



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
E ENGENHARIA DE MATERIAIS**



Rossanna Trócolli

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE BIOFILMES CONJUGADOS DE
QUITOSANA E QUITOSANA / INSULINA**

Campina Grande – PB
2015

Rossanna Trócoli

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE BIOFILMES CONJUGADOS DE
QUITOSANA E QUITOSANA / INSULINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande, Área de Concentração: Novos Materiais, como requisito final à obtenção do título de **Mestre em Ciências e Engenharia de Materiais**

Orientador: PROF. DR. GELMIRES DE ARAÚJO NEVES

Orientador: Prof. Dr. MARCUS VINÍCIUS LIA FOOK

Campina Grande – PB
2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

T843d Trócolli, Rossana.
Desenvolvimento e avaliação de biofilmes conjugados de quitosana e quitosana / insulina / Rossana Trócolli. – Campina Grande, 2015.
69 f. : il. Color.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia.
"Orientação: Prof. Dr. Gelmires de Araújo Neves, Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook".
Referências.

1. Biomateriais. 2. Diabetes *Mellitus*. 3. Biofilmes. 4. Insulina.
I. Neves, Gelmires de Araújo. II. Lia Fook, Marcus Vinícius. III. Título.

CDU 620.1(043)

VITAE DO CANDIDATO

Rossanna Trócolli

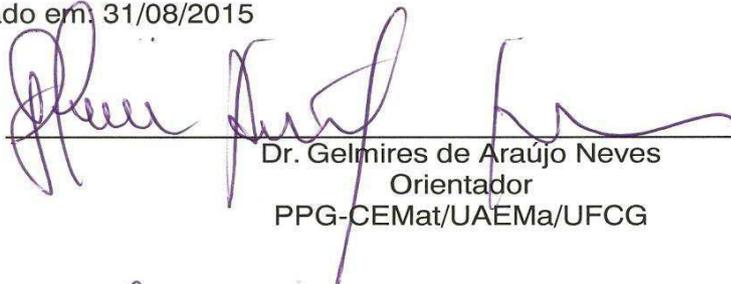
- Graduada em Enfermagem (1988) e em Medicina (1995) pela Universidade Federal da Paraíba – UFPB, com mais de 20 anos de experiência em Obstetrícia;
- Especialista em Administração Hospitalar – Ministério da Saúde - MS e Universidade Estadual do Rio de Janeiro – UERJ.
- Médica concursada do Programa de Saúde da Família, no Município de Itapororoca – PB, no período de abril de 2011 a agosto de 2014;
- Médica da Maternidade do Hospital Geral de Mamanguape, desde janeiro de 2015;
- Médica do S.A.D. – Serviço de Atenção Domiciliar do Município de João Pessoa – PB, desde Novembro de 2014;

ROSSANA TROCOLLI

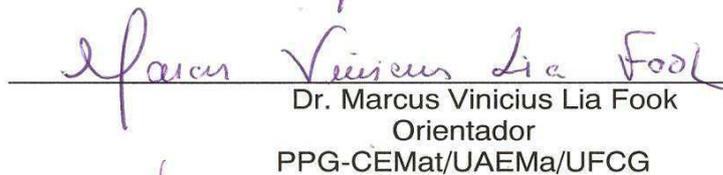
DESENVOLVIMENTO DE AVALIAÇÃO DE BIOFILMES CONJUGADOS DE
QUITOSANA E QUITOSANA/INSULINA

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciência e
Engenharia de Materiais como requisito
parcial à obtenção do título de **Mestre
em Ciência e Engenharia de
Materiais.**

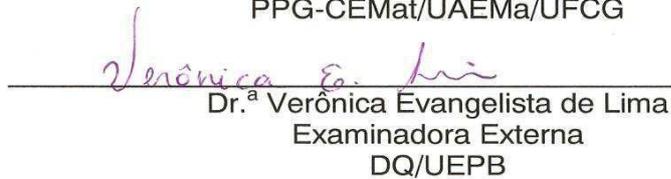
Aprovado em: 31/08/2015



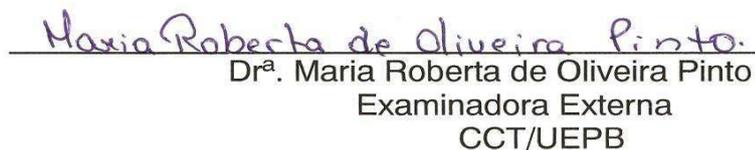
Dr. Gelmires de Araújo Neves
Orientador
PPG-CEMat/UAEMa/UFCG



Dr. Marcus Vinicius Lia Fook
Orientador
PPG-CEMat/UAEMa/UFCG



Dr.ª Verônica Evangelista de Lima
Examinadora Externa
DQ/UEPB



Dr.ª Maria Roberta de Oliveira Pinto
Examinadora Externa
CCT/UEPB

A Deus, representado pela vida, pelas oportunidades, pela fé, pelo amor sem fronteiras ou dimensão; por me fazer acreditar que posso mais, em cada momento da imensa luta interior que travo, vida a vida, mundo afora, comigo mesma, ora saindo como vencedora, ora como vencida, mas continuo... guiada e impulsionada pela força que, certamente, vem d'Ele e, assim, passo a passo, vou até a conquista que Ele me reserva no infinito de Seu amor.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, que sempre me incentivou a voos mais altos no âmbito do conhecimento, do saber que ela sempre quis ter e do qual, pela família, abdicou, mesmo sabendo que era o caminho para “ser livre”! Hoje percebo que a vida lhe tem trazido muito mais do que conhecimento, tem lhe trazido sabedoria;

Ao meu irmão, companheiro de tantas vidas, que, mesmo diante de nossas imensas diferenças, apoiou-me nesta difícil decisão de “voltar” à Academia;

A Germana, por seu apoio, por suas “suaves” cobranças e por ter me inspirado, com seu retorno aos estudos, transmitindo a ideia de que eu também posso;

A Daví, meu filho que, distante e sem saber, faz-me querer ser melhor;

A Luna, minha companhia constante durante as horas em que me debruçava sobre os estudos, sempre alegre, disponível, atenta às minhas chegadas e saídas, derramando sobre mim o seu amor incondicional;

A Ana Amélia, minha cunhada, sempre solícita e ponderada, pela amizade, encorajamento, apoio e confiança em mim e no meu trabalho;

Ao Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook, pelo Mestre, no sentido exato da palavra que é, por sua humildade, amizade, disponibilidade e pelo incentivo, principalmente, nos momentos mais difíceis, onde, para mim, o caminho mais fácil seria desistir;

A Associação Médica da Paraíba, por ver, nesse intercâmbio, a possibilidade de crescimento de seus associados;

Aos professores que acreditaram neste projeto, a meu ver, genial, de unir a Medicina e a Engenharia para proporcionar, aos que precisam melhor qualidade de vida e, por vezes, alívio de suas dores ou a cura de suas mazelas;

Aos colegas de turma, pelo compartilhamento de momentos de cumplicidade, dúvidas e certezas;

Aos funcionários do CERTBIO e da AMB – PB, por sua presteza e gentileza no trato para comigo;

A graduanda Anne Targino, por sua disponibilidade e amizade;

Aos doutorandos Willams e Imarally, pelas orientações na apresentação do Seminário;

Ao doutorando Wladymyr Jefferson, pelas orientações, paciência e sugestões;

Enfim, minha eterna gratidão a todos que me trouxeram, consciente ou inconscientemente, estímulo e, assim, contribuíram, direta ou indiretamente, para a concretização de mais este sonho.

“Ontem passado. Amanhã futuro. Hoje agora. Ontem foi. Amanhã será. Hoje é.
Ontem experiência adquirida. Amanhã lutas novas. Hoje, porém, é a nossa hora de
fazer e de construir”.

Chico Xavier

RESUMO

O Diabetes Mellitus configura-se como uma epidemia mundial. É o mais frequente distúrbio que envolve o metabolismo de carboidratos e é caracterizado pelo aumento da taxa de glicose no sangue, a chamada hiperglicemia. É uma doença decorrente da falta de produção ou déficit da ação da insulina. O seu tratamento é a insulino-terapia. Trabalhos utilizando-se da quitosana, como carreador da insulina, são considerados promissores como alternativa da via de administração da mesma. A quitosana é um polissacarídeo de origem natural, biocompatível e biodegradável. Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo desenvolver e avaliar biofilmes conjugados de quitosana e quitosana/ insulina. Os biofilmes foram desenvolvidos pelo método *dip-coating* e caracterizados pelas técnicas Difração de raios-X (DRX), Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Microscopia Ótica (MO), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) / Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS) e Molhabilidade por Medida de Ângulo de Contato. A técnica de DRX demonstrou alteração no caráter semicristalino da quitosana com a presença da insulina. Já com o FTIR, foi possível identificar a interação entre a quitosana e a insulina. Foi possível perceber, através das técnicas de MO e MEV, alteração na morfologia dos biofilmes contendo insulina quando comparada a de quitosana pura, com a presença de partículas granulares de tamanhos variados. Já os elementos químicos presentes na quitosana e na insulina foram detectados pela técnica de EDS e, no ensaio de tensão superficial, foi possível observar um aumento no caráter hidrofílico dos biofilmes contendo insulina em comparação àqueles de quitosana pura. Baseado nos resultados obtidos, conclui-se que há evidência da incorporação da insulina ao biofilme de quitosana, indicando possibilidades de uso em tratamentos menos invasivos no futuro.

Palavras-chave: 1. Biomateriais. 2. Diabetes *Mellitus*. 3. Biofilmes. 4. Insulina.

ABSTRACT

Diabetes Mellitus appears as a worldwide epidemic, as the most frequent disorder that involves the metabolism of carbohydrates and is characterized by the increased rate of glucose in the blood, called hyperglycemia. It is a disease resulting from the lack of production or the deficit action of insulin. Its treatment is insulin therapy. Works using the Chitosan as carrier of insulin are considered promising as an alternative to the route of administration. Chitosan is a natural polysaccharide, biocompatible and biodegradable. In this context, the present study aimed to develop and evaluate conjugated Chitosan and Chitosan biofilms/insulin. The Biofilms were developed by dip-coating method and characterized by x-ray Diffraction (DRX), Spectroscopy in the region of Fourier transform infrared (FTIR), Optical Microscopy(MO), Scanning Electron Microscopy (SEM), Energy Dispersive Spectroscopy/x-ray (EDS) and Wettability by Measuring Contact Angle. The technique of DRX demonstrated change in character of biodegradable thermoplastic Chitosan with the presence of insulin. With FTIR, the interaction between Chitosan and insulin was identified. It was possible to realize, through techniques of MO and MEV, change in morphology of membrane containing insulin when compared to pure Chitosan, with the presence of granular particles of varying sizes. The chemical elements already present in Chitosan and insulin were detected by EDS technique and, in the testing of surface tension, it was possible to observe an increase in the hydrophilic character of the biofilms containing insulin in comparison to those of pure Chitosan. Based on the results obtained, it is concluded that there is evidence of the incorporation of insulin to the biofilm of Chitosan indicating possibilities for use in less invasive treatments in the future.

Keywords: 1. Biomaterials. 2. Diabetes Mellitus. 3. Biofilms. 4. Insulin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema do Metabolismo normal e das modificações no metabolismo de um organismo com Diabetes (Genuth,2008).....	19
Figura 2– Mecanismo de Regulação da Insulina e do Glucagon (Genuth, 2008).	20
Figura 3 – Razão Insulina / Glucagon (Genuth, 2008).....	21
Figura 4– Esquema para Demonstração de Níveis após Administração de Combinações Diferentes de Insulina em Pacientes Diabéticos (Genuth, 2008)	292
Figura 5– Fluxograma do Rastreamento do Diabetes Gestacional (Bezerra, 2012)	29
Figura 6 - Molécula de Pró-insulina humana (Smith; Marks e Lieberman, 2007).....	32
Figura 7 - Localização da Lipodistrofia – Células de gordura (Alexandre, 2015).	37
Figura 8- Esquema de desacetilação da quitina, originando a quitosana (Adaptado de Stamford, 2006).	41
Figura 9- Mecanismo imunomodulador da quitosana (Adaptado de Muzzarelli, 1992 e Muzzarelli, 1997).....	43
Figura 10 - Perfil de liberação de fármacos convencional e controlada em função do tempo (Vitaline, 2010).	45
Figura 11 - Fluxograma da elaboração das membranas dos biofilmes de quitosana (Fonte: própria)	47
Figura 12 - Fluxograma da elaboração das membranas dos biofilmes de quitosana (Fonte: própria)	47
Figura 13 - Difratoograma de Raios X do pó da quitosana (Q_Pó) (Fonte: Própria). ..	51
Figura 14 - Difratoograma de Raios X da membrana de quitosana (Q) (Fonte: Própria).	52
Figura 15 - Difratoograma de Raios X da membrana de quitosana com insulina (Q_I) (Fonte: Própria).....	52
Figura 16 - Difratoograma de Raios X da membrana de quitosana com insulina (Q_I_Q) (Fonte: Própria).	53
Figura 17 - Espectro da Quitosana em Pó (Q_Pó) e da Insulina (Fonte: Própria)	54
Figura 18 - Espectro das Membranas (Q), (Q_I) e (Q_I_Q) (Fonte: Própria).	56
Figura 19 - Micrografia das membranas (Q), (Q_I) e (Q_I_Q). Magnitude de 1750x (Fonte: Própria)	57
Figura 20 - MEV e EDS da membrana de Quitosana (Q) (Fonte: Própria).	58
Figura 21 - MEV e EDS da membrana de Quitosana (Q) (Fonte: Própria).	59
Figura 22 - MEV e EDS da membrana de Quitosana (Q) (Fonte: Própria).	60

Figura 23 - Medida de ângulo de contato para as membranas Q, QI e QIQ. (Fonte: Própria)61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação do Diabetes Mellitus	24
Tabela 2 - Glicose plasmática (em mg/dl) para o diagnóstico de Diabetes Mellitus e intolerância à glicose.....	24
Tabela 3 - Tipos de Insulina de acordo com sua duração	33
Tabela 4 - Denominação das amostras.....	48
Tabela 5 - Bandas de absorção do pó de quitosana.	55

LISTA DE SIGLAS

CERTBIO Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste

DMID Diabetes Melitus insulino dependente

DMNID Diabetes Melitus não insulino dependente,

DNA Ácido Desoxirribonucleico

DRX Difração de Raio X

FTIR Espectroscopia na Região do Infra Vermelho com Transformada de Fourier

GA Grau de Acetilação

GD Grau de Desacetilação

GP Grau de Polimerização

HGM Hospital Geral de Mamanguape

MO Microscópio Ótico

MEV Microscopia Eletrônica de Varredura

NPH Neutral Protamine Hagedorn

PSF Programa de Saúde da Família

Q Quitosana

Q_I Quitosana Insulina

Q_I_Q Quitosana Insulina Quitosana

Rpm Rotação por minutos

SAD Serviço de Atenção Domiciliar

UERJ Universidade Estadual do Rio de Janeiro

UFCG Universidade Federal de Campina Grande

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
2.1 Diabetes <i>Mellitus</i>	18
2.1.1 Classificação do Diabetes <i>Mellitus</i>	23
2.1.1.1 Diabetes <i>Mellitus</i> tipo I.....	24
2.1.1.2 Diabetes <i>Mellitus</i> tipo II.....	26
2.1.1.3 A deficiência secretória da célula beta como defeito inicial.....	28
2.1.1.4 A resistência insulínica como defeito primário do DM II.....	28
2.1.1.5 Diabetes <i>Mellitus</i> Gestacional.....	29
2.1.1.6 Outros tipos de Diabetes <i>Mellitus</i>	30
2.1.2 Complicações do Diabetes <i>Mellitus</i>	30
2.2 Insulina	32
2.2.1 Tipos de Insulina.....	33
2.2.1.1 Insulina Ultrarrápida	33
2.2.1.2 Insulina Rápida.....	34
2.2.1.3 Insulina Intermediária	34
2.2.1.4 Insulina Longa	34
2.2.2 Insulinoterapia	34
2.2.3 Administração da Insulina.....	35
2.3 Biomateriais	38
2.4 Quitosana	39
2.4.1 Atividade Antimicrobiana	41
2.4.2 Efeito Coagulante	42
2.4.3 Efeito Analgésico	43
2.4.4 Aceleração da Cicatrização	43
2.5 Liberação Controlada de Fármacos	44
3 MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.1 Local da Pesquisa.....	46
3.2 Materiais	46
3.3 Métodos	46
3.3.1 Biofilmes conjugados de Quitosana e Quitosana/Insulina.....	46

3.4 Caracterizações	48
3.4.1 Difração de raios X (DRX)	48
3.4.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	48
3.4.3 Microscopia Ótica (MO)	49
3.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) / Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS)	49
3.4.5 Molhabilidade por Medida de Ângulo de Contato	49
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1 Difração de Raios X (DRX)	51
4.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	54
4.3 Microscopia Ótica (MO)	57
4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura / Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X	58
4.5 Molhabilidade por Medida de Ângulo de Contato	60
5 CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o Diabetes *Mellitus* (DM) é uma das doenças crônicas que mais atinge a população mundial, sem distinção de idade, classe social, raça ou etnia. É descrita como uma doença tão antiga quanto a própria humanidade. Há relatos em papiros da época de 1500 a.C., onde são descritos alguns sintomas, dentre eles: a diurese frequente e excessiva, sede incontrolável e o emagrecimento, elencados como as principais manifestações clínicas dessa patologia.

O Diabetes *Mellitus* é uma doença do metabolismo intermediário, caracterizada pela ocorrência de hiperglicemia crônica que, no decorrer da vida, promove lesões em órgãos-alvos e graves distúrbios metabólicos. Os fatores determinantes para a hiperglicemia são: déficit de produção de insulina e/ou uma incapacidade do corpo de utilizá-la adequadamente, causando aumento dos níveis de glicose no sangue.

O hormônio produzido pelo pâncreas, a insulina, é secretada pelas células betas das ilhotas pancreáticas (Ilhotas de Langerhans) em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos após as refeições. Age regulando a homeostase de glicose em vários níveis, diminuindo a produção hepática de glicose e aumentando sua captação periférica, principalmente, nos tecidos muscular e adiposo. (Cavalheira; Zecchin; Saad, 2002).

A utilização de insulina no tratamento para diabetes reduz a morbidade e a mortalidade de pacientes com Diabetes *Mellitus* tipo 1 e tipo 2, que necessitam de controle e reposição desse hormônio. O procedimento utilizado, para pacientes de DM, é a insulino terapia, que é realizada por via subcutânea, através de aplicações diárias de insulina para o controle dos níveis de glicose. Esses pacientes são submetidos a três principais esquemas de insulino terapia, podendo ser: duas aplicações diárias, múltiplas aplicações e infusão controlada.

Por ser administrado diariamente e, por vezes, mais de uma aplicação diária, por via subcutânea, portanto, de utilização dolorosa e invasiva, um método substitutivo tem sido investigado para tratamento de pacientes acometidos por DM. Acredita-se que modificar a forma de administração pode ser de grande relevância, levando ao aumento da adesão dos pacientes, facilitando o tratamento e, conseqüentemente, melhorando a qualidade de vida e a morbidade daqueles. Para

tanto, várias pesquisas estão sendo realizadas, com a utilização de biomateriais, buscando o uso de alternativas, para substituir tal método.

O biomaterial foi definido na Conferência do Instituto Nacional de Desenvolvimento de Consenso em Saúde, em 1982, como qualquer substância (outra que não droga) ou combinação de substâncias, sintética ou natural em origem, que possa ser usada por um período de tempo, completa ou parcialmente, como parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo. (Helmus; Gibbons; Cebon, 2008).

Dentre os biomateriais, optou-se por trabalhar com a quitosana, que é um biopolímero com uma estrutura química e características únicas que permitem excelente biocompatibilidade e fácil processamento. (Tavaria, *et al*, 2013). É estudada pela Biomedicina como um biomaterial que pode ser utilizado em sistemas de liberação controlada, característica, particularmente, interessante para ser usada em associação com a insulina (Holanda, 2013).

Desse modo, o presente trabalho, teve por objetivo desenvolver e avaliar biofilmes conjugados de quitosana e quitosana / insulina através do método *dip-coating*. Infere-se que essa conjugação possa ser uma alternativa confortável e menos invasiva para a administração de reposição da insulina em pacientes com DM no futuro.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Diabetes *Mellitus*

O Diabetes Mellitus (DM) é uma patologia incurável, considerado um sério problema de saúde pública, no Brasil e no mundo, em função, tanto do crescente número de pessoas atingidas quanto da complexidade que constitui o processo de viver com essa doença (Pasqualotto, 2012). As prospecções mais atuais apontam que cerca de 8% da população brasileira tem o diagnóstico de Diabetes (Francioni; Silva, 2007). Apesar disso, poucas pessoas, abrangidas por esse percentual, têm acesso ao tratamento ideal, o que implica em poucas possibilidades de controle das complicações dessa doença, especialmente as de longo prazo ou crônicas (Brasil, 2006).

Em números absolutos, o Diabetes já afeta 382 milhões de pessoas em todo o mundo e, no Brasil, cerca de 13,7 milhões de pessoas, ocupando a 4ª posição entre os países com maior prevalência desta doença (IBGE, 2010). A estimativa é de que, até 2025, os números em termos mundiais aumentem para 592 milhões de pessoas portadoras dessa patologia. (Pozzilli, 2014).

Vários são os fatores que afetam diretamente a gravidade das complicações da supracitada doença. Estudos mostram que, quanto melhor o apoio social, melhor será o controle glicêmico, a qualidade de vida e menor o número de complicações do diabético (Silva *et al.*, 2003).

O equilíbrio adequado adquirido entre insulina e glucagon é um regulador hormonal crucial da homeostasia metabólica basal, como demonstrado na parte superior da Figura 1. A insulina facilita, primariamente, o armazenamento de glicose como glicogênio, de ácidos graxos livres como triglicerídeos e de aminoácidos como proteínas. Além disso, inibe a glicogenólise (degradação de glicogênio realizada através da retirada sucessiva de moléculas de glicose), a lipólise (degradação de lipídios em ácidos graxos e glicerol), a cetogênese (processo de produção de corpos cetônicos pelo fígado), a proteólise (degradação - digestão - de proteínas por enzimas) e a gliconeogênese (rota pela qual é produzida glicose a partir de compostos aglicanos – não açúcares ou não carboidratos).

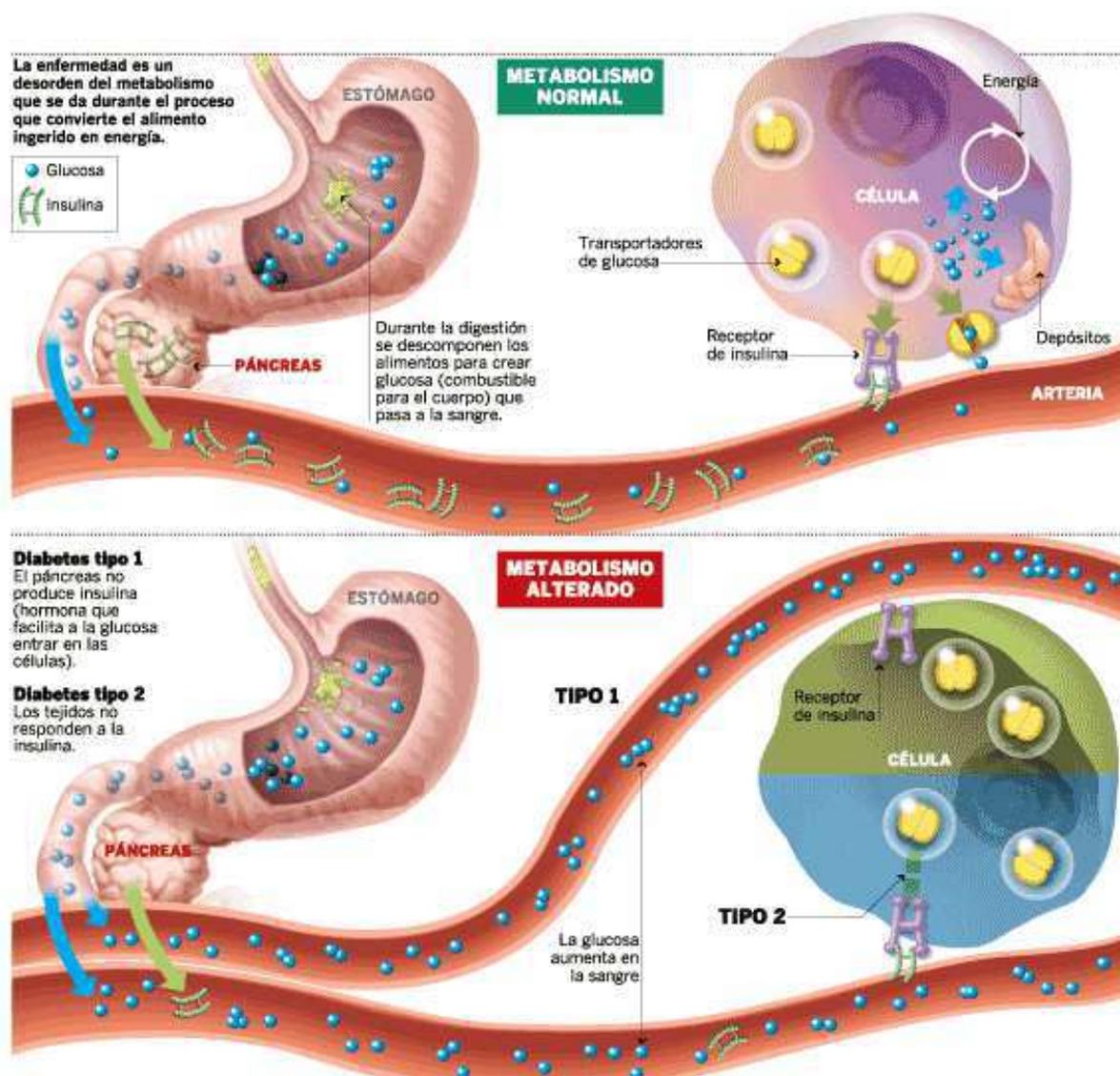


Figura 1 – Esquema do Metabolismo normal e das modificações no metabolismo de um organismo com diabetes (Genuth, 2008).

Na Figura 2, abaixo, observa-se que o glucagon estimula a mobilização de glicose, ácidos graxos livres e glicerol, bem como a captação hepática de aminoácidos, a conversão de seus esqueletos de carbono em glicose e também estimula a cetogênese, a partir de ácidos graxos livres. Os níveis normais, em estado de equilíbrio de insulina e glucagon, ajudam a manter o nível de glicose plasmática durante o jejum noturno entre 60 e 110 mg/dL, o nível de ácidos graxos livres em menos de 0,7 mmol/L, de cetoácidos (grupo funcional carbonila e um grupo ácido carboxílico) em menos de 0,2 mmol/L e cada aminoácido em seu próprio nível. (Genuth, 1998).

Observamos ainda que são explicitadas as ações opostas da insulina e do glucagon, em especial dentro do fígado, sobre o fluxo e os níveis plasmáticos de substratos, são aqui mostradas. Os dois hormônios têm efeitos diretamente opostos sobre enzimas-chave, como glicogênio-sintase e fosforilase. Assim, os efeitos estimulatórios do glucagon sobre a produção de glicose e cetoácidos são ampliados quando há deficiência de insulina, como no Diabetes melito tipo 1. As setas vermelhas indicam estimulação. As setas azuis indicam inibição. A insulina plasmática aumenta rapidamente após uma refeição mista e, com isso, a razão insulina/glucagon, situação que reverte todos os processos de mobilização de energia e síntese de glicose descritos anteriormente, de tal sorte que o carboidrato da dieta é armazenado no glicogênio dos músculos e do fígado, os ácidos graxos livres são novamente esterificados e armazenados como triglicerídeos no tecido adiposo e o metabolismo das proteínas retorna em direção ao anabolismo. (Genuth, 1998).

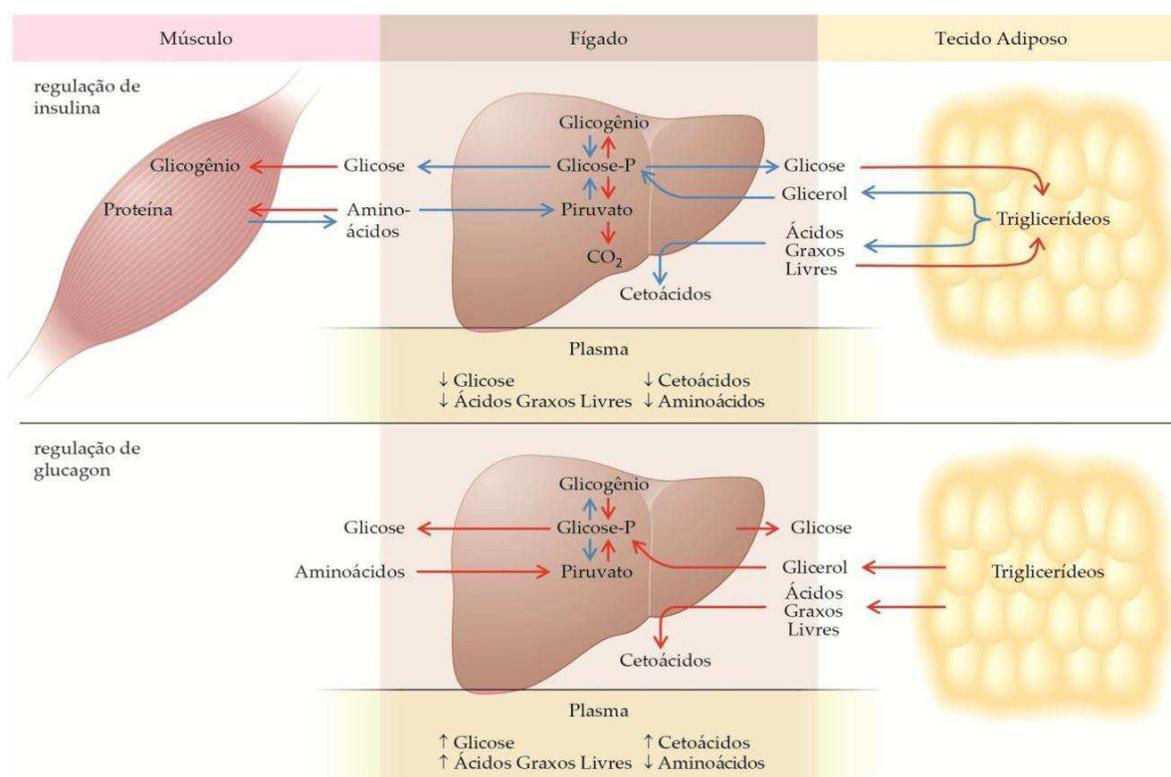


Figura 2 – Mecanismo de Regulação da Insulina e do Glucagon (Genuth, 2008).

Após a assimilação de todos os nutrientes, momento em que a glicose plasmática retorna ao nível pré-prandial basal, a insulina plasmática (Figura 3) e a

razão insulina/glucagon retornam, prontamente, para os níveis basais, evitando exacerbação de ação da insulina, o que causaria hipoglicemia. Desta forma, uma elevação imediata, um pico precoce e uma queda rápida na secreção de insulina constituem requisitos do metabolismo pós-prandial normal (Genuth, 2008).

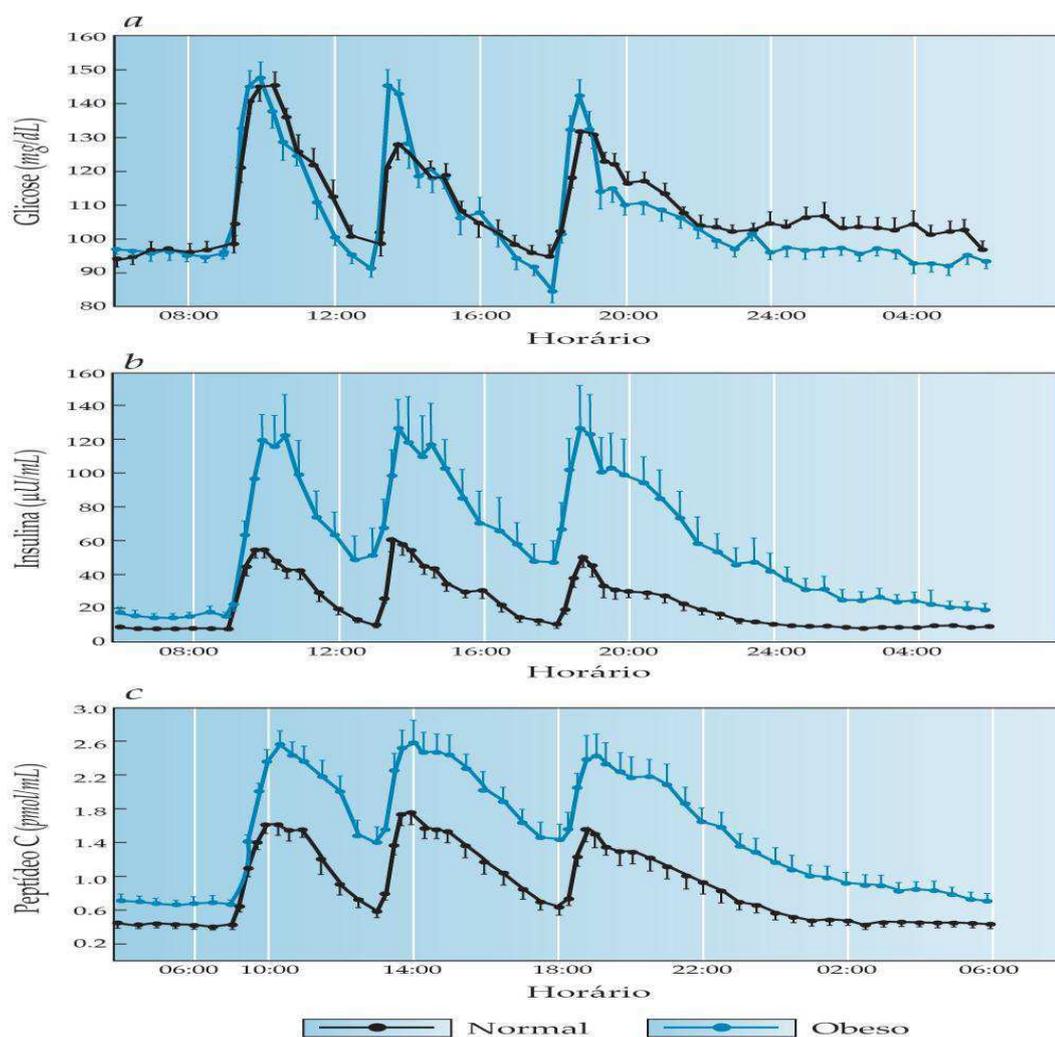


Figura 3 – Razão Insulina / Glucagon (Genuth, 2008).

Na Figura 3, a glicose plasmática (a) é normalmente mantida dentro de uma faixa estreita ao longo do dia, em grande parte por causa da função das células beta. A insulina plasmática (b) e o peptídeo C plasmático (c) aumentam rapidamente a partir dos níveis basais em cada refeição e, após atingirem um pico, retornam prontamente aos níveis basais, que são mantidos ao longo da noite. Observe também que os níveis plasmáticos de insulina e de peptídeo C estão elevados em pessoas obesas, as quais são resistentes à insulina.

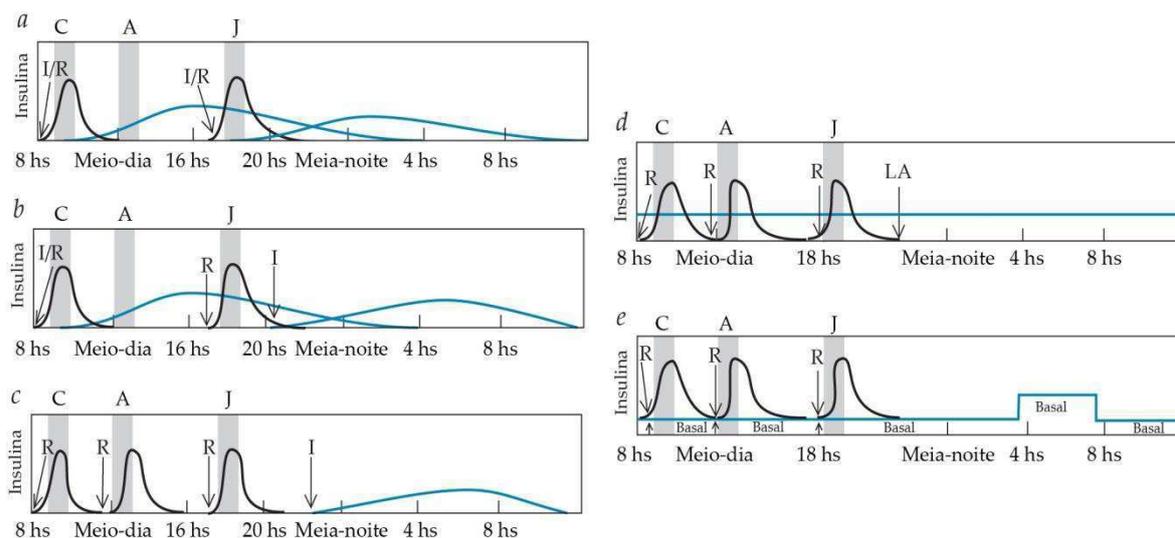


Figura 4– Esquemas para demonstração de níveis séricos após administração de combinações diferentes de insulina em pacientes diabéticos (Genuth, 2008).

A Figura 4 demonstra esquemas para demonstração que diversas combinações de preparações de insulina podem ser empregadas para estabelecer o controle glicêmico em pacientes com Diabetes melito tipo 1 (e naqueles pacientes com diabetes melito tipo 2 que alcançam um grau equivalente de deficiência de insulina). As setas indicam o momento da injeção. As curvas pretas representam insulina de ação rápida ou regular (R). As curvas azuis representam insulina NPH de ação intermediária (I) ou insulina de longa ação (LA) (p. ex., detemir ou glargina). (a) Uma injeção mista de insulina I e R é administrada antes do café da manhã e do jantar nesse regime não intensivo. Além do risco de hipoglicemia antes do almoço e no final da tarde, a administração de insulina I antes do jantar predispõe os pacientes à hipoglicemia entre 2 e 4 horas da manhã. (b) Neste regime mais seguro, o paciente recebe três injeções: uma injeção mista antes do café da manhã, insulina R antes do jantar e insulina I antes de deitar. O risco de hipoglicemia noturna é menor com esse regime e a glicemia de jejum tem um controle melhor. (c) Este regime intensivo combina três injeções pré-prandiais de insulina R com uma injeção de insulina I antes de deitar. As doses pré-prandiais de insulina R são ajustadas conforme a glicemia e o tamanho da refeição. (d) Este regime intensivo utiliza insulina de longa ação ao deitar para repor a secreção basal de insulina. Em alguns pacientes, injeções de insulina de longa ação devem ser administradas para melhorar os níveis glicêmicos antes do almoço e do jantar. As doses pré-prandiais

de insulina R são ajustadas conforme os níveis glicêmicos e o conteúdo previsto de carboidratos na refeição. (e) Este regime intensivo fornece apenas insulina R como insulina de ação rápida ou regular. Uma infusão subcutânea contínua de insulina R mantida por uma bomba repõe a secreção basal de insulina. As taxas basais podem ser alteradas durante diferentes momentos do dia ou conforme as atividades. Por exemplo, a taxa basal pode ser diminuída ou mesmo suspensa durante períodos de exercício aeróbico intenso. A taxa basal noturna pode ser aumentada em 1,5 a 2 vezes entre 3 ou 4 horas da manhã e o café para acomodar o aumento nas necessidades de insulina do início da manhã conhecido como fenômeno do alvorecer (dawn). As doses em bolo pré-prandiais são individualmente ajustadas e rapidamente bombeadas, conforme os níveis glicêmicos e o conteúdo de carboidratos previsto na refeição. (C = café da manhã, A = almoço, J = jantar).

2.1.1 Classificação do Diabetes *Mellitus*

Existem duas formas principais de Diabetes *Mellitus*: Diabetes do tipo I e do tipo II que eram conhecidos, anteriormente, como Diabetes *Mellitus* Insulino-Dependentes (DMID) e Diabetes *Mellitus* Não Insulino-Dependentes (DMNID), respectivamente.

Ao se observar a dificuldade em se diferenciar pacientes com DMID de DMNID, esta classificação foi abandonada. De fato, esses pacientes acabavam necessitando, em algum momento de suas vidas, de tratamento com insulina para controle da hiperglicemia, sendo, nesses momentos, impossível diferenciar um paciente com DMID de um com DMNID.

Além dos dois tipos já elencados, o Diabetes *Mellitus* Gestacional e uma gama de “outros tipos” de Diabetes, em sua maioria, de incidência temporária, são causados por utilização de alguma droga para tratamento de uma patologia específica, cujo efeito adverso é a hiperglicemia, ou complicações de doenças neoplásicas, pancreatite, hepatite etc (Genuth, 2008).

Atualmente, a história e as características desta doença são mais relevantes na hora de determinar sua etiologia do que no modo de tratamento, como era feito no passado. As Tabelas 1 e 2 se referem à classificação e às medidas de glicemia realizadas no soro ou plasma, através de métodos enzimáticos. Consideramos que

as mensurações em sangue total são 10% a 15% - menores do que as concentrações plasmáticas ou séricas - e que métodos colorimétricos ou automatizados, embora convenientes, não são específicos para glicose, pois reagem com outras substâncias redutoras (Ncbi, 1997).

Tabela 1- Classificação do Diabetes Mellitus

Tipo 1	Tipo 2	Diabetes Gestacional	Outros tipos específicos
Auto – Imune Idiopático	Não obeso obeso		Defeitos genéticos funcionais da célula beta; Defeitos genéticos na ação da insulina; Doenças do pâncreas; Endocrinopatias; Induzidas por fármacos; Diabetes imuno-mediado; Síndromes genéticas;

Fonte: Chaves *et al.*, 2013

Tabela 2 - Glicose plasmática (em mg/dl) para o diagnóstico de Diabetes Mellitus e intolerância à glicose.

Categorias	Jejum (mg/dl)	2 h após 75g glicose (mg/dl)
Intolerância de jejum à glicose	≥ 110 e < 126	<140
Intolerância oral à glicose	< 126	≥ 140 e < 200
Diabetes	≥ 126 ou *	≥ 200

Fonte: Chaves *et al.*, 2013

2.1.1.1 Diabetes *Mellitus* tipo I

O Diabetes *Mellitus* tipo I é uma doença com característica multifatorial, com grande importância dos fatores ambientais, além dos genéticos (Balda; Pacheco, 1999). Nestes termos, tal condição é determinada por uma destruição autoimune de células beta do pâncreas em 90% dos casos, ou seja, o corpo destrói, por engano, o próprio tecido que produz e secreta a insulina. De modo a reparar essa falta, existe a

necessidade de se fazer injeções de insulina no paciente para utilizar a glicose que se acumula no organismo (Gross *et al.*, 2000). Portanto, os portadores de DM I são, para o resto da vida, dependentes da reposição de insulina já que as células destruídas não se recuperam. A evolução da doença, ao contrário do que se imaginava, não é aguda, e sim, um processo de autoagressão, de evolução lenta que, provavelmente, desenvolve-se, durante anos, numa fase pré-clínica. No período de manifestação da doença, com a presença de hiperglicemia e cetose, as células secretoras de insulina já estão em número muito diminuído ou praticamente ausentes. Tem maior incidência em pacientes jovens não obesos (crianças e adolescentes), período no qual os sintomas da doença começam a aparecer (Balda; Pacheco, 1999).

Todavia, as causas incomuns de Diabetes tipo I, nas quais não há evidência de atividade autoimune e para as quais não podem ser encontradas outras causas para a destruição das células beta pancreáticas (p. ex., fibrose cística) são classificadas como tipo I idiopáticas (ADAD, 2007).

Estudos comprovam que o pico de incidência ocorre com 11 anos de idade, mas, casos novos podem, às vezes, aparecer em pacientes mais velhos. Nos Estados Unidos, são estimados, aproximadamente, 30.000 novos casos de Diabetes *Mellitus* tipo I, por ano, e isso é mais comum em brancos do que em afro-americanos. No mundo todo, a maior incidência anual de Diabetes *Mellitus* tipo I é encontrada na Finlândia (45 casos por 100.000), e a menor é encontrada na Coreia (< 1 por 100.000). A incidência de Diabetes tipo I está aumentando a uma taxa de cerca de 3% ao ano (Diamond, 2006).

No Brasil, temos poucos estudos epidemiológicos sobre o Diabetes tipo I, porém em estudo realizado em 1993, abrangendo três cidades do interior paulista, constatou-se uma incidência de 7,6/100.000 habitantes nesta população (Ferreira *et al.*, 1993).

Doença invariavelmente fatal, no passado, em 1922, quando Frederik Banting e Charles Best administraram um extrato pancreático num menino diabético gravemente afetado para salvar a vida dele, este quadro mudou drasticamente. Desde então, o tratamento do Diabetes tipo I com insulina purificada foi aperfeiçoado. Mas, um desafio permanece e, até os dias de hoje, tem sido tema de discussões e dúvidas: administração de insulina na medida das necessidades do organismo, no decurso de um ciclo típico de 24 horas de saciedade e jejum (Pratt;

Cornely, 2006). Esta dificuldade se baseia na necessidade de diversas variantes serem analisadas para se chegar a uma “dose ideal”. A relação entre os fatores, que vão desde a alimentação, estresse, sedentarismo até o tempo de evolução da doença *versus* sequelas por ela determinada, constituem uma gama imensa de possibilidades a serem avaliadas. Naturalmente, com tantas variantes, as doses diárias de insulina variam bastante de paciente para paciente.

Muitas são as alterações causadas por esta doença, sejam no metabolismo de hidratos de carbono, lipídios e proteínas, sejam alterações estruturais em diversos sistemas orgânicos, incluindo microangiopatia, retinopatia, nefropatia, neuropatia, doença coronariana, insuficiência arterial periférica etc. (Balda; Pacheco, 1999).

No DM tipo II, os sintomas se instalam de maneira gradativa. No Diabetes tipo I, ao contrário do Diabetes tipo II, eles aparecem rapidamente, dentre os quais: a vontade frequente de urinar, sede excessiva e emagrecimento. Se o diagnóstico de Diabetes tipo I é tardio, as células do organismo podem não conseguir a glicose necessária para produzir toda a energia de que elas precisam. Nesse cenário, o corpo começa a quebrar a gordura e, posteriormente, músculo para gerar energia. Quando a gordura é utilizada para produzir energia, corpos cetônicos são produzidos e entram na corrente sanguínea, causando um desequilíbrio chamado de cetoacidose diabética química, cujos sintomas são: pele avermelhada, quente e seca; perda de apetite, dor abdominal e vômitos; um odor frutado e forte na respiração, chamado de hálito cetônico; respiração rápida e profunda; agitação ou sonolência, dificuldade para acordar, confusão ou coma (Heimbecher *et al.*, 2015).

2.1.1.2 Diabetes *Mellitus* tipo II

Síndrome heterogênea, o DM II é caracterizado pela destruição das células beta (autoimune ou idiopática), devido à resistência a insulina, o que leva as células a trabalharem até atingir a exaustão, havendo deficiência secretória das células Beta. (Ferrannini, 1998). Atinge adultos obesos com mais de 45 anos, e, nas últimas décadas, tem atingido crianças e adolescentes devido à epidemia da obesidade, em virtude de maus hábitos alimentares, sedentarismo e stress da vida, presentes mesmo nesta faixa etária. Neste tipo de Diabetes, encontra-se a presença de insulina, porém, sua ação é dificultada pela obesidade, o que é conhecido como

resistência insulínica, uma das causas de hiperglicemia. Por ser, inicialmente, pouco sintomático, o Diabetes, na maioria das vezes, permanece, por muitos anos, sem diagnóstico e sem tratamento, o que favorece a ocorrência de suas complicações mais graves - no coração e no cérebro. Metade dos adultos com características da doença não demonstram sintomas claros o suficiente para sugerir o diagnóstico clínico. Nos Estados Unidos, os dados demonstram uma prevalência total de 16 milhões de indivíduos, dentre os quais, mais de 5 milhões não têm consciência de que sofrem de DM II. Deste modo, a maioria dos indivíduos hiperglicêmicos permaneceram não diagnosticados e somente apresentaram a doença clinicamente manifesta dos 50 a 65 anos.

Estudos epidemiológicos têm indicado o DM II como a principal causa de morbidade e morte prematuras, as quais afetam mais de 100 milhões de indivíduos. As pessoas com DM II estão mais sujeitas aos riscos de ocorrência de eventos cardiovasculares graves, com uma probabilidade duas a quatro vezes maior. O Diabetes, também, está associado a um grande espectro de morbidade. Ele é causa principal de doenças renais terminais, tais como: amaurose, neuropatia periférica e ulcerações de amputações de membros inferiores. O sedentarismo, a alimentação rica em carboidratos e gorduras e o excesso de peso, invariavelmente, culminam com o estado de "resistência à insulina", que pode associar-se ou não ao DM II, na dependência dos genes diabetogênicos envolvidos (Lowe, 2001).

Os objetivos do tratamento do DM II são, primeiramente, diagnosticar a doença e instituir tratamento precoce. Atingindo esse patamar, a manutenção da glicemia, em jejum e nos períodos pré e pós-prandiais próxima aos valores normais; a prevenção da progressão das complicações do DM II e o tratamento das comorbidades, encerram o quarteto dos objetivos de tratamento dessa patologia (Chaves; Romaldine, 2013).

Uma dúvida aparece: resistência insulínica ou deficiência secretória da célula beta? Qual seria, afinal, a causa do DM II? Não está claro se o defeito primário que culmina com o DM II se situa na célula beta ou no receptor periférico de insulina ou, ainda, necessita da concomitância das duas alterações (Chaves *et al.*, 2013).

2.1.1.3 A deficiência secretória da célula beta como defeito inicial

O fator que identificamos como o mais precoce, nas manifestações da deficiência da célula beta, é a abolição ou perda do pico rápido da fase inicial de secreção de insulina após o estímulo alimentar, pico este que é de fundamental importância para a sensibilização dos receptores insulínicos periféricos e sua ausência inicia ou desencadeia a resistência insulínica periférica. Esta resistência é maximamente expressa na ausência da supressão hepática de glicose, com uma hiperglicemia adicional, o que requer uma hiperinsulinemia compensatória, que ocorre na segunda fase de secreção de insulina, "pico lento" ou fase tardia. Na tentativa de compensar as elevações glicêmicas, a célula beta deficiente ativa uma via alternativa. Fato é que esta via libera pró-insulina intacta e produtos incompletamente processados (pró-insulinas divididas) que, por apresentarem pequena atividade biológica, não conseguem regular a hiperglicemia pós-prandial. A resistência insulínica, já estabelecida, expressa-se, também, na exacerbação da glicogenólise noturna através da não supressão hepática insulino-mediada, tendo como resultado final a hiperglicemia de jejum. (Chaves; Romaldine, 2013).

2.1.1.4 A resistência insulínica como defeito primário do DM II

No estado pós-absortivo, ocorre um excessivo aumento da produção hepática de glicose, já por resistência insulínica após a ingestão alimentar. Os tecidos insulino-dependentes (fígado, músculo e adipócitos), que deveriam utilizar este substrato, apresentam insulino-resistência, com conseqüente hiperglicemia pós-prandial e hiperinsulinemia compensatória. A célula Beta, atingindo seu limiar, começa a manifestar sua deficiência secretória, que se agrava com a hiperglicemia, através do mecanismo de redução da glucossensibilidade e, finalmente, da glucotoxicidade. Inicialmente, ocorre uma diminuição da secreção insulínica, através destes mecanismos, proporcional ao tempo de hiperglicemia e às concentrações glicêmicas. A deterioração da célula beta se deve à não reversibilidade do estado hiperglicêmico. (Chaves *et al.*, 2013).

2.1.1.5 Diabetes Mellitus Gestacional

Definido como a intolerância aos carboidratos, em graus variados de intensidade, o DM Gestacional, diagnosticado, pela primeira vez, durante a gestação, pode ou não persistir após o parto, fazendo-se necessária a reposição de insulina para melhor controle (Alberti; Zimmet, 1998).

Os maiores fatores de risco são: idade superior a 25 anos, obesidade ou ganho excessivo de peso na gravidez atual, deposição central excessiva de gordura corporal, história familiar de Diabetes em parentes de 1o grau, baixa estatura, crescimento fetal excessivo, polidrâmnio, hipertensão ou pré-eclâmpsia na gravidez atual, antecedentes obstétricos de morte fetal ou neonatal, macrossomia ou Diabetes gestacional. O rastreamento deste é demonstrado na Figura 5, sendo elemento imprescindível para o precoce diagnóstico, tratamento e prognóstico positivo desta patologia. (Schmidt; Reichelt, 1999).

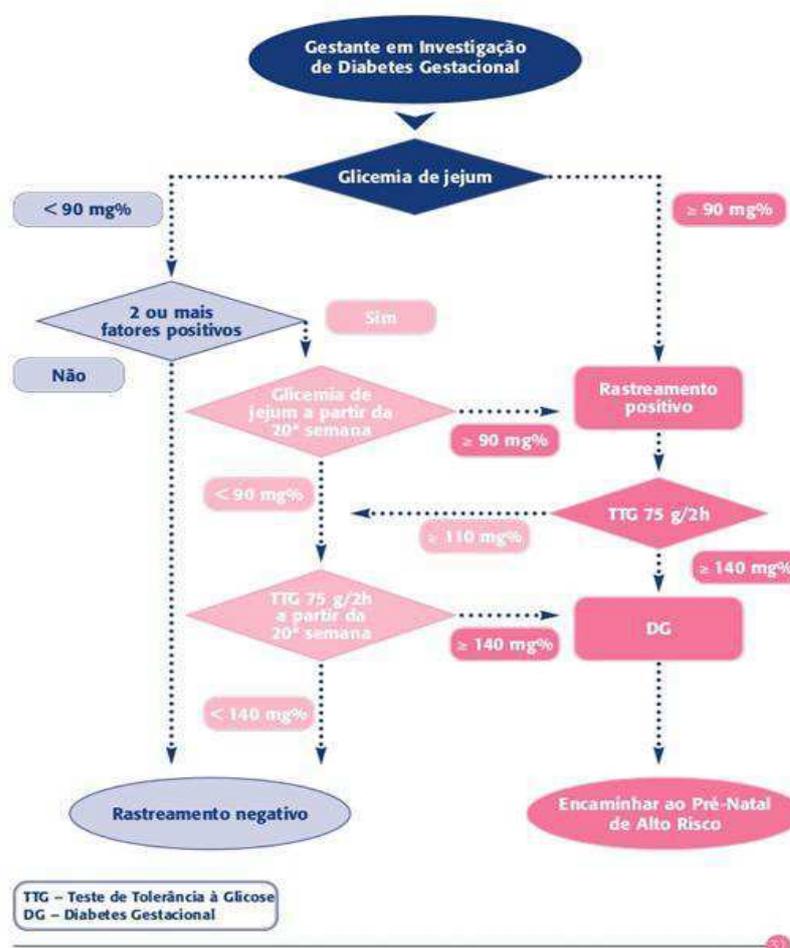


Figura 5 – Fluxograma do Rastreamento do Diabetes Gestacional (Bezerra, 2012)

2.1.1.6 Outros tipos de Diabetes *Mellitus*

Apesar de apenas cerca de 5% dos diagnósticos de DM estarem incluídos nesta classificação, inversamente proporcional é o imenso número de patologias que determinam este diagnóstico, muitos deles temporários e outros raríssimos. O tempo até o diagnóstico, mais uma vez, se faz extremamente importante para o seu prognóstico.

Doenças como as relacionadas ao defeito genético nas células beta, a resistência à insulina determinada geneticamente, as doenças no pâncreas, as causadas por defeitos hormonais e por compostos químicos ou fármacos, as infecciosas (rubéola congênita, citomegalovírus e outros) e as formas incomuns de diabetes imuno-mediadas (síndrome do "Homem Rígido", anticorpos anti-insulina e outros) juntamente com outras síndromes genéticas algumas vezes associadas com diabetes (síndrome de Down; síndrome de Klinefelter, síndrome de Turner, síndrome de Wolfram, ataxia de Friedreich, Coreia de Huntington, síndrome de Laurence-Moon-Biedl, distrofia miotônica, porfiria, síndrome de Prader-Willi e outras), apesar de não fecharem o rol das doenças causadoras de DM nesta classificação, nos dão uma boa ideia de quão amplo e diversificado são os outros tipos de Diabetes *Mellitus*, proporcionando, por isso, uma dificuldade extra no seu diagnóstico (Gross *et al.*, 2001).

2.1.2 Complicações do Diabetes *Mellitus*

As complicações causadas pela DM podem se dá, concomitantemente, com outras doenças que as potencializam. Diabetes e hipertensão são as duas mais comuns. O acompanhamento mensal de pacientes com pressão alta pode poupá-los de prognóstico reservado (Riddle; Genuth, 2010)

A retinopatia diabética é, também, outra complicação advinda do DM, significando uma lesão que aparece na retina do olho, podendo causar pequenos sangramentos e, como consequência, a perda da acuidade visual; a arteriosclerose, que é o endurecimento e espessamento da parede das artérias; a nefropatia diabética por alterações nos vasos sanguíneos dos rins, que fazem com que ocorra uma perda de proteína pela urina e podendo levar este órgão a reduzir a sua função lentamente, mas de forma progressiva até a sua paralisação total; a neuropatia

diabética por incapacidade dos nervos de emitir e receber as mensagens do cérebro, provocando sintomas, como formigamento, dormência ou queimação das pernas, pés e mãos, dores locais e desequilíbrio, enfraquecimento muscular, pressão baixa, distúrbios digestivos, excesso de transpiração e impotência; o pé diabético que ocorre quando uma área machucada ou infeccionada nos pés, desenvolve uma ou mais úlceras (feridas) e seu aparecimento está relacionado a circulação sanguínea deficiente e aos níveis de glicemia mal controlados, podendo levar à amputação deste membro. O infarto do miocárdio e AVC, da mesma forma, são possíveis sequelas do DM, que ocorrem quando os grandes vasos sanguíneos são afetados, levando à obstrução (arteriosclerose) de órgãos vitais como o coração e o cérebro. (Damiani; Damiani, 2008).

Outra consequência possível do DM é o risco de se contrair algum tipo de infecção, em decorrência do excesso de glicose, podendo causar danos ao sistema imunológico. Isso ocorre porque os glóbulos brancos (responsáveis pelo combate a vírus, bactérias etc.) ficam menos eficazes com a hiperglicemia. O alto índice de açúcar no sangue é propício para que fungos e bactérias se proliferem em áreas como boca e gengiva, pulmões, pele, pés, genitais e locais de incisão cirúrgica, contra indicando assim, todo e qualquer tratamento cirúrgico. (Brasil, 2001).

A incidência das supracitadas complicações é de duas a quatro vezes maiores em pessoas com Diabetes. Experiências clínicas, em atendimento a pacientes no PSF-Programa de Saúde da Família e SAD - Serviço de Atenção Domiciliar indicam que, ao longo dos anos, essas consequências e sequelas são graves e irreversíveis. Uma vez instalado o quadro do DM, não se pode revertê-lo. Daí o termo doença crônica, irreversível e de prognóstico reservado.

Para evitar as retrodelineadas complicações, faz-se imprescindível implementar algumas medidas de segurança, tendo como principal aliado o controle da glicose, a prática de atividade física, a suspensão do tabagismo e o combate à pressão alta e ao aumento do colesterol.

A manutenção de níveis normais de glicose no sangue previne, não só, as complicações aqui elencadas como também desperta o bem estar diário do paciente diabético, haja vista que as sequelas aqui apresentadas tanto agravam o prognóstico do DM como também comprometem, seriamente, a qualidade de vida dos seus portadores.

2.2 Insulina

Hormônio peptídeo, a insulina é secretada por células das ilhotas de Langerhans - células β do pâncreas, formadas por duas cadeias de aminoácidos – cadeias A e B com 21 e 30 resíduos, respectivamente - unidas entre si por duas pontes de dissulfeto, como demonstrado na Figura 6. (Smith; Marks; Lieberman, 2007).

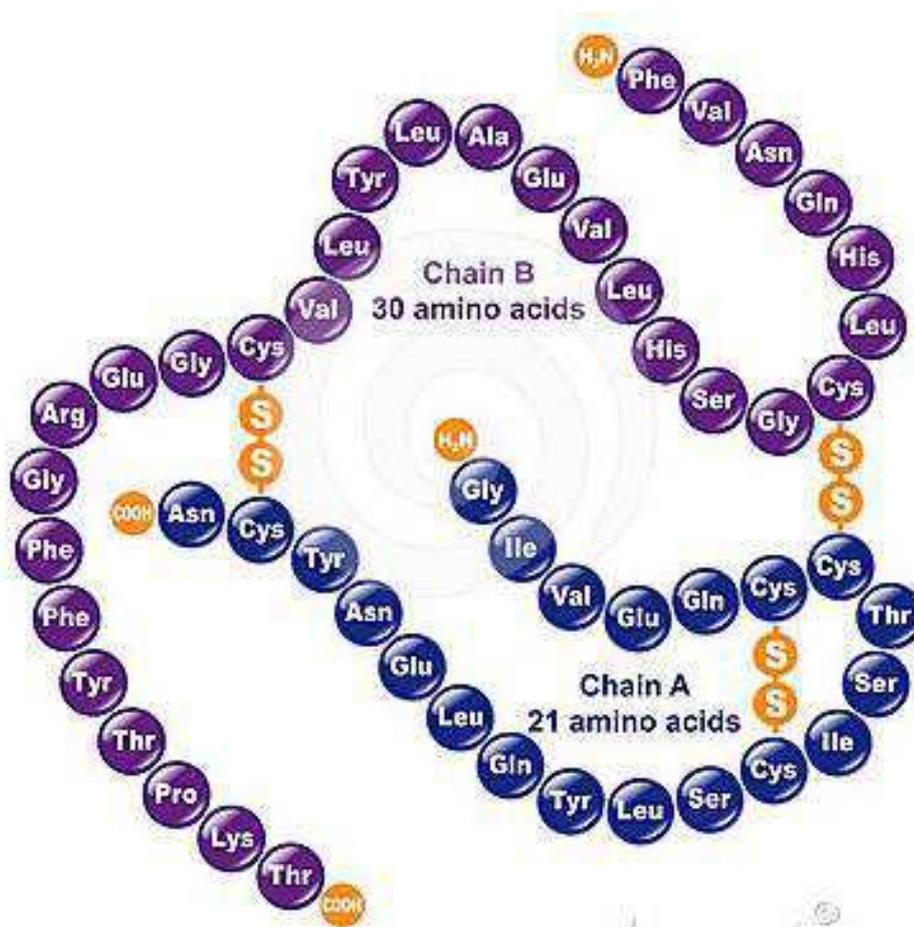


Figura 6 - Molécula de Pró-insulina humana (Smith; Marks e Lieberman, 2007).

A estrutura da insulina varia de acordo com a espécie do animal, sendo que, entre mamíferos, a sequência difere apenas em alguns aminoácidos. A cadeia A é a parte mais exposta da molécula e, provavelmente, a responsável pela sua atividade. Sua função é metabolizar a glicose (aproveitando-a para a produção de energia), favorecer a formação de proteínas, o acúmulo de gordura no tecido gorduroso e de glicogênio no fígado (El-Salhy, 1983).

Já nos anos 50, foi sintetizada uma insulina que não apresentava protamina, denominada insulina lenta. Com o avanço das tecnologias, na área de Biologia molecular, foi possível sintetizar, via DNA recombinante, a insulina humana sintética. Mais recentemente, foram disponibilizados vários tipos de análogos de insulina que permitiram o melhor controle metabólico dos pacientes com Diabetes *Mellitus* (Chacra, *et al.*, 2008).

2.2.1 Tipos de Insulina

A insulina é apresentada em quatro tipos diferentes, de acordo com o início, pico, duração efetiva e duração máxima de sua ação no organismo humano, conforme demonstrada na Tabela 3, a seguir.

Tabela 3 – Tipos de Insulina de acordo com sua duração

Ação	Tipo de Insulina	Início	Pico de ação	Duração efetiva	Duração máxima
Ultrarrápida	Lispro	< 15 min	0,5-1,5h	2-4h	4-6h
	Glulisina	5-10 min	30-90 min	±5h	ND
	Aspart	5-10 min	1-3h	3-5h	4-6h
Rápida	Regular	0,5-1h	2-3h	3-6h	6-10h
Intermediária	NPH	2-4h	4-10h	10-16h	14-18h
	Detemir	2h	Dose	Dose	Dose
Longa			dependente	dependente	dependente
	Glargina	2h	Não tem	24h	24h

Fonte: (<http://diabetesbrasil.com.br/author/admin/page/3/>, 2015)

2.2.1.1 Insulina Ultrarrápida

A insulina denominada de ultrarrápida supre as necessidades deste hormônio para refeições ingeridas logo após a injeção, pois sua ação se inicia de 5-15 minutos depois de injetada. É comum se utilizar um conjunto de insulinas de longa duração para que se possa aumentar sua ação. No organismo, esta, após a aplicação subcutânea, possui pico de ação entre 30 e 90 minutos, com duração efetiva de 2-4 horas e duração máxima de 4-6 horas (Burge; Schade, 1997).

2.2.1.2 Insulina Rápida

Esta insulina, também chamada de Regular, supre as necessidades deste hormônio para refeições ingeridas em um período de 30 e 60 minutos após ser introduzida no organismo. Tem pico de ação entre 2 e 3 horas, duração efetiva de 3 e 6 horas e duração máxima de 6 e 10 horas (Burge; Schade, 1997).

2.2.1.3 Insulina Intermediária

Também chamada de NPH, supre as necessidades de insulina por um período equivalente a meio dia (ou uma noite). Este tipo de insulina é usualmente utilizado com os tipos rápido ou ultrarrápido. Tem início de ação 2-4 horas, pico de ação de 4-10 horas; duração efetiva de 10-16 horas e duração máxima de 14-18 horas (Burge; Schade, 1997).

2.2.1.4 Insulina Longa

Insulina que possui o início de sua ação, como o próprio nome indica, longo, após 2 horas de sua aplicação, Seu pico de ação, duração efetiva e duração máxima, são dose-dependentes e estão diretamente relacionados com a quantidade de insulina administrada, que varia de paciente para paciente. Fatores como idade, peso, sedentarismo e patologias associadas são determinantes para a grande variedade de doses necessárias para cada paciente (Burge; Schade, 1997).

2.2.2 Insulinoterapia

A insulinoterapia é o tratamento do Diabetes *Mellitus* através da administração exógena de insulina. O método mais utilizado no tratamento do Diabetes envolve a escolha de um ou mais dos seguintes protocolos: duas aplicações diárias, múltiplas aplicações e infusão controlada. As doses são de quantidades previamente determinadas e medidas em UI (unidades internacionais). No início do tratamento, elas são calculadas observando-se a dose de 0,2 - 0,5

UI/Kg/dia e, na sequência do tratamento, utiliza-se a dose média de 0,5 - 1UI/Kg/dia, para pacientes adultos (Burge; Schade, 1997).

2.2.3 Administração da Insulina

A insulina deve ser aplicada diretamente no tecido subcutâneo (camada de células de gordura), logo abaixo da pele. A espessura da pele gira em torno de 1,9 a 2,4 mm nos locais de aplicação da insulina. As agulhas utilizadas podem ter 4, 5, 6 ou, no máximo, 8 mm. O ângulo de aplicação varia em função da quantidade de gordura da área de aplicação do paciente com Diabetes. Por exemplo, no caso de uma pessoa magra e com pouca gordura na região de aplicação, corre-se maior risco de atingir os músculos quando se utiliza agulha mais longa e ângulo de aplicação de 90° em relação à superfície da pele. Nesses casos, pode-se optar por uma agulha mais curta, fazer uma prega cutânea (de pele)¹ e aplicar em ângulo de 45°(Souza; Zanetti, 2000).

Ainda de acordo com os autores acima citados, o rodízio diário entre os locais de aplicação proporciona diminuição do risco de complicações naquela região, tal como a hipertrofia (pontos endurecidos abaixo da pele) ou atrofia (depressões no relevo da pele ocasionadas por perda de gordura). Recomenda-se aguardar de 20 a 30 dias para voltar a aplicar no mesmo ponto. A distância entre dois pontos de aplicação deve ser de mais ou menos três centímetros.

No abdome, as insulinas podem ser absorvidas de forma mais rápida do que nos braços e coxas. A escolha das agulhas pode seguir as seguintes recomendações:

Agulha com 4, 5 ou 6 mm podem ser usadas por adultos obesos e não obesos e, geralmente, não requerem a realização de prega cutânea, especialmente para as agulhas de 4 mm. Em geral, quando são usadas agulhas curtas (4, 5 ou 6 mm), as aplicações devem ser feitas em ângulo 90°. Contudo, quando a aplicação for realizada nos membros ou em abdomes magros, uma prega cutânea pode ser feita para garantir que não haja injeção intramuscular, mesmo com agulhas de 4 e 5 mm. Neste caso, as injeções com agulha de 6 mm só deveriam ser usadas com a

¹ Importante saber que a prega na pele, para quem tem Diabetes, é utilizada a fim de evitar que a agulha atinja os músculos que se situam logo abaixo do tecido adiposo pois, nesse local, a insulina pode ser absorvida mais rapidamente, alterando seu tempo de ação.

realização de uma prega cutânea ou em ângulo de 45°. Não há razão médica para usar agulhas mais longas do que 8 mm (Souza; Zanetti, 2000).

Para as crianças e os adolescentes, o mesmo autor referencia que agulhas com 4, 5 ou 6 mm podem ser utilizadas. Crianças e adolescentes magros e com Diabetes, quando injetam a insulina em braços e pernas, podem precisar fazer uma prega cutânea, especialmente quando são usadas agulhas de 5 ou 6 mm. Quando for usada uma agulha de 6 mm, a aplicação com ângulo de 45° pode ser realizada no lugar da prega cutânea. Entretanto, para a maioria das crianças, exceto aquelas muito magras, uma agulha de 4 mm pode ser inserida a 90°, sem necessidade de prega cutânea. Se apenas uma agulha de 8 mm estiver disponível (que pode acontecer com usuários de seringas), deve-se realizar a prega cutânea e, além disso, inserir a agulha em ângulo de 45°. (Souza; Zanetti, 2000).

Para as gestantes, o aparecimento de ecimoses (manchas roxas) é comum no local de aplicação de insulina. As agulhas curtas (4, 5 ou 6 mm) podem ser usadas por este público alvo. Quando apenas uma agulha de 8 mm estiver disponível, a região do abdome deve ser evitada e a aplicação realizada com a prega cutânea e em ângulo de 45°. É prudente realizar a destacada prega em todos os locais de aplicação. Contudo, para evitar complicações, recomenda-se evitar a aplicação de insulina na região abdominal, especialmente ao redor do umbigo, no último trimestre da gestação. Recomenda-se que a aplicação seja feita na região glútea (nádegas) para as gestantes magras. A região dos flancos do abdome pode ser usada, também, desde que se faça a prega cutânea (Souza; Zanetti, 2000).

No geral, os melhores locais para a aplicação de insulina são o abdome (barriga), a coxa (frente e lateral externa), o braço (parte posterior do terço superior), a região da cintura e o glúteo (parte superior e lateral das nádegas). (Souza; Zanetti, 2000).

A utilização de injeções diárias provoca desconforto nos pacientes, especialmente naqueles que necessitam de muitas aplicações. Várias complicações podem advir desse método de tratamento. Quando se aplica a insulina sempre na mesma região do corpo, seja através de seringa ou caneta de aplicação, pode-se causar um inconveniente que gera, além de problemas estéticos, efeitos sobre a correta absorção da insulina, a lipodistrofia. (Minelli, *et al*, 2003).

A Figura 7, abaixo, demonstra as camadas da pele e evidencia o tecido adiposo, local onde ocorre a lipodistrofia, cuja causa é desconhecida. Sabe-se,

porém, que são, em média, quatro vezes mais presentes nas mulheres do que nos homens, e que pode haver causas diferentes para os vários sintomas.

Uma das teorias, apresentadas por Minelli (2003), defende que os inibidores de protease interferem no processo da gordura. Isto ocorre porque moléculas de inibidor de protease são semelhantes a algumas proteínas humanas que processam a gordura. Porém, alguns pacientes, que nunca utilizaram tais inibidores, têm a lipodistrofia.

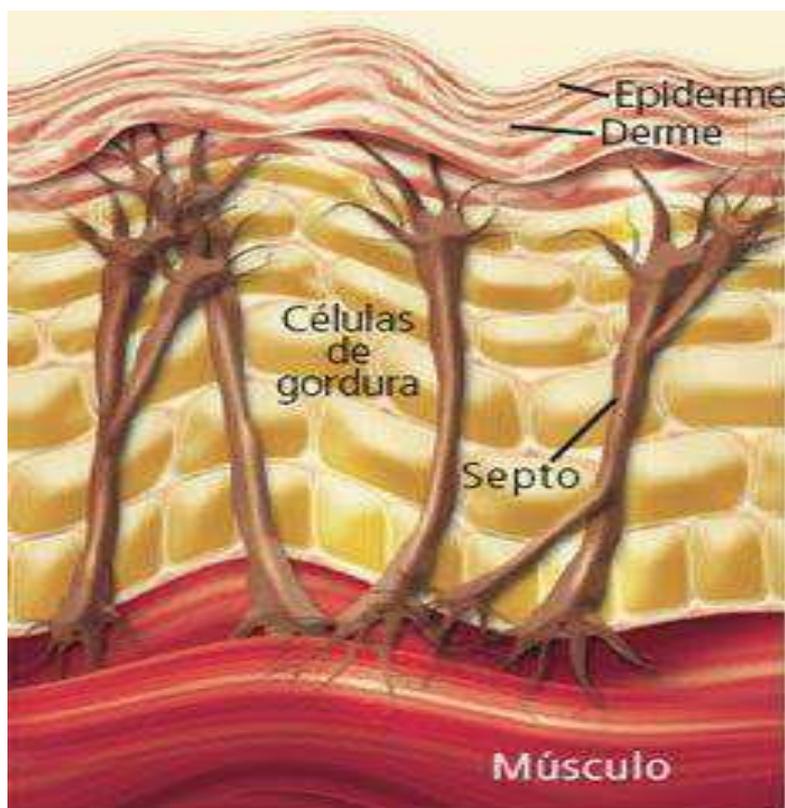


Figura 7 - Localização da Lipodistrofia – Células de gordura (Alexandre, 2015).

A lipodistrofia, por sua vez, divide-se em dois tipos, a Lipohipertrofia ou a hipertrofia de insulina: aparece sempre de forma suave em formato de nódulos nos locais das injeções. Esta condição pode ser causada pelos efeitos naturais da insulina, por não realizar corretamente o rodízio dos locais de aplicação ou pela reutilização de agulhas (Minelli, *et al*, 2003).

Lipoatrofia é a segunda forma de lipodistrofia e corresponde à perda de gordura sob a pele. Esta condição acontece no momento em que há um declive dentro da pele de textura firme, sendo mais frequente aparecer quando do uso continuado de insulinas misturadas e na região abdominal. Isso ocorre porque o

abdome é o local mais prático e indolor para o diabético fazer a autoaplicação e, por isso, acaba sendo o mais utilizado. Além disso, a camada de gordura formada na lipodistrofia diminui ainda mais a eventual sensação de dor, o que faz com que muitas pessoas acabem preferindo esta região (Minelli, *et al*, 2003).

Observamos, em nosso dia a dia, que não se deve injetar insulina nos locais com lipodistrofias porque eles não absorvem muito bem o hormônio. Para se conseguir níveis séricos adequados de insulina, quando aplicada nos locais onde existe lipodistrofia, será necessário se injetar quase o dobro de insulina para obter os mesmos resultados. Sendo assim, a diminuição da absorção da insulina nos locais afetados, acaba por levar à ocorrência, frequente, de episódios de hipo e hiperglicemias não esperados e, conseqüentemente, obriga o diabético a, cada vez mais, aumentar a sua dosagem de insulina, na tentativa de equilibrar suas taxas.

2.3 Biomateriais

Biomateriais são substâncias ou combinações destas, que podem ser de origem natural ou sintética, produzidas para serem utilizados no corpo por um período de tempo limitado ou definitivo, objetivando desempenhar uma função comprometida no organismo, como também ser um veículo para incorporar outras substâncias. Em contato com o organismo, não devem liberar substâncias tóxicas e devem ser biocompatíveis (Calister, 2002; William, 2008).

A escolha de um biomaterial deve ser fundamentada nas suas propriedades e aplicações, sendo determinada pela composição e tipo de material utilizado na produção. Essa avaliação das propriedades e características deve ser realizada através de parâmetros científicos e de Engenharia, considerando a interação complexa de fatores físicos, biológicos, clínicos e tecnológicos desejáveis (Orefice; Pereira; Mansur, 2012).

Silver e Doillon (1989) destacam algumas características na seleção dos materiais a serem utilizados em organismos vivos, como: biocompatibilidade, estabilidade química, estabilidade mecânica adequada, peso, densidade e forma adequados, ser relativamente barato, reprodutível e de fácil fabricação e ser biofuncional, ou seja, desempenhar a função para a qual foi projetado, com o máximo de eficiência.

A biocompatibilidade é a capacidade de um material dar uma resposta tecidual adequada numa aplicação específica, não causando reação inflamatória crônica, reação de corpo estranho ou toxicidade, podendo ser reabsorvida ou substituída por tecido natural (Williams, 2008; Santos; Wada, 2007).

Biomateriais, à base de quitosana, constituem uma classe de materiais com diversas aplicações, dentre elas, a regeneração tecidual. Têm sido aplicados em vários campos, desde a liberação controlada de fármacos até a engenharia de tecido, de forma que, a presença da quitosana nos biomateriais tem um grande potencial devido a sua versatilidade de aplicações (Laranjeira; Fávere, 2009; Spin-Neto *et al.*, 2008).

2.4 Quitosana

“A quitosana foi descrita, em 1894 por Hoppe-Seyler, quando a quitina foi submetida a um refluxo a 453 K em hidróxido de potássio concentrado, obtendo um produto bastante solúvel em ácido acético e ácido clorídrico. Além disso, o produto solubilizado precipitava por adição de álcalis e a este produto solubilizado se denominou quitosana, sendo assim obtida uma substância que possuía quantidade de nitrogênio igual à quitina original” (Abram, 2004).

Na natureza, a quitosana pode, também, estar presente em alguns fungos, como aqueles pertencentes aos gêneros *Mucor* e *Zygomycetes* (Kafetzoulou, 1993). De acordo com o grau médio de acetilação (GA), parâmetro empregado para caracterizar o conteúdo médio de unidades N-acetil-D-glicosamina de quitina e quitosana, podem-se obter diversas quitosanas variando-se, assim, suas propriedades físico-químicas, como solubilidade, pKa e viscosidade (Singla, 2001). Geralmente, é difícil se obter quitosana com elevado grau de desacetilação pois, à medida que este aumenta, a possibilidade de degradação do polímero também aumenta. (Le Dung, 1994).

É um polímero linear, obtido, geralmente, pela desacetilação alcalina da quitina, que é um polissacarídeo constituído de unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose, ligadas através de ligação β -(1→4). Tem grande importância econômica e ambiental, obtida, como dissemos, a partir da quitina, material existente principalmente nas carapaças de crustáceos, e que representa o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, só sendo ultrapassado pela celulose. É

originada a partir da reação de desacetilação parcial de quitina, geralmente por tratamento alcalino (Spin, *et al.*, 2008). Possui baixa toxicidade, além de ser biocompatível e biodegradável, sendo amplamente utilizada em diversas vertentes, com sucesso na área médica e farmacêutica, empregada para a obtenção de produtos cosméticos, no desenvolvimento de pele artificial para o tratamento de queimados, a fim de simular a permeabilidade de substâncias ativas através da pele humana (Majeti & Kumar, 2000), na obtenção de curativos com a capacidade de deter hemorragias, prevenir infecções, desenvolver filmes com ação antimicrobiana para a conservação de carnes, frutas e cereais e desenvolver membranas para hemodiálise. Além disso, previne a absorção de proteínas, a adesão de plaquetas e a formação do trombo por mecanismo de repulsão elétrica, já que as interações que levam à trombose ocorrem na interface sangue-biomaterial (Benesch, 2002; Sandford, 1988; Burkatovskaya, 2006).

No estado sólido, a quitosana é um polímero semicristalino. Sua morfologia tem sido muito investigada, e muitos polimorfismos são mencionados na literatura. Cristais de quitosana são obtidos usando-se a desacetilação completa da quitina de baixo peso molecular (Azevedo, 2007).

A produção de quitosana, a partir da quitina, deve ser realizada de forma que garanta, ao final do processo, a obtenção de quitosana com alto grau de pureza, sobretudo, isenta de contaminantes, como proteínas, endotoxinas e metais tóxicos. Neste âmbito, é válido ressaltar que o polímero obtido deve ser caracterizado adequadamente quanto à massa molar, grau de acetilação e distribuição deste grupo ao longo da cadeia polimérica. Estas características podem influenciar na biodegradabilidade do mesmo, principalmente na acessibilidade enzimática, influenciando a hidrólise do polissacarídeo. (Khor, 2002).

Algumas aplicações farmacêuticas da quitosana são limitadas por problemas de hidrossolubilidade, uma vez que esta é insolúvel em água em meio neutro, condição em que enzimas fisiológicas exercem sua atividade (Kubota, 2000).

Na Figura 8, é possível ver o esquema de desacetilação da quitina, dando origem à quitosana.

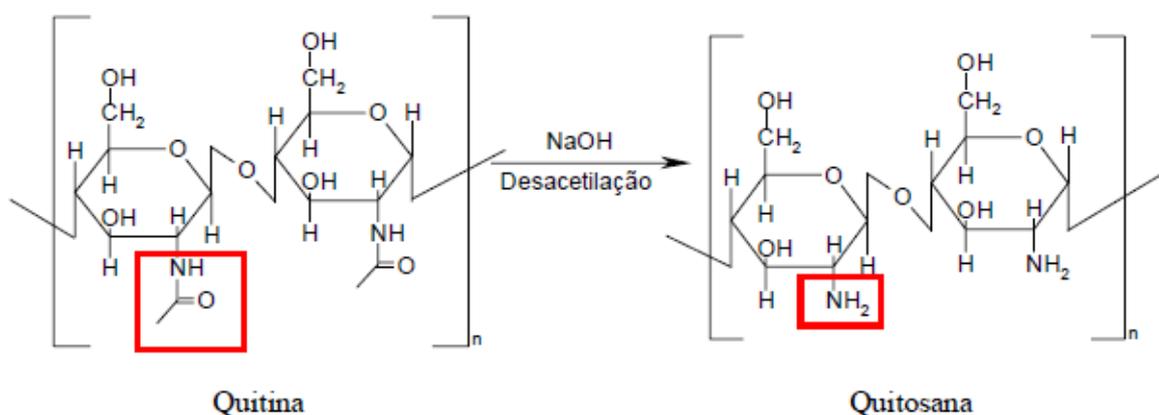


Figura 8 - Esquema de desacetilação da quitina, originando a quitosana (Adaptado de STAMFORD, 2006).

Partindo do princípio de que derivados de quitina e quitosana podem ser preparados a fim de se melhorar sua solubilidade em água, as aplicações destes polímeros podem aumentar significativamente. Desde a descoberta da molécula da quitosana, há cerca de 150 anos, sempre se acreditou que este polímero fosse insolúvel em meio alcalino. Porém, Muzzarelli e colaboradores (1997), de forma inovadora, conseguiram desenvolver um sistema em que pode existir quitosana solúvel, mesmo em pH 10. Várias são as propriedades deste polímero já comprovadas cientificamente. Dentre as mais importantes, destacam-se: a atividade antimicrobiana, o efeito coagulante, analgésico e aceleração da cicatrização.

2.4.1 Atividade Antimicrobiana

Alguns pesquisadores explicam a atividade antimicrobiana da quitosana por seus grupos amínicos que, uma vez em contato com os fluidos fisiológicos, provavelmente, são protonados e se ligam a grupos aniônicos desses microrganismos, resultando na aglutinação das células microbianas e inibição do crescimento (Olsen, 1989; Ravi Kumar, 2000).

Esses polímeros provocam a inibição do crescimento de microrganismos, como *E. coli*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Helminthosporium* (Ravi, Kumar, 2000), *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *S. pyogenes*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. faecalis* (Olsen, 1989), *Shigella dysenteriae*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Coliforms*, *Vibrio* (Singla, 2001), *Agrobacterium tumefaciens*,

Corynebacterium michiganense, *Erwinia* sp., *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Xanthomonas campestris*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Drechslera sorokiniana*, *Micronectriella nivalis*, *Procularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Tricophyton equinum* (Seo, 1989) e *Candida* (Koide, 1998).

Estudos mais recentes, entretanto, revelam que o mecanismo da atividade antimicrobiana da quitosana está intimamente relacionado às propriedades físico-químicas do polímero e às características da membrana do microrganismo ((Costa, *et al.*, 2006).

Esses resultados sugerem que os efeitos da quitosana são distintos nos dois tipos existentes de bactérias: as gram-positivas e as gram-negativas. No caso das primeiras, a hipótese é que quitosana de alta massa molecular forma películas ao redor da célula que acabam por inibir a absorção de nutrientes, enquanto que quitosana de baixa massa molecular penetra mais facilmente em bactérias gram-negativas, causando distúrbios no metabolismo desses microrganismos (Costa, *et al.*, 2006).

2.4.2 Efeito Coagulante

Quitina e quitosana desempenham, ainda, importante papel na homeostase (Singla, 2001; Olsen, 1989), muito embora, de maneira independente ao sistema clássico da cascata de coagulação (Rao, 1997). Okamoto e colaboradores (2003) mostraram que esses polímeros reduzem o tempo de coagulação sanguínea de forma dose-dependente, sendo a quitosana (tempo de coagulação sanguínea de 3,7 min) mais eficaz que a quitina (tempo de coagulação sanguínea de 4,7 min) na coagulação sanguínea sob a mesma concentração de 0,1 mg/ml (tempo de coagulação sanguínea de 12 min para o controle), embora a quitina tenha maior capacidade em agregar plaquetas (61,2%), comparada à quitosana (27,9%).

O fato de a quitosana ser mais eficaz na coagulação sanguínea, mesmo quando a quitina tem maior poder de agregação plaquetária, é atribuído à sua capacidade em agregar, também, os eritrócitos devido à interação das cargas positivas dos grupos amínicos livres da quitosana com as cargas negativas de receptores dos eritrócitos, contendo resíduos de ácido neuramínico e murâmico (Singla, 2001; Rao, 1997).

2.4.3 Efeito Analgésico

Estudos realizados por Okamoto (2002) sugerem que o principal efeito analgésico da quitosana é decorrente da captura de hidrogênios ácidos liberados no local da inflamação pela ionização do grupo amínico a NH_3^+ . A quitosana teria a propriedade de absorver a bradicinina liberada no sítio da inflamação, e a quitina teria a capacidade de absorção quase três vezes maior do que aquela (Costa, *et al.*, 2006).

2.4.4 Aceleração da Cicatrização

A propriedade imunomoduladora da quitosana (Figura 9) é devida à sua capacidade de ativar, quase que exclusivamente, o macrófago (Olsen, 1989), o que explica, não somente, seu papel na aceleração da cicatrização de lesões, mas, também, a biodegradabilidade desse polímero no organismo (Muzzarelli, 1992 e Muzzarelli, 1997).



Figura 9 - Mecanismo imunomodulador da quitosana (Adaptado de Muzzarelli, 1992 e Muzzarelli, 1997).

Os macrófagos, ativados pelos oligômeros de quitina e quitosana de baixa massa molecular, liberam interleucina-1, que estimula a proliferação de fibroblastos e influencia a estrutura do colágeno. Liberam, também, N-acetilglicosaminidase, que hidrolisa a quitosana a monômeros de Nacetilglicosamina e glicosamina, unidades de açúcares necessárias à biossíntese do ácido hialurônico e outros componentes da matriz extracelular pelos fibroblastos (Muzzarelli, 1992 e Muzzarelli, 1997). Trabalhos utilizando-se da quitosana como carreador da insulina são considerados promissores como alternativa da via de administração da mesma em sistema de liberação controlada de fármacos.

2.5 Liberação Controlada de Fármacos

Atualmente, os sistemas de liberação de fármacos fazem parte não só da investigação farmacêutica. Em sua grande parte, esses são baseados em matrizes poliméricas. As matrizes hidrofílicas tornaram-se muito populares na formulação de formas farmacêuticas de liberação modificada. A seleção do polímero hidrofílico na confecção da matriz pode fornecer uma junção adequada dos mecanismos de intumescimento, de dissolução ou de erosão e determinam a cinética de liberação *in vitro* (Lopes; Lobo e Costa, 2005).

O objetivo principal da liberação controlada de fármacos é o controle temporal e espacial, *in vivo*, da concentração de fármacos, para que haja uma administração maximizada, de modo que os efeitos adversos sejam diminuídos, ocasionando, assim, benefícios clínicos. Desta forma, o termo “fármaco” engloba os compostos bioativos utilizados com finalidade terapêutica (Uchegbu, 2006).

Os fármacos possuem uma faixa de ação terapêutica, acima da qual ela é tóxica e abaixo da qual é ineficaz. As dosagens administradas determinam os níveis plasmáticos. Observa-se que a concentração do fármaco na corrente sanguínea, na administração em dose única, apresenta um aumento, até atingir um pico máximo, a partir do qual passa a diminuir. Neste momento, é necessário uma nova dose, para que a concentração volte a se elevar. Se houver variação na administração, a concentração pode ficar abaixo do intervalo terapêutico, ou seja, abaixo do nível eficaz ou acima do nível tóxico. No sistema de liberação controlada de fármacos,

ocorre a manutenção da concentração do fármaco em níveis eficazes, por um tempo prolongado, utilizando-se de uma única administração (Allen, 2007).

Os sistemas poliméricos de liberação controlada de fármacos têm sido pesquisados, em detalhes, nos últimos 30 anos. Apresentam a vantagem de manter o fármaco por mais tempo dentro da janela terapêutica (Figura 10), reduzindo a possibilidade de níveis tóxicos ou subterapêuticos. Desta forma, minimizam-se os efeitos colaterais e o número de doses requeridas é diminuído, além de se promover a aproximação da secreção fisiológica de alguns hormônios (Souza, 2006).

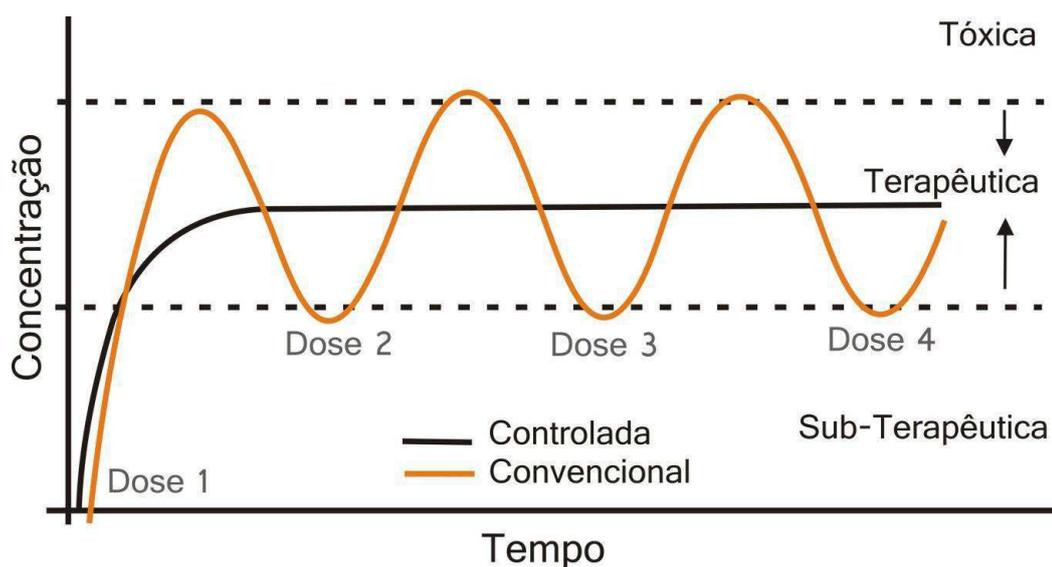


Figura 10 - Perfil de liberação de fármacos convencional e controlada em função do tempo (Vitaline, 2010).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local da Pesquisa

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste - CERTBIO, localizado na Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais, na Universidade Federal de Campina Grande/UFCG.

3.2 Materiais

- Quitosana fornecida na forma de pó pela Sigma Aldrich – de médio peso; molecular com grau de desacetilação entre 75- 85%;
- Ácido acético glacial P.A., fornecido pela Vetec;
- Insulina – Insulina Humana comercial líquida-NPH;
- Hidróxido de sódio P.A., fornecido pela Vetec;

3.3 Métodos

3.3.1 Biofilmes conjugadas de Quitosana e Quitosana/Insulina.

A solução de quitosana com concentração 1%*m/v* foi obtida através da técnica de evaporação do solvente, pela adição de 10g de quitosana em pó em uma solução de 1000 ml de ácido acético glacial a 1% *v/v*, sob agitação constante em agitador mecânico, por um período de 2h, em temperatura de 40°, a uma velocidade de 620 rpm. Posteriormente, a solução foi neutralizada com uma solução de hidróxido de sódio 1 Mol/L.

A seguir, foram colocados 5ml em 30 placas de Petri de 5,5 cm. Em 10 destas amostras, incorporamos 2ml de insulina, misturando a solução polimérica com a ajuda do bastão de vidro, de forma lenta por 1 min.

A secagem dos filmes foi realizada usando-se a técnica de evaporação de solvente, em temperatura entre 2° e 8° C (refrigerador), por 7 dias. Após, foram retiradas 10 biofilmes de quitosana e foram inseridos 2 ml de insulina e depois 5 ml de quitosana pela técnica de dip coating, e novamente foram secas. Em seguida

todos os biofilmes foram separados, identificados e submetidos aos processos de caracterização.

A Figura 11 ilustra de maneira simplificada o fluxograma da elaboração dos biofilmes de quitosana já a Figura 12 representa as demais membranas, desde o seu processo inicial até a sua caracterização e a Tabela 4 exibe a identificação dos biofilmes.



Figura 11 - Fluxograma da elaboração dos biofilmes de quitosana (Fonte: própria)

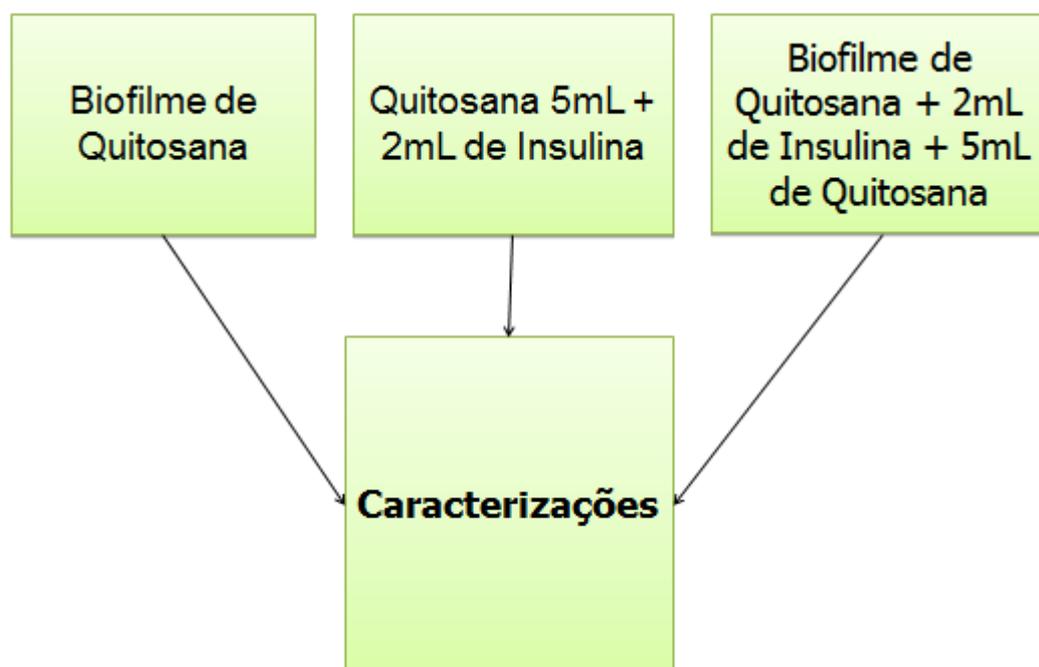


Figura 12 - Fluxograma da elaboração dos biofilmes de quitosana (Fonte: própria)

Tabela 4 - Denominação das amostras.

CÓDIGO	AMOSTRAS
Q	Quitosana 1%
QI	Quitosana 1% com insulina
Q_I_Q	Quitosana 1% com insulina + Quitosana 1%

Fonte: Própria

3.4 Caracterizações

Os biofilmes foram caracterizados por Difração de raios-X (DRX), Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Microscopia Ótica (MO), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) / Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS) e Molhabilidade por Medida de Ângulo de Contato.

3.4.1 Difração de raios X (DRX)

As análises de difração de raios X foram conduzidas a temperatura ambiente em aparelho XRD-6000 Shimadzu, utilizando radiação $K\alpha$ do cobre (1,5418 Å), tensão de 40 kV e corrente 30 mA. Os biofilmes foram examinados em um intervalo de 2θ entre 1,5 e 40,0 graus a uma velocidade de 2°/min.

3.4.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As análises utilizando a técnica de espectroscopia na região de infravermelho com transformada de Fourier dos biofilmes foram realizadas em temperatura ambiente e o equipamento utilizado foi um Spectrum 400 da Perkin Elmer. A técnica FTIR foi usada para identificar as bandas características dos grupos funcionais presentes nos biofilmes utilizando a faixa de varredura de 4000 a 600 cm^{-1} .

3.4.3 Microscopia Ótica (MO)

Para materiais que são opacos a luz visível, como é o caso dos metais, da maioria dos cerâmicos e polímeros, somente a superfície pode ser observada e deve ser criteriosamente preparada de maneira que venham a revelar a microestrutura (Fook, 2005). A microscopia Ótica foi utilizada para avaliação da morfologia dos biofilmes com magnificação de 350x.

Aparelho Microscópio Óptico Hirox de reflexão e transmissão com acessórios 2D, acoplado a uma estação de Análise de Imagens.

3.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) / Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS)

Para realização destas análises foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura de bancada, modelo PHENOM, MEV PROX, fabricante PHENOM WORD, com magnificação de 1000x sem recobrimento metálico, mesmo em amostras não condutoras.

Para a identificação química do material foi utilizado um Microscópio Eletrônico de Varredura de bancada, PHENOM, MEV PROX, fabricante PHENOM WORD acoplado com sistema para micro análise química por Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS).

3.4.5 Molhabilidade por Medida de Ângulo de Contato

A técnica consiste no cálculo da tensão superficial dos biofilmes baseada na análise do formato da gota. O ângulo de molhabilidade entre a gota de água destilada com tensão superficial conhecida e a superfície sólida depende da relação entre as forças adesivas, que fariam a gota se espalhar sobre a superfície.

As análises de ângulo de contato foram efetuadas após o gotejamento de água destilada na superfície da amostra. Foi utilizada uma câmara digital para capturar a imagem, tendo sido tais imagens, posteriormente, remetidas a um computador que possui um programa específico para ser feita a conversão do ângulo da interface líquido-material em unidade de tensão interfacial. A medida do

ângulo de contato, assim obtida, foi utilizada para caracterizar a molhabilidade das superfícies.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Difração de Raios X (DRX)

O difratograma de Raios X obtido do pó de quitosana está ilustrado na Figura 10. Observou-se no difratograma (Figura 13) bases largas iniciados aproximadamente entre 7° e 10° e entre 17 e 20°, comportamento este típico de materiais poliméricos semicristalinos, condizentes com os estudos de Barbosa (2011).

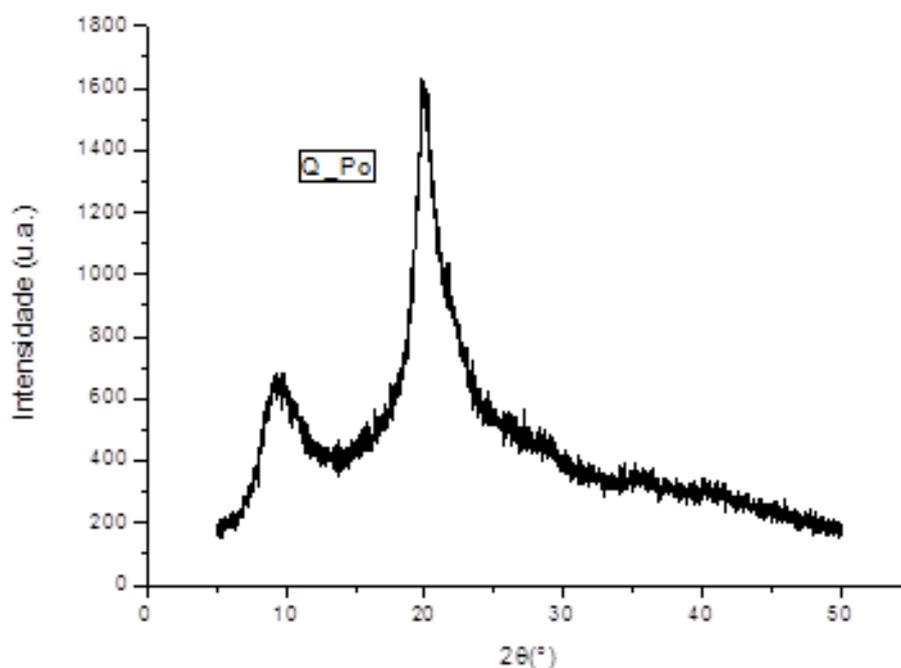


Figura 13 - Difratograma de Raios X do pó da quitosana (Q_Pó) (Fonte: Própria).

O polímero quitosana tem um perfil semicristalino, que é proveniente das fortes interações intra e intermolecular, caracterizado pelas pontes de hidrogênio formadas entre os grupos amina, álcool, amida e outros grupos funcionais presentes na molécula de quitosana. As interações que ocorrem na quitosana provêm de uma certa organização na estrutura cristalina (Uragam; Tokura, 2006).

As Figuras 14, 15 e 16 ilustram os difratogramas das membranas contendo quitosana (Q), quitosana-insulina (Q_I) e quitosana-insulina-quitosana (Q_I_Q)

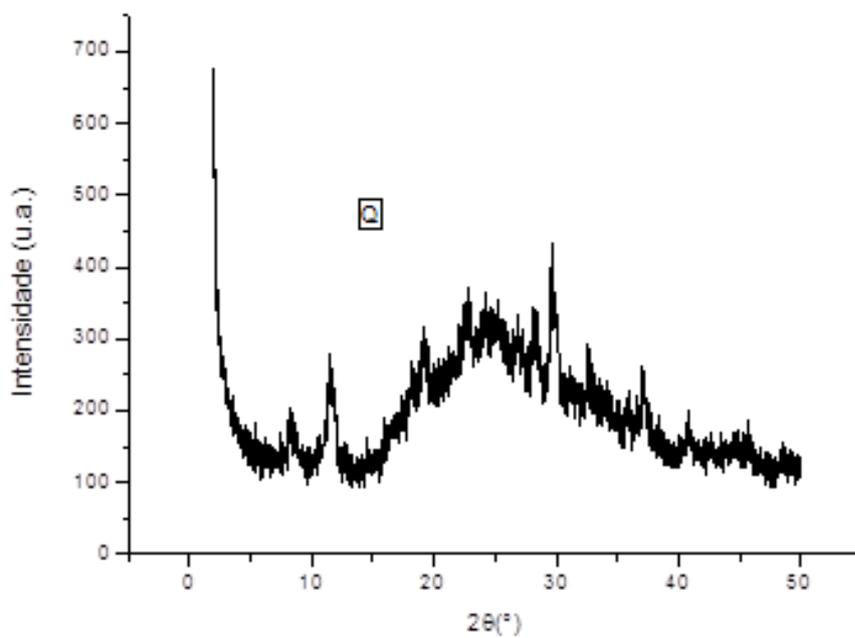


Figura 14 - Difratoograma de Raios X da membrana de quitosana (Q) (Fonte: Própria).

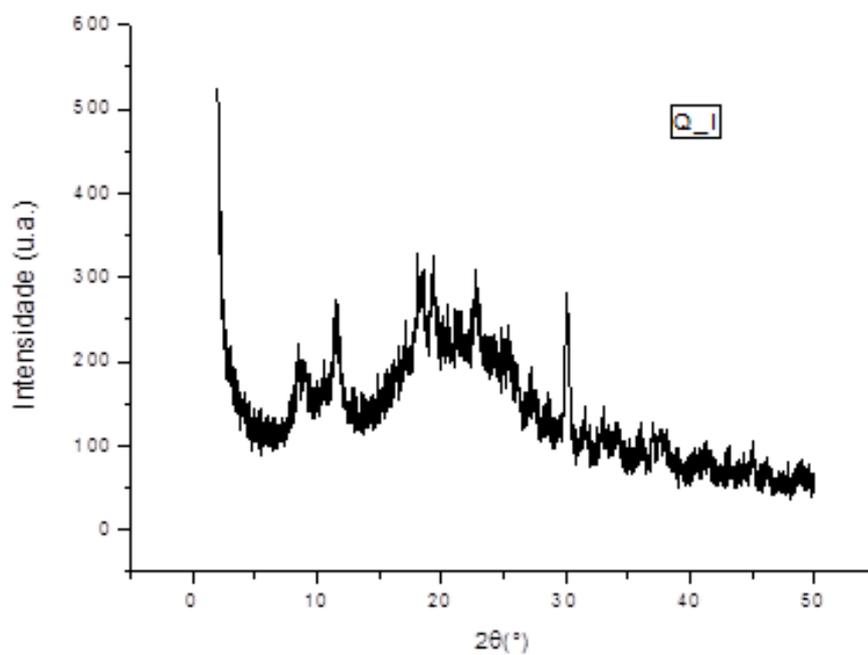


Figura 15 - Difratoograma de Raios X da membrana de quitosana com insulina (Q_I) (Fonte: Própria).

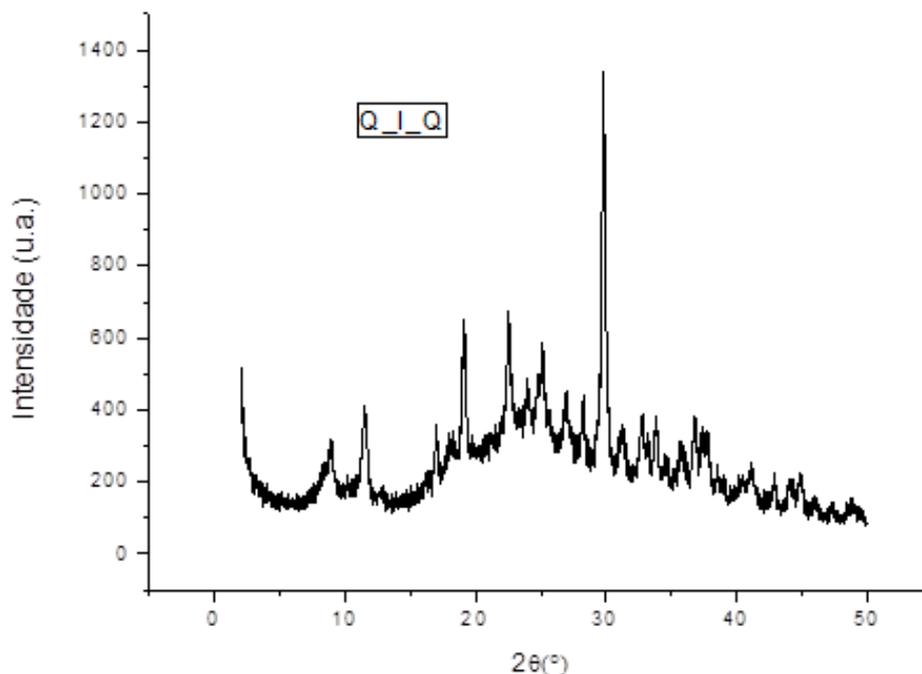


Figura 16 - Difratograma de Raios X da membrana de quitosana com insulina (Q_I_Q) (Fonte: Própria).

O difratograma de Raios X da membrana de quitosana (Q), Figura 14, continua apresentando uma estrutura típica de um polímero semicristalino com dois picos de reflexão (Figura 11, Q_Pó), característico dos difratogramas da quitosana, corroborando com o estudo de Aimoli (2007). Entretanto nota-se que apareceram outros picos, que devem ser relacionados à neutralização da solução que foi realizada por hidróxido de sódio, e, provavelmente, formou um sal (acetato de sódio), pois, nos estudos de Trigueiro (2015), a solução de quitosana - sem neutralizar - não alterou o perfil semicristalino característico das membranas.

Ao analisar o difratograma da membrana quitosana com insulina (Figura 15, Q_I), constata-se que este polímero diminuiu, discretamente, a base larga, iniciada em aproximadamente 17 e 20°. Também ocorreu a intensificação de alguns picos e a diminuição de outros, indicando que ocorreu a interação entre a quitosana e a insulina, confirmando o estudo de Holanda (2011).

Quando observado o difratograma da quitosana – Insulina – quitosana (Figura 16, Q_I_Q), é possível inferir que há um indicativo da incorporação da insulina devido à mudança discreta no perfil da membrana quando comparado com a Figura 15. Ocorreu um aumento na cristalinidade, passando a membrana a ter um perfil

mais cristalino. Isto deve ter ocorrido devido à presença do hidróxido de sódio utilizado na neutralização.

4.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de FTIR foi proposta nesta dissertação visando identificar uma possível interação entre a quitosana e a insulina, numa possível interação entre os grupos funcionais das moléculas das membranas de quitosana (Q), quitosana-insulina (Q_I) e quitosana-insulina-quitosana (Q_I_T). A Figura 17 ilustra o espectro da quitosana em pó e da insulina para servir como base para as discussões dos espectros das membranas.

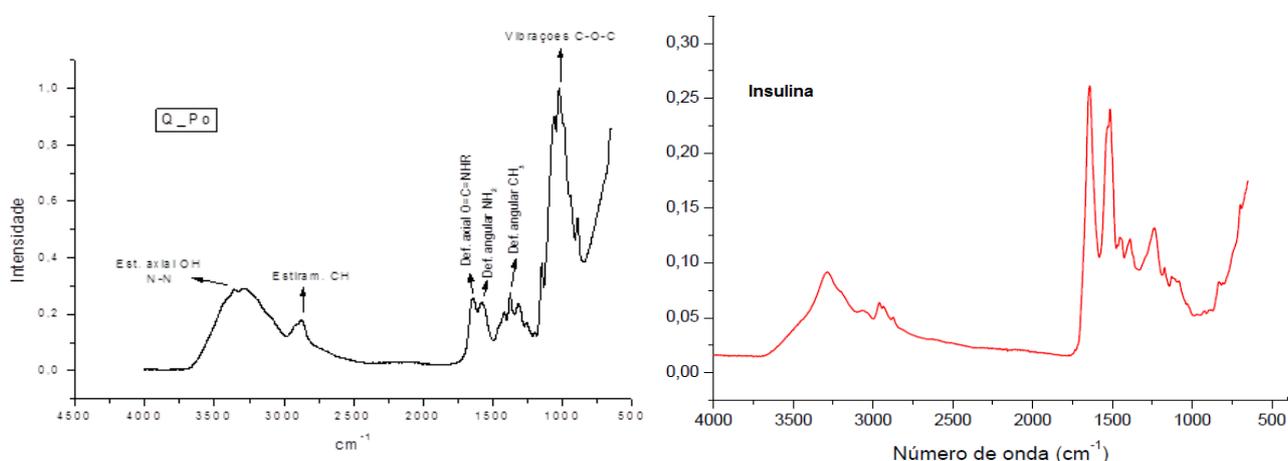


Figura 17 - Espectro da Quitosana em Pó (Q_Pó) e da Insulina (Fonte: Própria)

Analisando o espectro de infravermelho obtido do Pó de quitosana (Q_Pó), Figura 17, verificou-se que ele está de acordo com Barbosa (2011) e Ponciano (2010), pois o espectro apresentou todas as absorções relativas à quitosana. Pode-se ainda afirmar que a mesma não é 100% desacetilada, pois possui uma banda característica da amida ($O = C - NHR$), como pode ser visualizado na Figura 17.

Tabela 5 - Bandas de absorção do pó de quitosana.

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
3334	Deformação axial de O-H e N-H do grupo NH_2
2928 e 2873	Deformação axial de C-H de grupos CH_2 e CH_3
1652	Deformação axial de RHN-C=O (amida)
1586	Deformação angular N-H do grupo NH_2 (amina)
1423 e 1319	Deformação angular de O-H e deformação angular de C-H do anel glicosídico
1377	Deformação angular do C-H de CH_3
1150,1062 e1020	Deformação axial do C-O-C da ligação éter

Fonte: PONCIANO, 2010.

A Figura 17 ilustra o espectro da insulina, indicando duas bandas de absorção referentes à amida I em 1642 cm^{-1} e à amida II em 1512 cm^{-1} . Os estudos de Sarmiento *et. al.*, (2006) indicaram resultados parecidos em seus estudos sobre desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de polissacarídeos contendo insulina. No espectro da insulina do autor citado, bandas em 1650 cm^{-1} (Amida I) e em 1540 cm^{-1} (Amida II) foram ditas como bandas características de espectros de proteínas.

A Figura 18 ilustra o espectro de infravermelho das membranas contendo quitosana (Q), quitosana-insulina (Q_I) e quitosana-insulina-quitosana (Q_I_Q).

Comparando os espectros da Quitosana em Pó (Figura 16) e da membrana de Quitosana (Q) (Figura 18), verificou-se uma alteração no espectro, devida, provavelmente devido à neutralização da solução com hidróxido de sódio.

Analisando os espectros Q e QI (Figura 18), notou-se, no espectro da quitosana com insulina, para além do aumento da intensidade de absorbância, um discreto deslocamento das bandas características da amida I (1646 cm^{-1}) e da amida II (1555 cm^{-1}). Além disso, foi observada uma alteração no valor da intensidade de absorbância da banda na faixa 3331 cm^{-1} , quando comparado à membrana de quitosana sem insulina. Isto pode ter ocorrido em razão da insulina conter os mesmos grupos funcionais nesta faixa de absorbância, ocasionando um aumento na intensidade desta banda devido à concentração de grupos OH. Essas modificações do espectro podem sugerir uma possível interação entre a quitosana e a insulina,

corroborando com os estudos de Holanda (2011) e Trigueiro (2015). Comparando as membranas de Q_I_Q com Q_I, verifica-se que elas são similares, indicando que a insulina continuou incorporada nas membranas de quitosana.

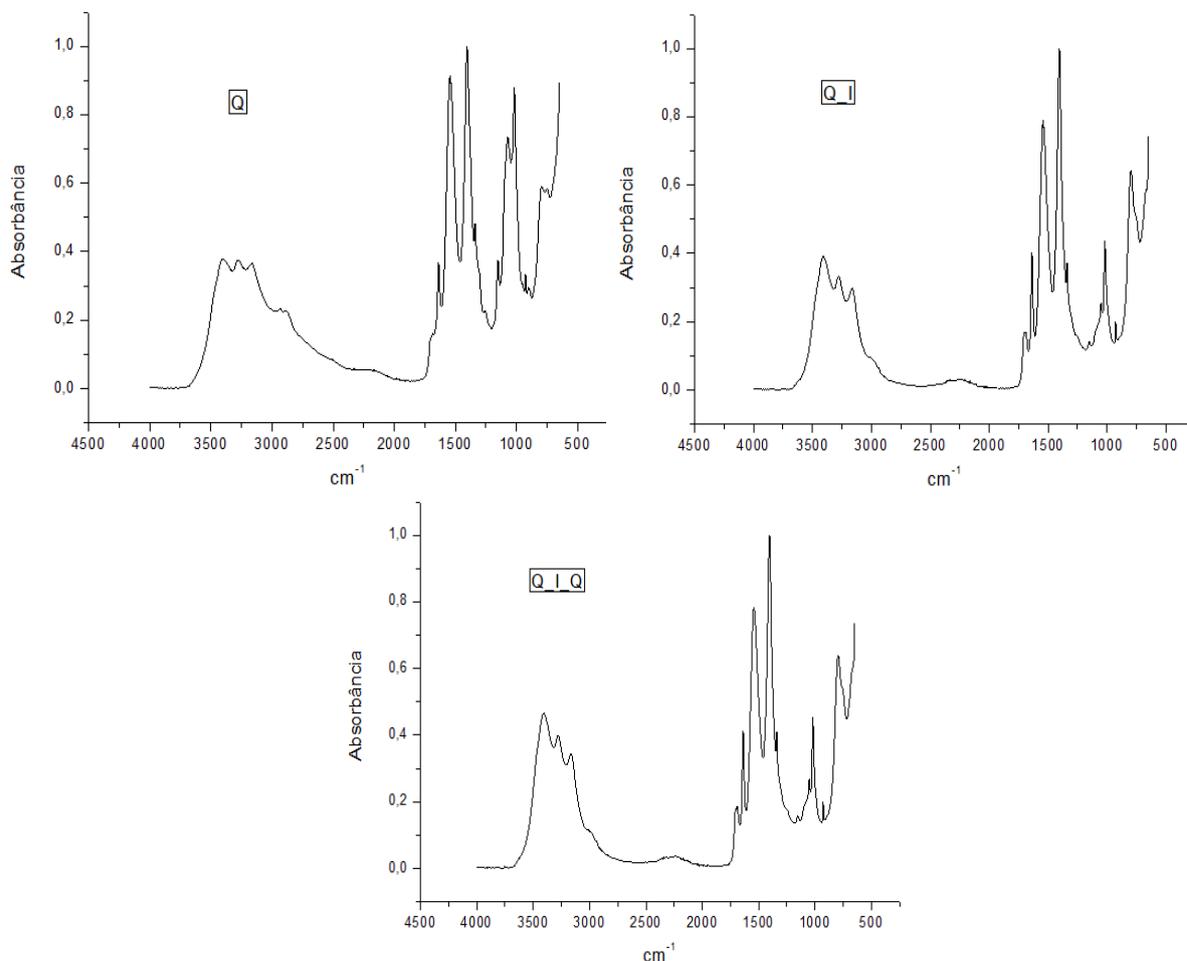


Figura 18 - Espectro das Membranas (Q), (Q_I) e (Q_I_Q) (Fonte: Própria).

A interação entre quitosana e alguns fármacos foi estudada por Boonsongrit, Mueller e Mitrejev (2007). Seus resultados, de FTIR de micropartículas de quitosana-insulina, indicam bandas de quitosana sobrepostas com insulina, resultando em um aumento de intensidade das bandas de carbonila (1654 cm^{-1}) e amina (1540 cm^{-1}) - comportamento atribuído à interação entre a quitosana e a insulina. O ensaio de FTIR confirmou a interação química ocorrida entre a quitosana e a insulina que foi observada no ensaio de DRX.

4.3 Microscopia Ótica (MO)

Na Figura 19, são observadas as micrografias quitosana (Q), quitosana e insulina (Q_I) e quitosana – insulina – quitosana (Q_I_Q).

Verificou-se que a técnica de microscopia óptica, para as membranas estudadas, evidenciou a presença dos poros como encontrado na análise MO.

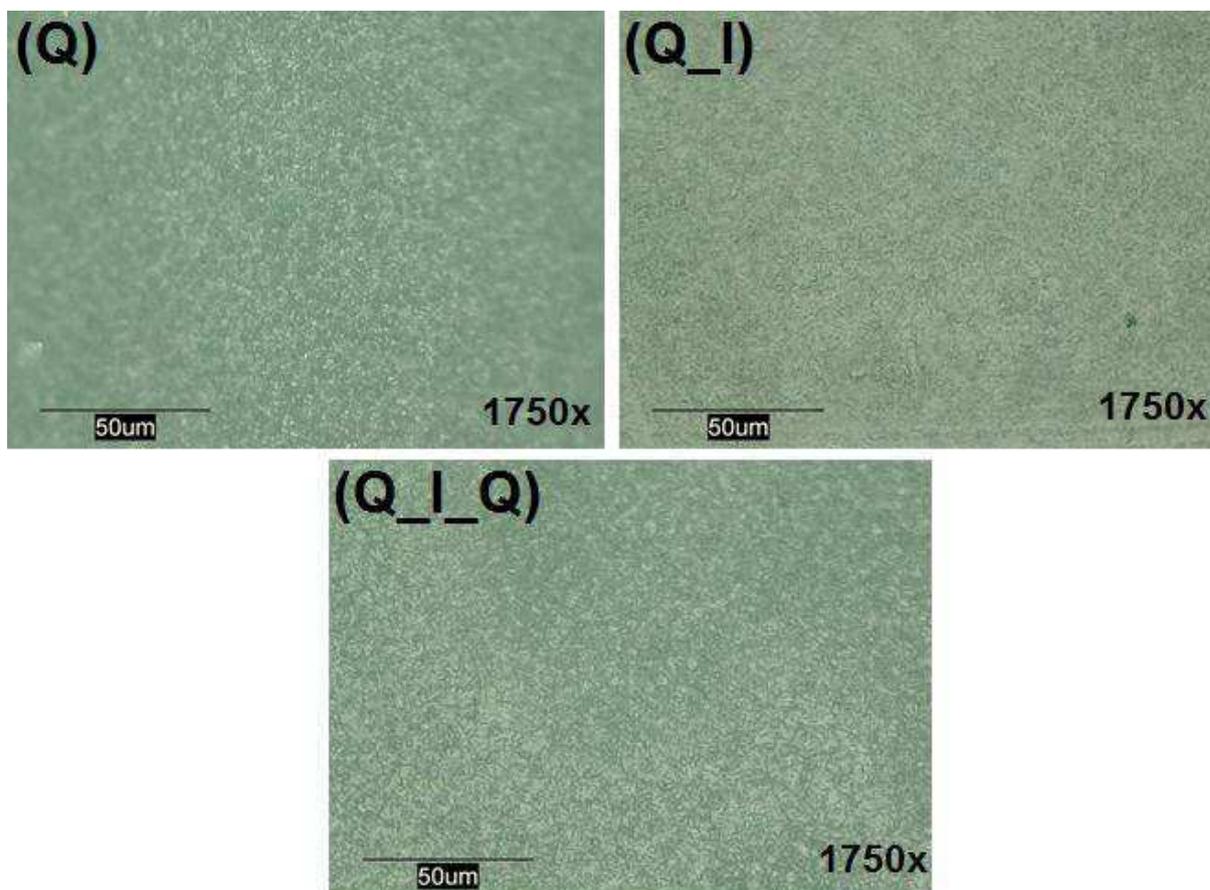


Figura 19 - Micrografia das membranas (Q), (Q_I) e (Q_I_Q). Magnitude de 1750x (Fonte: Própria)

Ao analisar a membrana de quitosana (Q), Figura 19, observa-se uma superfície rugosa, com várias partículas de tamanhos diferentes. Estes resultados diferem dos apresentados por Lima (2010) e Fidéles (2010), que analisaram a morfologia de filmes de quitosana, tendo encontrado uma superfície plana e densa. Isto deve ter ocorrido devido à neutralização com hidróxido de sódio, corroborando como as análises de DRX e FTIR.

Observando-se a membrana com a incorporação da insulina, constata-se a dispersão de uma nova fase na matriz de quitosana quando comparada à imagem

(Q, Q_I), Figura 19. São encontradas, nesta figura, estruturas esféricas distribuídas em toda a superfície da amostra que tendem à formação de aglomerados de aspectos filamentosos. Este comportamento de aglomeração pode ser atribuído à presença da insulina, que foi encapsulada pela matriz polimérica da quitosana. O mesmo comportamento foi verificado na membrana Q_I_Q, corroborando com os estudos de Maia (2015).

4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura / Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X

A Microscopia Eletrônica de Varredura é uma técnica que possui uma elevada resolução aliada a uma apropriada profundidade de campo, que pode produzir imagens superfície da amostra. Nesta técnica, o feixe de elétrons é rastreado pela superfície da amostra e a imagem é produzida pela coleta dos elétrons secundários emitidos pela superfície excitada por um cintilador. Este ensaio foi realizado com a finalidade de observar a morfologia de todas as amostras ensaiadas nesta pesquisa e compará-las e por meio de um detector de EDS acoplado, identificando a composição química das membranas.

A Figura 20 ilustra a micrografia da membrana de quitosana (Q) e seu respectivo EDS.

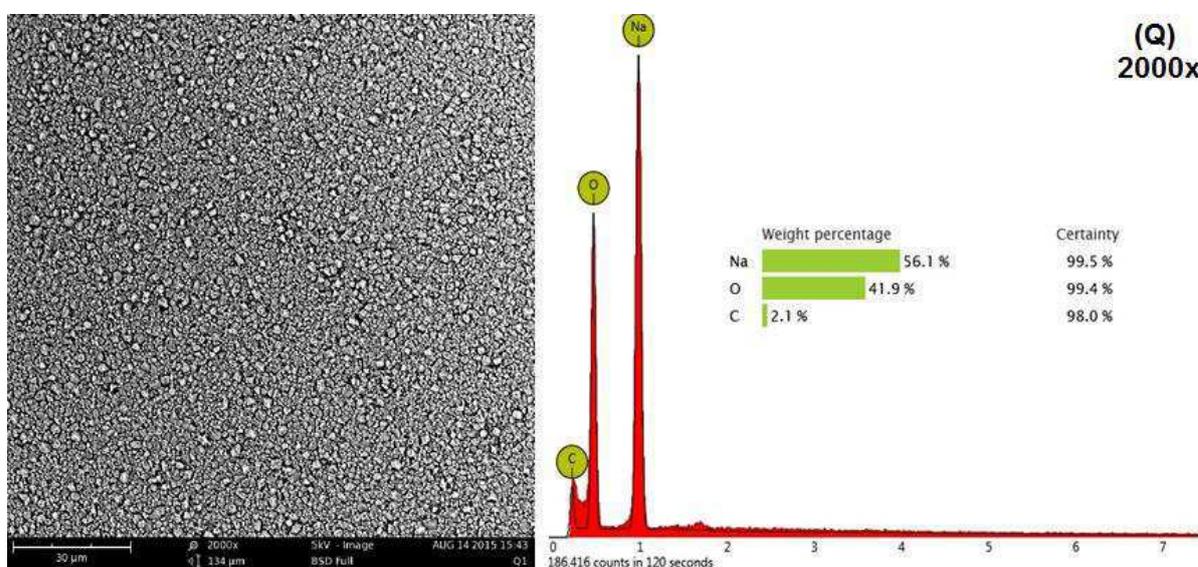


Figura 20 - MEV e EDS da membrana de Quitosana (Q) (Fonte: Própria).

Ao analisar a morfologia da membrana de quitosana (Figura 20), com uma magnificação de 2000x, observa-se uma superfície heterogênea, com a presença de poros visíveis, caracterizando as membranas como porosas. Lima, 2010; Fidèles 2010; Marreco *et. al*, 2004 e Dallan, 2005 estudaram a morfologia de filmes de quitosana e encontraram, diferentemente, uma superfície plana e densa. Ressalte-se que a solução de quitosana foi neutralizada antes da formação do filme, indicando a formação do sal (acetato de sódio) na superfície da membrana apresentada na Figura 20.

Ao analisar o espectro de EDS da Figura 20, constatou-se a presença dos elementos C, O e Na, confirmando, desta maneira, a formação do acetato de sódio, corroborando com o MO.

A Figura 21 ilustra a micrografia da membrana de quitosana-insulina (Q_I) e seu respectivo EDS.

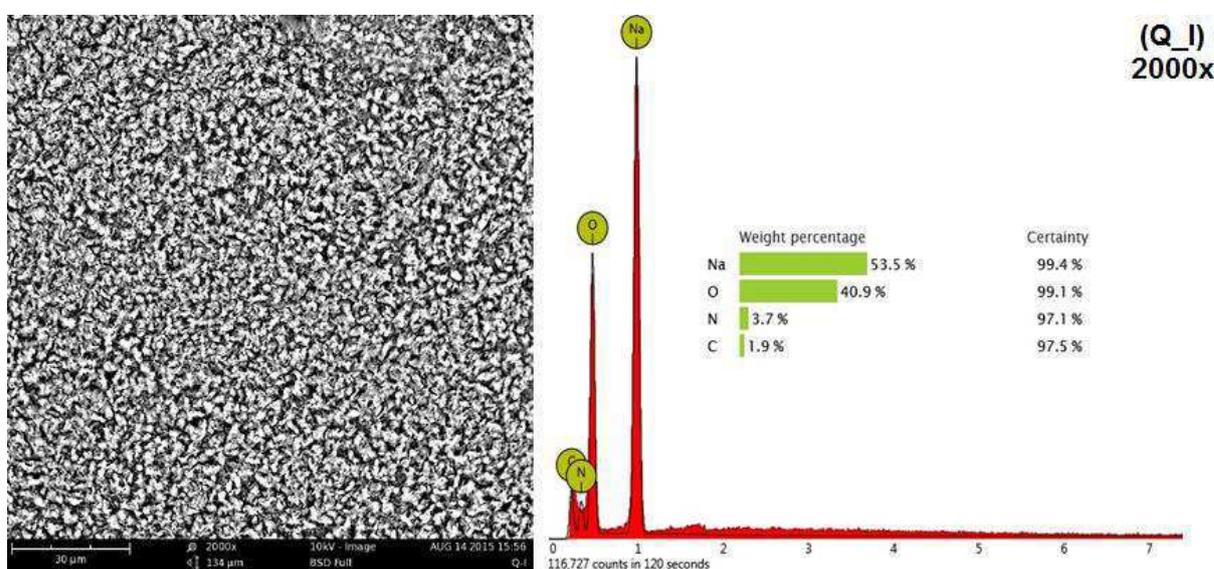


Figura 21 - MEV e EDS da membrana de Quitosana (Q) (Fonte: Própria).

Ao analisar a micrografia (Figura 21) da membrana de quitosana com insulina (Q_I), observa-se uma superfície heterogênea, com a presença de poros visíveis, caracterizando as membranas como porosas, comparando com a membrana de quitosana, apontando para um aumento no tamanho de poros e uma discreta mudança no formato e tamanho das partículas. O EDS confirma a presença da insulina, visto que o mesmo identificou C, O, Na e N. O nitrogênio é um elemento

químico que faz parte da composição química da insulina (Smith; Marks e Lieberman, 2007).

A Figura 22 ilustra a micrografia da membrana de quitosana-insulina_quitosana (Q_I_Q) e seu respectivo EDS.

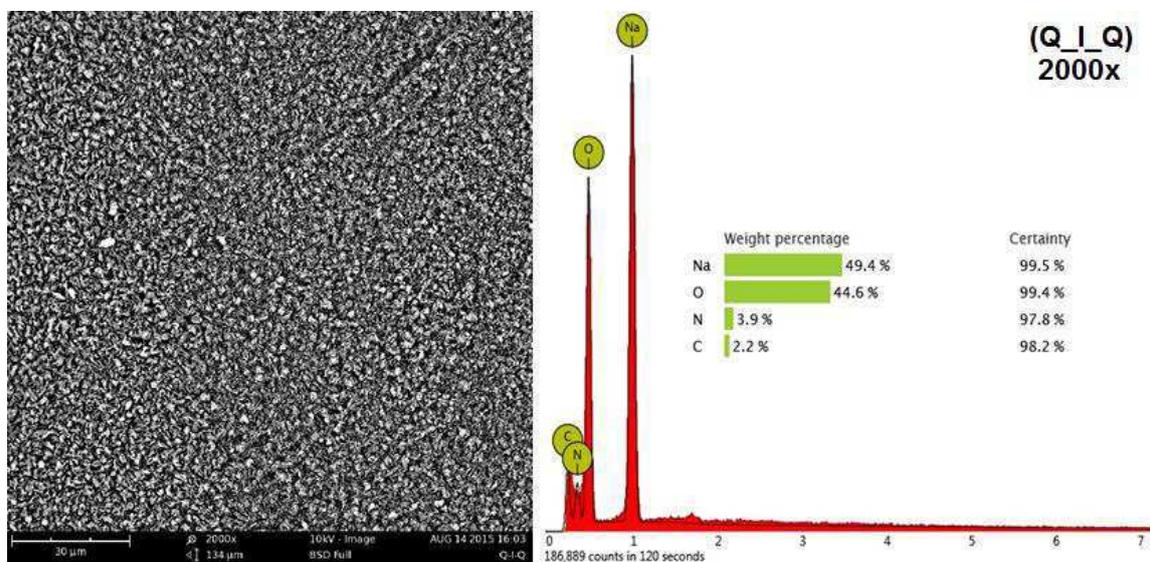


Figura 22 - MEV e EDS da membrana de Quitosana (Q) (Fonte: Própria).

A micrografia da membrana de quitosana_insulina_quitosana está representada na Figura 22. Constatou-se uma morfologia em forma e tamanhos variados e distribuídos em toda superfície da membrana. Certamente, essa alteração na morfologia, quando comparada às micrografias apresentadas nas Figuras 20 e 21, pode ser atribuída à segunda camada de quitosana, visto que a membrana é conjugada de quitosana_insulina_quitosana. Dessa forma, a associação alterou a morfologia da membrana de quitosana. Destaca-se, na análise por EDX (Figura 21), a presença do nitrogênio (Na), o que confirma a presença da insulina na membrana.

4.5 Molhabilidade por Medida de Ângulo de Contato

A Figura 23 ilustra o resultado da molhabilidade por medida de Ângulo de contato das membranas contendo quitosana (Q), quitosana-insulina (Q_I) e quitosana-insulina_quitosana (Q_I_Q). Foram realizadas dez medições de cada tipo de amostra e obtida à média dos ângulos de contatos.

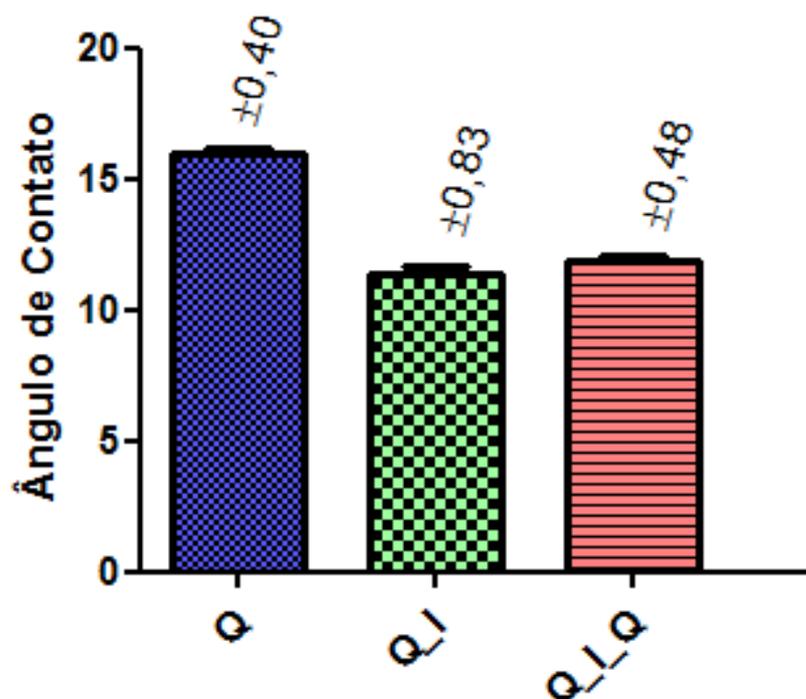


Figura 23 - Medida de ângulo de contato para as membranas Q, QI e QIQ. (Fonte: Própria)

De acordo com os resultados, verifica-se que todas as membranas apresentaram as medidas de ângulo de contato menor que 90°, o que indica hidrofiliicidade. Este resultado era desejável em razão das membranas terem sido confeccionadas para um posterior contato com o corpo humano.

Caso o ângulo de contato estático tenha um valor acima de 90°, o líquido tem a tendência a não molhar a superfície e a fase é chamada de não-molhante. Com um valor aproximado a 0, o líquido recobre toda a superfície, formando um filme fino de fluido molhante. Quando o valor do ângulo for menor ou igual a 90°, a molhabilidade é dita parcial. Logo, quanto menor for o ângulo, maior será a molhabilidade (Wisniewski; Arguelho, 2011).

A presença da insulina não interferiu, consideravelmente, no perfil hidrofílico do material. Entretanto, observa-se, na Figura 23, que a presença da insulina nas membranas de quitosana foi a que obteve o menor valor do ângulo de contato comparando-se com as membranas de Q e Q_I_Q, ou seja, com a inserção da insulina, o ângulo de contato diminuiu, tornando a membrana mais hidrofílica, resultado este que corrobora com Lima (2010) e Holanda (2011).

5 CONCLUSÃO

Os resultados de DRX demonstraram que a neutralização das membranas atribuiu às mesmas um perfil mais cristalino quando comparado ao perfil da quitosana em pó. Este fato ocorreu devido à formação do acetato de quitosana. Foi observado o indicativo da incorporação da insulina.

O processo utilizado para confecção do biofilme (biomaterial), constituído por um polímero (quitosana) e pelo fármaco insulina, mostrou-se eficaz. Os resultados obtidos nos ensaios de FTIR mostram uma possível interação.

Nos ensaios de MO, MEV e EDS, foi possível confirmar a presença da insulina nas membranas e, também, a formação do acetato de sódio devido à neutralização.

Com as medidas de molhabilidade por medida de ângulo de contato, foi possível observar um aumento no caráter hidrofílico das membranas contendo insulina em comparação àquelas de quitosana pura.

Baseado nos resultados obtidos, conclui-se que há evidência da incorporação da insulina ao biofilme de quitosana, indicando possibilidades de uso em tratamentos menos invasivos no futuro.

REFERÊNCIAS

- ABRAM, A. P. Quitina Y Quitosano, Pontifícia Universidad Católica Del Peru 2004.
- ADAD, American Diabetes Association. Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care. 2007 Jan;30 Suppl 1:S42-7.
- AIMOLI, C. G. Investigação da Adequação de Membranas de Quitosana Quimicamente Modificadas para Uso como Biomaterial: Estudo da Calcificação *in vitro*. 2007. 187f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Curso de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas – Faculdade de Engenharia Química. 2007.
- ALBERTI KGMM, ZIMMET PZ for the WHO Consultation. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Provisional Report of a WHO Consultation. Diabetic Medicine 1998; 15:539-553.
- ALLEN JR. L.V.; POPOVICH,N.G.; ANSEL, H.C. Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos. Porto Alegre: Artmed, 2007, 775p.
- ALEXANDRE, 2015. <http://prazeralexandre.blogspot.com.br/2011/03/lipodistrofia-o-que-e-tratamento.html>. Acesso em 12/06/2015.
- Azevedo, V. V. C., et al. "Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais." Revista eletrônica de Materiais e processos 2.3 (2007): 27-34.
- BALDA, C. A; PACHECO, S. A. Aspectos imunológicos do diabetes melito tipo 1. Rev Ass Med Brasil 1999; 45(2): 175-80.
- BARBOSA, R.C., Compósitos Quitosana/Carbonato de Cálcio para Utilização em Cânulas de Fístula Ruminal. 2011. 119f. Dissertação (Doutorado em Engenharia de Materiais)- Universidade Federal de Campina Grande - UFCG
- BENESCH, J.; TENGVALL, P. Blood protein adsorption onto chitosan. Biomaterials. 2002;23:2561-8.
- BEZERRA, 2012. <http://pt.slideshare.net/RosianeBezerra/atencao-pre-natal>. Acesso em 15/08/2015 as 11horas e 15 min.
- BOONSONGRIT, Y.; MUELLER, B.W.; MITREJEV, A. Characterization of drug-chitosan interaction by H NMR, FTIR and isothermal titration calorimetry.European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 69, p.388-395, 2008.
- BRASIL, 2001. Ministério da Saúde. Plano de reorganização da atenção à hipertensão arterial e ao diabetes mellitus: hipertensão arterial e diabetes mellitus. 2001. Site consultado: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/dicas/67diabetes.html> , em 24/08/2015.

BURGE, MR; WALTERS, DL; HOLCOMBR, JH & Schade, DS. Eficácia prolongada de insulina de ação curta em combinação com Lispro ultralenta humano em diabetes mellitus dependente de insulina. J. Clin. Endocrinol Metab. Mar 1997; 82 (3): 920-4.

BRASIL, 2006. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Diabetes Mellitus / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 64 p. il. – (Cadernos de Atenção Básica, n. 16) (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Site consultado: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diabetes_mellitus.PDF, em 24/08/2015.

BURKATOVSKAYA, M.; TEGOS, G.P.; SWIETLIK, E. DEMINOVA, T.N.; CASTANO, A. P.; HAMBLIN, M.R. Use of chitosan bandage to prevent fatal infections developing from highly contaminated wounds in mice. Biomaterials. 2006; 27:4157-64.

CALLISTER JR.,W.D. Ciência e engenharia de materiais. Uma introdução. 5ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002.

CAMPOS, R. A. Insulinoterapia. Nacer e Crescer vol.20 no.3 Porto 2011. Disponível em: http://www.scielo.oces.mctes.pt/scielo.php?pid=S0872-07542011000300023&script=sci_arttext&lng=pt Acesso em 21/12/2014.

CAVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, J. A. Vias de Sinalização da Insulina. Arq Bras Endocrinol Metab vol.46 no.4 São Paulo Aug. 2002. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302002000400013 Acesso em : 20/12/2014

CHACRA, A.R.; PIRES, A. C. Insulin therapy for type 1 Diabetes Mellitus: past and present. Arq Bras Endocrinol Metab v.52 n.2 São Paulo mar. 2008

CHAVES, FR.; ROMALDINE, JH. Diabetes Mellitus tipo 2. RBM - REVISTA BRASILEIRA DE MEDICINA. 2013. 83-90.

COSTA, S. HELIO, S.R. SANTOS, K. S.C.R. FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços Quim. Nova, Vol. 29, No. 4, 776-785, 2006.

DALLAN, P. R. M. Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração da pele. Universidade Estadual de Campinas, Campinas. (Tese). 194f, 2005.

DAMIANI, D.; DAMIANI, D. Complicações Hiperglicêmicas Agudas no Diabetes Melito 1 do Jovem. Arq Bras Endocrinol Met, São Paulo, v. 52, n.2, p. 367-374, 2008. Disponível em: Acesso: 09 nov. 2012.

DIAMOND, Project Group. Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999. Diabet Med. 2006 Aug;23(8):857-66.

EL-SALHY, M.: FALKMER, S; KRAMER, K.J; SPEIRS, R.D. Immunohistochemical investigations of neuropeptides in the brain, corpora cardiaca and corpora allata of adult lepidopteran insect, *Maruduca sexta* (L.). *Cell and Tissue Research*. 232: 295-317, 1983.

FERREIRA, S.R.G.; FRANCO, L.J.; VIVOLO, M.A. Population-based incidence of IDDM in the state of São Paulo, Brazil. *Diabetes Care* 1993; 16: 701-704.

FERRANNINI, E. Insulin resistance versus insulin deficiency in non-insulin-dependent Diabetes Mellitus. Problems and prospects. *Endocr Rev* 1998; 19: 477-90

FIDÉLES, T. B. Filmes reticulados de quitosana para aplicação como biomaterial. 2010. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciência e Tecnologia. Campina Grande, 2010.

FOOK, M. V. L. Desenvolvimento de técnica de deposição de hidroxiapatita pelo método biomimético na superfície polietileno de ultra-alto peso molecular para aplicação como biomaterial. 2005. 128f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química. Araraquara, 2005.

GENUTH S. Type 1 Diabetes Mellitus. *ACP Medicine*. 2008;1-19.[The original English language work has been published by DECKER INTELLECTUAL PROPERTIES INC. Hamilton, Ontario, Canada. Copyright © 2011 Decker Intellectual Properties Inc. All Rights Reserved.]. Tradução: André Islabão. Revisão Técnica: Dr. Euclides Furtado de Albuquerque Cavalcanti

GENUTH, S. Cetoacidosis Diabética y Coma Hiperglucémico Hiperosmolar no Cetósico en el adulto. Tratamiento de la Diabetes Mellitus y sus Complicaciones. terceira edição. American Diabetes Association, Editor Harold E. Lebovitz, 1998.
Gross C, Kelleher M, Iyer VR, Brown PO, Winge DR. Identification of the copper regulon in *Saccharomyces cerevisiae* by DNA microarrays. *J Biol Chem*. 2000 Oct 13;275(41):32310-6.

GROSS JD, MATSUO H, FLETCHER M, SACHS AB, WAGNER G. Interactions of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2001;66:397-402.

HÉLIO, S. R. COSTA, S, KÁTIA S. C. R.S. ELIZABETH, I. F. Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 580, 05508-900 São Paulo - SP, Brasil - Recebido em 15/3/05; aceito em 3/8/05; publicado na web em 14/3/06).

HELMUS, M.N; GIBBONS, D.F.; CEBON, D. Biocompatibility: Meeting a Key Functional Requirement of Next-Generation Medical Devices. *Toxicologic Pathology*, 2008. Disponível em: <http://tpx.sagepub.com/cgi/content/full/36/1/70>. Acesso em 22/12/2014.

HEIMBECHER, A. HÖFLING, D. SABINO, C. TELES, M. <http://www.minhavidade.com.br/saude/temas/diabetes-tipo-1>. Acesso em 12 Julho 2015.

HOLANDA, A. L. Membranas de quitosana para uso em sistema de liberação controlada de insulina: síntese e caracterização. Tese (Doutorado). Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 2011, 113 p.

<http://diabetesbrasil.com.br/author/admin/page/3/>, 2015

KAFETZOULOS, D.; MARTINOV, A.; BOURIOTIS, V. Em Chitin Enzymology; Muzzarelli, R. A. A., ed., European Chitin Soc: Ancona, 1993, p. 147.

KHOR, E.; CURR. Opin. Solid State and Materials Science 2002, 6, 313

KOIDE, S. S.; Nutr. Res. 1998, 18, 1091.

KUBOTA, N.; TASTUMOTO, N.; SANO, T.; TOYA, K.; Carbohydratos. Res. 2000, 324, 268.

LARANJEIRA, M.C.; FAVÉRE, V.T. Quitosana: Biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. Química Nova, v.32, p.672-678, 2009.

LE DUNG, P.; MILAS, M.; RINAUDO, M.; DESBRIÈRES, J.; Carbohydr. Polym. 1994, 24, 2009.

LIMA, R.S.C. Desenvolvimento de Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos: Quitosana/Insulina. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos). Universidade Federal de Campina Grande, 2010, 112 f.

LOPES, C.M.; LOBO, J. M. S. COSTA. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 41, n. 2, abr./jun., 2005.

LOWE WL. Genetics of diabetes mellitus. Kluwer Academic Publishers. Massachusetts, 2001

MAIA, P. C. G. G. S., Desenvolvimento de membranas de quitosana/ gelatina para liberação controlada de insulina. Dissertação (Mestrado). Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 2015, 70 p.

MAJETI, N.V.; KUMA, R. A review of chitin and chitosan applications. React Funct Polym. 2000;46:1-27.

MARRECO, P.R.; MOREIRA, P.L.; GENARI, S.C.; MORAES, A.M. Effect of Different Sterilization Methods on the Morphology, Mechanical Properties, and Cytotoxicity of Chitosan Membranes Used as Wound Dressings. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 71A, p. 268-277, 2004.

MINELLI, Lorivaldo *et al.* Diabetes mellitus e afecções cutâneas. *An. Bras. Dermatologia*. Rio de Janeiro, v. 78, n. 6, p. 735-747, Dec. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962003000600010&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 23 de Ago 2015.

MUZZARELLI, R. A. A. Em ref. 6, 1992, p. 25.

MUZZARELLI, R. A. A.; BELMONTE, M. M.; MUZZARELLI, B.; SIMONELLI, L. Materiali da medicazione a base di chitosani. In: *Convegno-Scuola Associazione Italiana di Scienza e Tecnologia Delle Macromolecole — Polimeri in Medicinal*. Gargnano, p. 307-336, 1997.

NABIPOUR, I. "Clinical Endocrinology in the Islamic Civilization in Iran". *International Journal of Endocrinology and Metabolism* 1: 43–45 [44–5]. 2003.

OKAMOTO, Y.; KAWAKAMI, K.; MIYATAKE, K.; MORIMOTO, M.; SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S.; *Carbohydrat. Polym.* 2002, 49, 249.

OLSEN, R.; SCHWARTZMILLER, D.; WEPPNER, W.; WINANDY, R. Biomedical applications of chitin and its derivatives. In: *Chitin and Chitosan*. Skjåk-Braek. G. Anthonsen, T. and Sandford, P, eds. New York: Elsevier Applied Science, p. 813 - 828.

ORÉFICE, R.L., PEREIRA, M.M., MANSUR, H.S. *Biomateriais – fundamentos e aplicações*. Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica, 1.ed. 2012

PASQUALOTTO, K. R. *et al.* Diabetes mellitus e Complicações. Vol. 3, N. 4: pp. 134-145, November 2012

PIRES A. C.; CHACRA, A. R A evolução da insulino terapia no diabetes melito tipo 1. *Insulin therapy for type 1 Diabetes Mellitus: past and presente*. *Arq Bras Endocrinol Metab* vol.52 no.2 São Paulo Mar. 2008.

PONCIANO, J. J. In: *Desenvolvimento de membranas bioabsorvíveis com variado nível de orientação molecular para aplicação como biomaterial*. 2010. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciência e Tecnologia. Campina Grande, 2010.

POZZILLI, E.M.P. Getting it right for people with LADA. *Health Delivery. Diabetes Voice*. 2014. Volume 59.

PRATT, C. W.; CORNELLY K. *Bioquímica Essencial*. 2006. Ed. Guanabara Koogan.
RAO, S. B.; SHARMA, C. P.; *J. Biomed. Mater. Res., Part A* 1997, 34, 21

RAVI Kumar, M. N. V.; A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, Volume 46, Issue 1, November 2000, Pages 1–27.

RIDDLE MC, GENUTH S. Type 2 Diabetes Mellitus. *ACP Medicine*. 2010; 1-18. [The original English language work has been published by DECKER INTELLECTUAL PROPERTIES INC. Hamilton, Ontario, Canada. Copyright © 2011 Decker Intellectual Properties Inc. All Rights Reserved.

SANDFORD, P.A. Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications. 4th ed. New York: Elsevier; 1988. 665p.

SANTOS, J. A. R.; WADA, M. L. F. Polímeros Biorreabsorvíveis como Substrato para Cultura de Células e Engenharia Tecidual. São Paulo – Campinas. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 17, p. 308-317, 2007.

SARMENTO, B.; RIBEIRO, A.; VEIGA, F.; FERREIRA, D. Development and characterization of new insulin containing polysaccharide nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. v. 53, p.193-202, 2006.

SCHIMIDT, Maria I.; REICHEL, Angela J. Consenso Sobre Diabetes Gestacional e Diabetes Pré-Gestacional. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica*. Vol. 43. Nº 1. Fevereiro, 1999.

SEO, H.; MITSUHASHI, K.; TANIBE, H. Em ref. 6, 1989, p. 34.

SILVA, I.; PAIS-RIBEIRO J.; CARDOSO H.; RAMOS, H.; CARVALHOSA, S. F.; DIAS, S.; GONÇALVES, A. Efeitos do apoio social na qualidade de vida, controle metabólico e desenvolvimento de complicações crônicas em indivíduos com diabetes. *Psicologia, Saúde & Doenças*, 2003, 4 (1), 21-32.

SILVER, F; DOILLON, C. Biocompatibility, interactions and implantable materials, New York, VCH. v. 1. p. 1-76, 1989.

SINGLA, A. K.; CHAWLA, M.; *J. PHARM. Pharmacol.* 2001, 53, 1047.

SMITH, C.; MARKS, A. D.; LIEBERMAN, M. *Bioquímica Médica Básica de Marks*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

SOUSA, K. S. O uso do polissacarídeo natural quitosana quimicamente modificado na remoção de cátion e termoquímica de interação na interface sólido/líquido. Tese (Doutorado em Química). Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, 2009.

SOUZA A. Materiais mesoporosos ordenados aplicados como sistemas para liberação controlada de drogas. Dissertação (Mestre em ciências e tecnologia dos materiais). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materias. Centro de Desenvolvimento da Tecnologia. Comissão Nacional de Energia Nuclear. Belo Horizonte – MG. 2006.

SOUZA, C.R.; ZANETTI, M.L. Administração de insulina: uma abordagem fundamental na educação em diabetes. Rev. Esc. Enf. USP, v.34, n.3, p. 264-70, set. 2000.

SPIN-NETO, R. et al. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. Revista de Odontologia da UNESP, v.37, p. 155-161, 2008.

STAMFORD, T.C.M. Produção, caracterização e atuação anticariogênica de quitosana extraída de *Cunninghamella elegans* UCP 542. 153f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Pernambuco – UFPE – Recife, 2006.

TAVARIA, F. K.; COSTA, E. M.; VAZ I. P.; CARVALHO M. F.; PINTADO M. M. A quitosana como biomaterial odontológico: estado da arte. Chitosan as a dental biomaterial: state of the art Rev. Bras. Eng. Bioméd. vol.29 no.1 Rio de Janeiro Jan./Mar. 2013 Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-31512013000100011&script=sci_arttext>. Acesso em 22/12/2014.

TRIGUEIRO, G. P. S., Desenvolvimento de membranas de quitosana com insulina para liberação controlada de fármaco. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais)- Universidade Federal de Campina Grande – UFCG. 2015. 48f.

UCHEGBU, I., Introduction. In Polymers in drug delivery, Uchegbu, I.; Schatzlein, A., Eds. Taylor & Francis: Boca Raton, 2006.

URAGAMI T.; TOKURA S, (eds.) Material Science of Chitin and Chitosan, Japan: Kodansha Ltd., Springer, 2006.

VITALINE C. GERBRAS. Química Farmacêutica. 2010. Disponível em: <http://www.gerbras.com.br/produtos/vitaline_c.asp>. Acesso em 06 junho 2015.

WILLIAM, D. F. On the Mechanisms of Biocompatibility. Biomaterials. Elsevier, 2008 p. 2941-2953.

WISNIEWSKI, A.; ARGUELHO, M. L. Manual de Instruções e Roteiros de Experimentos. Laboratório de Química. Universidade Federal de Sergipe, 2011. Disponível em: http://albertowj.files.wordpress.com/2011/03/106372-apostila-2011_1-t3.pdf. Acesso em 05/07/2015.