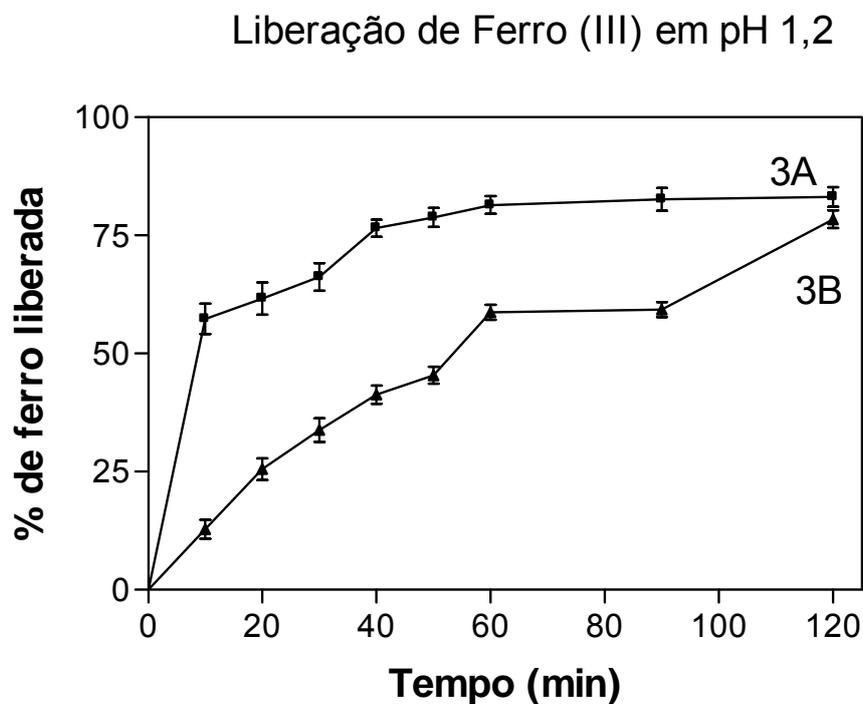


Figura 52. Perfil de liberação de ferro das micropartículas de N,O-carboximetilquitosana

Para as micropartículas CMQ-Fe(III) e CMQ-Glu-Fe(III) os valores de “n” em pH 1,2 foram 0,55 e 0,68 respectivamente. Como podem ser observados, os valores calculados para “n” indicam que a liberação afasta-se do modelo Fickiano, podendo ser concluído que a liberação para as micropartículas CMQ-Fe(III) e CMQ-Glu-Fe(III) depende dos processos de difusão e relaxamento das estruturas.

5.3.1. Complexo de ascorbato de quitosana- Fe (II)

5.3.1.1. Ascorbato de quitosana – Fe (II)

O ácido ascórbico, além de ser um ácido adequado para a formação de sal de quitosana solúvel (ascorbato de quitosana), pode também reagir com a quitosana para formar derivados via reação de Schiff (MUZZARELLI et al., 1984; MUZZARELLI, 1985). Agentes oxidantes moderados como o iodo e o oxigênio (ar) facilmente convertem o ácido ascórbico a ácido deidroascórbico, no qual os grupos carbonilas estão aptos a reagir com aminas. Soluções viscosas e límpidas são obtidas dentro de minutos após a mistura. Sob a ação de atmosfera de oxigênio em contato com a solução aquosa de ascorbato de quitosana, derivados solúveis da quitosana e do ácido deidroascórbico espontaneamente são formados dentro de 6 horas a 25 °C ou mais cedo em altas temperaturas (MUZZARELLI et al., 1984; MUZZARELLI et al., 1989).

5.3.1.2. Teor de grupos amino livres na quitosana e no ascorbato de quitosana

As Figuras 53 e 54 representam as curvas de titulação condutométrica das soluções de QTS e ascorbato de QTS acidificadas com HCl em excesso e conduzida com NaOH. A curva de titulação apresenta 2 pontos de inflexão e a diferença entre os volumes corresponde a quantidade de NaOH necessária para neutralizar os grupos amino.

O teor de grupos amino livres fornece o grau de desacetilação (%GD) para a quitosana e pode ser calculado através da equação de Broussignac (BROUSSIGNAC, 1970), Equação 6:

$$\%GD = \frac{M \times (V_2 - V_1) \times 161}{W} \times 100 \quad (6)$$

onde V_1 e V_2 correspondem aos volumes no primeiro e segundo ponto de equivalência, M_b é a molaridade da base e W é o massa de amostra empregada na titulação.

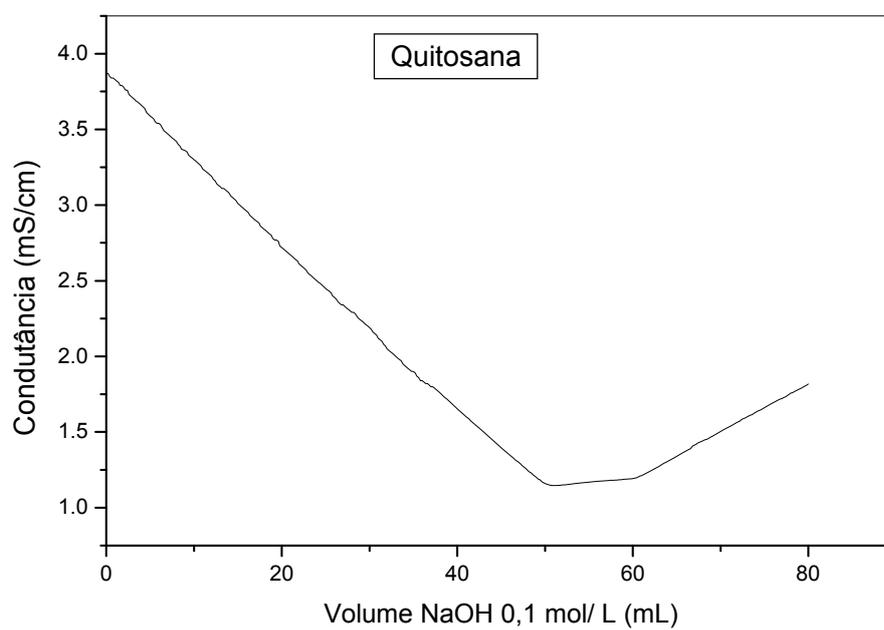


Figura 53. Curva de titulação condutométrica da solução de QTS

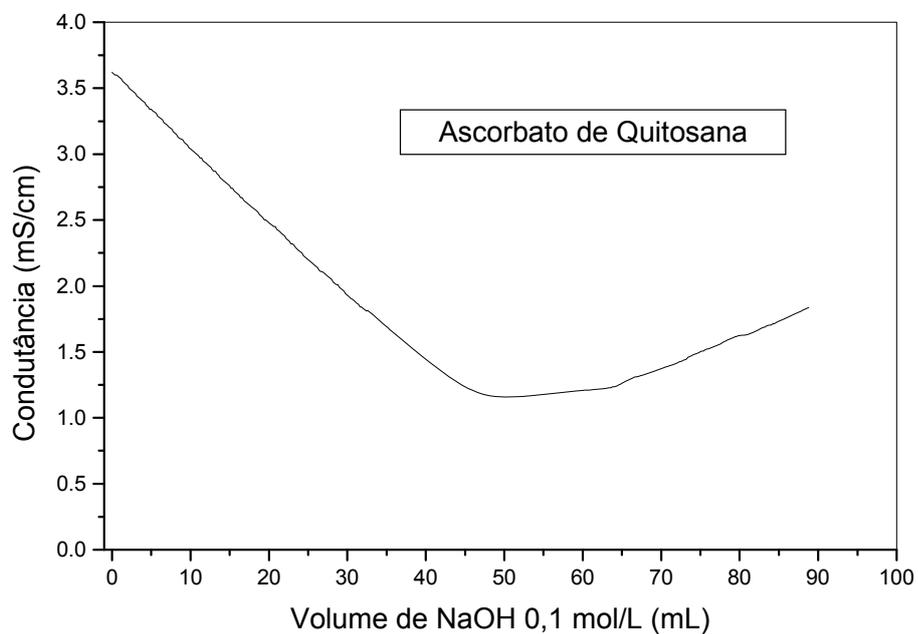


Figura 54. Curva de titulação condutométrica da solução de ascorbato de QTS

Os valores correspondentes aos teores de grupos amino livres (NH_2) obtidos pela média de três determinações das titulações condutométricas da quitosana e ascorbato de quitosana estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Valores de % de grupos amino livres (NH₂)

| Amostra | % GD |
|------------------------|------|
| Quitosana | 84% |
| Ascorbato de Quitosana | 56% |

Na Tabela 9, observou-se um grau de substituição para o ascorbato de quitosana de 28% pela presença do íon ascorbato na formação do sal de quitosana.

5.3.1.3. Determinação da concentração de ferro nas microesferas do complexo AscQTS – Fe (II)

A concentração de ferro nas microesferas foi determinada após abertura das amostras e leitura espectrofotométrica em UV-vis a 510 nm. O resultado obtido foi de 105 mg / g seca.

5.3.1.4. Espectroscopia de Infravermelho

As Figuras 55, 56 e 57 apresentam os espectros de infravermelho da quitosana (QTS), ascorbato de quitosana (Asc-QTS) e complexo de ascorbato de quitosana-Fe(II).

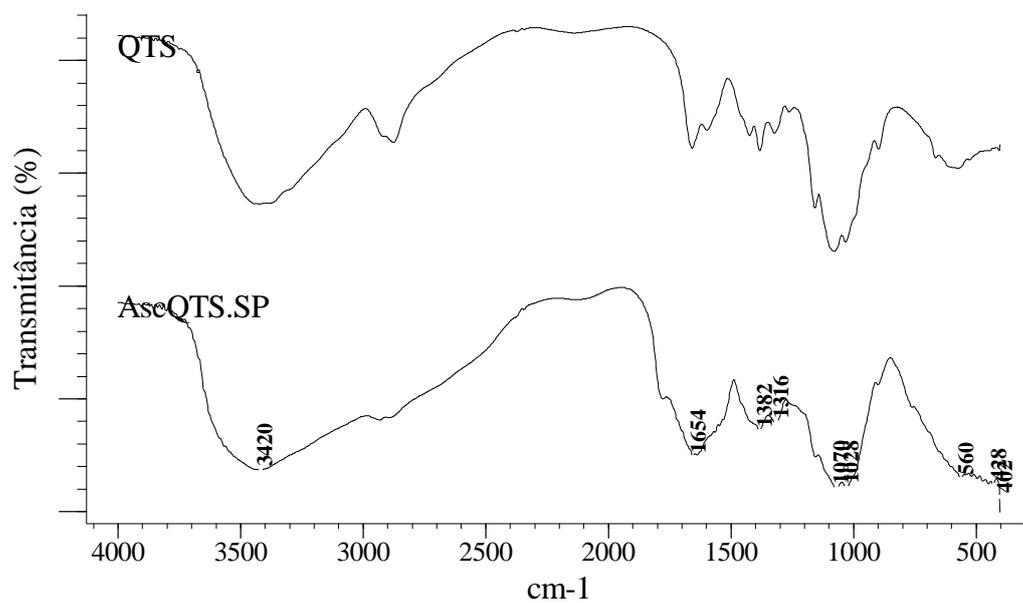


Figura 55. Espectro na região de Infravermelho da quitosana e do ascorbato de quitosana em pastilha de KBr.

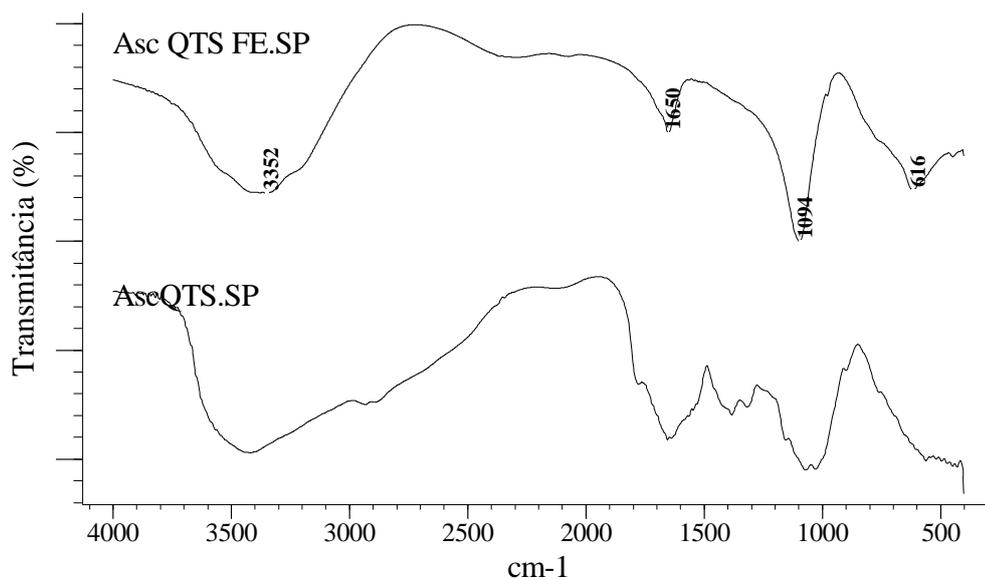


Figura 56. Espectro na região de Infravermelho do ascorbato de quitosana e ascorbato de quitosana Fe(II) em pastilha de KBr.

A formação do sal ascorbato de quitosana (Asc-QTS) pode ser verificada no espectro infravermelho mostrado na Figura 55. Este espectro mostra que a formação do sal não induziu grandes mudanças nas bandas de absorção no infravermelho da quitosana. Entretanto, uma pequena banda de absorção referente ao estiramento de C=O de grupo carbonil de grupo carboxílico protonado pode ser observado próximo de 1750 cm^{-1} , ausente no espectro da quitosana (BARTH, 2000; OUIOMET et al., 2003).

A complexação do ascorbato de quitosana com o íon ferro(II) pode ser sugerida pela espectroscopia infravermelho através da comparação entre os espectros de absorção do ascorbato de quitosana na presença e ausência de ferro(II). A Figura 56 mostra que a banda de absorção em 3420 cm^{-1} , atribuída ao estiramento da ligação OH, foi deslocada para 3352 cm^{-1} (SHIN et al., 2003). O deslocamento de 68 cm^{-1} para menor número de onda sugere a ocorrência da complexação com metal, envolvendo o grupo hidroxila da quitosana e/ou do íon ascorbato e provavelmente água coordenada no sítio de coordenação.

5.3.1.5. Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é um método não destrutivo que fornece informações sobre a estrutura molecular de compostos, ajudando na identificação de grupos característicos, onde moléculas relativamente grandes estão envolvidas.

A influência da água no espectro Raman de celulose tem sido descrita por Fechner e colaboradores (FECHNER et al., 2003). Bandas largas de O-H são observadas em 1640 cm^{-1} e entre 3100 e 3500 cm^{-1} . Com o aumento da quantidade de água, a vibração de estiramento O-H de grupos hidroxilas de unidades de glicose com máximo em 3274 cm^{-1} muda para o modo de estiramento O-H de água livre em 3230 cm^{-1} . Por outro lado, a banda em 3274 cm^{-1} pode ser atribuída a um estágio transacional entre vibrações de grupos OH de unidades de glicose e água livre (FECHNER et al., 2003).

A Figura 57 mostra os espectros FT-Raman para a quitosana, ascorbato de quitosana e ascorbato de quitosana-ferro(II). Praticamente, não há diferença nos

espectros entre quitosana e o ascorbato de quitosana. No entanto, a espectroscopia FT-Raman, pode distinguir entre ascorbato de quitosana e o produto ascorbato de quitosana-ferro(II).

A Figura 57 mostra a influência da banda em torno de 3220 cm^{-1} atribuída a ligação O-H é evidente no espectro do ascorbato de QTS-Fe (II), enquanto as bandas em torno de 2960 cm^{-1} (atribuída ao estiramento de grupos CH_2^-) e em 1600 cm^{-1} (atribuída ao modo vibracional de água coordenada) aparecem em ambos espectros (BARAN et al., 2002). A posição da banda forte em 3320 cm^{-1} no espectro Raman suporta a complexação do ferro considerada para o deslocamento da banda O-H na mesma região no espectro infravermelho.

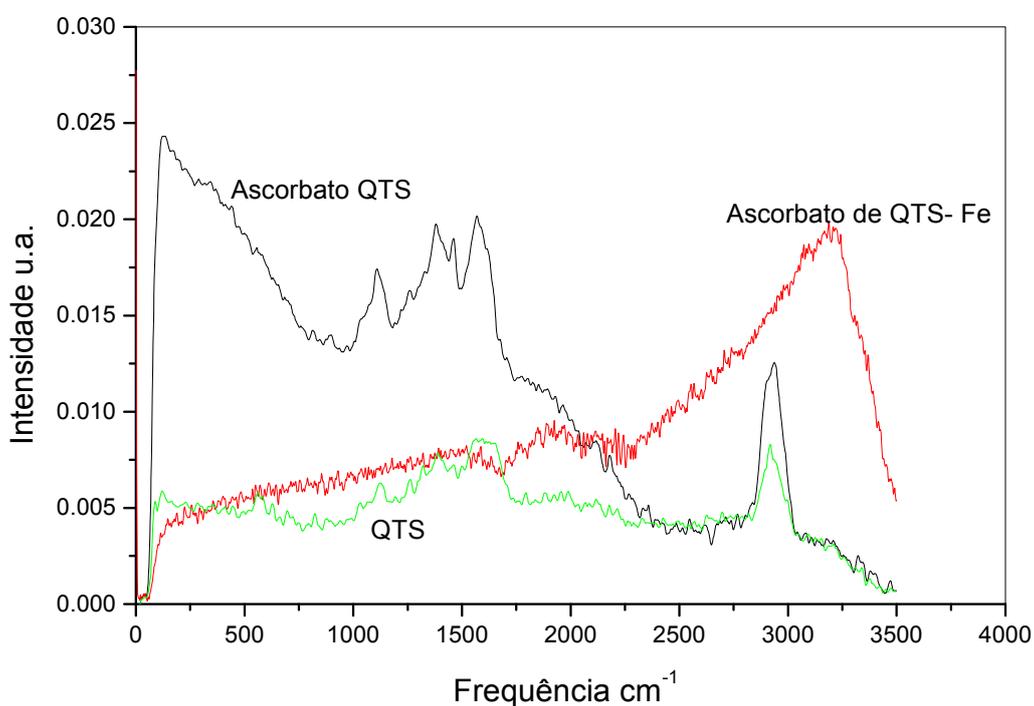


Figura 57. Espectro FT-RAMAN da quitosana, do ascorbato de quitosana e ascorbato de quitosana Fe(II).

5.3.1.6. Análise Termogravimétrica (TGA)

A Figura 58 mostra a análise termogravimétrica do complexo ascorbato de quitosana-ferro(II). Um comportamento térmico similar às microesferas N,O- Ferro(III)-CMQ e N,O-CMQ-Glu Ferro (III) também é observado para as micropartículas de ascorbato de QTS-Fe(II). Os dois primeiros picos observados em 115 °C e 141 °C correspondem às perdas de massa de água adsorvida. O pico em 300 °C e corresponde a decomposição das unidades de monoméricas da cadeia polimérica, e o pico em temperatura elevada em 506 °C pode ser atribuído à decomposição de prováveis ligações covalentes coordenadas com o ferro e liberação de grupos hidroxilas para formação de óxido de ferro (DE BOER, DEKKERS, 2001).

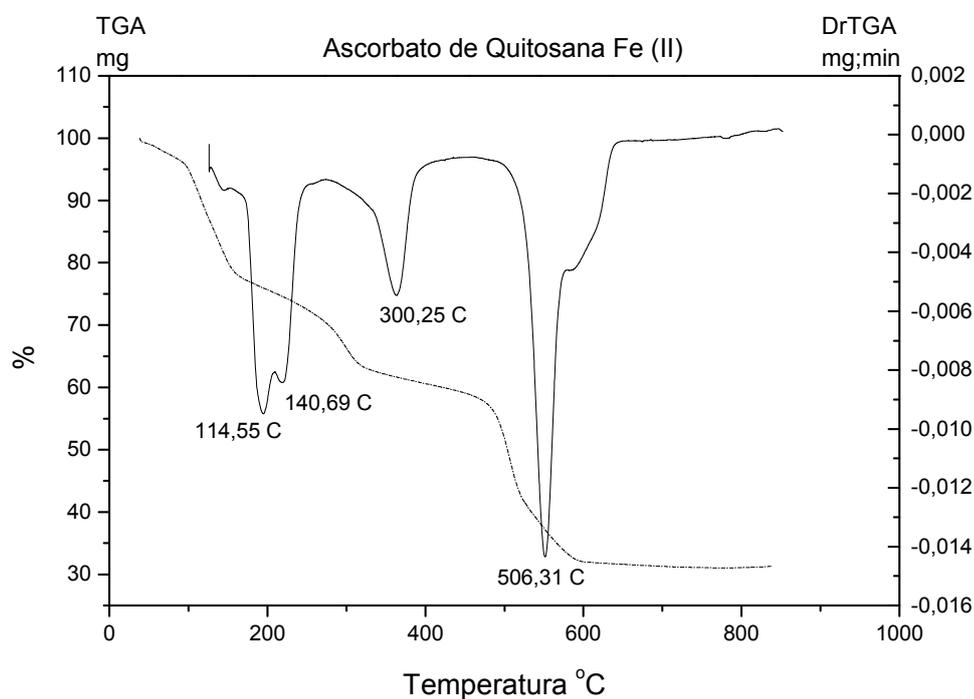


Figura 58. TGA e DrTGA do ascorbato de quitosana

5.3.1.7. Espectroscopia Mössbauer

A Figura 59 mostra o espectro Mössbauer para o complexo ascorbato de quitosana-Ferro(II)(valores dos parâmetros hiperfinos desses espectros estão apresentados na Tabela 10).

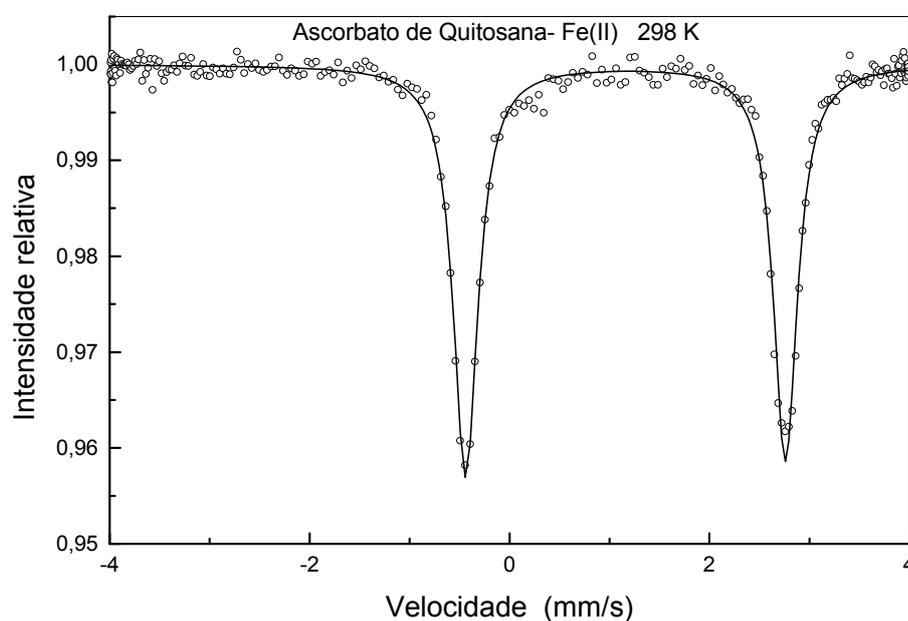


Figura 59. Espectro Mössbauer das microesferas de AscQTS –Fe (II) , obtido a 298 K

O espectro Mossbauer do complexo ascorbato de quitosana-ferro (II) na temperatura de 298 K exibiu um intenso desdobramento quadrupolar de 3,20 mm/s e deslocamento isomérico de 1,22 mm/s, os quais são característicos para íon ferro(II) alto-spin, com elevado número de coordenação (possivelmente seis).

O fato de o espectro apresentar linhas de largura fina, 0,30 mm/s indica um ambiente de coordenação mais simétrico e harmônico, sugerindo pequenas variações locais, com menor distorção da estrutura e que todo ferro está num único estado

eletrônico estando os possíveis ligantes ascorbato e quitosana em uma bem definida conformação.

A presença de um dubleto com seus picos de absorção com diferentes intensidades pode estar relacionada a quimissorção do complexo na matriz polimérica. Isto porque quando ocorre esta quimissorção, ela em geral estabelece uma ligação química mais fraca com o polímero do que com os demais ligantes o que irá determinar o chamado “Efeito Goldanskii-Kariagin”.

Tabela 10 – Parâmetros Mössbauer de Fe obtidos a 298 K para amostra ascorbato de quitosana – Fe(II). δ = deslocamento isomérico relativo ao α Fe; ΔE_q = desdobramento quadrupolar, A+R= área relativa subspectral Γ = largura de linha a meia altura.

| Amostra | $\delta / \text{mm s}^{-1}$ | $\Delta E_q / \text{mm s}^{-1}$ | $\Gamma / \text{mm s}^{-1}$ |
|-------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| Ascorbato de Quitosana Fe(II) | 1,22 | 3,20 | 0,30 |

5.3.1.8. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do complexo ascorbato de quitosana-Ferro(II)

A superfície e morfologia externa das micropartículas esféricas de ascorbato de QTS-Fe (II) estão apresentadas na Figura 60. As microesferas formadas por spray-drying são estruturas monolíticas esféricas apresentando tamanho médio em torno de 5 μm .

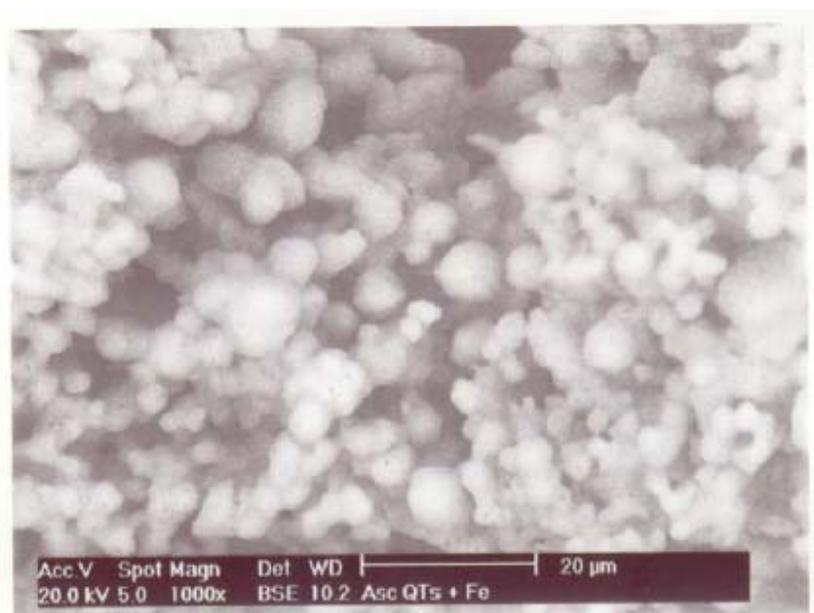


Figura 60. Fotomicrografias das microesferas de Asc QTS- Fe (II) obtidas por spray drying

5.3.1.9. Proposta de estrutura para os complexos de Asc QTS- Fe (II)

A Figura 61 representa a provável estrutura para as microesferas de AscQTS-Fe (II) obtidas por spray drying.

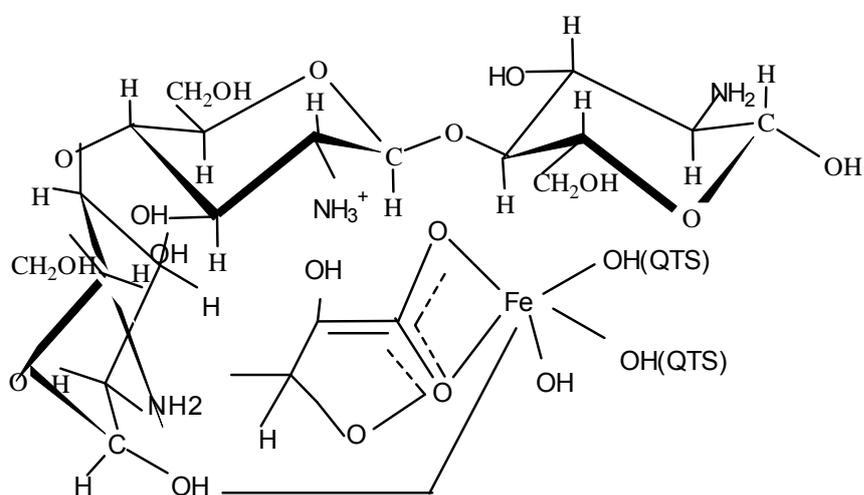


Figura 61. Estrutura proposta para as microesferas de ascorbato de quitosana Fe(II)

5.31.10. Estudo de liberação *in vivo*

Os resultados obtidos com o tratamento de animais saudáveis tratados durante 15 dias com as diferentes formulações de Fe (II) são apresentados na Figura 62, correspondendo a Fase I. Os dados demonstram que a formulação de pasta de ascorbato de quitosana Fe(II) 20mg/Kg levou a uma elevação sanguínea de Fe(II) significativamente maior que aquela observada com os outros tratamentos. Curiosamente os animais tratados somente com sulfato ferroso na mesma concentração não apresentou diferença estatística nos níveis sanguíneos de ferro quando comparados ao grupo controle negativo sugerindo possivelmente uma baixa absorção do metal possivelmente por oxidação do mesmo durante o processo de manipulação da formulação ou mesmo já no trato gastrointestinal.

Os animais tratados com sulfato ferroso apresentaram a partir do segundo dia de tratamento, amolecimento das fezes perdurando durante todo o processo, o qual é um efeito colateral deste fármaco. Já os animais tratados com os demais complexos não apresentaram alterações.

A administração simultânea de ácido ascórbico com ferro na sua forma reduzida favorece sua absorção uma vez que este metal normalmente só é absorvido como Fe (II). Os dados obtidos com o presente trabalho corroboram aqueles já existentes na literatura e também sugerem que a formulação de pasta estaria favorecendo uma maior absorção de Fe (II) (EL-HAWARY et al. 1975, CHRISTENSEN et al., 1983; HUNT, J.R.; GALLAGHER, S.K; JOHSON, L.K., 1994; OLIVARES et al., 1997).

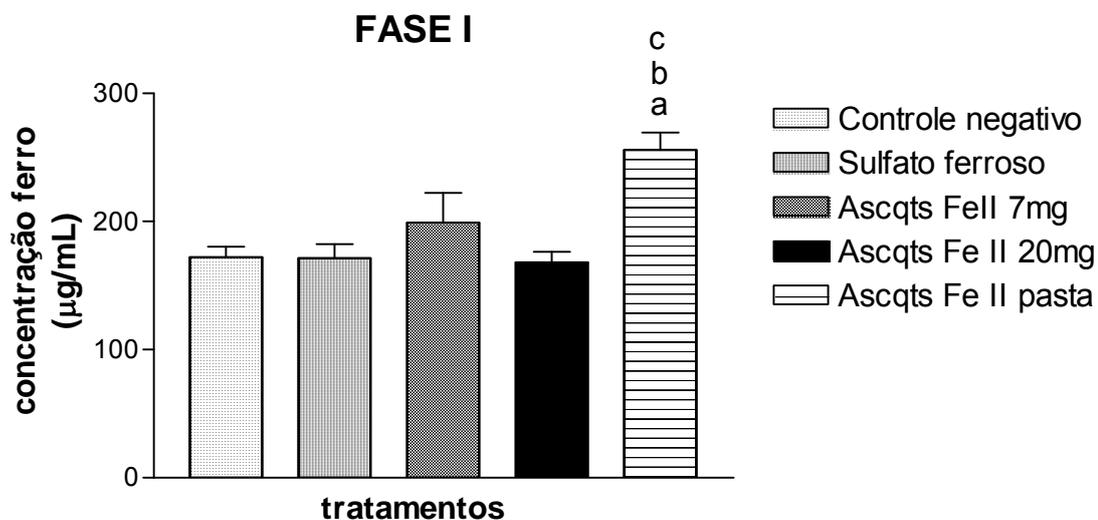


Figura 62: Concentração sanguínea de ferro em ratos tratados durante 15 dias com sulfato ferroso 20mg/Kg (controle positivo), ascorbato de quitosana Fe (II) 20 mg / Kg (ascqts fe(II) 20) na forma líquida, ascorbato de quitosana Fe (II) 20 mg / Kg na forma de pasta (ascqts fe(II) 20 pasta), ascorbato de quitosana Fe (II) 7 mg / Kg (ascqts fe(II) 7) e um grupo sem tratamento (controle negativo). Todos os valores são expressos em termos de média \pm EPM, n= 6. (a), (b) e (c) diferença significativa ($p < 0,01$) em relação ao controle, diferença significativa em relação ao ascqts fe (II) 20 e diferença significativa em relação ao sulfato ferroso, respectivamente.

A Figura 63 apresenta os dados obtidos com os animais tratados com sulfato ferroso Fe (II) 20mg/kg ou ascorbato de quitosana Fe (II) 20mg/kg em dose única e determinados as concentrações sanguíneas de ferro a cada hora durante 8 horas. Os resultados confirmam os dados obtidos nos ensaios na Fase I, pois novamente os níveis plasmáticos de ferro nos animais tratados com o ascorbato de quitosana Fe (II) foram maiores que aqueles observados com o tratamento somente com o sulfato ferroso.

De acordo com Carpenter, a absorção de ferro ocorre em duas fases, uma rápida, fase inicial de cerca de uma hora, e uma mais lenta, segunda fase que finaliza dentro de 12 a 24 horas, o que pode ser visualizado na Fase II (CARPENTER, 1995).

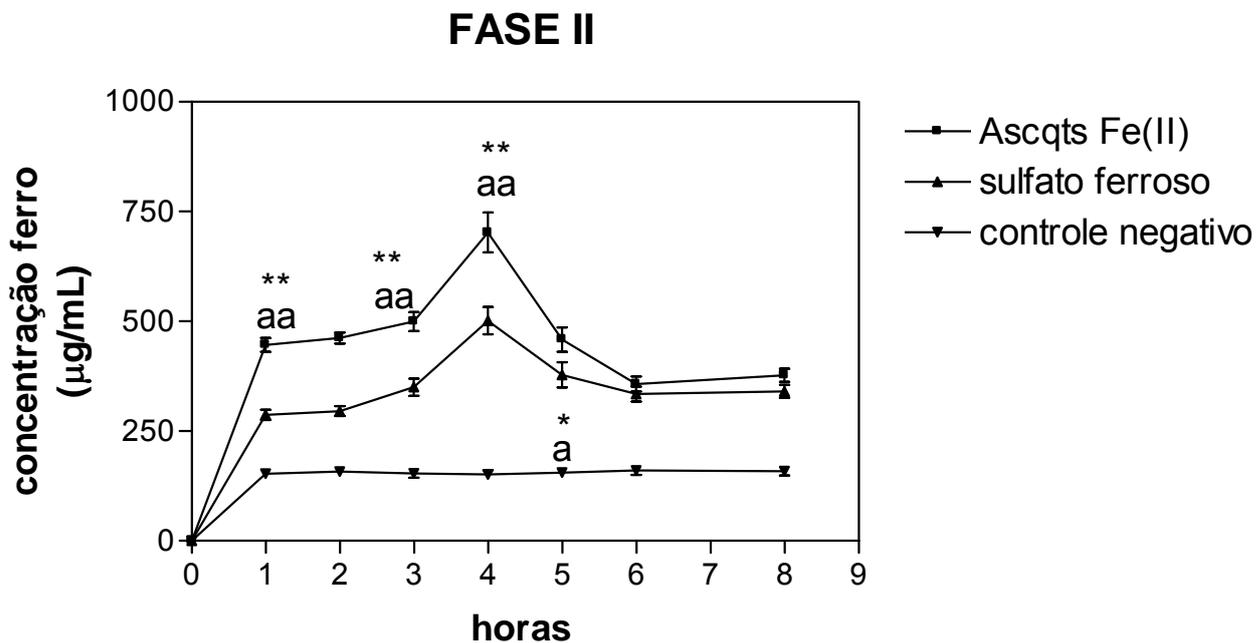


Figura 63. Concentração sanguínea de ferro em ratos tratados com sulfato ferroso 20 mg/Kg (controle positivo) e ascorbato de quitosana Fe (II) 20 mg / Kg na forma de pasta. Todos os valores são expressos em termos de média \pm EPM, n=6. (**) e (*) diferença significativa ($p < 0,01$) e ($p < 0,01$) entre AscQTS Fe (II) 20 mg/kg em relação ao controle, (aa) e (a) diferença significativa em relação ao AscQTS Fe (II) em relação ao sulfato ferroso para ($p < 0,01$) e ($p < 0,01$), respectivamente.

A Figura 64 apresenta os dados obtidos após tratamento de 14 dias em animais sadios com variação da concentração de AscQTS Fe(II) (10 e 20 mg). Os resultados mostram que a concentração de 20 mg /Kg apresentam menor variação, sendo definida para o tratamento dos animais anêmicos.

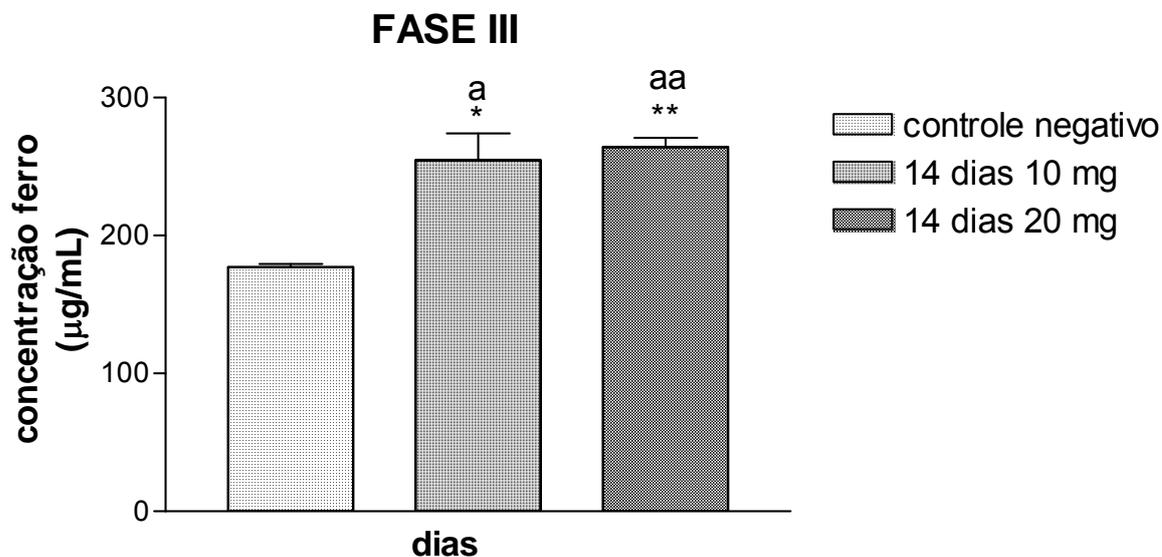


Figura 64. Concentração sanguínea de ferro tempo dependente em ratos tratados durante 14 dias com ascorbato de quitosana Fe(II) 10m / Kg e 20 mg / Kg na forma de pasta líquida e um grupo sem tratamento (controle negativo). Todos os valores são expressos em termos de média \pm EPM, n= 6. (*) e (**) diferença significativa ($p < 0,001$) em relação ao controle, (aa) diferença significativa ($p < 0,001$) em relação a (a).

Após o estudo da concentração de AscQTS - Fe(II) a variação de tempo (dias) foi estipulada. Na Figura 65 os dados demonstraram que para a formulação os tempos de 14 e 28 dias apresentaram um aumento significativo na concentração sanguínea de ferro nas mesmas concentrações.

Nesta fase as fezes e urina dos animais se mantiveram sem alterações.

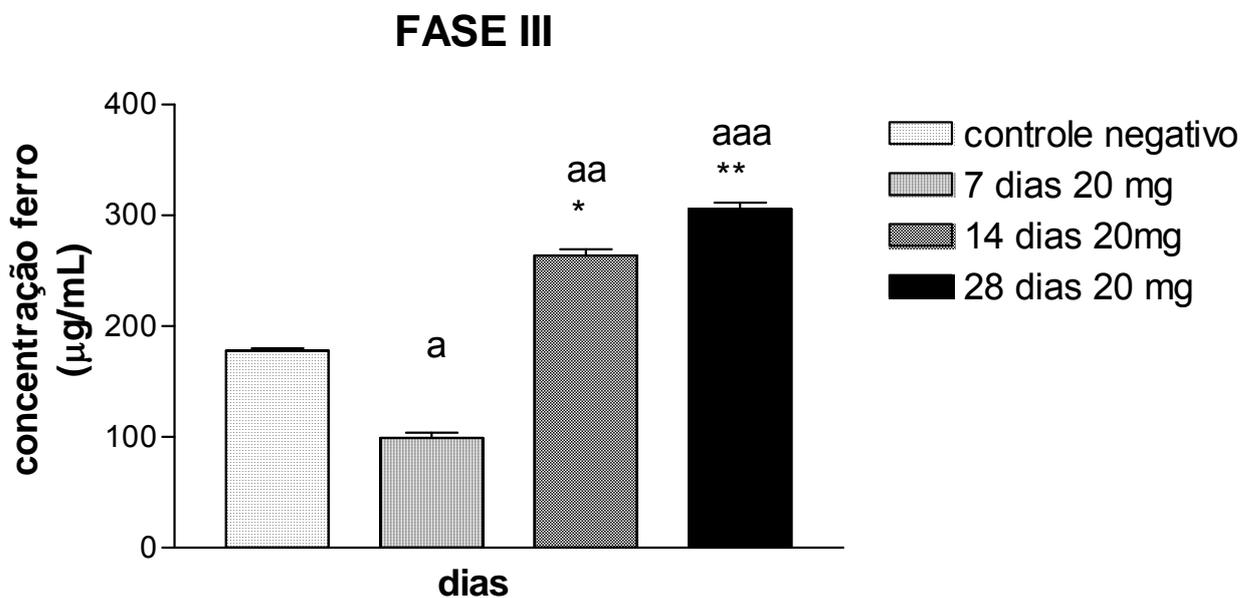


Figura 65: Concentração sanguínea de ferro tempo dependente em ratos tratados durante 7, 14 e 28 dias com ascorbato de quitosana Fe(II) na forma de pasta líquida e um grupo sem tratamento (controle negativo). Todos os valores são expressos em termos de média \pm EPM, $n=6$. (*) e (**) diferença significativa ($p < 0,001$) em relação ao controle, (a) diferença significativa ($p < 0,001$) em relação a (aa) e (aaa) e (aaa) diferença significativa ($p < 0,001$) em relação a (aa).

Para a Fase IV a primeira coleta foi realizada antes do início do tratamento com a ração. Após 45 dias de tratamento com a ração especial foi realizada a segunda coleta. Após 15 dias de tratamento (baseado na fase III) com os produtos a base de ferro, foi realizada a terceira coleta de sangue e dosados os parâmetros apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Valores médios de hemoglobina (Hb) e hematócrito (Ht) coletados dos animais da Fase IV

| Tratamento | 1ª. Coleta | | 2ª. Coleta (45 dias) | | 3ª. Coleta (15 dias) | |
|------------------|------------|--------|-------------------------|------|-------------------------|------|
| | Hb (g/dL) | Ht (%) | Hb (g/dL) | Ht % | Hb (g/dL) | Ht % |
| Controle normal | 14,1 | 39,4 | 14,0 | 39,3 | 14,0 | 38,9 |
| Controle anêmico | 14,0 | 39,1 | 12,3 | 36,5 | 11,1 | 33,5 |
| Sulfato Ferroso | 13,8 | 38,8 | 12,4 | 37,6 | 13,3 | 38,2 |
| AscQTS Fe(II) | 14,4 | 40,4 | 11,0 | 33,4 | 13,2 | 37,3 |

Os dados obtidos demonstram a diminuição nos valores de hemoglobina e hematócrito com caracterização da anemia. Após 15 dias de tratamento com sulfato ferroso e AscQTS Fe(II) os valores desses parâmetros indicam que tanto para o sulfato como para AscQTS o tempo e a concentração foram suficientes para a normalização do processo patológico.

A Figura 66, apresenta os valores de ferro na corrente sanguínea dos animais anêmicos tratados com sulfato ferroso e AscQTS Fe(II) 20 mg/Kg. Os dados obtidos após 60 dias de tratamento demonstram os valores iniciais de ferro seguido da diminuição após 45 dias de alimentação com a ração ausente de ferro e o aumento com volta à normalidade após 15 dias de tratamento e confirmam os dados obtidos nos ensaios anteriores (Fase I, II e III), pois os níveis de ferro plasmático foram maiores em animais tratados com AscQTS que os tratados somente com sulfato ferroso.

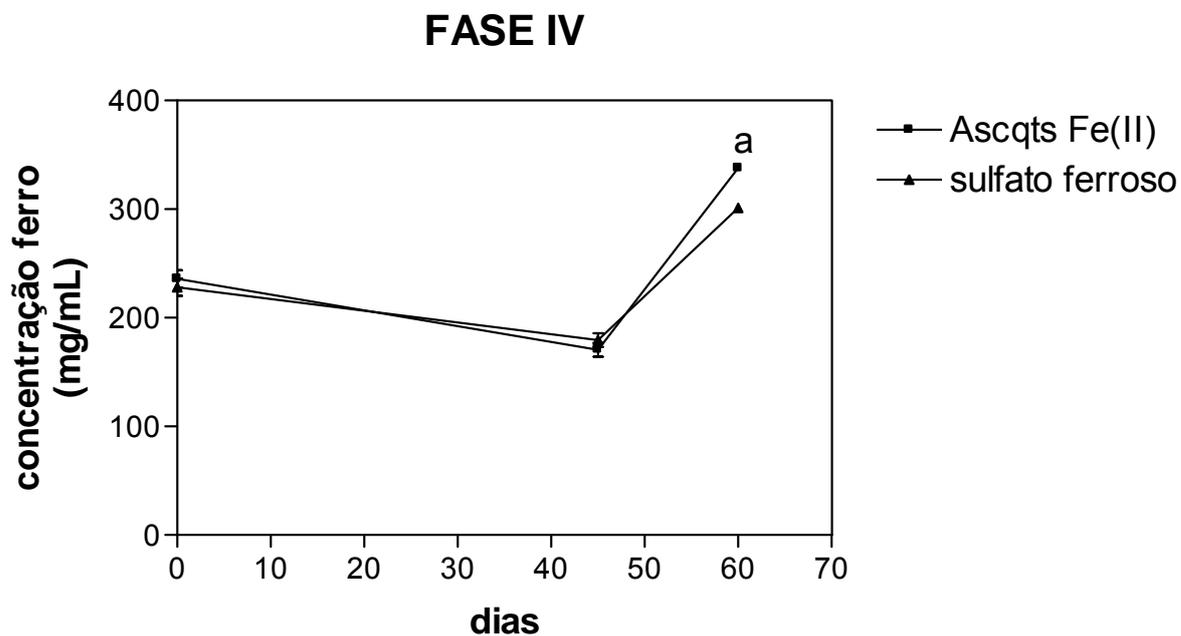


Figura 66. Concentração sanguínea de ferro em ratos anêmicos tratados durante 15 dias com ascorbato de quitosana Fe(II) 20 mg / Kg na forma de pasta e com sulfato ferroso 20 mg / Kg. Todos os valores são expressos em termos de média \pm EPM, n= 6. (a) diferença significativa ($p < 0,001$) em relação ao sulfato ferroso.

6. Considerações Finais

Com base nos objetivos propostos e nos resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho, pode-se fazer as seguintes considerações finais:

- Os compostos estudados forneceram informações importantes no que se refere à espectroscopia, estrutura eletrônica e estabilidade térmica de compostos de ferro (II) e (III).
- Os resultados obtidos pelas análises mostraram que para cada tipo de sistema com variação do polímero, do agente reticulante e do método de obtenção das micropartículas, ocorreu a formação de estruturas tridimensionais diferentes, tendo desde a presença de “clusters” dispersos no polímero até complexos bem definidos.
- A espectroscopia Mössbauer revelou a presença de ferro (III) alto spin superparamagnético para as micropartículas de quitosana e N,O-carboximetilquitosana e ferro (II) alto spin para as de ascorbato de quitosana.
- As análises termogravimétricas dos polímeros QTS e N,O-CMQ e das micropartículas Fe (II) e Fe(III) revelaram que a estabilidade térmica das micropartículas é diminuída pela presença de cadeias laterais resultantes da reticulação e interação com o metal.
- O processo de reticulação das microesferas de quitosana com diferentes agentes reticulantes, epícloridrina e glutaraldeído, permitiu a obtenção de microesferas mais resistentes e com variação no grau de reticulação, de intumescimento e na liberação *in vitro*.
- Comparativamente, as micropartículas de N,O-CMQ apresentaram maior porcentagem de liberação *in vitro* do que as microesferas reticuladas de QTS. Os resultados revelaram que as micropartículas (QTS-Epi-Fe(III), QTS-Glu-Fe(III), CMQ-Fe(III) e CMQ-Glu-Fe(III)) atuam, possivelmente por mecanismo difusional por apresentarem $n \geq 0,5$.

- Para as micropartículas de N,O-CMQ, o processo de reticulação das microcápsulas com glutaraldeído resultou na obtenção de microesferas mais resistentes em pH 1,2 fazendo com que a liberação *in vitro* fosse mais lenta e gradativa, chegando próximo a 80%.
- O ácido ascórbico mostrou ser um ótimo dissolvente da quitosana no meio aquoso e o íon ascorbato exibiu habilidade para agir como agente redutor mantendo o ferro no estado de oxidação +2.
- Os estudos de liberação *in vivo* em animais saudáveis demonstraram que o AscQTS na concentração 20 mg/Kg foi o que apresentou melhor resultado na Fase II elevando os níveis plasmáticos de ferro em relação ao sulfato ferroso, na Fase III definindo o tempo de 15 dias para o tratamento em animais anêmicos.
- A Fase IV, caracterizada por animais anêmicos mostrou que o AscQTS 20mg/Kg quando administrado durante 15 dias eleva os níveis plasmáticos de ferro bem mais que o sulfato ferroso.
- O AscQTS - Fe (II) é bem mais tolerado resultando em diminuição dos efeitos colaterais indesejáveis quando comparado ao sulfato ferroso.

Os resultados apresentados nesta tese permitiram chegar a conclusões bastante satisfatórias, as quais, sem dúvida, reforçam a necessidade de se tentar compreender as interações eletrônicas nos compostos de quitosana e carboximetilquitosana com ferro (II) e (III), a natureza das ligações, assim como as possíveis estruturas formadas.

Vale ressaltar que de acordo com os resultados, as micropartículas de quitosana e carboximetilquitosana mostraram-se com boas perspectivas para a complexação e liberação do ferro, tanto no estado ferroso como férrico, assim como no tratamento da anemia ferropriva.

7. Referências Bibliográficas

AHSAN, N. Intravenous infusion of total dose iron is superior in treatment of anemia in peritoneal dialysis patients: a single center comparative study. **J. Am. Soc. Nephrol.** v. 9, 664-668, 1998.

AIEDEH, K.; TAHA, M.O. Synthesis of iron- crosslinked chitosan succinate and iron-crosslinked hydroxamated chitosan succinate and their in vitro evaluation as potencial matrix materials for oral theophylline sustained-release beads. **Eur.J. Pharm. Sci.** v. 13, 159-168, 2001.

AKBUGA, J.; BERGISADI, N. 5-flourouracil-loaded chitosan microspheres preparation and release characteristics. **J. Microencapsul.** v. 13, 161-168, 1996.

BARAN, E. J.; WAGENR, C. C.; TORRE, M. H., Synthesis and Characterization of EDTA Complexes Useful for Trace Elements Supplementation. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.13, n. 5, 576-582, 2002.

BARTH, A., The Infrared Absorption of Amino Acid Side Chains, **Prog. Biophys. Mol. Biol.** v. 74, 141-173, 2000.

BAUMGARTENER, J.A. Overview of clinical studies regarding the safety of iron polymaltose complex. (Toxicity, iron overloading). **Vifor files**, 1997.

BEREMAN, R.D.; BERG, K. The structure, size and solution chemistry os a polysaccharide iron complex (Niferex). **Inor. Chimica Acta.** v. 155, 183-189, 1989.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J.M. et al. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** v. 57, 19-34, 2004.

BHATIA, S.C.; RAVI, N. A magnetic study of na Fe-chitosan complex and its relevance to other biomolecules. **Biomacromolecules.** v. 1, 413-417, 2000.

BHATIA, S.C.; RAVI, N. A Mössbauer study of interaction of chitosan and D-glucosamine with iron and its relevance to other metalloenzymes. **Biomacromol.** v. 4, 723-727, 2003.

BOCCIO, J.R.; ZUBILLAGA, M.B.; CARO, R.A. A new procedure to fortify fluid milk and dairy products with high-bioavailable ferrous sulfate. **Nutr. Rev.** v. 55, n.6, 240-246, 1997.

BOCCIO, J.R.; ZUBILLAGA, M.B.; CARO, R.A. et al. Bioavailability, absorption mechanism and toxicity of microencapsulated iron (II) sulfate: studies in mice. **Biol. Trace Element Res.** v. 62, 65-73, 1998.

BORBOLLA, J.R.; CICERO, R.E.; DIBILDOX, M.M. et al. Complejo polimaltoso férrico vs sulfato ferroso en el tratamiento de la anemia por deficiencia de hierro en lactantes. **Rev. Mex. Pediatr.** v. 67, n. 2, 63-67, 2000.

BOVELL-BENJAMIN, A.; VITERI, F. E.; ALLEN, L.H. Iron absorption from ferrous bisglycinate and ferric trisglycinate maize is regulated by iron status. **Am.J.Cli. Nutr** v.71, 1563-1569, 2000.

BROUSSIGNAC, J. Un hault polymère naturel per connum dans l' industrie le chitosane. **Chim. Ind. Gên. Chim.** , v. 99, n. 9, 1211-1247, 1970.

BURTIS, C. A.; ASSHWOOD, E.R. **Tietz:Textbook of clinical chemistry**. 3^a ed. 1698-1705, 1999.

CAMPANA FILHO, S.P.; DESBRIERES, J., In Chitin, chitosan and derivatives, in: Natural Polymers, Derivatives and Composites: Fundamenatls, Properties and Recent Advances, A.A. Leão; E. Frollini; L.H. C. Mattoso, ed., 2000.

CÁRDENAS, G.; CUELLAR,J. D.; NEIRA, K, Synthesis and characterization of carboxymethyl chitosan-arg and carboxymethyl chitosan-lys derivatives. **J. Chil. Chem. Soc.** v.49, 237-240, 2004.

CARPENTER, C.E. Iron status alters the adsorption, uptake and absorption capacities of rat duodenum for ferrous and ferric iron. **Nutr. Res.** v. 15, n. 8, 1129-1138, 1995.

CASAL-GARCIA,M.N.; LAYRISSE, M. The effect of change in pH on the solubility of iron bis-glycinate chelate and other iron compounds. **Arch. Latinoamericano Nutr.** v.51, n. 1, 35-36, 2001.

COPLIN, M.; SCHUETTE,S.; LEICHTMANN, G. Tolerability of iron: a comparison of bisglycino iron II and ferrous sulfate. **Clin. Therapeutics** v. 13, n. 5, 606-612, 1991.

CRAWFORD, R.D. Proposed role for a combination of citric acid and ascorbic acid in the production of dietary iron overload: a fundamental cause of disease. **Biochem. Molecul. Med.** v.54, 1-11, 1995.

CRISPIN, D.J.; VAREY, J.E. Iron release from spinach: effects of treatment on levels of iron (II) and iron (III) release *in vitro*. **Food Chem.** v. 76, 117-123, 2002.

CHANDY, T.; SHARMA, C. Chitosan matrix for oral sustained delivery of ampicilin. **Biomat.** v. 12, n. 12, 939-943, 1993.

CHEN, L.; DU Y.; ZENG, X. Relationships between the molecular structure and moisture-absorption and moisture-retention abilities of carboxymethyl chitosan II. Effect of degree of deacetylation and carboxymethylation. **Carbohydr. Res.** v. 338, 333-340, 2003.

CHEN, L.; TIAN, Z.; DU, Y. Synthesis and pH sensitivity of carboxymethyl chitosan-based polyampholyte hydrogels for protein carrier matrices. **Biomat.** v. 25,n.17, 3725-3732, 2004a.

CHEN, S-C.; WU, Y-C.;MI, F-L. et al. A novel pH-sensitive hydrogel composed of *N,O*-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery. **J. Control. Release.** v. 96, 285-300, 2004b.

CHEN, X-G.; PARK, H-J. Chemical characteristics of *O* – carboxymethyl chitosans related to the preparation conditions. **Carbohydr. Polym.** v. 53, 355-359, 2003.

CHIBA, M: **Concentrations of essential trace elements in blood and introduction of analytical techniques**, Nippon. Rensko, v.54,179-185, 1996.

CHRISTENSEN, J.M.; GHANNAM, M.; AYRES, J.W. Effects of divalent amino acids on iron absorption. **J. Pharm. Sci.** v. 73,n. 9, 1245-1248, 1984.

DE BOER, C. B.; DEKKERS, M. J., Unusual thermomagnetic behaviour of hematites : neoformation of a highly magnetite spinel phase on heating in air. **Geophys. J. Int.**, v.144, 481-494, 2001

DENKBAŞ, E.B.; KILIÇAY, E.; BIRLIKSEVEN, C. et al. Magnetic chitosan microspheres: preparation and characterization. **React. Funct. Polym.** v. 50, 225-232, 2002.

DIAMOND, M.P.; LUCIANO, A.; JOHNS, D.A., et al. Reduction of postoperative adhesions by N,O, carboxymethylchitosan (NOCC): a pilot study. **PCRS Abstracts**, v. 77, n. 4. Sup. 3, 2002.

DUNN, R.L. Polymeric matrices. In: DUNN R.L., OTTENBRITE, R.M. Polymeric drugs and drug delivery systems. USA: **Am. Chem. Soc.**, 11-23, 1990.

EL- GIBALY, I. Development and in vitro evaluation of novel floating chitosan microcapsules for oral use: comparison with non-floating chitosan microspheres. **Int. J. Pharm.** v. 249, 7-21, 2002.

EL-HAWARY, M.F.S.; EL-SHOBAKI, F.A.; KHOLEIF, T., The absorption of iron, with or without supplements of single amino acids and of ascorbic acid, in healthy and Fe-deficient children. **Br.J.Nutr.** v. 33, 351-355, 1975.

EL-TAHER, M.A.; EL- HATY, M.T.; HUSSIEN, T.M. Effect of partially aqueous solutions of different pH's on the hydrolysis rate of some Schiff bases. **Polish J. Chem.** v. 75, 79-91, 2001.

EVANS, J.R.; DAVIDS, W.G.; MACRAE, J.D. et al. Kinetics of cadmium uptake by chitosan-based crab shells. **Water Res.** v. 36, 3219-3226, 2002.

FÁVERE, V. T. Adsorção dos íons Cu (II), Cd (II), Ni (II), Pb (II) e Zn (II) pelos biopolímeros quitina e quitosana e pelas quitosanas modificadas. Florianópolis. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 1994.

FECHNER, P. M.; WARTEWIG, S.; FÜTING, M., et al. Properties of Microcrystalline Cellulose and Powder Cellulose After Extrusion/Spheronization as Studied by Fourier Transform Raman Spectroscopy and Environmental Scanning Electron Microscopy. **AAPS Pharm.Sci.** v.5, n. 4, 2003.

FILHO, N.A.; OLIVEIRA, A.G. Sistemas de micro/nano encapsulação de fármacos. **Pharm. Bras.** v. 9,n.1/5, 18-21, 1999.

GAMBLIN, B.E.; STEVENS, J.G.; WILSON, K.L. Structural investigations of chitin and chitosan complexed with iron or tin. **Hyperf. Interact.** v. 112, 117-122, 1998.

GLOSSER, W.; JAIN, R.K. Method of making ester-crosslinked chitosan support materials and products there of. US 5.874.551, 23 fev, 1999.

GONÇALVES, V.L.; LARANJEIRA, M.C.M.; FÁVERE, V. et al. Effect of crosslinking agents on chitosan microspheres in controlled release of diclofenac sodium. **Polímero: Ciência e Tecnologia.** v. 15,n.1, 6-12, 2005.

GUIBAL, E.; DAMBIES, L.; MILOT, C. et al., Influence of polymer structural parameters and experimental conditions on metal anion sorption by chitosan. **Polym. Int.** v.48, 671-680, 1999.

GUIBAL,E. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review. **Separat. Purific. Technol.** v. 38, 43-74, 2004.

GYURCSIK, B.; NAGY, L. Carbohydrates as ligands: coordination equilibria and structure of the metal complexes. **Coord. Chem. Rev.** v. 203, 81-149, 2000.

HARTHOORN-LASTSHUIZEN, E.J.; LINDEMANS, J.; LANGENHUIJSEN, M.M. Zinc protoporphyrin as screening test in female blood donors. **Clin. Chemv.** v. 44, 800-804, 1998.

HASSAN,E.E.; PARISH, R.C.; GALLO, J.M. Optimized formulation of magnetic chitosan microspheres containing the anticancer agent, oxantrazole. **Pharmac. Res.**, v. 9, 390-397, 1992.

HEJAZI,R.; AMIJI,M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. **J. Control. Release.** v. 89, 151-165, 2003.

HUANG, Y.C.; YEH, M.K.; CHIANG, C.H. Formulation factors in preparaing BTM-chitosan microspheres by spray drying method. **Int. J. Pharm.** v. 242, 239-242, 2002.

HUDSON, J.Q.; COMSTOCK, T.J. Considerations for optimal iron use for anemia due to chronic kidney disease. **Clin. Therapeutics**, v. 23, n.10, 1637-1671, 2001.

HUEBERS, H.A.; HUEBERS, E.; CSIBA, E. et al. The significance of transferrin for intestinal iron absorption. **Blood.** v. 61, 283-290, 1983.

HUGHES, M.N. – The Inorganic Chemistry of Biological Process. John Wiley & Sons, 1985.

HUNT, J.R.; GALLAGHER, S.K; JOHSON, L.K. Effect of ascorbic acid on apparent iron absorption by women with low iron stores. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 59, 1381-1385, 1994.

JONES, C.J. **A Química dos elementos dos blocos d e f.** Porto Alegre: Bookman, 2002.

JUNG, C.H; WEELS, W.W., Spontaneous Conversion of L-Dehydroascorbic Acid to L-Ascorbic Acid and L- Erythroascorbic Acid. **Arch. Bioch. Bioph.** v. 355, 9-14, 1998.

KAIM, W.; SCHWEDERSKI,B. Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of life. Wiley,1991.

KALTWASSER, J.P.; WERNER, E.; NIECKZIEAL, M. Bioavailability and therapeutic efficacy of bivalent and trivalent iron preparations. **Arzneimittelforschung.**, v. 37, n.1A 122- 129, 1987.

KAPLAN, L.A.; PESCE, A. J. **Clin. Chem. Theor. Correl.** Ed. Mosby. 3^a ed.144-158, 1996.

KARSA, D.R.; STEPHENSON, R.A. **Encapsulation and controlled release**, Cambridge:RSC, 1993.

KAS, H. S. Chitosan: properties, preparation and application to microparticulate systems. **J. Microencapsul.**, v. 14, n. 6, p. 689-711, 1997.

KIEBER, R.J. et al. Iron speciation in coastal rainwater: concentration and deposition to seawater. **Marine Chem.** v. 73, 83-95, 2001.

KIM, S.Y.; CHO, S.M.; LEE, Y.M. et al. Thermo – and – pH responsive behaviours of graft copolymer and blend based on chitosan and N- isopropylacrylamide. **J. Appl. Polym. Sci.** v. 78, 1381-1391, 2000.

KNIGHT, B.; BOWEN,L.H.; BEREMAN, R.D., Mössbauer studies of some polysaccharide-iron complexes used as hematinics. **J. Inorg. Bio.** v.64, 225-229, 1996.

KO, J.A.; PARK, H.J., HWANG, S.J. et al. Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery. **Int. J. Pharm.** v. 249, 165-174, 2002.

KUMBAR, S.G.; KULKARNI, A.R.; AMINABHAVI, T.M. Crosslinked chitosan microspheres for encapsulation of diclofenac sodium: effect of crosslinking agent. **J. Microencapsul.** v.19, 173-180, 2002.

KYDONIEUS, A.F. Controlled release technologies: Methods. Theory and applications. Boca Raton: CRC Press, 1980.

LANGER, R. New Methods of Drug Delivery. **Am. Assoc. Adv.** v. 249, 1527-1533, 1990.

LINDNER,W.D.; MOCKEL,J.E., LIPPOLD, B.C, controlled release of drugs from hydrocolloid embeddings, **Pharmazie.** v. 51, 263-272, 1996.

LIU, X.; GUAN, Y.L., YANG, D.Z., et al. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. **J. App. Polym. Sci.** v. 79 1324-1335,2001 .

LONGHINOTTI, E.; FURLAN, L.; LARANJEIRA, M.C.M. et al. Adsorção de azul de metileno e croconato amarelo pelo biopolímero quitona. **Química Nova.** v. 19, n.3, 221-224, 1996.

LU, G.; YAO,X.; WU, X.; et al. Determination of the total iron by chitosan-modified glassy carbon electrode. **Microchemin J.** v. 69, 81-87, 2001.

LYSIONEK, A. E.; ZUBILLAGA, M. B.; SALGUEIRO, M. J. Bioavailability of microencapsulated ferrous sulfate in powdered milk produced from fortified fluid milk: a prophylactic study in rats. **Basic Nutr. Inves.** v. 18, 279-281, 2002.

MALLEY, O J.; HASSAN, A; SCHILLEY, J., et al. Serum iron evaluation with hydroxylamine reaction. **Clin. Chem.** v. 16, 92-101, 1970.

MARINONI, V. CONTI, F. Preparation of chitosan derivative-ferrous ion complexes for the treatment of iron deficiency. **Eur. Pat. Appl.**_n. 194497, 9 pp. 1986.

MARLIN, D.S.; MASCHARAK, P.K.,.Coordination of carboxamido nitrogen to trivalent iron: insight into a new chapter of iron chemistry. **Chem. Soc. Rev.**, v. 29, 69–74, 2000.

MARTÍ,F.B; CONDE, F.L., JIMENO, S.A. et al. **Química Analítica Qualitativa.** Madrid: Paraninfo, 16^a ed., 1998.

MATTHEUS, H.R.; FREEDLAND, R.; MIESFELD, R.L., **Biochemistry: a short course.** Wiley-Liss, Inc. 67-76, 1997.

MAXTON, D.G.; THOMPSON, R.P.; HIDER, R.C. Absorption of iron from ferric hydroxypirane complexes. **Br. J. Nutr.** v. 71, n. 2, 203-207, 1994.

MI, F. et al. Chitosan microspheres modification of polymeric chem.-physical properties of spray dried microspheres to control the release of antibiotic drug. **J. Appl. Polym. Sci.** v. 71, 747-759, 1999.

MI, F-L.; KUAN, C-Y.; SHYU, S-S. et al. The study of gelation kinetics and chain-relaxation properties of glutaraldehyde-cross-linked chitosan gel and their effects on microspheres preparation and drug release. **Carbohydr. Polym.** v. 41, 389-396, 2000.

MILNE, D.B., Trace Elements. In: BURTIS, C. A., ASSHWOOD, E.R. **Tietz:Textbook of clinical chemistry**. 3^a ed. 1029-1035, 1999.

MIN,S.H.;HAN J.S.; SHIN, E.W.; et al. Improvement of cadmium ion removal by base treatment of juniper fiber. **Water Research**, v.38, 1289-1295, 2004.

MOHIE-ELDIN, M-E.Y.; FRANKEL,R.B.; GUNTHER,L. A comparison of the magnetic properties of polysaccharide iron complex (PIC) and ferritin. **J. Magnetism Magnetic materials**.v.135, 65-81, 1994.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R.M.V. **Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização, preparação e purificação**. 2^a.ed. São Paulo: Blücher, 1983.

MUZZARELLI, R. A.A.; BIAGINI, G.; PUGNALONI, A.et al. Reconstruction of parodontal tissue with chitosan. **Biomat.** v. 10, 598-603, 1989.

MUZZARELLI, R., Chitosan-based dietary foods. **Carbohydr. Polym.** v. 29, 309-316, 1996.

MUZZARELLI, R.A.A. Removal of uranium from solutions and brines by a derivative of chitosan and ascorbic acid. **Carbohydr. Polym.** v. 5, 85-89, 1985.

MUZZARELLI, R.A.A.; TANFANI, F.; EMANUELLI, M. Chelating derivatives of chitosan obtained by reaction with ascorbic acid. **Carbohydr. Polym.** v. 4, 137-151, 1984.

NEWTON, D.W. Coacervations: Principles and applications. In: TARCHA,P.J. **Polym. Control. Drug Del.** Boston: CRC Press, 1991. cap. 4, 67-82.

NGAH, W.S.W.; ENDUAL, C.S.; MAYAMAR, R. Removal of copper (II) ions from aqueous solution into chitosan and cross-linked chitosan beads. **React. & Funct. Polym.** v.50, 181-190, 2002.

NGAH, W.W.; AB GHANI, S.; KAMARI, A. Adsorption behaviour of Fe (II) and Fe(III) ions in aqueous solution on chitosan and cross-linked chitosan beads. **Biores. Techn.** v. 96, 443-450, 2005.

NGAH, W.W.; ENDUD, C.S.; MAYANAR, R. Removal of copper (II) ions from aqueous solution onto chitosan and cross-linked chitosan beads. **React. Funct. Polym.** v. 50, 181-190, 2002.

NIETO, J.M.; PENICHE-COVAS, C.; DEL BOSQUE, J. Preparation and characterization of a chitosan – Fe (III) complex. **Carbohydr. Polym.** v. 18, 221-224, 1992.

OCHIAI, E.I. *Bioinorganic Chemistry – An Introduction*. Allyn and Bacon Inc., Boston Mass, 1997.

OGAWA, K.; OKA, K.; YUI, T. X-ray study of chitosan-transition metal complexes. **Chem. Materials.** V. 5, n.5, 726-728, 1993.

OKUYAMA, K.; NOGUCHI, K.; KANENARI, M. et al. Structural diversity of chitosan and its complexes. **Carbohydr. Polym.** v. 41, 237-247, 2000.

OLIVARES, M.; WALETR, T.; HERTRAMPF, E., et al. Anaemia and iron deficiency disease in children. **Br. Med. Bull.** v. 55, n. 3, 534-543, 1999.

OLIVARES, M.; PIZARRO, F., PINEDA, O. et al. Milk inhibits and ascorbic acid favors ferrous bis-glycine chelate bioavailability in humans. **J. Nutr.** v.127, 1407-1411, 1997.

OLIVEIRA, J.E.D.; FREITAS, M.L.S.; FERREIRA, J.F. et al. Iron from complex salts and its bioavailability to rats. **Int. J. Vit. Nutr. Res.** v. 65, 272-275, 1995.

ORGEL, L.E. **Introdução à Química dos metais de transição**, 1^a ed. Edgard&Blücher, 1970.

OUIMET, J.; CROFT, S.; PARÉ, C., et al. Modulation of the Polymorphism of the Palmitic Acid/Cholesterol System by the pH. **Langmuir**, v.19,1089-1097, 2003.

PENICHE-COVAS, C.; ALVAREZ, L.W.; ARGUELLES-MONAL, W. The adsorption of mercuric ions by chitosan. **J. Appl. Polym. Sci.**, v. 46, 1147-1150, 1992.

PEPPAS, N. A. Analysis of Fickian and Non- Fickian Drug release from polymers. **Pharm.Acta.Hel.** v. 60, n. 4, 110-111, 1985.

PLUG, C.M.; DEKKER, D.; BULT,A. Complex stability of ferrous ascorbate in aqueous solution and its significance for iron absorption. **Pharm. Weekbl. Sci.** v.6, n.6, 245-248, 1984.

PO, L., YING; Z.; QIANG, S. et al. The effect of carboxymethyl chitosan on the precipitation of calcium carbonate. **J. Crystal Growth.** v. 261, 571-576, 2004.

RANG, H.P., DALE, M.M. **Farmacologia**. Guanabara Koogan, 4^a ed. 340-343, 2001.

REEDIJK, J., Introduction to bioinorganic chemistry. In: REEDIJK, J. **Bioinorganic Catalysis**, New York: Marcel Dekker, Inc., 1-11, 1993.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J. Nutr.** 1939-1951, 1993.

RITGER, P.L.; PEPPAS, N.A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and Anomalous release from swellable devices. **J. Contr. Rel.** v. 5, 37-42, 1987.

ROBERTS, G.A.F., Chitin Chemistry. Ed. MacMillan Press, 1992.

RUMSEY, S.C.; LEVINE, M., Absorption, transport and disposition of ascorbic acid in humans. **Nutr. Biochem.** v. 9, 116-130, 1998.

SAFAVI, A.; ABDOLLAHI, H., Speciation of Fe(II) and Fe(III) with chromagenic mixed reagents by principal-component regression. **Microchemin. J.** v.63, 211-217, 1999.

SÄKKINEN, M. et al. In vitro evaluation of microcrystalline chitosan (MCCh) as gel-forming excipient in matrix granules. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** v.54, 33-40, 2002.

SANTOS, H. et al. Physical properties of chitosan pellets produced by extrusion/spheronization.: influence of formulation variables. **Int. J. Pharm.** v. 246, 153-169, 2002.

SELIGMAN, M.D, MOORE, G.M, SCHLEICHER, B.S. Clinical studies of HIP: an oral heme-iron product. **Nutr. Res**, v. 20, n. 9, 1279-1286, 2000.

SHIN, E. W.; HAN, J. S.; ROWELLI, R. M., et al. Enhancement of Cadmium Ion Sorption Capacity of Lignocellulosic Bio-sorbent by Sulfonation, Proceedings of **AIChE Annual Meeting**, San Francisco, CA, 16-20 November, 2003.

SHRIVER, D.F.; ATKINS, P.W.; LANGFORD, C.H., **Inorganic chemistry** . 2^a ed. Oxford University Press, 1994.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A., Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 48, 139-157, 2001.

SINHA, V.R.; SINGLA, S.; WADHAWAN, R. et al. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. **Int. J. Pharm.** v. 274, 1-33, 2004.

SIPOS, P.; BERKESI, O.; TOMBÁ CZ, E. et al. Formation of spherical iron (III) oxyhydroxide nanoparticles sterically stabilized by chitosan in aqueous solutions. **J. Inorg. Biochem.** v. 95, 55-63, 2003.

SKINE, B.; FONZO, D., LYNCH, C.R., COOK, J.D. Bovine ferritin iron bioavailability in man. **Eur. J. Clin. Invest.** v. 27, n. 3, 228-233, 1997.

SPARKS, R.E. Microencapsulation. In: OTHEMR, K. **Encyclopedia of chemical technology**. New York: J. Wiley, 1990. v. 15, 470-493.

SREENIVASAN, K. Thermal stability studies of some chitosan- metal ion complexes using differential scanning calorimetry. **Polym. Degrad. Stab.** v. 52, 85-87, 1996.

SREERAM, K.J.; SHRIVASTAVA, Y.; NAIR, B.U. Studies on the nature of interaction of iron (III) with alginates. **Bioch. Bioph. Act.** v. 1670, 121-125, 2004.

STRYER, L. **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 4^a ed, 144-158, 1996.

TOLBERT, B.M; WARD, J.B, Dehydroascorbic acid. In: Ascorbic acid: Chemistry, Metabolism and Uses.(P.A. Seib and Tolbert, eds.) **Am. Chem. Soc.**, 101-123, 1982.

TOMA, H.E. Química Bioinorgânica. Org. Est. Americanos, v.29, Washington, DC, 1984.

TOZAKI, H.; KOMOIKE, J.; TADA, C. et al. Chitosan capsules for colon-specific drug delivery: improvement of insulin absorption from the rat colon. **J. Pharm. Sci.** v. 86, n.9, 1016-1021, 1997.

UICICH, R.; PIZARRO, F.; ALMEIDA, C. et al. Bioavailability of microencapsulated ferrous sulfate in fluid cows milk studies in human beings. **Nutr. Res.** v. 19, n. 6, 893-897, 1999.

VAN WYCK.D.B.; CAVALLO,G.; SPINOWITZ, B.S., et al. Safety and efficacy of iron sucrose in patients sensitive to iron dextran : North American clinical trial. **Am. J. Kidney Dis.** v. 36, 88-97, 2000.

VARMA, A.J.; DESHPANDE, S.V.; KENNEDY, J.F. Metal complexation by chitosan and its derivatives: a review. **Carbohydr. Polym.** v. 55, n.1, 77-93, 2001.

VOET, D.; VOET, J.G. **Biochemistry**, Somerset :John Wiley & Sons, Inc. 2001 HAEN, P.J. Iron deficiency anemia. In: Harris Young L, ed. **Principles of Hematology**. Duboque, J.A: Willian C. Mrown Publisher, 118-125, 1995.

VON WIRÉN, N.; KHODR, H.; HIDER, R. C., Hydroxylated Phytosiderophore Species Possess an Enhanced Chelate Stability and Affinity for Iron(III). **Plant Physiol.** v.124, 1149–1157, 2000.

WALTER, T.; OLIVARES, M.; PIZARRO, F.; MUNOZ, C. Iron, anemia and infection. **Nutr. Rev.** v. 55, 111-124, 1997.

WHITTAKER, P.; MAHONEY, A.W.; HENDRICKS, D.G. Effect of iron-deficiency anemia on percent blood volume in growing rats. **J. Nutr.** v. 114, n. 6, 1137-1142, 1984.

WILKINS, P.C.P.; WILKINS, R.G., **Inorganic chemistry in biology**, New York, Oxford Chemistry Primers, 1997.

YANG, Z.; ZHUANG, L.; TAN, G. Preparation and adsorption behavior for metal of chitosan crosslinked by dihydroxy azacrown ether. **J. Appl. Polym. Sci.** v. 85, 530-535, 2002.

ZHAO, Z.; WANG, Z.; YE, N. et al. A novel N,O- carboxymethyl chitosan / poly (ethersulfone) composite MF membrane and its charge characteristics. **Desalination.** v. 144, 35-39, 2002.