

## Estudo de Toxicidade Aguda Oral (Dose Única) de N-Carboximetilquitosana

Rafael Rodriguez Antelo LOPES<sup>1</sup>, Roberta LAMIM<sup>2</sup>, Rilton Alves de FREITAS<sup>3</sup>,  
Cristiani BÜRGER<sup>3</sup> & Tania Mari Bellé BRESOLIN<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Curso de Farmácia, <sup>2</sup> Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas,

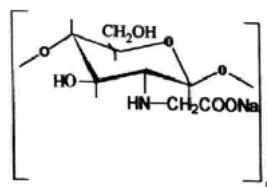
<sup>3</sup> Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí,  
UNIVALI, CP 360, CEP 88302-202, Itajaí (SC), Brasil

**RESUMO.** O objetivo deste trabalho foi obter e analisar a N-Carboximetilquitosana (N-CMQ) a partir da Quitosana comercial (QTS) quanto ao potencial de toxicidade aguda (via oral). A N-CMQ obtida apresentou características adequadas quanto ao grau de substituição (26%), possuindo vantagens em relação ao polímero de origem, como a solubilidade em água, viabilizando inúmeras aplicações farmacêuticas. Neste estudo foram empregados ratos fêmeas, realizando-se um ensaio limite, a partir do qual foi concluído que a N-CMQ pode ser classificado como “sem classificar” quando administrado em uma dose de 2 g/kg, via oral, em ratos.

**SUMMARY.** “Toxicity acute study at limit-dose of N-Carboxymethylchitosan”. The aim of this work was to analyze the possible oral acute toxicity of the N-carboxymethylchitosan (N-CMC) obtained from commercial chitosan. The N-CMC presented suitable characteristics (degree of substitution of 26%) and represent an alternative to pharmaceutical applications due to they aqueous solubility. In the present study were used females rats, in a limit dose assay and the product was classified into unclassified category when being administrated in one dose of 2 g/kg (p.o.) in rats.

### INTRODUÇÃO

A quitina (QTN) é o segundo biopolímero mais abundante na natureza, após a celulose<sup>1</sup>. Presente na casca de crustáceos, representa um subproduto da atividade pesqueira, característica de regiões litorâneas. A quitosana (QTS) é um derivado hidrolizado da quitina (através de processos químicos ou enzimáticos), representando a forma desacetilada desta, composta principalmente de glicosamina 2-amino-2-desoxi-D-glicose, com diferentes graus de desacetilação podendo ser solúvel em soluções ácidas em virtude de sua natureza policatiónica. Este polímero é disponível comercialmente e possui diversas aplicações industriais, na área de biomateriais, alimentos, cosméticos, e medicamentos<sup>2</sup>. Tais aplicações devem-se às características associadas à segurança de seu uso (baixa toxicidade, biodegradabilidade, ausência de alergenicidade), atividades biológicas (anticoagulante, antifúngica, antimicrobiana)<sup>3</sup>, propriedades fisi-



**Figura 1.**  
Estrutura da  
N-Carboximetilquitosana  
(N-CMQ).

co-químicas (aumento de viscosidade, formação de gel, propriedades formadoras de filme - os filmes de QTS apresentam dureza, elasticidade e resistência, sendo que a maioria destas propriedades mecânicas é comparável a muitos polímeros comerciais<sup>1</sup>, entre outras. Além disso, a QTS pode ser quimicamente modificada por possuir grupamentos amino livres, presentes ao longo da cadeia principal, para obtenção de novos derivados solúveis em água<sup>4</sup>, como a N-carboximetilquitosana (N-CMQ, Figura 1)<sup>5</sup>, ampliando as possíveis aplicações do polímero.

Para sintetizar a N-CMQ solúvel em água, deve haver uma razão equimolar entre o ácido

**PALAVRAS-CHAVE:** Biopolímero, N-carboximetilquitosana, Toxicidade aguda oral.

**KEY WORDS:** Biopolymer, N-carboxymethylchitosan, Oral Acute toxicity.

\* Autor a quem dirigir a correspondência. E-mail: tania@ccs.univali.br, tbresolin@univali.br

glioxílico e o grupo amino. Quando um excesso de ácido glioxílico é usado obtém-se N-CMQ insolúvel. Isto ocorre pela presença da função aldeído que é altamente reativa<sup>6</sup>. O ácido glioxílico (HO<sub>2</sub>CCHO), por possuir dois átomos de carbono na forma carbonila, é usado em síntese orgânica, especialmente no campo farmacêutico. Quando o ácido glioxílico é adicionado à suspensão aquosa de QTS, esta é imediatamente dissolvida formando um gel com valores de pH entre 4,5-5,5. Aumenta-se este pH com hidróxido de sódio formando N-(carboximetilidene) quitosana (base de schiff), esta é reduzida com borohidreto de sódio a temperatura ambiente em N-CMQ, um pó branco solúvel em água a todos os valores de pH. Uma série de N-CMQ pode apresentar vários graus de acetilação e devido a alta reatividade é inevitável sua substituição<sup>5-6</sup>.

Apesar das várias potenciais aplicações da N-CMQ, muitas em consequência da similaridade e das vantagens em relação ao polímero de origem, há poucos dados na literatura sobre este derivado, sendo suas propriedades físico-química recentemente avaliadas<sup>7-8</sup>. Para viabilizar as possíveis aplicações é fundamental conhecer especificamente o potencial tóxico deste derivado, uma vez que somente os dados toxicológicos da QTS são conhecidos. O objetivo deste trabalho é obter informações sobre a toxicidade aguda oral da N-CMQ, em ratos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### **Análise da QTS**

Foi utilizada uma amostra comercial de QTS (doada pela Universidade Federal de Santa Catarina) para a síntese da N-CMQ. A QTS foi previamente analisada com relação à perda por dessecação, em balança de secagem por infravermelho (LJ 16 Mettler Toledo) utilizando-se alíquotas de 500 mg, até massa constante. Também foi avaliado o teor de cinzas sulfatadas<sup>9</sup>.

O grau de desacetilação da QTS foi avaliado pelo método de Tan *et al.*<sup>10</sup>. Uma série de soluções padrão de N-acetil-glucosamina-NAG (Sigma) de 0,005- 0,04 mg/mL em ácido acético 0,01 M (5 replicatas) foram preparadas e o espectro de primeira derivada foi registrado. A primeira derivada do ácido acético em concentrações de 0,01, 0,02 e 0,03M foi obtida usando um espectrofotômetro (Shimadzu, UVPC 1601), na faixa de 190 a 250 nm, numa velocidade de 30 nm/min, utilizando uma cubeta de quartzo

com caminho óptico de 1 cm. O ponto de convergência zero (PCZ) foi determinado pela sobreposição dos espectros destas soluções. A distância vertical do PCZ para cada espectro de solução de NAG foi mensurado (valor H). Uma curva de calibração linear foi obtida plotando-se o valor H em função da correspondente concentração de NAG. Todos os espectros foram sobrepostos em um diagrama e a altura do pico de cada concentração de NAG analisada foi medida acima do ponto zero para o ácido acético.

A amostra de QTS foi previamente dissolvida em ácido acético 0,01M na concentração de 5 mg/mL, desta solução foi retirada uma alíquota de 1mL e diluída em 100mL de ácido acético 0,01M, resultando em uma concentração de 0,05mg/mL. Seu espectro de primeira derivada foi registrado e o valor H foi medido no PCZ., obtendo-se a contribuição devido aos grupos NAG da amostra através da curva de calibração. O grau de desacetilação foi calculado em %.

### **Obtenção e análise da N-CMQ**

A N-CMQ foi obtida segundo metodologia adaptada de *Muzzarelli et al.*<sup>5</sup>, onde em 5,75 g de ácido glioxílico (1300 mL de água destilada) foram adicionados 10 g de QTS, com agitação mecânica por 48 h, na temperatura ambiente. Logo após, ajustou-se o pH para 4,00 com auxílio de solução de hidróxido de sódio 1M, e com o auxílio de um funil de separação gotejou-se 100 mL de solução de borohidreto de sódio a 2% mantendo o sistema sob agitação mecânica por mais 24 h, na temperatura ambiente. A N-CMQ foi precipitada, sob agitação, com 4 volumes de álcool etílico absoluto PA. Quando ocorreu a precipitação suspendeu-se a agitação e deixou-se decantar, resfriando a suspensão em banho de gelo, até atingir 20 °C e filtrando-se o polímero com tecido nylon<sup>®</sup>. A N-CMQ, então foi secada em estufa a vácuo a 40 °C, por 6 h e mantida em dessecador.

A determinação do % de grupamento carbóxil na amostra de N-CMQ foi realizado através do método condutivimétrico descrito por Casu e Gennaro<sup>11</sup>. Também foi avaliada a perda por dessecação e o teor de cinzas sulfatadas, do mesmo modo que para a QTS. A N-CMQ foi caracterizada através de análises de FTIR (espectrômetro Hartmann e Braum MB-serie), utilizando-se KBr como suporte em uma faixa de número de onda de 400 to 4.000 cm<sup>-1</sup> com uma resolução de 2 cm<sup>-1</sup>, com 19 leituras em uma taxa de 10 leituras por minuto.

**Estudo de toxicidade aguda oral**

O trabalho foi realizado no laboratório de farmacologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Vale do Itajaí, a qual conta com um biotério concebido para proporcionar aos animais condições adequadas à reprodução e manutenção, com padrão sanitário tipo SPF (criação de animais sem patogenia especial) e seguindo normas internacionais <sup>12</sup>. Foram utilizados 20 ratos (fêmeas) *Wistar* de 8-12 semanas de idade, com massa de 150-200 g, agrupados em 4 grupos aleatórios de 5 animais cada: 1) animais tratados com N-CMQ (300 mg/kg em cerca de 2 mL de água); 2) animais controle do veículo (água, 2 mL); 3) animais tratados com N-CMQ (2.000 mg/kg em cerca de 2 mL de água); 4) animais controle do veículo (água, 2 mL). Em todos os casos se administrou uma única dose por via oral (com seringa e cânula intragástrica). Não se podendo administrar em doses únicas em uma só vez, frações menores foram administradas em período não superior a 24 h. A dose foi administrada em volumes semelhantes, dependendo do peso do animal, não sendo excedendo 2mL/100 g. As doses foram preparadas próximo da aplicação para garantir a estabilidade da mesma. Os animais, os quais estavam em jejum durante 48 h, foram pesados antes dos tratamentos, no 7° e no 14° dia de estudo. A duração total do estudo foi de 14 dias. A temperatura do ambiente foi controlada entre 19 °C e 25 °C, umidade relativa do ar 30% a 70%, sendo os animais mantidos sob iluminação artificial em uma sequência de 12 h claro e 12 h escuro. A alimentação seguiu a dieta convencional, sem falta de água. Os animais foram agrupados de modo que o número de animais não interferisse na observação individual.

Os animais foram observados individualmente, após a primeira dose, por cerca de 30 minutos, e periodicamente durante as primeiras 24 h, com atenção especial durante as primeiras 4 h, e diariamente depois disso, num total de 14 dias. No décimo quinto dia, os animais foram pesados e sacrificados após anestesia (hiperventilação com oxigênio) e lesão cervical. Todos os animais de teste foram submetidos a necrópsia, sendo as mudanças patológicas dos órgãos registradas.

Os dados obtidos foram processados estatisticamente com o software Excel, versão 2.0, utilizando o teste t de student ( $p > 0,05$ ), para duas amostras presumindo variâncias equivalentes.

**RESULTADOS E DISCUSSÕES**

**Caracterização da QTS e da N-CMQ**

Na Tabela 1, encontram-se os resultados da caracterização da QTS e do derivado obtido, a N-CMQ.

A N-CMQ obtida resultou em um pó esbranquiçado, com aspecto variando de pó fino a granuloso. A QTS, por sua vez, apresenta uma cor amarelada. A QTS apresentou valores levemente superiores ao especificado de perda por dessecação (no máximo 10% em 1g) e valor de cinzas sulfatadas (máximo 1% em 1g) de acordo com a especificação farmacopéica para o cloridrato de QTS <sup>13</sup>. Como mostra a tabela 01, o derivado apresentou um teor de cinzas sulfatadas bem superior ao da QTS, mostrando a maior estabilidade térmica do derivado, uma vez que este conteúdo de cinzas ainda contém matéria orgânica não degradada termicamente.

O Grau de desacetilação da QTS foi de cerca de 90%, dentro da especificação farmacopéica, de 70-95 % <sup>13</sup>, cuja determinação é realizada a partir da curva padrão da 1° derivada da absorvância de soluções de N-Acetilglucosamina. A curva padrão apresentou uma boa correlação, como mostra o valor do coeficiente de correlação ( $R^2 = 0,9963$ )

O grau de substituição da N-CMQ, encontra-se dentro da faixa dos valores descritos por Muzzarelli *et. al.* <sup>5</sup> de 14-58 %.

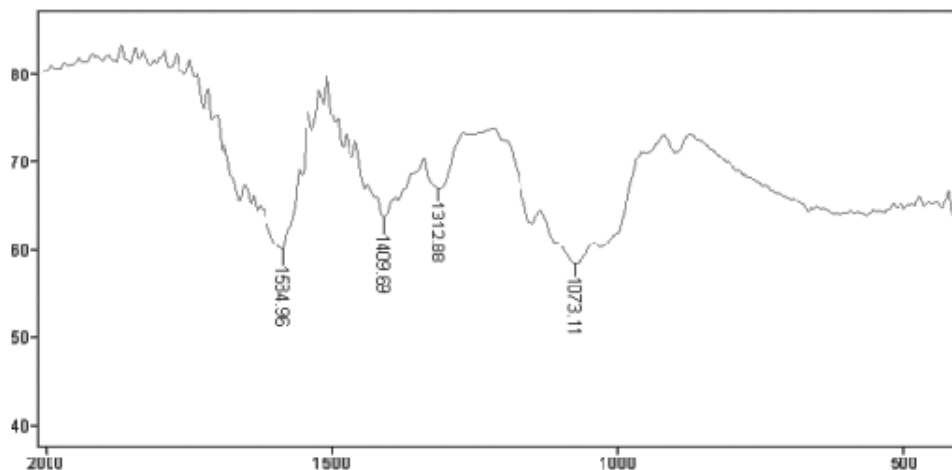
O espectro de IV da N-CMQ (Figura 2), corresponde ao citado por Muzzarelli *et al.* <sup>5</sup>, com as bandas em 1584 e 1409  $cm^{-1}$ , atribuídas ao íon carboxilato, comprovando o sucesso da síntese.

**Estudo de toxicidade**

Não foi observado morte ou qualquer outro sinal de toxicidade nos animais controle ou tratados com as doses de 300 e 2000 mg/kg durante o estudo. Na Tabela 02 observa-se o comportamento do ganho de massa corpórea durante o estudo. A administração de N-CMQ na dose de 2000 mg/kg não gerou diferenças de ganho de

	N-CMQ	QTS
Perda por dessecação (%)	10,0	11,9
Cinzas sulfatadas (%)	15,0	1,3
% grupos carboxil	26	-
Grau de desacetilação (%)	-	89,2

**Tabela 1.** Características dos biopolímeros QTS e N-CMQ.



**Figura 2.**  
Espectro de IV da N-CMQ, em disco de KBr.

	7 dias	14 dias
Controle	16,6 (8,7%)	32,8 (17,1%)
300 mg/kg	10,8 (5,4%)	26,6 (13,2%)
Controle	17,9 (10,1%)	35,1 (19,8%)
2.000 mg/kg	16,6 (8,8%)	33 (17,4%)

**Tabela 2.** Ganho de massa corpórea (g) dos animais durante o estudo de toxicidade aguda de N-CMQ (desvio padrão).

massa estatisticamente significativas em relação ao grupo controle ( $p > 0,05$ ). Já o grupo tratado com a dose de 300 mg/kg, após o 7º dia, apresentou um ganho de peso estatisticamente inferior ao respectivo grupo controle, sendo que após 14 dias não houve mais diferença estatisticamente significativa entre ambos.

No décimo quinto dia os animais foram sacrificados e posteriormente foi realizada a necropsia de todos os animais, realizando-se uma análise macroscópica dos órgãos: coração, timo, pulmões, baço, intestino delgado e grosso e glândulas mesentéricas, buscando-se possíveis sinais de toxicidade. Não foram encontradas alterações ou danos atribuídos a administração da N-CMQ por esta via de administração.

Em observações clínicas realizadas durante o estudo como alterações do sistema respiratório, sistema nervoso central e periférico somático e autônomo e sistema locomotor, não se observaram alterações comportamentais dos animais, nem qualquer sinal de toxicidade. A sobrevivência de 100% dos animais em doses de 2000 mg/kg indica que este pode ser considerado como "sem classificar" quanto à toxicidade e que, por analogia, a sua DL50 por via oral é superior a este valor.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Shahidi, F., J.K.V. Arachchi. & Y.J. Jeon (1999) *Trends Food Sci. Technol.* **10**: 37-51.
- Berger, J., M. Reist, J.M. Mayer, O. Felt, N.A. Peppas & R. Gurny (2004) *Europ. J. Pharm. Biopharm.* **57**: 19-34.
- Ari, K., T. Kinumaki & T. B. Fugita (1968) *To-kai Reg. Fish. Res. Lab.* **56**: 89.
- Delben, F., R. Lapasin & S. Pricl (1989) *Int. J. Biol. Macromol.* **12**: 9-13.
- Muzzarelli, R. A. A., F. Tanfani, M. Emanuelli & S. Mariotti (1982) *Carbohydr. Res.* **107**: 199-214.
- Muzzarelli, R.A.A., P. Iiari & M. Petrarulo (1994) *Int. J. Bol. Macromol.* **16**: 177-80.
- Monagas, S.A.F., M.D.R. Albadalejo, O.B. Revoredo & O.M.N. Acosta (1998) *Rev. Cubana Farm.* **32**: 120-4.
- Miranda, M.E.S., C.A. Rodrigues, T.M.B. Bresolin, R.A. Freitas & E. Teixeira (2003) *Alimentos e Nutrição* **14**: 141-7.
- "Farmacopéia Brasileira." (1988) Ed. Atheneu. São Paulo. 4. ed. Parte I.
- Tan, S. C., E. Khor, T. K. Tan & S. M. Wong (1998) *Talanta.* **45**: 719.
- Casu, B. & U. Gennaro (1975) *Carbohydr. Res.* **39**: 168-76.
- OECD (2001) "Guideline for testing of chemicals. Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure" p. 420.
- European Pharmacopoeia (2002) Council of Europe. Strasbourg. 4 ed.