



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

ADRIANA LIMA DE HOLANDA

**MEMBRANAS DE QUITOSANA PARA USO EM SISTEMA DE LIBERAÇÃO
CONTROLADA DE INSULINA: SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO**

CAMPINA GRANDE, 2011

ADRIANA LIMA DE HOLANDA

**MEMBRANAS DE QUITOSANA PARA USO EM SISTEMA DE LIBERAÇÃO
CONTROLADA DE INSULINA: SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO**

Trabalho de tese apresentado à banca examinadora do Programa de Pós Graduação em Engenharia de Processos da Universidade Federal de Campina Grande, Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos, como exigência final para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Processos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook

CAMPINA GRANDE, 2011



DIGITALIZAÇÃO:
SISTEMOTECA - UFCG

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

H722m Holanda, Adriana Lima de.
Membranas de quitosana para uso em sistema de liberação controlada de insulina: síntese e caracterização / Adriana Lima de Holanda. - Campina Grande, 2011.
113f.: il. col.

Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia.
Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook.
Referências.

1. Polissacarídeos. 2. Biomateriais. 3. Diabetes *Mellitus*. 4. Membranas. 5. Sistemas Matriciais. I. Título.

CDU 577.114.4 (043)

ADRIANA LIMA DE HOLANDA

**MEMBRANAS DE QUITOSANA PARA USO EM SISTEMA DE LIBERAÇÃO
CONTROLADA DE INSULINA: SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO**

Data da Aprovação: 15/12/2011

Membros da banca examinadora:

Marcus Vinicius Lia Fook
Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook (Orientador)

Eliana Rigo
Prof.^a. Dr.^a. Eliana Cristina da Silva Rigo (Examinadora Externa)

Maria Carolina
Prof.^a. Dr.^a. Maria Carolina/Bandeira Macena (Examinadora Externa)

Rosemary Sousa Cunha Lima
Prof.^a. Dr.^a. Rosemary Sousa Cunha Lima (Examinadora Externa)

Sayonara Maria Lia Fook
Prof.^a. Dr.^a. Sayonara Maria Lia Fook (Examinadora Externa)

DEDICATÓRIA

Pelo amor sem dimensão de cada momento. Por me inspirar a caminhar e fazer acreditar que, por mais longo e escuro que seja o caminho, haverá sempre um horizonte, dedico este trabalho a minha mãe e amiga, Maria do Carmo, que, por inúmeras vezes, tão bem me substituiu no papel de mãe. A você, mainha, meu respeito, meu afeto e minha gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, e a Jesus, meu guia e protetor, em quem encontro força e coragem para vencer todas as adversidades.

Ao Prof. Dr. **Marcus Vinícius Lia Fook**, pelo exemplo de ser humano que é. Pela experiência, auxílio e orientação em todas as etapas desta jornada, para que enfim esse trabalho pudesse ser concluído.

Às Prof^{as} Dr^a **Sayonara Maria Lia Fook** e Dr^a. **Roberta Oliveira Pinto** pela disponibilidade e amizade, indispensáveis à conclusão desta pesquisa.

Aos meus pais, Florivaldo e Maria do Carmo, pelo generoso amor que me dedicam e pelas valiosas lições ao longo da vida.

Ao meu esposo Clístenes, por ter sido peça fundamental nessa conquista e por ter proporcionado a realização do meu sonho de ser mãe.

À minha filha Beatriz, doce inspiração, por ter-me feito descobrir que existe um amor sublime, maior que tudo no mundo.

Aos meus irmãos Daniel, Roberta e Flávia pela força, compreensão e carinho e em especial a minha irmã **Andréa** pelo apoio e pela torcida desde a etapa de seleção do doutorado.

Aos meus sobrinhos Ana Luísa, Arthur e Guilherme por fazer com que eu me sinta criança novamente.

À minha prima **Divanira Ferreira Maia** pela sua disponibilidade, apoio incondicional e participação efetiva nesta pesquisa.

Ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos, pelo conhecimento adquirido e empenho em transmitir o saber.

Aos amigos do Grupo de Biomateriais da UFCG, **Chirlaine, Rose, Valdênia, Izabel, Carmen, Greyce, Roberta Meira, Eva, Ana Sílvia, Maria Eduarda, Imarally, Vieira, Márcio, Thiago, Glória, Magna, Natália, Ítalo e João Paulo** que contribuíram no meu caminhar acadêmico, e com os quais muito aprendi e em especial a **Rossemberg, Carol, Rita, Wladimir e Katilayne** pela participação efetiva no trabalho, pela amizade e companheirismo em todas as horas e pelo apoio e paciência nos momentos finais desta pesquisa.

Aos colegas do Doutorado em Engenharia de Processos, **Mônica, Vera, Flávio, Fechine e Clenilson** pela ajuda indispensável para pagar as disciplinas obrigatórias do programa.

À **Alisson e Paulinho**, acadêmicos do curso de farmácia da UEPB, pela enorme paciência e persistência durante o ensaio de HPLC.

Aos professores membros da banca examinadora pelas valiosas contribuições.

À Professora Dr^a. **Iracilda Zeppone Carlos** e sua equipe pela utilização do Laboratório de Imunologia Clínica e Biologia Molecular de Departamento de Análises Clínicas da UNESP, Araraquara – SP.

Aos funcionários de Engenharia de Materiais e Processos, em especial: **Kátia, D. Selma, Sr. Geraldo, Emanuel, Márcia, Sr. Sérgio e Jeane**.

A todos que por mim torceram e contribuíram, direta ou indiretamente, para que o sonho se tornasse realidade, minha gratidão.

MENSAGEM

Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.

Chico Xavier

RESUMO

O termo Diabetes *Mellitus* (DM) compreende um grupo de desordens metabólicas caracterizado por hiperglicemia crônica resultante de defeitos na secreção e/ou ação da insulina. A Insulinoterapia se constitui no tratamento de eleição para o DM, consistindo em aplicações subcutâneas diárias de insulina para o controle dos níveis glicêmicos. A quitosana, estudada pela Biomedicina, é um biomaterial que pode ser utilizado em sistemas de liberação controlada de fármacos, cuja taxa de liberação pode ser controlada pelo Tripolifosfato de Sódio (TPP) que é um reticulante iônico da quitosana utilizado para aplicações específicas. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo desenvolver e avaliar membranas poliméricas de quitosana e quitosana reticulada pelo TPP para uso em sistema de liberação controlada de insulina, com a finalidade de obter uma via alternativa à injetável para administração desse fármaco. As membranas desenvolvidas foram caracterizadas pelas técnicas de Tensão Superficial, Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Difração de Raios X (DRX), Microscopia Ótica (MO), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDX), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Biodegradação Enzimática, Avaliação da Viabilidade Celular dos Macrófagos (MTT) e Determinação da Produção de Óxido Nítrico (NO). Com as medidas de tensão superficial, foi possível observar um aumento no caráter hidrofílico da membrana contendo insulina e tripolifosfato em comparação àquelas de quitosana pura. Com a técnica de FTIR foi possível identificar a interação entre a quitosana, a insulina e o tripolifosfato. A técnica de DRX demonstrou alteração no caráter semicristalino da quitosana com a presença da insulina e do tripolifosfato. Elementos químicos presentes na quitosana, na insulina e no tripolifosfato de sódio foram detectados pela técnica de EDX. Foi possível perceber, através das técnicas de MO e MEV, alteração na morfologia da membrana contendo insulina quando comparada a de quitosana pura, com a presença de partículas granulares de tamanhos variados. O ensaio de CLAE mostrou que a insulina foi identificada e separada, sem sofrer alteração estrutural, da membrana de quitosana mesmo quando esta membrana estava reticulada pelo TPP. Os ensaios de biodegradação apontaram que as membranas são biodegradáveis. A biocompatibilidade dos compostos foi confirmada com os ensaios de MTT e NO que revelaram pouca ou nenhuma citotoxicidade. Os resultados apresentados indicaram alterações que sugerem a presença de insulina incorporada na membrana de quitosana. As membranas desenvolvidas apresentam viabilidade para serem utilizadas como biomaterial em sistemas de liberação controlada de insulina.

Palavras-chave: 1. Polissacarídeos. 2. Biomateriais. 3. Diabetes *Mellitus*. 4. Membranas. 5. Sistemas Matriciais.

ABSTRACT

Diabetes *Mellitus* (DM) accounts for a set of metabolic disorders characterized by chronic hyperglycemia resulting from failure of insulin action and/or insulin secretion. Insulinotherapy consists in treating DM through daily subcutaneous applications of insulin to control glycemic levels. Chitosan, studied by Biomedicine, is a biomaterial that can be used in pharmacol-controlled delivery systems whose delivery rate can be controlled by sodium tripolyphosphate (TPP) – an ionic reticulate chitosan used in specific applications. Thus, the primary objective of this work was to develop and estimate chitosan polymeric membranes and reticulated chitosan through TPP to be used in insulin-controlled delivery system, aiming to obtain an alternative route rather than the injectable system to administer this drug. The existing membranes were characterized by Surface Tension techniques, Fourier Transform Infrared-Region Spectroscopy (FTIR), X-ray Diffraction (XRD), Optic Microscopy (OM), Scanning Electron Microscopy (SEM), Energy-dispersive X-ray Spectroscopy (EDX), High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), Enzymatic Biodegradation, Macrophage Cellular Availability Estimate (MCA), and Nitric Oxide Production Determination. The surface tension measurements enabled to detect an increase in the hydrophilic character of the surface membrane containing insulin and tripolyphosphate compared to those of pure chitosan. The FTIR helped to identify interaction between chitosan, insulin and tripolyphosphate. The XRD technique showed a change in chitosan semicrystalline character with insulin and tripolyphosphate. Chemical elements in chitosan, insulin and tripolyphosphate sodium were detected by EDX technique. OM and SEM revealed a change in the membrane morphology with insulin when compared to that of pure chitosan in the presence of granular multiple-sized particles. The HPLC test showed that the insulin was identified and separated without any structural change in chitosan membrane even when this membrane was reticulated by TPP. The biodegradation tests revealed that the membranes are biodegradable. Composite biocompatibility was confirmed by MCA and NO that revealed little or no cytotoxicity. The results presented indicated changes that suggest the presence of insulin incorporated in chitosan membrane. The membranes developed presented availability to be used as biomaterial in insulin-controlled delivery systems.

Keywords: 1. Polysaccharides; 2. Biomaterials; 3. Diabetes *mellitus*; 4. Membranes; 5. Matrix Systems

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Comparação ilustrativa das variações de concentração de fármacos administrados por (a) métodos convencionais de multidosagem e (b) sistemas de liberação controlada. D = dose do fármaco.	27
Figura 2: Classificação dos Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos	29
Figura 3: Matriz Hidrofóbica	30
Figura 4: Matriz Hidrofílica	30
Figura 5: Sistema Osmótico L-Oros®	32
Figura 6: Estrutura química da quitina.	34
Figura 7: Esquema de desacetilação da quitina, originando a quitosana.	35
Figura 8: Molécula de Pró-insulina humana.	42
Figura 9: Interação iônica entre a quitosana e o TPP.	55
Figura 10: Estrutura Química do TPP.	56
Figura 11: Tentativas de Obtenção de Membranas. a) Membrana de Quitosana enrugada. b) Membranas de Quitosana/Insulina. c) Membrana de Quitosana/Insulina dobrada. d) Quitosana/Insulina e TPP	60
Figura 12: Etapas para preparação das membranas	61
Figura 13: Preparação das Membranas no CERTBIO. a) Quitosana em pó e ácido acético b) Solubilização c) Filtração d) Neutralização e) Distribuição em placa de Petri f) Secagem e Armazenagem.	62
Figura 14: Ângulo de contato.	64
Figura 15: Ângulo de contato x Molhabilidade.	64
Figura 16: Goniômetro desenvolvido por técnicos da Unidade Acadêmica de Engenharia Mecânica da UFCG	65
Figura 17: Membranas confeccionadas no CERTBIO (a) Membrana Q (b) Membrana QI e (c) Membrana QIT.	74
Figura 18: Medida do ângulo de contato para os diferentes tipos de membranas....	75
Figura 19: Espectro do FTIR da Membrana de Quitosana.	77
Figura 20: Espectro de FTIR da Insulina	79
Figura 21: Espectro de FTIR do Tripolifosfato de Sódio	80
Figura 22: Espectro FTIR das Membranas Q, QI e QIT.	81

Figura 23: Difratoograma de Raios X da membrana de quitosana.	83
Figura 24: Difratoogramas de Raios X das Membranas Q, QI e QIT.....	84
Figura 25: Microscopia Óptica da Membrana Q x 1750.....	85
Figura 26: Microscopia Óptica da Membrana QI x1750.....	85
Figura 27: Microscopia Óptica da Membrana QIT X1750.	86
Figura 28: MEV da Membrana de Quitosana a) 1000 X, b) 5000X.....	87
Figura 29: EDX e Percentual de Massa da Membrana de Quitosana.....	88
Figura 30: MEV da Membrana QI a) 2000 X, b) 5000X.	89
Figura 31: EDX e Percentual de Massa da Membrana QI.....	90
Figura 32: MEV da Membrana QIT a) 2000 X, b) 5000X.	91
Figura 33: EDX e Percentual de Massa da Membrana QIT.....	92
Figura 34: Cromatograma da Solução Padrão de Insulina	93
Figura 35: Cromatograma da Membrana de Quitosana sem insulina.....	93
Figura 36: Cromatograma das Membranas de Quitosana ,Quitosana com insulina e Quitosana/TPP com insulina.....	94
Figura 37: Microscopia Óptica de Membranas Degradadas 20 X a) Quitosana, b) Quitosana/Insulina e c) Quitosana/Insulina/TPP.....	97
Figura 38: Viabilidade de macrófagos de camundongos Swis na presença das membranas. Q - Quitosana, QI – Quitosana/Insulina, QIT - Quitosana/Insulina/TPP, LPS – controle positivo e CN – controle negativo.....	98
Figura 39: Produção de óxido nítrico por macrófagos de camundongos Swiss na presença das membranas: Q - Quitosana, QI – Quitosana/Insulina, QIT - Quitosana/Insulina/TPP, LPS – controle positivo e CN – controle negativo. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de 6 animais.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tempo de ação das preparações de insulina (humanas) e dos análogos de insulina.....	48
Tabela 2: Atribuições das frequências vibracionais observadas no espectro de FTIR apresentado na Figura 19.....	78
Tabela 3: Grau de desacetilação (GD) da quitosana em ar (25°C) calculado pela técnica de FTIR.....	82
Tabela 4: Perda de massa percentual das membranas de Quitosana (Q), Quitosana/Insulina (QI) e Quitosana/Insulina/TPP (QIT) submetidos a ensaio de biodegradação e seus respectivos desvios padrão.	95
Tabela 5: Análise de Variância – ANOVA Teste de Tukey para as membranas testadas confrontadas com o padrão positivo e negativo	101

LISTA DE SIGLAS

ASTM – *American Society for Testing and Materials*
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CN – Controle Negativo
DRX – Difração de Raios X
EDX – Espectroscopia Dispersiva de Raios X
FTIR – Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier
GD – Grau de Desacetilação
GP – Grau de Polimerização
LCF – Liberação Controlada de Fármacos
MEV – Microscópio Eletrônico de Varredura
MO – Microscópio Óptico
MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
NPH – *Neutral Protamin Hagerdorn*
NO – Óxido Nítrico
OMS – Organização Mundial da Saúde
PBS – *Phosphate Buffered Saline*
pH – Potencial de Hidrogênio Iônico
pI – Ponto Isoelétrico
SBCAL – Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SBF – *Solution Body Fluid*
TPP – Tripolifosfato de Sódio
TS – Tensão Superficial
UFCG – Universidade Federal de Campina Grande
UI – Unidade Internacional
UNESP – Universidade Estadual Paulista Prof. Júlio de Mesquita Filho

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivos Específicos	22
3 REVISÃO DE LITERATURA	24
3.1 Considerações gerais acerca dos biomateriais	24
3.2 Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos	26
3.2.1 Classificação dos Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos	28
3.3 Polímeros na obtenção de sistemas de liberação de fármacos	32
3.3.1 Quitina e Quitosana	34
3.3.1.1 Quitina.....	34
3.3.1.2 Desacetilação – Da quitina à quitosana	34
3.3.1.3 Degradação térmica e enzimática da Quitosana	36
3.3.1.4 Propriedades Físico-Químicas da Quitosana.....	37
3.3.1.5 Propriedades Biológicas da Quitosana	38
3.4 Insulina	41
3.4.1 Características físico-químicas	41
3.4.1.1 Estrutura química.....	41
3.4.1.2 Regulação da síntese e secreção.....	43
3.4.1.3 Carga elétrica.....	43
3.4.1.4 Cristalização	43
3.4.1.5 Solubilidade	44
3.4.1.6 Estabilidade	44
3.4.2 Deficiência de Insulina e Diabetes Mellitus	45
3.4.3 Terapia com Insulina	46
3.4.4 Propriedades Farmacodinâmicas	49
3.4.5 Farmacocinética	49
3.4.6 Reações adversas à insulino terapia	50
3.4.6.1 Hipoglicemia	50
3.4.6.2 Alergia.....	51
3.4.6.3 Resistência à insulina	51
3.4.6.4 Lipodistrofia.....	51

3.4.7 Vias de administração não invasivas alternativas à administração subcutânea de insulina	51
3.4.7.1 Administração por Via Oral	52
3.4.7.2 Administração por Via Nasal.....	52
3.4.7.3 Administração por Via Pulmonar.....	53
3.4.7.4 Administração por Via Sublingual	53
3.4.7.5 Administração por Via Ocular	54
3.4.7.6 Administração por Via Transdérmica	54
3.4.7.7 Administração por Via Retal.....	54
3.5 Tripolifosfato de Sódio (TPP)	55
3.5.1 Características físico-químicas	56
3.5.2 Aplicações do TPP	56
4.1 Materiais	58
4.1.1 Biopolímero	58
4.1.2 Reagentes	58
4.1.3 Animais	59
4.2 Métodos	59
4.2.1 Preparo das membranas de quitosana	61
4.2.1.1 Incorporação da insulina na membrana de quitosana	62
4.2.1.2 Incorporação do Tripolifosfato de Sódio (TPP) na membrana de quitosana	62
4.2.2 Caracterização das membranas obtidas	63
4.2.2.1 Tensão Superficial/Molhabilidade	63
4.2.2.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	65
4.2.2.3 Difração de Raios X (DRX)	66
4.2.2.4 Microscopia Óptica (MO)	67
4.2.2.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	67
4.2.2.6 Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDX)	68
4.2.2.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	68
4.2.2.8 Ensaio de Biodegradação Enzimática	69
4.2.2.9 Avaliação da Viabilidade Celular dos Macrófagos	70
4.2.2.10 Determinação da Produção de Óxido Nítrico.....	71
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
5.1 Tensão Superficial/Molhabilidade	75

5.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	76
5.2.1 Cálculo do grau de desacetilação (GD) da quitosana.....	82
5.3 Espectroscopia por Difração de Raios X	83
5.4 Microscopia Óptica	84
5.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDX).....	86
5.6 Avaliação do Ensaio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .	92
5.7 Biodegradação Enzimática	95
5.8 Avaliação da Viabilidade Celular dos Macrófagos.....	97
5.9 Determinação da Produção de Óxido Nítrico	99
6 CONCLUSÃO	103
REFERÊNCIAS	105



INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O termo biomaterial foi definido na Conferência do Instituto Nacional de Desenvolvimento de Consenso em Saúde, em 1982, como sendo “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). Essa definição está em constante evolução, agrupando as funções e os conceitos que os novos campos do saber propõem (LIMA, 2010).

Dentre os pré-requisitos, os biomateriais não devem produzir respostas biológicas adversas, nem ser tóxicos, carcinogênicos, antigênicos, mutagênicos ou trombogênicos (HELMUS; GIBBONS; CEBON, 2008).

O desenvolvimento de biomateriais mostra-se fundamentalmente importante, uma vez que, a partir deles espera-se uma melhoria na qualidade de vida das pessoas, representada por um aumento na longevidade, na saúde em geral e no bem estar da população (SILVA JÚNIOR; ORÉFICE, 2001).

Particularmente no Brasil, apesar da necessidade de melhoria da saúde geral dos brasileiros, grande parte dos biomateriais usados são importados e acabam por gerar gastos elevados por parte da previdência social. Desta forma, observa-se uma maior necessidade de desenvolvimento científico e tecnológico no país, nessa área, como meio de atender às necessidades sociais de melhoria da saúde da população e de redução dos custos dos materiais envolvidos (ORÉFICE, 2008).

Neste contexto, indivíduos acometidos por doenças incuráveis ou crônicas e que estão fadados a um tratamento contínuo, por toda a vida, podem ser bastante beneficiados pelo uso de biomateriais em seus tratamentos. Este é o caso daqueles que sofrem de Diabetes *Mellitus* e que necessitam da administração de insulina exógena, especialmente, os Diabetes *Mellitus* (Tipo 1) insulino-dependentes, muito embora a insulina também possa ser necessária aos Diabetes *Mellitus* (Tipo 2) não insulino-dependentes (SANTOS, 2010).

O Diabetes *Mellitus* configura-se como uma epidemia mundial, representando um grande desafio para os sistemas de saúde de todo o mundo. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) o número de portadores da doença em todo o mundo era de 177 milhões em 2000, com expectativa de alcançar 350 milhões de

peças em 2025 (BRASIL, 2006). O Brasil ocupava, em 2007, a sétima posição no ranking de países com maior número de diabéticos, com 6,9 milhões de casos registrados e em 2025, a previsão é de que esse país passe a ocupar a quarta posição, com 17,6 milhões de pessoas com diabetes e com alta incidência entre crianças (RIBEIRO; FREUDENRICH, 2007; BRASIL, 2008).

A maioria dos tratamentos a base de insulina envolvem a múltipla administração de injeções subcutâneas diárias, o que promove um desconforto no paciente especialmente quando se trata de crianças (KHAFAGY, et.al, 2007). Dessa forma, busca-se, com este trabalho, encontrar uma alternativa de administração da insulina de forma menos traumática. Assim, torna-se necessário o desenvolvimento de um sistema de liberação que possa realizar essa função.

Devido às suas diversas aplicações e funcionalidades, especialmente em terapias de liberação controlada do fármaco, os polímeros estão entre os excipientes mais utilizados para a obtenção de formas farmacêuticas. Modificando as propriedades do polímero, um sistema de matriz pode ser elaborado para uma liberação sustentada ou controlada do fármaco. Materiais poliméricos farmacêuticos com pequena ou nenhuma toxicidade podem ser utilizados como matrizes, nas quais o ingrediente ativo é disperso ou dissolvido (RIOS, 2005).

Dentre os biopolímeros destaca-se a quitosana que, por ser abundante e atóxica, tem sido utilizada para diversos fins. As suas indicações incluem, entre outras, meio complexante de íons metálicos e como elemento básico para a confecção de matrizes de liberação controlada de drogas. Já há algum tempo membranas finas de quitosana têm sido submetidas a avaliações, sobretudo em decorrência de suas características físico-químicas, que resultam em propriedades como fácil formação de géis, capacidade filmogênica e boas propriedades mecânicas (ASSIS; SILVA, 2003).

Modificações químicas da quitosana através de reações de reticulações podem produzir materiais com uma grande variedade de propriedades físicas, mecânicas e biológicas. O Tripolifosfato de Sódio (TPP), um ânion de baixa massa molar, vem sendo utilizado no processo de reticulação iônica da quitosana com o objetivo de otimizar o uso desse polímero para aplicações específicas como, por exemplo, em sistemas de liberação controlada de fármacos (CALVO et.al, 1997).

Nesta pesquisa, a quitosana foi utilizada como matriz polimérica na qual foi dispersada a insulina, formando um composto em que a insulina deverá ser liberada

de forma desejável e controlada. O composto assim formado poderá ser utilizado no tratamento de indivíduos com Diabetes *Mellitus*.



OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e avaliar membranas poliméricas de quitosana e quitosana reticulada pelo Tripolifosfato de Sódio (TPP) para uso em sistema de liberação controlada de insulina.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a incorporação da insulina na membrana de quitosana com e sem a presença do Tripolifosfato de Sódio.
- Analisar, comparativamente, a molhabilidade das membranas de quitosana e das desenvolvidas com quitosana/insulina e quitosana/insulina/tripolifosfato.
- Verificar a estabilidade das membranas em condições de biodegradação.
- Verificar o efeito das membranas sobre a viabilidade celular e a capacidade de ativação dos macrófagos (Citotoxicidade).
- Estabelecer perspectivas de liberação controlada da insulina, a partir das membranas desenvolvidas.



REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Considerações gerais acerca dos biomateriais

À medida em que os seres vivos envelhecem ocorrem, em seus corpos, perdas funcionais progressivas. Embora muitos fatores responsáveis pelo envelhecimento não sejam compreendidos, as consequências são bastante claras. As articulações entram em processo degenerativo, os ossos tornam-se frágeis e quebradiços, as capacidades auditiva e visual diminuem, o coração perde o controle do seu ritmo de bombeamento e suas válvulas perdem a capacidade de vedação. E como se não bastassem os processos naturais, o ser humano alcançou uma enorme capacidade para mutilar, esmagar, quebrar e desfigurar seu próprio corpo, seja através do uso de veículos motores, armas e ferramentas ou como resultado de práticas desportivas excessivas (SILVA JÚNIOR; ORÉFICE, 2001).

Uma consequência dessas causas naturais e antinaturais de deterioração do corpo humano é que cerca de 2 a 3 milhões de partes artificiais são implantadas em indivíduos nos Estados Unidos a cada ano. Para atender a essa demanda o campo de biomateriais se desenvolveu historicamente de forma a se obter uma combinação satisfatória de propriedades físicas próximas àquelas do tecido substituído com uma resposta tóxica mínima para o hospedeiro (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2006).

O termo biomaterial compreende qualquer substância ou combinação de substâncias de origem natural ou sintética, idealizada para ser implantada no corpo por qualquer período de tempo, com a finalidade de substituir matéria viva que deixou de ter sua função, podendo ou não servir como veículo, matriz, suporte ou estimulador para o crescimento de novo tecido (WILLIAM, 2008).

A utilização de biomateriais para o reparo de tecidos vivos tem aumentado consideravelmente graças ao desenvolvimento de novos materiais e a uma melhor compreensão dos mecanismos de sua interação com os organismos vivos. De forma que se pretende produzir materiais que sejam biocompatíveis, funcionais e duráveis, ao interagirem com o organismo (PARK, 1984).

Os biomateriais podem ser classificados, quanto ao tipo de material, em sintéticos (cerâmicos, metais, polímeros sintéticos), naturais (colágeno, queratina, polissacarídeos) e compósitos (compostos por mais de um tipo de material). Suas aplicações ocorrem nos mais diversos campos da medicina, como por exemplo:

próteses em ortopedia ou cirurgias cardiovasculares, órgãos artificiais, materiais para reparação de tecidos e sistemas de liberação de fármacos (SILVER; DOILLON, 1989).

Silver e Doillon (1989) destacam que para se utilizar materiais em organismos vivos, estes devem ter as seguintes características fundamentais: biocompatibilidade, estabilidade química, estabilidade mecânica adequada, peso, densidade e forma adequados, ser relativamente barato, reproduzível e de fácil fabricação e ser biofuncional, ou seja, desempenhar a função para a qual foi projetado com o máximo de eficiência.

Para Kmann (1990), dentre essas características, a biocompatibilidade é a mais importante, pois a biofuncionalidade do material só poderá se manifestar caso haja biocompatibilidade. Quando um material estranho entra em contato com os fluidos biológicos, respostas de proteção são desencadeadas e se manifestam como processos inflamatórios ou imunológicos, visando à eliminação do corpo estranho. Assim, o bom desempenho de um biomaterial pós-implante, está associado a um equilíbrio entre biocompatibilidade e biofuncionalidade.

A biocompatibilidade não é apenas a ausência de rejeição, mas envolve também a interação entre o implante e o tecido adjacente. Pode-se distinguir, portanto, termos como bioinércia, quando ocorre a formação de uma cápsula fibrosa não aderente ao redor do implante e bioatividade, quando o material interage com os tecidos adjacentes de forma semelhante à parte natural que eles substituem (HENCH; DOILLON, 1993).

Dependendo da aplicação do biomaterial, a biodegradabilidade é também uma característica importante, como por exemplo, em suporte de crescimento de tecidos e em sistemas de liberação de fármacos, nos quais, as matrizes implantadas não são retiradas após o término de sua função e sim degradadas pelo organismo (SZYCHER, 1983; SHIGEMASA; MINAMI, 1995).

As possibilidades de manipulação da estrutura e propriedades dos biomateriais e das suas interações com os sistemas vivos oferecem grandes oportunidades de concretização, com sucesso, de várias metas associadas ao tratamento de patologias sistêmicas (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2006).

3.2 Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos

A pesquisa de fármacos tem atravessado diversas fases, iniciando-se com a busca de plantas medicinais no início das civilizações humanas, evoluindo à fase da química sintética na metade do século XX e, finalmente, à era biotecnológica no início do século XXI. Assim, o final do século passado e o início deste têm sido marcados por grandes avanços tecnológicos, incluindo o acentuado desenvolvimento de novas formas de liberação de fármacos. Por estar envolvida com pesquisa multidisciplinar, a tecnologia de liberação controlada de fármacos representa uma das áreas promissoras da ciência, contribuindo de maneira inovadora para o tratamento da saúde do homem (ALLEN JR; POPOVICH; ANSEL, 2007).

O desenvolvimento e o uso terapêutico de um novo medicamento abrangem mais do que simplesmente a descoberta de um composto com atividade farmacológica intrínseca. De igual importância é o caminho que as moléculas do fármaco seguirão do seu sítio de administração até o seu sítio de ação; o fármaco deve de alguma forma, estar no local certo e no momento oportuno para ser liberado. Uma vez que tenha sido identificada uma via de administração apropriada, local ou sistêmica, os cientistas devem desenvolver uma forma farmacêutica que facilite o transporte do fármaco para seu sítio de ação e que o torne disponível na concentração eficaz, em um tempo apropriado, para uma duração de ação adequada. O desenvolvimento de um sistema de liberação apropriado costuma ser tão complexo quanto a obtenção de um novo agente terapêutico (PANDIT, 2008).

Baker (1987) definiu como sistemas de liberação controlada aqueles nos quais o agente ativo é liberado independentemente de fatores externos e com uma cinética bem estabelecida.

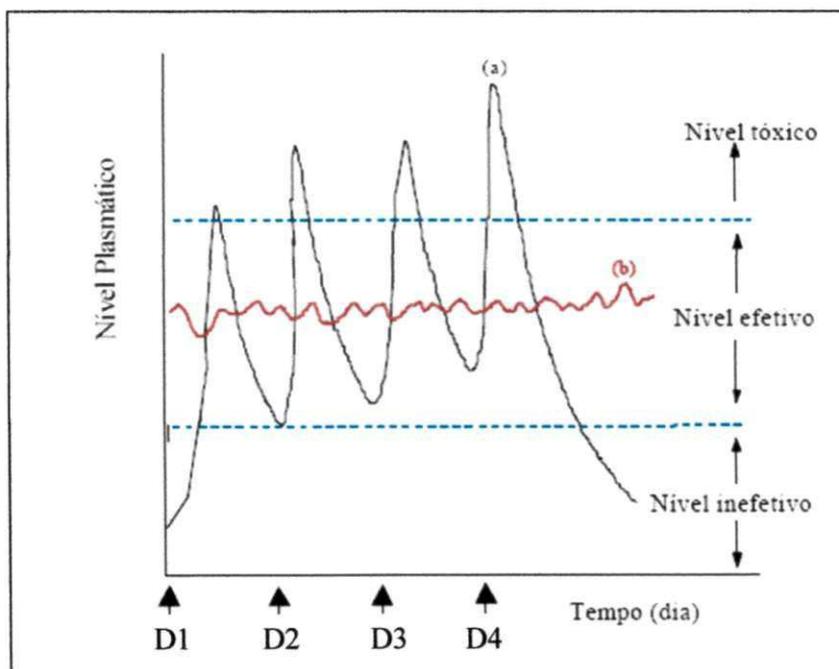
Essa tecnologia proporciona algumas vantagens em relação aos sistemas convencionais de liberação de fármacos como melhora da eficácia, diminuição da toxicidade, liberação do fármaco no local específico de ação (direcionamento de fármacos), mascaramento do sabor/odor desagradável de alguns fármacos, diminuição do número de doses diárias, tratamento contínuo (sem administrações noturnas), proteção do fármaco de uma eventual degradação pelos componentes dos fluidos biológicos, diminuição ou mesmo desaparecimento dos picos plasmáticos, diminuição ou eliminação dos efeitos locais e sistêmicos além de

otimização da administração de produtos oriundos da biotecnologia, tais como vacinas, peptídeos e proteínas, entre outras (AZEVEDO, 2002).

Allen Jr, Popovich e Ansel (2007) destacam como motivo especial para a indústria desenvolver medicamentos de liberação controlada a geração de novas patentes de produtos contendo fármacos convencionais com o uso dessa tecnologia. Desse modo, a indústria farmacêutica tem investido fortemente neste setor tecnológico, devido ao alto retorno financeiro que ele proporciona mesmo a longo prazo.

Comparando-se, na Figura 1, o método convencional de multidosagem e o sistema de liberação controlada percebe-se que o primeiro está longe do ideal, proporcionando variações consideráveis na concentração do fármaco no plasma sanguíneo, podendo não haver efeito farmacológico ou ocasionar intoxicação, pois há uma faixa de concentração efetiva para a ação no organismo. Já o método de liberação controlada proporciona uma pequena variação na concentração do fármaco com o tempo, impossibilitando inefetividade ou toxicidade (VULCANI, 2004).

Figura 1: Comparação ilustrativa das variações de concentração de fármacos administrados por (a) métodos convencionais de multidosagem e (b) sistemas de liberação controlada. D = dose do fármaco.



Fonte: Adaptado de VULCANI (2004)

A manutenção de concentrações plasmáticas do fármaco em níveis terapêuticos, através de cinéticas de liberação próximas da ordem zero, o que resulta na diminuição da frequência de administração de doses, contribui para a melhoria na eficácia, diminuição dos efeitos colaterais e maior colaboração do paciente ao tratamento. Além disso, essa tecnologia pode prevenir inúmeros inconvenientes relacionados ao fármaco, através da melhoria da sua estabilidade com diminuição da velocidade de degradação (VULCANI, 2004).

A tecnologia relacionada aos medicamentos de liberação controlada é tão complexa, que vem originando, às vezes, uma terminologia ambígua e controversa. Assim, há uma variedade de termos designados para denominar a liberação de tais medicamentos, tais como liberação modificada, sustentada, retardada, programada, controlada, entre outros. A terminologia mais aceita é a que designa o termo geral como liberação controlada, pois denota que o sistema está apto a prover um real controle terapêutico, seja de maneira temporal, controlando o tempo de liberação, ou espacial, através da vetorização para locais específicos de ação (AZEVEDO, 2002).

3.2.1 Classificação dos Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos

Em geral, a Liberação Controlada de Fármaco (LCF) utiliza como métodos de liberação a difusão, a dissolução e a osmose, nos quais quase sempre é possível utilizar o sistema de reservatório e o sistema matricial (LIMA, 2010). A Figura 2 apresenta os principais itens de classificação da Liberação Controlada de Fármacos.

Nos sistemas de difusão a taxa de liberação da droga é determinada pela sua difusão através de um polímero insolúvel em água. Destaca-se, nestes sistemas, dois tipos de dispositivos: os reservatórios nos quais um núcleo de droga é cercado por uma membrana polimérica e os dispositivos de matriz onde a droga dissolvida ou dispersa é distribuída uniformemente em uma matriz polimérica inerte (LEE; ROBINSON, 2004).

Figura 2: Classificação dos Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos



Fonte: Adaptado de LIMA (2010).

Nos dispositivos de reservatório a liberação da droga é regida pela primeira lei de difusão de Fick representada pela seguinte equação:

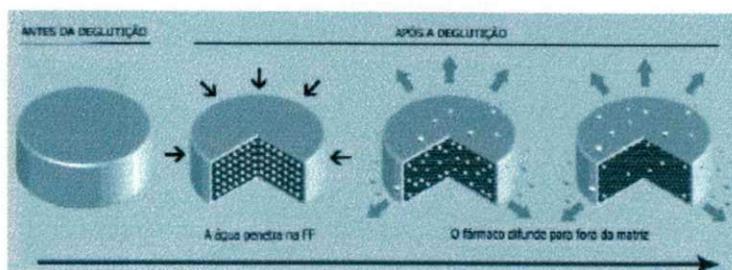
$$J = -DdC_m/dx \quad (1)$$

Onde J é o fluxo da droga através da membrana, na direção da concentração decrescente (quantidade/área-tempo); D é o coeficiente de difusão da droga na membrana (área/tempo); e dC_m/dx é a variação da concentração da droga com a distância x (LEE; ROBINSON, 2004).

Sistemas matriciais são dispersões ou soluções de um fármaco em uma ou mais substâncias capazes de modular a sua liberação, geralmente polímeros de natureza hidrofílica ou inerte. Essas matrizes podem ser sintetizadas sob as formas de comprimidos, como ilustrado nas Figuras 3 e 4, cápsulas gelatinosas, grânulos, pellets ou minicomprimidos. Nos sistemas matriciais, a liberação do fármaco pode envolver processos de intumescimento do polímero, difusão do fármaco e erosão da matriz. Em alguns casos, o fármaco pode estar ligado quimicamente à cadeia

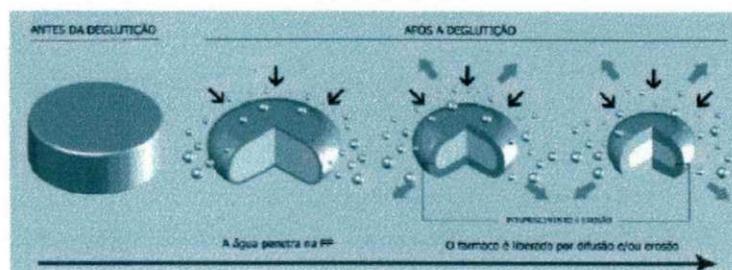
polimérica e ser liberado pela quebra hidrolítica ou enzimática dessa ligação. Um ou mais desses processos podem regular a liberação em uma mesma forma farmacêutica, dependendo do tipo de polímero empregado e das propriedades físico-químicas do fármaco (PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007).

Figura 3: Matriz Hidrofóbica



Fonte: PEZZINI; SILVA; FERRAZ (2007).

Figura 4: Matriz Hidrofílica



Fonte: PEZZINI; SILVA; FERRAZ (2007).

Na matriz hidrofóbica também conhecida como insolúvel, (Figura 3), após a administração, a água presente nos fluidos do trato gastrointestinal penetra na forma farmacêutica e dissolve o fármaco. Como consequência são formados canais na estrutura da matriz, através dos quais o fármaco é gradualmente liberado por difusão. Em contrapartida, na matriz hidrofílica (Figura 4) a água presente no trato gastrointestinal penetra na superfície da forma farmacêutica, hidrata o polímero, que intumescce e forma uma camada gelificada. O fármaco contido nessa camada dissolve e difunde a partir da matriz ou é liberado quando ela sofre erosão. Quando a camada gelificada erode, expõe a superfície da forma farmacêutica novamente e o processo se repete (PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007).

Nos sistemas de dissolução o processo é controlado por camadas de difusão em que a taxa de difusão da superfície sólida para a solução bruta através de um

filme líquido não-agitado é a etapa de determinação da taxa. Nesse caso, o processo de dissolução em estado constante é descrito, segundo Lee; Robinson (2004) pela equação (2) de Noyes-Whitney representada abaixo:

$$dC/dt = k_D A(C_s - C) = (D/h)A(C_s - C) \quad (2)$$

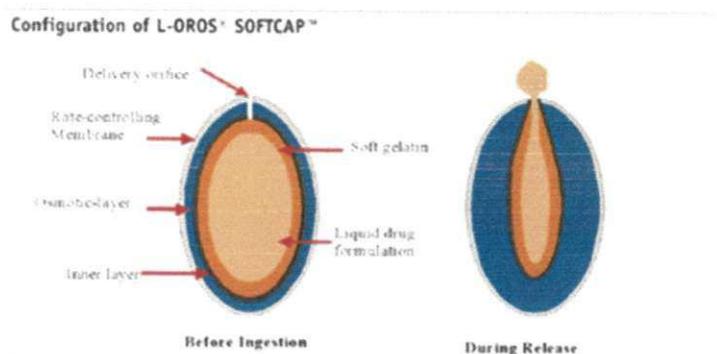
Onde dC/dt é a taxa de dissolução, k_D é a constante da taxa de dissolução, A é a área da superfície total, C_s é a solubilidade de saturação do sólido e C é a concentração do soluto na solução bruta. A constante da taxa de dissolução, k_D , é igual ao coeficiente de difusão, D , dividido pela espessura da camada de difusão, h .

No processo de dissolução a maioria dos produtos se encontra em dois tipos de formulação: a encapsulada e a matricial. Os sistemas encapsulados podem ser preparados por revestimento de partículas ou grânulos da droga com espessuras variáveis de polímeros. Por outro lado os dispositivos de dissolução matricial são preparados comprimindo-se a droga com um carreador polimérico lentamente solúvel em forma de comprimido (LEE; ROBINSON, 2004).

Nos Sistemas Osmóticos, a pressão osmótica pode ser empregada como força propulsora para gerar uma liberação constante do fármaco. Um reservatório de fármaco, na forma de solução ou no estado sólido, contido num recipiente semipermeável constitui a base desses sistemas terapêuticos conhecidos como bombas osmóticas (LEE; ROBINSON, 2004).

Um exemplo é o sistema L-Oros[®] (Figura 5), que contém uma camada líquida de fármaco e um agente osmótico ou camada propulsora rodeada por uma membrana polimérica semipermeável, insolúvel em água, perfurada com um orifício. No trato gastrointestinal, a água passa através da membrana semipermeável, expandindo o agente osmótico. Este, por sua vez, pressiona a camada de fármaco, liberando-o no trato gastrointestinal através do orifício de liberação (SINKO, 2008; DONG et al, 2002).

Figura 5: Sistema Osmótico L-Oros®



Fonte: DONG et.al (2002).

Os sistemas de liberação controlada de fármacos utilizando polímeros tem sido uma alternativa eficiente na administração de fármacos, pois esses sistemas combinam um material polimérico, que pode ser chamado de carreador, ao fármaco que se deseja administrar (RODRIGUES, 2006). Esses sistemas serão melhor discutidos nos tópicos que se seguem.

3.3 Polímeros na obtenção de sistemas de liberação de fármacos

Polímeros são sintetizados por um processo denominado polimerização e são formados pela repetição de uma unidade chamada mero. O número de vezes que o mero se repete nas moléculas do polímero é denominado de grau de polimerização. Como as moléculas do polímero não tem o mesmo tamanho considera-se um grau de polimerização médio o qual é dado pela razão entre a massa molar média do polímero e a massa molar do mero (STEVES, 1999).

O grau de polimerização dos polímeros é bastante variável podendo ir da ordem de algumas unidades (oligômeros) até milhares e milhões de unidades de repetição. As propriedades dos polímeros são fortemente influenciadas pelo seu grau de polimerização e este é um dos fatores que influencia a sua aplicabilidade. Dessa forma, os polímeros são materiais muito versáteis podendo ser empregados nos mais diversos setores para aplicações simples e até para as mais complexas podendo-se destacar a aplicação como biomaterial em sistemas de liberação controlada de fármacos (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001).

Polímeros podem ser empregados como excipientes em preparações convencionais de medicamentos e cosméticos. Denomina-se excipiente, qualquer substância, diferente do fármaco, que tem sua segurança avaliada e, a partir de então, pode ser incluído na forma farmacêutica, com intenções variadas, tais como, auxiliar na preparação; fornecer estabilidade física, química e microbiológica ao produto; melhorar a disponibilidade do ativo no organismo; garantir a aceitabilidade do paciente e melhorar ou promover qualquer outro atributo relacionado à segurança e efetividade (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010).

Os biopolímeros estão entre os excipientes mais utilizados na indústria farmacêutica dada a sua versatilidade quanto a aplicações e funcionalidades. Vários biopolímeros vêm sendo estudados e utilizados nos sistemas de liberação controlada de fármacos, com o intuito de liberá-los efetivamente no alvo pretendido e, dessa maneira, aumentar os benefícios terapêuticos do tratamento (OLIVEIRA; LIMA, 2006).

O recobrimento de formas farmacêuticas com filmes poliméricos constitui tipos especiais de sistemas de liberação controlada, os chamados sistemas reservatórios. Na maioria das vezes, a liberação controlada do fármaco, a partir da forma farmacêutica revestida com filme, ocorre em consequência da dissolução do filme pelos fluidos do trato gastrointestinal ou pela penetração destes fluidos através do filme, com consequente difusão do fármaco neles dissolvido (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010). Esta liberação pode ser controlada por fatores físico-químicos do organismo como pH, temperatura e força iônica e pode ser constante ou cíclica por um longo período de tempo (RODRIGUES, 2006).

Polissacarídeos e seus derivados representam um grupo de polímeros naturais largamente utilizados em formas farmacêuticas, sendo preferidos, em detrimento de polímeros sintéticos, devido à baixa toxicidade, baixo custo e disponibilidade. Aliado a isto, a biodegradabilidade, características filmogênicas e facilidade de derivatização têm constituído um elemento de elevado interesse e destaque nas investigações voltadas à sua inclusão no grupo de excipientes farmacêuticos (LAMIM, 2006).

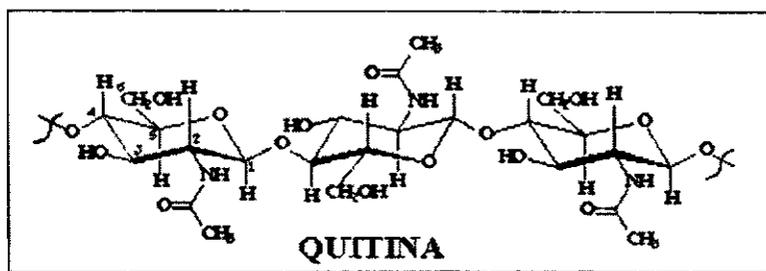
Ainda, de acordo com Lamim (2006), entre os polímeros de origem orgânica mais aplicados como excipientes no controle de liberação de fármacos pode-se citar a quitina e a quitosana.

3.3.1 Quitina e Quitosana

3.3.1.1 Quitina

A quitina é um polímero constituído por uma seqüência linear de açúcares monoméricos β -(1-4) 2-acetamido-2-desoxi-D-glicose (N-acetilglicosamina) possuindo, assim, estrutura semelhante à das fibras de celulose (Figura 6). A diferença estrutural entre estas duas fibras se deve aos grupos hidroxila, localizados na posição dois, que na quitina foram substituídos por grupos acetamino, sendo a mais abundante fibra de ocorrência natural depois da celulose (GIL; FERREIRA, 2006).

Figura 6: Estrutura química da quitina.



Fonte: CAMPANA FILHO et. al (2007).

Esse polímero natural possui uma estrutura cristalina, sendo, dessa forma insolúvel em meio aquoso e na maioria dos solventes orgânicos e tem baixa reatividade química (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009).

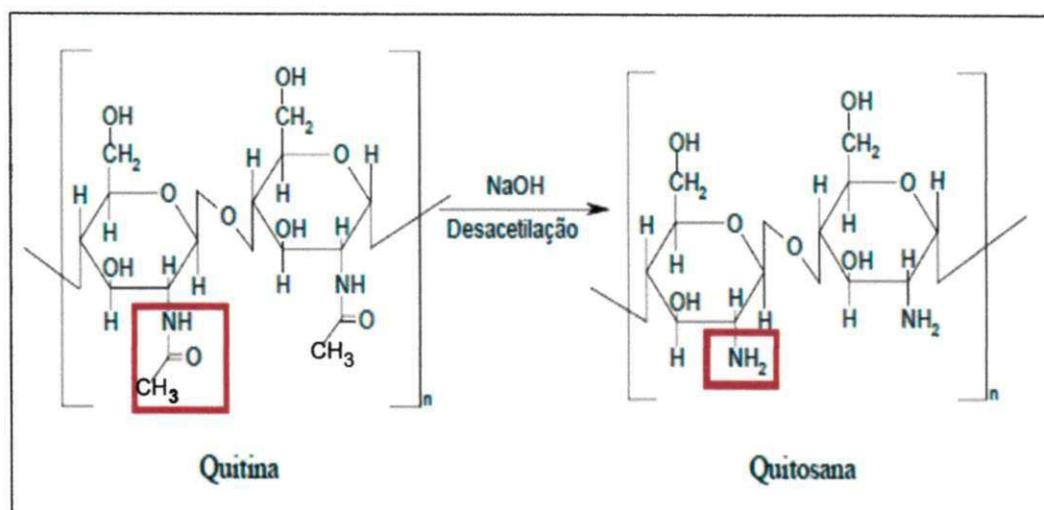
A quitina é encontrada em abundância na natureza e tem como principais fontes naturais as carapaças de crustáceos (notadamente caranguejo, camarão e lagosta), sendo também encontrada em insetos, moluscos e na parede celular de fungos (DALLAN, 2005).

3.3.1.2 Desacetilação – Da quitina à quitosana

A desacetilação da quitina leva à obtenção de quitosana, seu mais importante derivado, cuja estrutura primária é idêntica à da quitina a não ser pelo fato de que na quitosana predominam as unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose (Figura 7). A completa desacetilação da quitina raramente é realizada, pois são necessárias

muitas reações consecutivas, que também favorecem a sua progressiva despolimerização. O termo quitosana abrange o conjunto de copolímeros que contém ao menos 50-60% de unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose. O grau médio de acetilação (GA) define a porcentagem de unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose presentes, em média, nas cadeias do polímero (CAMPANA FILHO et. al, 2007).

Figura 7: Esquema de desacetilação da quitina, originando a quitosana.



Fonte: Adaptado de STAMFORD (2006).

A desacetilação da quitina pode ser realizada por processos químicos ou enzimáticos, porém esses últimos não são empregados em escala industrial, devido aos custos elevados de extração das desacetilases bem como de sua baixa produtividade. Nos processos químicos da desacetilação geralmente a quitina é suspensa em soluções aquosas concentradas de NaOH ou KOH (40 – 60%) por tempo variável (0,5 – 24h) e a temperaturas relativamente elevadas (50 – 130°C). As características da quitosana obtida são determinadas pela concentração da solução alcalina e razão quitina/solução alcalina, tamanho das partículas de quitina, temperatura, tempo e atmosfera de reação (CAMPANA FILHO et. al, 2007).

A quitosana possui semelhança, na sua estrutura química, com a celulose, porém, exibe propriedades diferenciadas devido à presença dos grupos amínicos. Pode ser encontrada naturalmente na parede dos fungos, especialmente nas espécies do gênero *Mucor*, porém a maior fonte disponível de quitosana é a síntese a partir da desacetilação da quitina (DAMIAN et. al, 2005).

Segundo Lourenço (2006), a quitosana apresenta propriedades interessantes para a utilização na área farmacêutica, pois, comparada a muitos outros polímeros naturais, ela tem a vantagem de possuir carga positiva, o que confere à mesma, propriedade de mucoadesividade.

3.3.1.3 *Degradação térmica e enzimática da Quitosana*

Quando polímeros são aquecidos a temperaturas mais elevadas, várias mudanças físico-químicas podem ocorrer como a formação de gases, líquidos e mudanças de coloração. A degradação térmica é uma reação que envolve a ruptura das ligações das cadeias principais e secundárias. A habilidade do polímero em resistir à decomposição química causada pelo aquecimento a altas temperaturas é chamada de estabilidade térmica. Um dos fatores determinantes da estabilidade térmica do polímero é a energia das ligações da cadeia principal (DAMIAN et. al, 2005).

A ligação C-C é uma das mais resistentes à degradação térmica. A presença de átomos de hidrogênio na molécula do polímero diminui a energia entre a ligação C-C, motivo pelo qual os hidrocarbonetos com elevada massa molecular e seus derivados possuem comparativamente baixa estabilidade sendo facilmente degradados com o aquecimento a temperaturas mais elevadas. A quitosana, quando aquecida a temperaturas mais elevadas sofre degradação. Os termogramas da quitosana, realizados por calorimetria de análise térmica diferencial e termogravimétrica mostraram um efeito endotérmico a 60°C, seguido por resistentes efeitos exotérmicos entre 280 e 480°C (LIM; WAN, 1995).

A enzima responsável pela degradação da quitosana, a lisozima, está presente em tecidos, órgãos e fluidos corporais de mamíferos e os produtos da degradação enzimática da quitosana são oligômeros de n-acetil-D-glicosamina, que, além de apresentarem propriedades cicatrizantes e antimicrobianas, são totalmente absorvidos pelo organismo (DALLAN, 2005). Dessa forma, a quitosana tem atraído a atenção como uma matriz para liberação controlada de fármacos devido a sua decomposição por enzimas e por apresentar produtos de degradação não tóxicos (DAMIAN et.al, 2005).

3.3.1.4 Propriedades Físico-Químicas da Quitosana

Por tratar-se de um polímero catiônico, em condições de pH neutro e alcalino, apresenta grupamentos amino livres sendo, desta forma, insolúvel em água, em solventes orgânicos e em bases, mas é solúvel na maioria das soluções de ácidos orgânicos com pH inferior a 6, pois em pH ácido os grupamentos amino podem ser protonados (NH_3^+), tornando o polissacarídeo solúvel (DALLAN, 2005). Dessa forma, a quitosana pode formar complexos eletrostáticos com espécies carregadas negativamente incluindo proteínas, polímeros, fármacos e outros ânions de baixa massa molar (ZHANG et.al, 2002).

O ácido acético e o fórmico são os mais usados para a solubilização da quitosana. Alguns ácidos inorgânicos diluídos, tais como: ácido nítrico, clorídrico, perclórico e fosfórico, também podem ser usados para preparar uma dispersão da quitosana, mas somente após prolongada agitação e aquecimento. Misturas como dimetilformamida com tetróxido de dinitrogênio numa proporção de 3:1 também podem ser utilizados como solventes (DAMIAN et.al, 2005).

De acordo com Silva, Santos e Ferreira (2006), Laranjeira, Fávere (2009), Lima (2010) e Barbosa (2011) usualmente soluções aquosas de ácido acético entre 1 e 3% são utilizadas para solubilizar a quitosana.

A estrutura D-glicosamina do polissacarídeo quitosana é rígida e hidrofílica. Apresenta muitos grupos reativos para ativação química e reticulação e é capaz de formar sais com ácidos orgânicos e inorgânicos. Apresenta propriedades quelantes e condutividade iônica (ARANAZ et al, 2009). Agentes reticulantes, tais como glutaraldeído, etilenoglicol diglicidil éter, tripolifosfato, ácido sulfúrico e epicloridrina, são usados para aumentar a estabilidade química e a resistência mecânica da quitosana (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009)

A quitosana apresenta grupos funcionais potencialmente reativos como grupamentos amina ($-\text{NH}_2$), vários grupos hidroxilas primários e secundários nas posições C-2, C-3 e C-6 que, por sua vez, apresentam forte afinidade com a água. Modificações feitas nestes grupamentos produzem diferentes materiais que podem ser utilizados em diversas aplicações (SANTOS, 2004).

O biopolímero quitosana apresenta uma carga positiva por resíduo glicosamina, dessa forma interage com moléculas de carga negativas e tem

propriedade de adsorção. Apresenta habilidade formadora de filme; pode ser usado como material para isolamento de biomoléculas (CRINI; BADOT, 2007).

De acordo com Wong (2009) quando a quitosana apresenta menos do que 150 KDa ela é considerada de baixa massa molar, entre 150 e 700 de média massa molar e acima de 700 KDa de alta massa molar.

A quitosana exibe diversas propriedades físico-químicas e biológicas interessantes, como biodegradabilidade, biocompatibilidade e bioatividade, e tem várias aplicações em diferentes campos como, por exemplo, tratamento de água não potável, agricultura, cosméticos, processamento de alimentos e aplicações biomédicas (DALLAN, 2006). Dentre estas destacar-se-ão, nesta pesquisa, as propriedades biológicas da quitosana.

3.3.1.5 Propriedades Biológicas da Quitosana

Dentre as propriedades biológicas da quitosana destacam-se: a atividade antimicrobiana, redução do tempo de coagulação, o efeito analgésico, a aceleração da cicatrização, o tratamento da osteoartrite e o efeito hipocolesterolêmico e hipolipidêmico.

a) Atividade antimicrobiana

Segundo Goy, Brito e Assis (2009) a atividade antimicrobiana da quitosana pode ser explicada por três mecanismos: 1) A interação superficial iônica entre a quitosana e o microorganismo resulta em vazamento de eletrólitos e outros constituintes protéicos de baixa massa molar pela parede celular; 2) A penetração da quitosana dentro do núcleo dos microorganismos inibe a síntese de RNA e proteínas e 3) A formação de uma barreira externa provoca a diminuição de nutrientes essenciais para o crescimento microbiano.

A massa molar e o grau de acetilação são importantes fatores na determinação da atividade antimicrobiana da quitosana. Quanto mais baixa a massa molar e menor o grau de acetilação mais eficiente será essa atividade na redução do crescimento e multiplicação do microorganismo (DAMIAN et. al, 2005).

b) Efeito coagulante

A quitosana reduz o tempo de coagulação sanguínea de forma dose-dependente devido a sua capacidade em agregar plaquetas e eritrócitos (SILVA; SANTOS FERREIRA, 2006).

c) Efeito analgésico

É atribuída à quitosana uma potente ação analgésica tópica. 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 de inflamação, que tem importante papel no mecanismo da dor. Estudos tem mostrado que, quando aplicada topicamente, em feridas abertas, a quitosana forneceu uma sensação refrescante, agradável e calmante (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009).

d) Aceleração da cicatrização

A propriedade imunomoduladora da quitosana é devida à sua capacidade de ativar quase que exclusivamente os macrófagos e explica não somente seu papel na aceleração da cicatrização de lesões, mas também a biodegradabilidade desse polímero no organismo. Os macrófagos ativados pelos oligômeros da quitosana, 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 *N*-acetilglicosamina e glicosamina, unidades de açúcares necessárias biossíntese do ácido hialurônico e outros componentes da matriz extracelular pelos fibroblastos. Promovem a migração de neutrófilos, induzindo a resposta inflamatória (SILVA; SANTOS FERREIRA, 2006).

Além disso, feridas tratadas com quitosana mostraram menor grau de fibrose, favorecendo a reepitelização com formação de cicatriz lisa. A sua despolimerização pela lisozima também pode ser aproveitada no desenvolvimento de sistemas bioerosíveis para a liberação de fármacos (GOY; BRITO; ASSIS, 2009).

e) Tratamento de osteoartrite

A unidade monomérica principal da quitosana é a D-glicosamina a qual pode ser obtida industrialmente a partir da hidrólise ácida da quitina. Sulfato de glicosamina tem sido usado no tratamento de doenças reumáticas, incluindo a osteoartrite. A glicosamina tem sido reportada como o principal remédio no combate à artrite (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009).

f) Efeito hipocolesterolêmico e hipolipidêmico

O uso da quitosana, por via oral, promove a redução dos níveis de colesterol e triglicerídeos plasmáticos devido à sua capacidade de se ligar aos lipídeos da dieta, interferindo na absorção intestinal dessas gorduras. Pesquisas demonstraram que uma dieta contendo 5% de quitosana reduziu o colesterol sérico pela metade em ratos. O uso de quitosana como hipocolesterolêmico em humanos foi documentado em estudo, no qual adultos do sexo masculino foram alimentados com biscoitos à base de quitosana por duas semanas. Aqueles que utilizaram a dose de 3 g/dia durante uma semana e 1,6 g/dia durante duas semanas apresentaram redução de 6% do colesterol total (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

Devido às propriedades físico-químicas e biológicas apresentadas, a quitosana tem sido extensivamente utilizada na área farmacêutica, como um diluente para compressão direta, como um veículo para liberação sustentada de fármacos e também para aumentar o grau de dissolução e a biodisponibilidade de fármacos insolúveis em água (LAMIM, 2006).

No contexto da liberação de fármacos, a quitosana vem sendo utilizada como excipiente para modificar a liberação de fármacos em formulações de administração oral, nasal, transdérmica e tópica e na obtenção de nanopartículas para a veiculação de proteínas, vacinas e DNA. Ainda, como sistemas de liberação de fármacos, as microesferas de quitosana, têm sido utilizadas com sucesso para muitos fármacos, como por exemplo, fosfato sódico de prednisolona, indometacina, oxitetraciclina, progesterona, amoxicilina, metronidazol, entre outros (VULCANI, 2004).

No desenvolvimento de micro/nanopartículas, a quitosana apresenta muitas vantagens como a habilidade de modificar a liberação de substâncias ativas; a possibilidade de utilização de técnicas de obtenção que não envolvem solventes

orgânicos e a propriedade de mucoadesividade, que aumenta o tempo de permanência no sítio de absorção (LAMIM, 2006).

Os estudos realizados têm apresentado resultados que corroboram com o uso da quitosana como agente de liberação de fármacos, visto que explicitam as qualidades dessa substância principalmente quando se necessita de liberação lenta e controlada (SPIN-NETO et.al., 2008). Até o momento, no entanto, desconhecem-se pesquisas que apresentem resultados com perspectivas concretas de se obter um material que possa promover a liberação da insulina em membranas de quitosana.

3.4 Insulina

A insulina é um hormônio anabólico, sintetizado pelas células beta nas ilhotas de *Langerhans* do pâncreas, sendo o hormônio mais importante na regulação do metabolismo energético. Sua principal função é regular o metabolismo da glicose por todos os tecidos do corpo, com exceção do cérebro (BENNETT; PLUM, 1997). Ela aumenta a velocidade de transporte da glicose para dentro das células musculares e do tecido adiposo. Com a captação da glicose, se esta não for imediatamente catabolizada como fonte de obtenção energética, gera-se glicogênio nos músculos e triglicerídeos no tecido adiposo. Dessa forma, o efeito da insulina é hipoglicemiante, visto que reduz a glicemia sanguínea (BAYNES; DOMINICZAK, 2007).

Normalmente, a insulina é liberada em ocasiões nas quais existam altos índices de glicose plasmática, como acontece após as refeições, variando de acordo com a quantidade e o tipo de alimento ingerido. Imediatamente após uma refeição, as concentrações de glicose no sangue podem elevar-se para 8mM, a partir de uma concentração normal em torno de 3,6 a 5,8mM. O aumento da glicose circulante estimula a liberação do hormônio insulina (PRATT; CORNELLY, 2006).

3.4.1 Características físico-químicas

3.4.1.1 Estrutura química

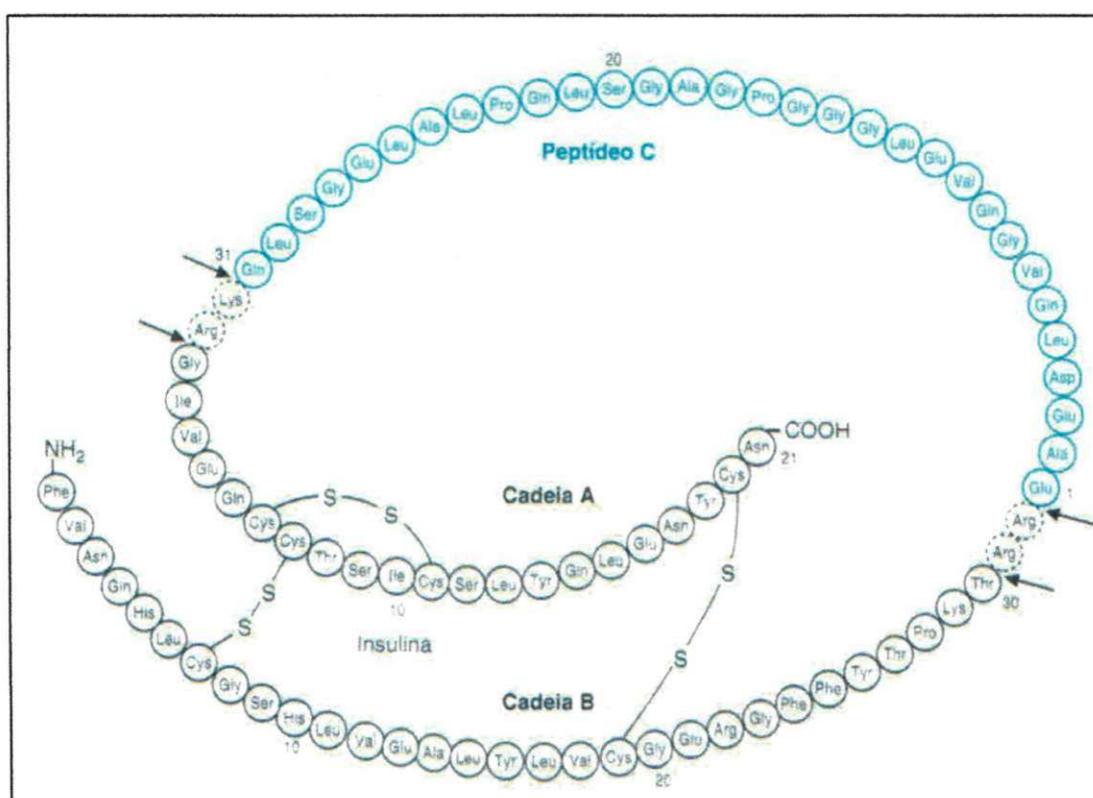
A insulina é uma proteína sintetizada a partir da molécula precursora proinsulina pela ação de enzimas proteolíticas conhecidas como pro-hormônios

convertases (PC1 e PC2). A insulina ativa tem 51 aminoácidos e é um polipeptídeo (SILVA, 2006). A maioria dos aminoácidos descritos, derivados de fontes naturais, é constituído de um grupo carboxila, um grupo amino e uma cadeia lateral distinta (grupo R) ligado a um átomo de carbono (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2006).

Em humanos, a insulina tem uma massa molar de 5808. Ela é formada por duas cadeias de polipeptídeos ligadas por duas pontes dissulfídicas (Figura 8). A cadeia A consiste de 21, e a cadeia B, de 30 aminoácidos. A insulina é produzida como uma molécula de pro-hormônio pro-insulina - que é mais tarde transformada, por ação proteolítica, em hormônio ativo (SMITH; MARKS; LIEBERMAN, 2007).

A parte restante da molécula de pro-insulina é chamada de peptídeo C. Este polipeptídeo é liberado no sangue em quantidades iguais à da insulina. Como insulinas exógenas não contêm peptídeo C, o nível em plasma desse peptídeo é um bom indicador de produção endógena de insulina (KATZUNG, 2005).

Figura 8: Molécula de Pró-insulina humana.



Fonte: (SMITH; MARKS; LIEBERMAN, 2007).

3.4.1.2 Regulação da síntese e secreção

O principal fator de controle da síntese e secreção da insulina é a glicemia. As células beta respondem tanto à glicemia absoluta quanto à velocidade de alteração da glicemia. Outros estímulos para liberação de insulina incluem aminoácidos, ácidos graxos, estimulação parassimpática do sistema nervoso, hormônios peptídicos para o intestino e fármacos que atuam sobre os receptores de sulfoniluréia (RANG; DALE; RITER, 2007).

Há uma liberação basal constante de insulina e também uma resposta a um aumento da glicemia. Esta resposta é bifásica: a fase rápida inicial, reflete a liberação do hormônio armazenado e a fase tardia mais lenta, reflete a liberação contínua de hormônio armazenado e nova síntese. Cerca de um quinto da insulina armazenada no pâncreas do adulto humano é secretado diariamente (SILVA, 2006).

Após a sua síntese, a insulina é diretamente difundida pela veia porta em direção ao fígado, onde exerce seus efeitos metabólicos. No estado basal, a insulina é secretada a uma velocidade de 1 UI (Unidade Internacional) por hora. Após as refeições, a secreção desse hormônio aumenta de cinco a dez vezes (HOFFMAN; ZIV, 1997).

3.4.1.3 Carga elétrica

A carga elétrica geral da molécula de insulina varia com o pH do meio. O ponto isoelétrico (pI) da insulina, ou seja, o pH no qual há um equilíbrio entre as cargas positivas e negativas dos grupamentos iônicos, encontra-se compreendido entre 5,3 e 5,4 (CRAIG; STITZEL, 2008).

3.4.1.4 Cristalização

A insulina cristaliza, isoeletricamente a pH 5,5 – 5,6 na presença de íons metálicos divalentes (Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , etc.). O conteúdo em metal é diretamente proporcional ao seu peso atômico. Alguns ânions, como o cloreto, o acetato, o citrato, o fosfato ou o carbonato também podem estar presentes na cristalização da insulina. Em soluções ácidas (pH 2 – 2,5) e com baixa força iônica, a molécula de insulina associa-se muito pouco e cristaliza, mesmo na

ausência de metal. A insulina também pode cristalizar na presença de bases orgânicas e sem zinco (CHIEN, 1996).

3.4.1.5 Solubilidade

A solubilidade da insulina depende da sua pureza, da natureza do solvente, do pH, da temperatura, da força iônica e da concentração de íons metálicos divalentes. A precipitação da insulina pode ocorrer, em meio aquoso, num intervalo de pH próximo do seu *pI*. A insulina também pode sofrer precipitação (*salting-out*) na presença de soluções com concentrações elevadas de sais (força iônica elevada). A solubilidade deste hormônio depende fortemente da concentração de íons divalentes como o zinco para valores de pH neutros e básicos (BRANGE; HAVELUND; HOUGAARD, 1992).

A solubilidade da insulina também é influenciada pela presença de compostos orgânicos. Em soluções neutras, moléculas carregadas positivamente podem interagir com a insulina carregada negativamente, formando complexos que precipitam (BRANGE; HAVELUND; HOUGAARD, 1992).

A insulina é muito solúvel em misturas homogêneas de água e de solventes orgânicos, no entanto, quando o conteúdo em solvente orgânico é muito elevado, a solubilidade da insulina diminui dependendo do solvente, da temperatura, do pH e do conteúdo em sal (BRANGE; HAVELUND; HOUGAARD, 1992).

O pH influencia a solubilidade da insulina, se ela estiver associada ao íon zinco. A dissolução dos cristais de insulina-zinco ocorre melhor num solvente ácido do que em meio neutro ou ligeiramente alcalino. As pontes dissulfeto da insulina são degradadas em soluções básicas fortes por isso essas soluções não devem ser utilizadas (BRANGE; HAVELUND; HOUGAARD, 1992).

3.4.1.6 Estabilidade

A insulina pura pode manter-se estável durante anos, sob refrigeração constante em temperatura entre 2 e 8°C. O frasco de insulina pode ser mantido por até 30 dias à temperatura ambiente, cerca de 25°C. Devem ser evitadas temperaturas extremas (menos de 2°C e mais de 30°C) através de armazenagem em local fresco e ventilado, não exposição direta a luz solar, a proximidade de

fogões, fornos e outros eletrodomésticos que emanam calor e aquecem o ambiente. A fim de manter a estabilidade, também deve ser evitado o contato com gelo seco, o transporte em veículo não ventilado, a excessiva agitação e o congelamento (EMTD, 2011).

Em ácidos diluídos a insulina sofre clivagem em vários fragmentos e em soluções alcalinas, ela é rapidamente decomposta por hidrólise das ligações amida, o que demonstra a influência do pH na manutenção da estabilidade da insulina (CHIEN, 1996).

Na presença de trocadores iônicos ácidos e básicos, as ligações no C-terminal da cadeia B são hidrolisadas. A uréia concentrada causa carbamilação na molécula de insulina mas não reduz a sua atividade. Os peroxiácidos quebram as pontes dissulfeto, deixando a molécula em estado oxidado e sem atividade biológica. Já os agentes redutores, como o sulfureto de hidrogênio, inativam rapidamente a insulina (CHIEN, 1996).

Quanto à influência da luz na estabilidade da insulina, pode-se afirmar que as radiações ultra-violetas (UV) e os ultra-sons desencadeiam a degradação desse hormônio (MARSCHUTZ; CALECETI, 2000).

Com relação à estabilidade enzimática, a insulina nativa é resistente à hidrólise enzimática *in vitro*, possivelmente devido a um elevado conteúdo em zinco, mas pode sofrer clivagem na presença da tripsina, da α -quimiotripsina, da subtilisina e da leucina-aminopeptidase. A insulina pode ser ainda degradada na presença da elastase (MARSCHUTZ; CALECETI, 2000).

3.4.2 Deficiência de Insulina e Diabetes Mellitus

Quando existe dificuldade no organismo em manter adequados os níveis de insulina, ocorre uma patologia denominada Diabetes *Mellitus*, um distúrbio metabólico crônico caracterizado por hiperglicemia (glicose plasmática de jejum > 7mmol/L ou glicose plasmática > 10mmol/L duas horas após uma refeição), devido à deficiência ou resistência à insulina (RANG; DALE; RITER, 2007).

Existem duas formas principais de Diabetes *Mellitus*: Diabetes do tipo I e do tipo II. O Diabetes *Mellitus* tipo I é caracterizado por uma destruição auto-imune de células beta do pâncreas, 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).

Os sintomas aparecem inicialmente na infância quando a produção de insulina começa a declinar. No passado, a doença era invariavelmente fatal. Isso mudou em 1922, quando Frederik Banting e Charles Best administraram um extrato pancreático num menino diabético gravemente afetado para salvar a vida dele. Desde então, o tratamento do Diabetes tipo I com insulina purificada foi aperfeiçoado, mas um desafio permanece na arte da administração de insulina, na medida das necessidades do organismo, no decurso de um ciclo típico de 24 horas de saciedade e jejum (PRATT; CORNELLY, 2006).

O Diabetes *Mellitus* tipo II é bastante diferente do tipo I. Nesse caso, a insulina está presente, mas não é eficiente para estimular a absorção de glicose nas células (o que é chamado de "resistência à insulina"). O corpo tenta compensar esse defeito secretando cada vez mais insulina, até que a capacidade de reserva das células β -pancreáticas se reduz e a glicemia aumenta (GROSS et al., 2000).

Sem dúvida, a forma mais comum de Diabetes, responsável por 90% dos casos, é o Diabetes do tipo II (diabetes do adulto ou diabetes independente da insulina). Somente uma pequena fração das pessoas acometidas por Diabetes do tipo II exhibe defeitos genéticos no receptor da insulina (PRATT; CORNELLY, 2006).

O tratamento do Diabetes tipo II consiste, numa primeira fase, na adoção de uma dieta alimentar adequada e exercício físico, de modo a normalizar os níveis glicêmicos. Caso essas medidas não sejam suficientes, o paciente tem que recorrer à medicação específica, e em certos casos ao uso de insulina, que tem que ser injetada por via subcutânea e posteriormente, atingir a corrente sanguínea (KATZUNG, 2005).

3.4.3 Terapia com Insulina

Em 1922, a descoberta da insulina levou a uma revolução no tratamento do diabetes. Desde então, muitas melhorias foram feitas nas preparações de insulina visando uma melhor purificação e uma duração de ação mais prolongada.

No início da terapia com insulina muitos pacientes acharam incômodo a necessidade de administrar várias injeções de insulina por dia. Dessa forma, pesquisadores iniciaram estudos para tentar prolongar o tempo de ação da insulina.

No início dos anos 30, foi descoberto que a adição de protamina à insulina, reduzia substancialmente a sua solubilidade no pH normal dos fluidos corporais retardando, assim a sua absorção e prolongando sua ação. Nesta mesma época, foi também descoberto que a adição de zinco à insulina também prolongava seu efeito (HELLER; KOZLOVSKI; KURTZHALS, 2007).

Em 1946 foi produzida a 1ª insulina cristalina – Neutral Protamine Hagedorn (NPH), tornando-se assim possível fazer misturas com insulina de ação rápida. A insulina ultra lenta também estava disponível como insulina protamina-zinco (PZI). Nos anos 50 foram introduzidas formulações diferentes com insulina de protamina amorfa e zinco cristalino. Neste período, os pacientes já dispunham de uma grande variedade de escolhas de insulina desde as rápidas às ultra-lentas e as de origem suína e bovina (SILVA, 2006). No entanto, a maioria deles apresentou reações e viu-se a necessidade de adotar técnicas de purificação da insulina numa tentativa de diminuir os efeitos colaterais. Assim, em 1978 surgiu a tecnologia do DNA recombinante, que consistiu na introdução do gen da insulina no genoma de uma bactéria e conseguiu-se fazer com que ela produzisse insulina idêntica à humana (PORTAL FATOR BRASIL, 2011).

As propriedades físico-químicas das insulinas humana, suína e bovina diferem devido às suas diferentes sequências de aminoácidos. A insulina de porco difere da humana em um aminoácido (alanina em vez de treonina no carboxi-terminal da cadeia B) e a insulina bovina difere por duas alterações adicionais da cadeia A (treonina e isoleucina nas porções A8 e A10 são substituídas por alanina e valina, respectivamente). A insulina humana é mais solúvel que a de porco em soluções aquosas. Todas as preparações são altamente supridas em pH neutro, o que melhora a estabilidade e permite o armazenamento por vários dias em temperatura ambiente (BANDEIRA et.al, 2009).

Com a tecnologia do DNA recombinante tornou-se possível reestruturar a molécula de insulina para superar algumas das limitações terapêuticas da molécula convencional. Essa é a tecnologia utilizada nos dias atuais para a fabricação da insulina (PORTAL FATOR BRASIL, 2011). Contudo, a administração de insulina por via subcutânea resulta num perfil de insulina plasmática bastante diferente da resposta prandial normal em indivíduos não diabéticos. A insulina ultra lenta (NPH) não simula exatamente a secreção de insulina fisiológica no indivíduo sem diabetes, assim, episódios de hipoglicemia são por vezes problemas para usuários desse tipo

de preparação. De modo a superar esse entrave, foram desenvolvidos análogos da insulina, através da substituição de certos aminoácidos na estrutura da insulina de modo a fornecer um perfil de insulina mais fisiológico (HELLER; KOZLOVSKI; KURTZHALS, 2007).

Existem quatro tipos de formulações de insulina para a terapia diabética. Elas diferem entre si pelo início de ação, que corresponde ao tempo que a insulina leva para alcançar a corrente sanguínea e começar a diminuir a glicemia, o pico máximo que se traduz pela potência máxima da insulina, no sentido de baixar a glicemia e a duração que diz como a insulina continua a diminuir a glicose (HELLER; KOZLOVSKI; KURTZHALS, 2007).

A Tabela 1 ilustra a classificação de Bandeira et al., (2009) para as insulinas de acordo com o início e a duração de sua ação em: Insulina de ação ultra rápida, Insulina de ação rápida, Insulina de ação intermediária, Insulina de longa duração ou ultra lenta.

Tabela 1: Tempo de ação das preparações de insulina (humanas) e dos análogos de insulina

	Início da ação	Pico da ação	Duração (máxima)
DE AÇÃO ULTRA RÁPIDA			
Lispro/Aspart	5 a 15 min	1 a 2 h	4 a 6 h
DE AÇÃO RÁPIDA			
Regular	30 min a 1 h	2 a 4 h	6 a 10 h
DE AÇÃO INTERMEDIÁRIA			
NPH	2 a 4 h	6 a 10 h	14 a 18 h
Lenta	3 a 4 h	6 a 12 h	16 a 20 h
DE AÇÃO LONGA			
Ultralenta	6 a 10 h	10 a 16 h	20 a 24 h
Glargina	30 min a 2 h	--	20 a 24 h
Detemir	30 min a 2 h	--	6 a 23 h

Fonte : Adaptado de (BANDEIRA et. al, 2009)

Através da utilização desses análogos, conseguiu-se um perfil de insulina muito próximo do normal, além de maior flexibilidade e praticidade no tratamento do paciente com diabetes, que se via na obrigação de um esquema de refeições muito rígido, uma vez que tendo tomado sua insulina pela manhã teria que almoçar por

volta do meio dia, correndo o risco de queda da glicemia pelo pico de ação dessas insulinas nesse período (PORTAL FATOR BRASIL, 2011).

Com o esquema atual, os pacientes utilizam-se de uma ou duas doses diárias do análogo de ação prolongada, o que lhes garante a glicemia de jejum e os períodos entre as refeições, mais três doses de análogo de ação ultra-rápida, o que lhes garante as glicemias pós prandiais, aquelas que são influenciadas pelas refeições. Com esse esquema terapêutico, as glicemias são mais facilmente normalizadas e os horários das refeições mais flexibilizados (PORTAL FATOR BRASIL, 2011).

3.4.4 Propriedades Farmacodinâmicas

A atividade primária da insulina é a regulação do metabolismo de glicose. Além disso, todos os tipos de insulinas possuem diversas ações anabólicas e anticatabólicas sobre muitos tecidos do organismo. No músculo e outros tecidos (exceto o cérebro), a insulina causa um rápido transporte intracelular de glicose e aminoácidos, promove o anabolismo e inibe o catabolismo de proteínas. No fígado, a insulina promove a captação e o armazenamento da glicose em forma de glicogênio, inibe a gliconeogênese e promove a conversão do excesso de glicose em gordura (CRAIG; STITZEL, 2008).

3.4.5 Farmacocinética

A atividade proteolítica do trato gastrointestinal destrói a insulina, o que tem impedido seu uso por via oral. Sua meia-vida (MV) é de 5-6 minutos em indivíduos normais ou diabéticos não complicados (SILVA, 2006).

A maior parte da insulina circula livremente; só uma pequena fração da insulina endógena ou exógena se prende à β -globulina. O fígado e o rim são os dois órgãos principais que removem a insulina da circulação. Normalmente o fígado depura cerca de 60% da insulina circulante liberada pelo pâncreas, em virtude de sua localização como sítio terminal do fluxo sanguíneo da veia porta, enquanto os rins removem 35-40% do hormônio endógeno (KATZUNG, 2005).

Nos pacientes diabéticos tratados com insulina que recebem injeções subcutâneas desse hormônio a relação acima mencionada é invertida, de modo que

60% da insulina exógena são depurados pelo rim, enquanto o fígado não remove mais do que 30-40% (KATZUNG, 2005).

3.4.6 Reações adversas à insulinoterapia

Quando a insulina é injetada por via subcutânea para a circulação sistêmica expõe todos os tecidos à mesma concentração. Os músculos e os adipócitos respondem à dose de insulina administrada sem a monitorização hepática, uma vez que o fígado recebe, apenas, uma fração da dose administrada. A exposição excessiva da vasculatura e outras células nomeadamente musculares faz com que a insulina injetada represente uma estimulação extra para o crescimento, para a divisão celular e outras respostas metabólicas que, de uma forma gradual, vão dando origem às complicações associadas à doença (KATZUNG, 2005).

Dentre as reações mais comuns pode-se citar: hipoglicemia, alergia, resistência à insulina e lipodistrofia (SILVA, 2006).

3.4.6.1 Hipoglicemia

A administração de insulina subcutânea não reproduz a insulina fisiológica hepática e da circulação sistêmica. Num indivíduo normal, a insulina é secretada rapidamente, como resposta metabólica ao aumento de glicose no sangue após ingestão de comida, diretamente para a veia porta e desta para o fígado (local primário de ação da insulina) (BANDEIRA et.al, 2009).

As concentrações hepáticas de insulina são superiores às sistêmicas. Quando a insulina é injetada pela via subcutânea, apenas 20% da insulina inicial alcança o fígado, uma vez que esta é liberada na circulação sistêmica e é necessário um período de tempo para sua dissolução e difusão, sendo este período de tempo independente da concentração de glicose no sangue. Dessa forma podem ocorrer os casos de hipoglicemia que é considerada a complicação clínica mais comum da insulinoterapia (KATZUNG, 2005).

3.4.6.2 Alergia

A alergia à insulina é um distúrbio raro e representa uma reação de hipersensibilidade do tipo imediato em que a urticária local ou sistêmica resulta da liberação de histamina por mastócitos teciduais sensibilizados por anticorpos IgE antiinsulina. Nos casos mais graves podem ocorrer anafilaxias (KATZUNG, 2005).

3.4.6.3 Resistência à insulina

O termo resistência à insulina indica a presença de uma resposta biológica diminuída à insulina. Historicamente, esse termo tem sido aplicado a pacientes que necessitam de mais de 200 UI/dia de insulina, por vários dias, na ausência de obesidade, infecção ou outras intercorrências (SILVA, 2006).

O defeito pode estar a nível do pré-receptor (anticorpos contra a molécula de insulina), no receptor (anticorpos contra o receptor da insulina) ou no pós-receptor (obesidade). Raramente essa resistência ocorre por anticorpos contra a molécula de insulina (0,01%) (SILVA, 2006).

3.4.6.4 Lipodistrofia

Com o decorrer do tempo, as injeções subcutâneas repetidas de insulina podem causar lipodistrofia (lipo-hipertrofia ou lipoatrofia) do tecido subcutâneo nas áreas de aplicação da insulina. Na lipoatrofia existe depressão da pele por causa da atrofia do tecido gorduroso. Já a lipo-hipertrofia ocorre devido a um acúmulo de gordura no tecido subcutâneo que, algumas vezes, acontece em áreas em que foram aplicadas injeções repetidas de insulina (KATZUNG, 2005).

3.4.7 Vias de administração não invasivas alternativas à administração subcutânea de insulina

O desafio de substituir a agulha para liberação da insulina por vias alternativas menos invasivas tem levado a rigorosas pesquisas farmacêuticas. A via parenteral ainda é a mais utilizada para liberação de proteínas como a insulina, por causa da inadequada biodisponibilidade dessa substância quando liberada através

de outras vias (CUNHA, 2009). Algumas vias de administração promissoras e, ainda, sob investigação serão, agora, brevemente descritas.

3.4.7.1 Administração por Via Oral

Embora o emprego desta via seja a ideia mais atraente, tendo em vista a universalidade de seu uso, é a que apresenta maior número de dificuldades na formulação em função das múltiplas e extensas barreiras a absorção (ação de enzimas proteolíticas e o pobre desempenho da categoria das proteínas em termos de permeabilidade em membranas biológicas). Também, devido ao fato de a via oral mimetizar a liberação fisiológica da insulina através da veia porta, reduzindo os efeitos adversos associados a hiperinsulinemia provocada pela aplicação da insulina próximo a vasos periféricos (SANTOS, 2010).

Existem uma série de diferentes sistemas de liberação de insulina para uso por via oral em estudo. Essas formulações lançam mão de substâncias capazes de promover a absorção de peptídeos, como a insulina, por diferentes mecanismos. Para esse tipo de administração dois desafios precisam ser vencidos: 1) Proteger o fármaco do meio ácido do estômago e permitir que a molécula permaneça íntegra sem sofrer ataque das enzimas proteolíticas; 2) Promover e otimizar o processo de absorção através do epitélio intestinal (KHAFAGY et. al, 2007).

3.4.7.2 Administração por Via Nasal

É uma via muito pesquisada tendo como vantagem a facilidade de administração, grande superfície de absorção e o desvio do efeito de primeira passagem pelo fígado. As formulações em estudo fazem uso também da associação com substâncias capazes de acelerar o processo de absorção como, por exemplo, os surfactantes. Porém, alguns dos problemas encontrados têm sido a escolha do tamanho da partícula, a velocidade de eliminação do local de ação e alguns efeitos colaterais como citotoxicidade (liberação excessiva de muco e perda dos cílios protetores) (SANTOS, 2010).

3.4.7.3 Administração por Via Pulmonar

Trata-se de uma opção cômoda e não invasiva que oferece vantagens comparativamente a rotas tradicionais de administração de medicamentos: a grande superfície de absorção pulmonar, a sua elevada vascularização, a relativa ausência de metabolismo de primeira passagem bem como de degradação enzimática. Apesar dos pulmões não serem totalmente isentos de atividade enzimática, esta difere daquela observada no trato gastrointestinal, o que faz com que a administração pulmonar de peptídeos e proteínas seja extremamente promissora. A biodisponibilidade de proteínas e outras macromoléculas é maior do que por qualquer outra via não invasiva. A espessura fina do epitélio alveolar permite uma rápida absorção do fármaco e deste modo um rápido início de ação (PATTON; BYRON, 2007).

O uso rotineiro de inalantes (como os broncodilatadores para asmáticos), no entanto, é sabidamente impreciso e, no caso da insulina, a precisão necessária é muito maior, haja vista os riscos associados ao descontrole dos níveis de insulina (SANTOS, 2010).

3.4.7.4 Administração por Via Sublingual

A administração através dessa via é menos exigente do que de outras no que diz respeito a formulação e planejamento. Através dessa via, os fármacos são rapidamente absorvidos pela veia reticulada, que se situa abaixo da mucosa oral e entram na circulação sistêmica diretamente sem passar pelo fígado (SANTOS, 2010).

O uso de promotores de absorção nesta via de administração melhora a absorção de peptídeos uma vez que estes aumentam a permeabilidade da membrana e a adição de inibidores de enzimas aumentam a estabilidade da substância ativa, dessa forma, o papel destes potenciadores no transporte bucal de proteínas é crucial. Várias substâncias podem funcionar como promotores, devendo, no entanto, ser prevenida a ocorrência de efeitos colaterais como a irritação da mucosa bucal (MOELLER; JORGENSEN, 2008).

3.4.7.5 Administração por Via Ocular

A via ocular pode ser usada para liberação sistêmica de fármacos à base de peptídeos e proteínas. Os fármacos são instilados sobre a cavidade pré-corneal, podendo alcançar os vasos sanguíneos presentes abaixo da mucosa conjuntival ou penetrar no sistema de drenagem nasolacrimal e serem absorvidos através da mucosa nasal. Apresenta a vantagem de ser muito mais prática e fácil do que uma injeção, sendo que a taxa de absorção sistêmica via ocular é tão rápida quanto a via injetável, o tecido do olho é significativamente menos sensível ao desenvolvimento de reações imunológicas do que outros tecidos, evita o efeito de primeira passagem a nível hepático assim como as degradações que ocorrem em nível gastrointestinal (KHAFAGY et. al, 2007).

3.4.7.6 Administração por Via Transdérmica

O uso desta via parece ser uma opção atraente por não apresentar a barreira da presença das enzimas proteolíticas, entretanto, o tamanho molecular e a hidrofília dos fármacos tipo peptídeos limitam a absorção por esta via. Desta forma, vários processos estão sendo testados no sentido de equacionar estas diferenças como a aplicação de corrente elétrica - iontoforese, que acelera a migração de partículas ionizadas, de ultra-som e de vesículas com carreadores especiais capazes de se deformarem o suficiente para penetrar na pele intacta. Quanto aos efeitos colaterais desse tipo de administração, pode-se citar irritação na pele ou dano cutâneo (SANTOS, 2010).

3.4.7.7 Administração por Via Retal

A despeito da pouca aceitação dos supositórios, a via retal também está sendo investigada, uma vez que a semelhança da via oral, permite liberação da insulina via sistema porta e em contraste não apresenta o inconveniente da hidrólise por enzimas proteolíticas (MOELLER; JORGENSEN, 2008).

Cada uma das várias vias de administração da insulina possui, como visto, o seu conjunto de vantagens e desvantagens, mas todas representam possibilidades de administração dessa substância a longo prazo, estando, no entanto, a dificuldade

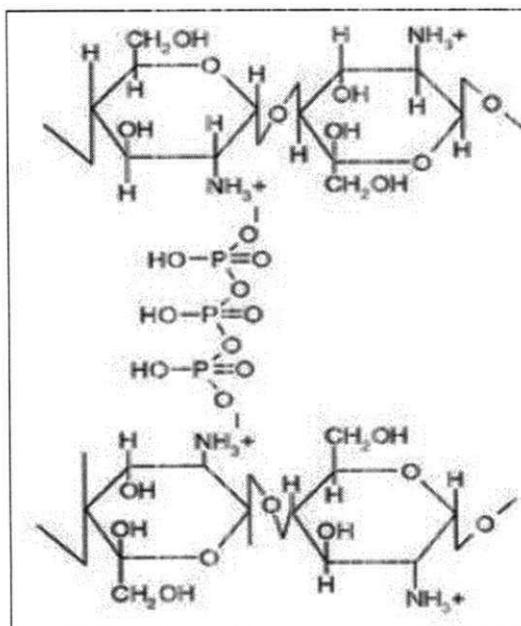
de atingir concentrações plasmáticas adequadas, ainda por ultrapassar (KHAFAGY et. al., 2007).

A associação da insulina com a quitosana, formando uma membrana para ser utilizada em um sistema de liberação controlada de fármacos, pode representar uma alternativa para administração da insulina por uma via, ainda a ser definida, porém diferente da injetável, diminuindo os efeitos colaterais que esse tipo de aplicação provoca. Dessa forma, com o propósito de melhorar algumas propriedades da quitosana e ajudar a manter a insulina estável na membrana, optou-se, na presente pesquisa, por utilizar, em algumas membranas, o tripolifosfato de sódio (TPP), um agente químico, cuja função é reticular iônica a quitosana.

3.5 Tripolifosfato de Sódio (TPP)

O tripolifosfato de sódio é um ânion multivalente e atóxico que vem sendo estudado como agente reticulante alternativo ao glutaraldeído (considerado antigênico). O TPP pode reticular a quitosana, formando um gel, pela interação iônica entre suas cargas negativas e as cargas positivas dos grupamentos amino da quitosana (CALVO et. al, 1997). Essa interação está ilustrada na Figura 9.

Figura 9: Interação iônica entre a quitosana e o TPP.

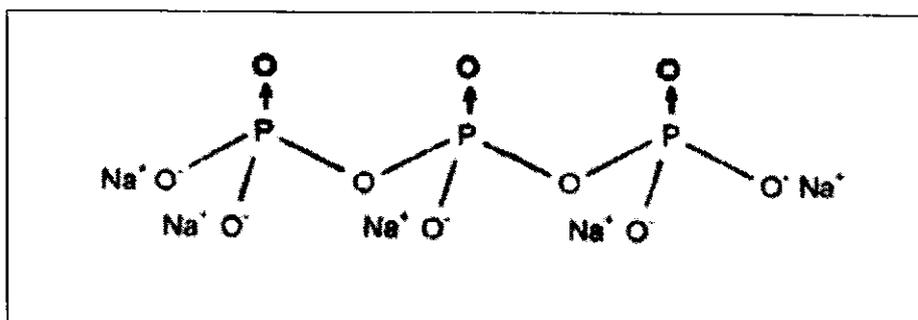


Fonte: (AZEVEDO et.al, 2011)

3.5.1 Características físico-químicas

O TPP, cuja estrutura química está representada na Figura 10, é um ânion com massa molar de 367,86. Apresenta-se na forma de pó branco, pouco higroscópico, completamente solúvel em água e em uma solução 1% (m/v) a 25°C apresenta um pH em torno de 9,7 (O'NEIL et.al, 2001).

Figura 10: Estrutura Química do TPP.



Fonte: GUIMARÃES (2005)

3.5.2 Aplicações do TPP

Dentre as aplicações do TPP, Brazmo (2010), destaca: agente sequestrante e emulsificante em indústrias de pastas e papéis; tratamento de água (removedor de íons cálcio e magnésio); produção de produtos de limpeza; dispersão de pigmentos e argilas; fabricação de vidros e tintas; dispersante de óleos em perfurações petrolíferas; agente de floculação e estabilizante do solo.

Por ser considerado um ânion de baixa massa molar, o TPP vem sendo utilizado, também, como agente reticulante físico, na formulação e na preparação de sistemas de liberação de fármacos (SHU; ZHU, 2002).

O grande número de cargas negativas do TPP resulta na sua grande habilidade de reticular ionicamente a quitosana. O tratamento de quitosana com TPP resulta numa diminuição da susceptibilidade de degradação da quitosana pela quitinase, além de alterar o comportamento de solubilidade do polímero, o que pode ser usado como ferramenta para mudanças desejáveis nas propriedades da quitosana para aplicações específicas (SHARMA; MONDAL; GUPTA, 2002).



METODOLOGIA

4 METODOLOGIA

4.1 Materiais

Os materiais foram adquiridos de empresas e/ou distribuidoras da região.

4.1.1 Biopolímero

Quitosana ($C_{12}H_{24}N_2O_9$) – Quitosana, 75-85% desacetilada, massa molar (190.000 - 310.000 daltons), grau de polimerização entre 1186 - 1924, fornecida pela Sigma Aldrich®. Lote MKBC 3804.

4.1.2 Reagentes

- **Ácido Acético Glacial ($C_2H_4O_2$)** - Vetec® Química Fina Ltda com grau analítico. Lote 0801000.
- **Hidróxido de Sódio (NaOH)** - Vetec® Química Fina Ltda com grau analítico, massa molar 39,9971 g/mol. Lote 08071098.
- **Insulina ($C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$)** – Insulina Humana comercial líquida - Novolin N, fabricada pelo laboratório Novo Nordisk Farmacêutica do Brasil Ltda, Lote AS6 1049 fornecida por unidades de saúde públicas da região e Insulina Humana comercial pó (I2643) fornecida pela Sigma Aldrich®, massa molar (5807,57 g/mol). Lote 096K03811V. É importante ressaltar que somente a insulina líquida foi utilizada para confecção das membranas. A insulina em pó foi utilizada, nesta pesquisa, apenas para a realização das caracterizações por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).
- **Tripolifosfato de Sódio ($Na_5O_{10}P_3$)** - Sigma Aldrich®, massa molar (367,86). Lote 16529COV.
- **Lisozima** - Sigma Aldrich®.
- **Phosphate Buffered Saline (PBS)** - Sigma Aldrich®, pH = 7,4. Lote 049K8204.
- **Sulfato de Sódio (Na_2SO_4)** – Carlos Erba do Brasil, massa molar (142,04).

- **Acetonitrila (CH₃CN)** - Vetec[®] Química Fina Ltda, massa molar (41,05). Lote 1008941.

4.1.3 Animais

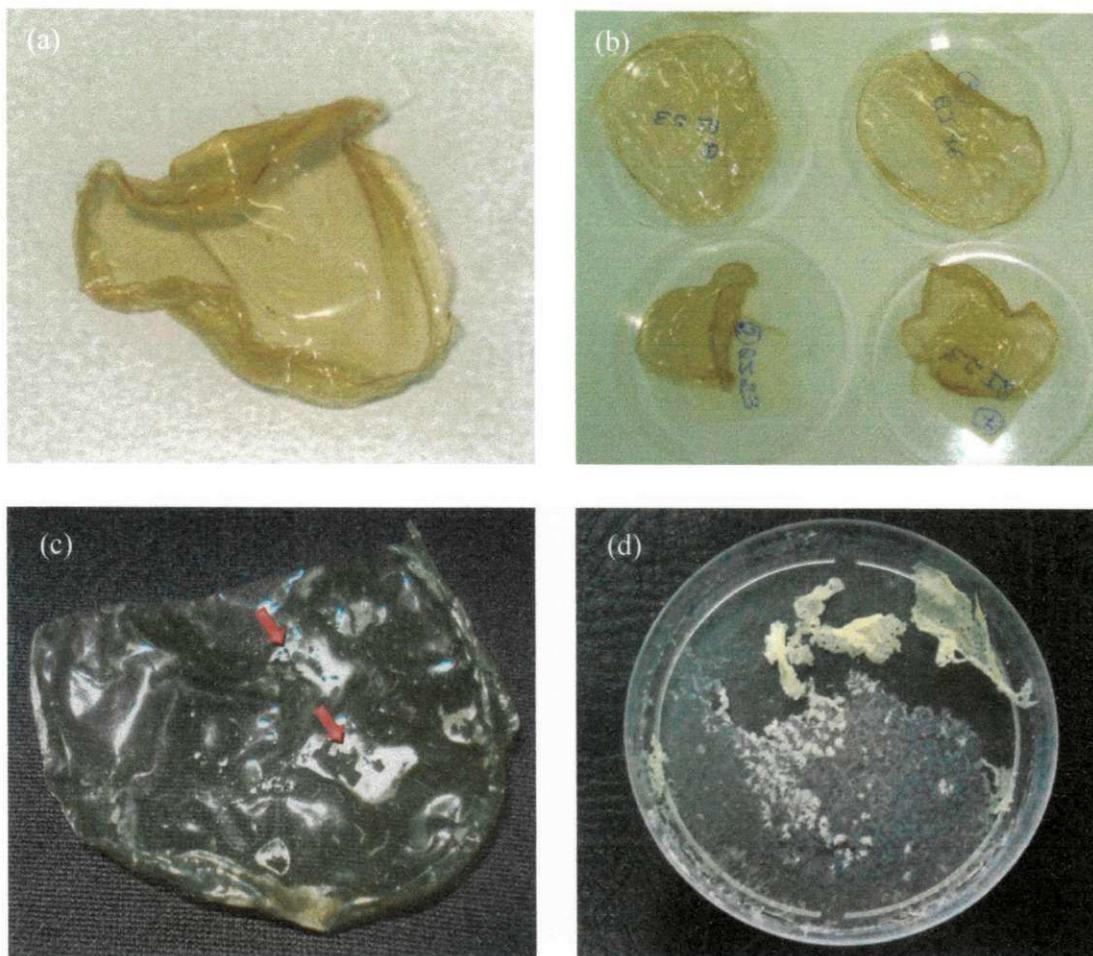
Foram utilizados, como fonte de macrófagos peritoneais, para o ensaio de citotoxicidade, camundongos machos tipo *Swiss*, provenientes do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP. Todos os procedimentos que utilizaram animais foram conduzidos conforme normas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e mediante parecer do Comitê de Ética local.

4.2 Métodos

Para obtenção das membranas estudadas, foi utilizado o método de evaporação do solvente, adaptado de Osório (2007) e implementado pelo grupo de biomateriais da Universidade Federal de Campina Grande.

Foram realizados diversos testes para o estabelecimento das condições a serem utilizadas no desenvolvimento de membranas que atendessem aos objetivos da pesquisa. Na Figura 11 são apresentadas tentativas mal sucedidas para obtenção dessas membranas. Observa-se na Figura 11a uma membrana de quitosana não plana e enrugada após secagem à temperatura ambiente. Na Figura 11b tem-se membranas de quitosana com a insulina incorporada na solução antes do processo de secagem, resultando na mesma aparência da 11a. A Figura 11c retrata uma outra tentativa de incorporar a insulina à membrana de quitosana, fazendo-a, com a membrana dobrada, após o processo de secagem. As regiões esbranquiçadas, em destaque, correspondem a insulina que não foi incorporada pela membrana. Na Figura 11d a incorporação do Tripolifosfato de Sódio em quantidade inadequada na solução de quitosana impediu a formação da membrana.

Figura 11: Tentativas de Obtenção de Membranas. a) Membrana de Quitosana enrugada. b) Membranas de Quitosana/Insulina. c) Membrana de Quitosana/Insulina dobrada. d) Quitosana/Insulina e TPP



As tentativas, anteriormente relatadas, apesar de mal sucedidas, representaram etapa fundamental para o alcance das conclusões da pesquisa. É desnecessário lembrar que, em estudos dessa natureza, é praticamente impossível obter-se resultados satisfatórios sem que sejam realizadas várias tentativas com insucessos repetidos. O insucesso, nessas situações, nada mais é que um degrau a mais na escalada para a conquista do conhecimento pretendido.

O fluxograma apresentado na Figura 12, por sua vez, detalha o processo de fabricação das membranas no qual se obteve êxito.

Figura 12: Etapas para preparação das membranas



4.2.1 Preparo das membranas de quitosana

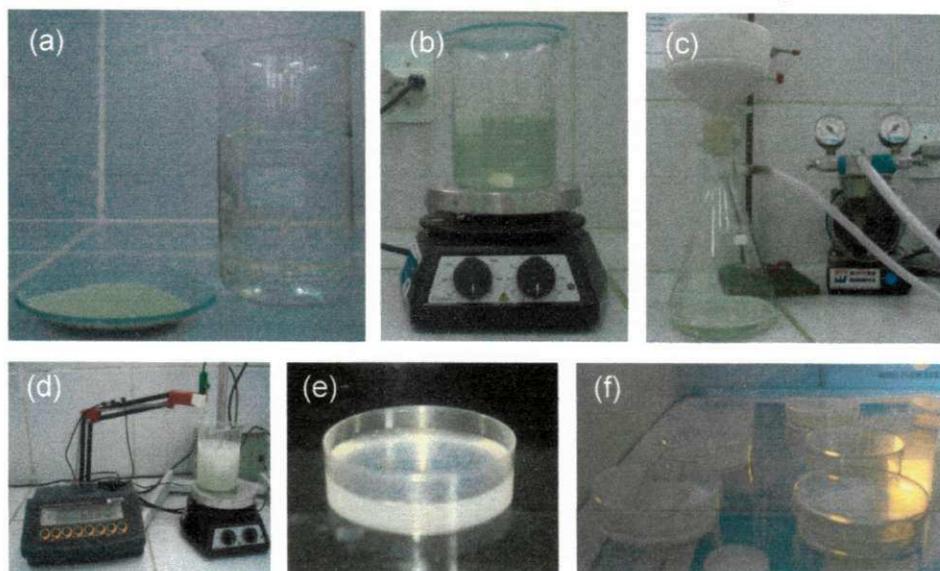
As membranas de quitosana foram preparadas pelo método de evaporação de solvente (Figura 13), através da dissolução do polímero em uma solução de ácido acético (1% v/v), para uma concentração final da solução polimérica 1% (m/v), sob agitação magnética por um período de 24 horas (13a e 13b). Em seguida, foi realizada a filtração a vácuo para remoção de substâncias insolúveis (13c).

Após a filtração, a solução foi mantida sob agitação magnética, onde, para obter a completa neutralização do ácido, foi gotejado hidróxido de sódio a 1M e medido, constantemente o pH da solução (13d), até que fosse atingida a neutralidade (pH=7).

A solução, assim formada, foi distribuída em placas de Petri de 5,5 cm, com um volume final em cada placa de 5 ml de solução (13e) e submetidas à secagem em geladeira à 8°C por 5 dias para evaporação completa do solvente. Após a secagem as placas foram tampadas e as membranas mantidas refrigeradas (13f).

É importante ressaltar que mais de 500 membranas de quitosana foram preparadas ao longo de todo o processo.

Figura 13: Preparação das Membranas no CERTBIO. a) Quitosana em pó e ácido acético b) Solubilização c) Filtração d) Neutralização e) Distribuição em placa de Petri f) Secagem e Armazenagem.



4.2.1.1 Incorporação da insulina na membrana de quitosana

A incorporação da insulina foi realizada usando-se a mesma técnica de evaporação do solvente em placas, descrita para obtenção da membrana de quitosana (item 4.2.1), porém, após a neutralização a solução de quitosana foi distribuída em placas de Petri e a insulina foi adicionada em cada placa, de modo que, ao final, para cada 5 ml de quitosana tinha-se 1ml (100 UI) de insulina. A insulina foi lentamente misturada à quitosana com ajuda de um bastão. A seguir as placas foram colocadas na geladeira, a 8°C, para secagem.

4.2.1.2 Incorporação do Tripolifosfato de Sódio (TPP) na membrana de quitosana

A incorporação do TPP foi realizada usando-se a mesma técnica de evaporação do solvente em placas, descrita para obtenção da membrana de quitosana (item 4.2.1), porém, após a neutralização da solução de quitosana, foi adicionado o tripolifosfato (0,1% m/v) para uma concentração final da solução polimérica 1% (v/v), sob agitação magnética por um período de 15 minutos (adaptado da metodologia proposta por Boonsongrit; Mitrevej e Mueller, 2008). Em seguida, a solução foi vertida em placas de Petri. As demais etapas se sucederam

na mesma ordem descrita para elaboração das membranas de quitosana e incorporação da insulina (item 4.2.1.1).

As membranas assim formadas foram designadas como: Q (Grupo controle - membrana de quitosana pura), QI (Grupo experimental 1 - membrana de quitosana com insulina) e QIT (Grupo experimental 2 - membrana de quitosana, insulina e tripolifosfato) e posteriormente, caracterizadas.

4.2.2 Caracterização das membranas obtidas

O material obtido foi caracterizado pelas técnicas de Molhabilidade, Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Difração de Raios X (DRX), Microscopia Ótica (MO), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDX), Biodegradação Enzimática, Avaliação da Viabilidade Celular dos Macrófagos, Determinação da Produção de Óxido Nítrico e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Com exceção da Avaliação da Viabilidade Celular dos Macrófagos e Determinação da Produção de Óxido Nítrico, que foi realizada no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, do Departamento de Análises Clínicas da UNESP, Araraquara, as demais análises foram realizadas no Laboratório de Referência em Desenvolvimento e Avaliação de Biomateriais da Região Nordeste do Brasil (CERTBIO) localizado na Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) e Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

4.2.2.1 Tensão Superficial/Molhabilidade

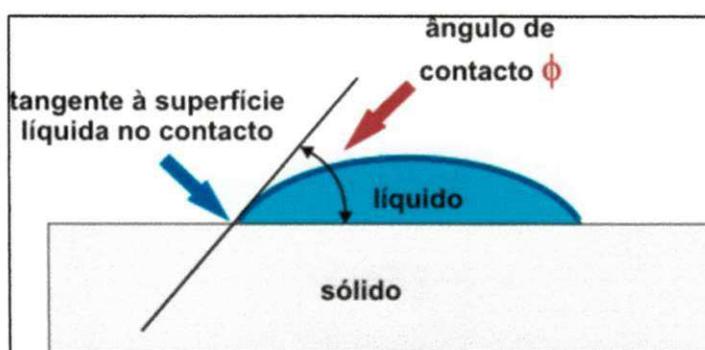
Diversos métodos podem ser empregados para obter uma avaliação da interação entre as fases sólido/líquido (molhabilidade), mas o ângulo de contato tem sido um parâmetro que apresenta excelente relação custo/benefício (FOOK, 2005).

As moléculas da superfície de um líquido estão sujeitas a fortes forças de atração das moléculas interiores. A resultante dessas forças, cuja direção é a mesma de plano tangente à superfície (em qualquer ponto desta) atua de maneira a que a superfície líquida seja a menor possível. A grandeza desta força, atuando

perpendicularmente (por unidade de comprimento) ao plano na superfície é dita tensão superficial (BIANCO; NONATO, 2011).

O resultado depende das forças intermoleculares que se estabelecem entre as fases, resultando na medida chamada ângulo de contato (Figura 14). Por meio da medida desse ângulo de contato entre a superfície do sólido e o plano tangencial à superfície líquida, pode-se obter a molhabilidade do líquido sobre um determinado substrato (ALHANATI, 2011).

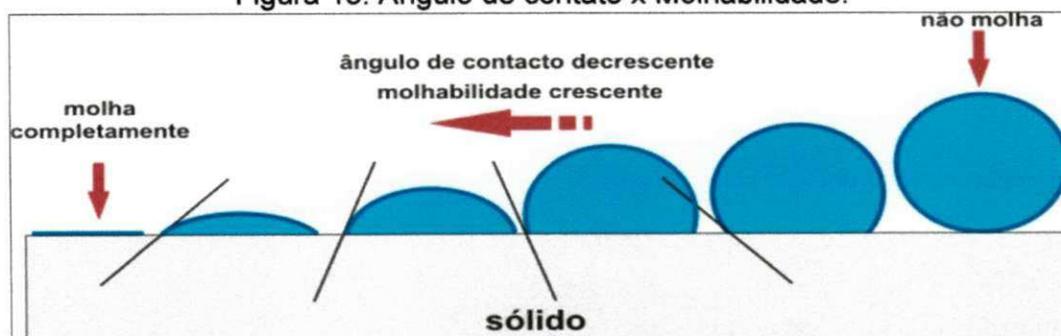
Figura 14: Ângulo de contato.



Fonte: ALHANATI, 2011

Se o ângulo de contato estático for um valor maior que 90° , o líquido tem a tendência a não molhar a superfície e a fase é dita 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 considerada parcial (Figura 15). Portanto, quanto menor for o ângulo, maior será o molhamento (WISNIEWSKI; ARGUELHO, 2011; ALHANATI, 2011).

Figura 15: Ângulo de contato x Molhabilidade.

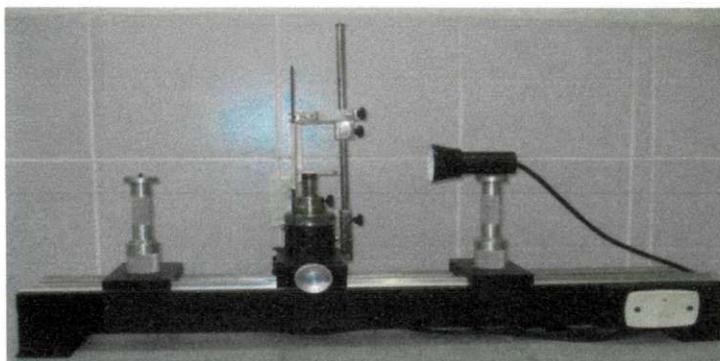


Fonte: ALHANATI, 2011

Nesta pesquisa, as análises do ângulo de contato foram efetuadas após o gotejamento de água deionizada na superfície das membranas. Utilizou-se uma câmara digital para capturar a imagem que foi, posteriormente, remetida a um microcomputador 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.

Para a realização desta análise foi utilizado um goniômetro (Figura 16) desenvolvido por técnicos da Unidade Acadêmica de Engenharia Mecânica da UFCG (Universidade Federal de Campina Grande) que se encontra instalado no Laboratório de Caracterização de Materiais da Unidade Acadêmica de Ciências e Engenharia de Materiais, da UFCG.

Figura 16: Goniômetro desenvolvido por técnicos da Unidade Acadêmica de Engenharia Mecânica da UFCG



Fonte: Arquivo Próprio

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

A espectroscopia de infravermelho foi utilizada para testar a identidade dos compostos, dando informações estruturais sobre as bandas dos agrupamentos das moléculas e informações sobre os grupos atômicos que participam da estrutura cristalina. Esta técnica considera que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibração específicas, as quais correspondem a níveis vibracionais das moléculas (FOOK, 2005).

Considerando que a frequência de vibração de um par de elétrons é aproximadamente igual à frequência da radiação infravermelha e que, quando

radiação infravermelha incide em uma substância, a radiação de mesma frequência que as frequências vibracionais das ligações é absorvida, é possível deduzir as frequências de vibração de uma molécula, observando as frequências que são seletivamente removidas do espectro infravermelho (LIMA, 2010).

Esta análise foi realizada utilizando um espectrômetro Spectrum 400 Perkin Elmer FTIR/FTNIR *Spectrometer* com varredura entre 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 20 varreduras, instalado no Laboratório de Caracterização de Materiais - UAEMa/UFCG.

Este aparelho foi utilizado para identificar os compostos químicos presentes, a partir das frequências vibracionais absorvidas das substâncias existentes na composição da membrana.

O espectro de FTIR também foi utilizado para confirmação do grau de desacetilação da quitosana, pois embora existam outros métodos, essa técnica é mais frequentemente utilizada devido a simplicidade do cálculo (GUPTA; JABRAIL, 2006).

Para obtenção do grau de desacetilação (GD) da quitosana utiliza-se a equação abaixo:

$$GD = \left[1 - \left(\frac{A_{3327}}{A_{1642}} \right) / 1,33 \right] \times 100\% \quad (3)$$

onde A_{1642} é o valor da absorbância a 1643 cm^{-1} atribuído a banda característica da amida I e A_{3327} é o valor da absorbância a 3331 cm^{-1} atribuído ao grupo hidroxila da quitosana; o valor 1.33 representa a razão A_{3327}/A_{1642} para um composto totalmente acetilado (GUPTA; JABRAIL, 2006).

4.2.2.3 Difração de Raios X (DRX)

A Difração de Raios X é um fenômeno de espalhamento da radiação eletromagnética, provocada pela interação entre o feixe de raios X incidente e os elétrons dos átomos componentes de um material. A técnica de Difração de Raios X é usada para se obter informações estruturais importantes sobre a cristalinidade de um composto qualquer. A principal aplicação da difração de raios X refere-se a identificação de compostos cristalinos, sejam eles orgânicos ou inorgânicos (KAHN, 2011).

Os planos de difração e suas respectivas distâncias interplanares, bem como a densidade dos átomos (elétrons) ao longo de cada plano cristalino, são características específicas e únicas de cada substância cristalina, da mesma forma que o padrão difratométrico por ela gerado (equivalente a uma impressão digital). Um banco de dados contendo informações cristalográficas básicas e algumas propriedades físicas de compostos cristalinos é mantido e continuamente atualizado pelo *International Center for Diffraction Data*, com sede nos EUA (ICDD). Atualmente, são disponíveis informações referentes a mais de 70000 compostos cristalinos, sendo que os mais importantes, para fins de identificação de um composto cristalino, são as distâncias interplanares e as intensidades difratadas normalizadas (relativas a 100%) para os vários planos que difratam construtivamente os raios X (KAHN, 2011).

As membranas Q, QI e QIT foram submetidas à análise por Difração de Raios X (DRX), através de um Difrátômetro de Raios X SHIMADZU (modelo XRD 7000) com varredura angular $5^{\circ} < 2\theta < 35^{\circ}$, na montagem de Bragg-Brentano, sistema θ - 2θ , utilizando-se radiação de Cu ($K\alpha_1$) com varredura no passo de 0,02 (2θ), com intervalo de 0,6 segundo para cada amostra. As análises foram realizadas no Laboratório de Caracterização de Materiais - UAEMa da UFCG.

4.2.2.4 Microscopia Óptica (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 a propiciar condições de revelar a microestrutura (FOOK, 2005).

Neste trabalho, a caracterização por MO, para avaliação da morfologia das membranas, foi realizada em um Microscópio Óptico Hirox de reflexão e transmissão com acessórios 2D e variação de 50X-400X, acoplado a uma estação de Análise de Imagens, instalado no Laboratório de Caracterização de Materiais da UAEMa/UFCG.

4.2.2.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) é um equipamento capaz de produzir imagens de alta ampliação (até 300.000 X) e resolução. A microscopia

eletrônica analisa o material através da irradiação por um fino feixe de elétrons que interage com a superfície da amostra e origina uma série de radiações, fornecendo, dessa forma, informação morfológica e topográfica sobre superfícies de sólidos, necessária para se entender o comportamento de superfícies (FIDELES, 2010; FOOK, 2005). A caracterização, por MEV, foi realizada no equipamento fabricado pela HITACHI®, modelo TM 1000, acoplado com sistema para microanálise química por Espectroscopia de Energia Dispersiva – EDS, instalado no Laboratório de Caracterização de Materiais – UAEMa/UFCG.

4.2.2.6 Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDX)

O EDX é um acessório essencial no estudo de caracterização microscópica de materiais, no qual os elementos químicos presentes numa amostra podem ser identificados através do espectro de raios X emitido pela amostra. O diâmetro reduzido do feixe permite a determinação da composição mineral em amostras de tamanhos muito reduzidos ($< 5 \mu\text{m}$), permitindo uma análise quase que pontual (FIDÉLES, 2010). Para caracterização por EDX foi utilizado um microscópio eletrônico de bancada, modelo TM 1000 HITACHI instalado no Laboratório de Caracterização de Materiais, da Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais, da UFCG.

4.2.2.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A Cromatografia Líquida de Alta Resolução (CLAE) é um método sensível e capaz de detectar clivagens de ligações peptídicas com consequente separação dos componentes de uma amostra (REIS, 2007).

A análise cromatográfica foi baseada no método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando um Sistema Ultra-Fast LC (UFLC) da Shimadzu munido de duas bombas (LC 20AD), com DGU 20A₃, que oferece opções de reboque para desgaseificar. Além disso, o equipamento apresenta: Forno de coluna (CTO 20A), detector de UV visível com lâmpada de Deutério (SPD 20A), um controlador de sistema (Interface CBM 20A), e monitoração pelo Software LC-Solution.

Para este ensaio foram utilizadas membranas contendo quitosana, quitosana/insulina e quitosana/insulina/tripolifosfato. As membranas foram, individualmente, cortadas e colocadas, cada uma em um Becker contendo 40 ml de solução tampão sulfato de sódio com pH=2,4 e colocadas em agitador magnético (100 r.p.m) por 60 minutos. Após a agitação o sobrenadante foi cromatografado pelo Sistema Ultra-Fast LC (UFLC) da Shimadzu.

Para o preparo da solução padrão utilizou-se insulina humana em pó (Sigma Aldrich) diluída na fase móvel, abaixo descrita, resultando em uma concentração de 2mg/ml.

A separação cromatográfica foi realizada com o auxílio de uma coluna analítica tipo C18 50 x 3,0 mm DI Shim-Pac da Shimadzu, a qual foi mantida a 40 °C. Utilizou-se um método binário, em que a fase móvel foi constituída de uma mistura acetonitrila e solução tampão de sulfato de sódio 0,2M (30:70 v/v), o pH foi ajustado para 2,4 com H₂SO₄ conforme metodologia proposta por Xua et.al.(2006) e Yilmaz; Kadioglu (2010). Obedeceu-se o fluxo eluente de 1,0 mL min⁻¹. O volume da amostra injetado foi de 20 µL. A detecção foi realizada em comprimento de onda de 214 nm, com tempo de eluição total de 5 minutos.

4.2.2.8 Ensaio de Biodegradação Enzimática

Para a metodologia empregada neste ensaio utilizou-se como base as normas ASTM F1635-04 *Standard teste Method for in vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants* (2010) e a ASTM F2103-01 *Standard Guide for Characterization and Testing of Chitosan Salts as Starting Materials Intended for Use in Biomedical and Tissue-Engineered Medical Products Applications* (2007). As membranas secas foram cortadas na dimensão de 2,0 cm², pesadas em balança analítica e esterilizadas com álcool a 70%. Em seguida as membranas foram isoladas em placas de polipropileno. As amostras foram divididas em dois grupos para avaliação da biodegradação. O primeiro grupo contendo uma solução de lisozima/*Phosphate Buffered Saline* – PBS com concentração de 1mg/mL, o segundo apenas com a solução de PBS para controle.

Foram utilizadas cinco amostras da membrana de quitosana e cinco amostras de cada membrana composta de quitosana/insulina e quitosana/insulina/ tripolifos-

fato, tanto para a solução de lisozima como para o tampão PBS, em dois lotes, resultando em 60 amostras. As membranas foram incubadas em estufa microbiológica, à temperatura de 37 °C, sendo retiradas da estufa após 07 dias (1º lote) e 14 dias (2º lote), seguindo um procedimento de lavagem em água destilada, secagem por 48 horas em estufa a 50 °C e pesagem em balança analítica. As diferenças percentuais das massas das amostras antes e após o ensaio forneceram os resultados referentes à degradação das membranas, observados a partir da média de ensaios repetidos nas cinco amostras.

4.2.2.9 Avaliação da Viabilidade Celular dos Macrófagos

Com o objetivo de atender à norma ISO 10993-5 que recomenda ensaios *in vitro* de citotoxicidade como testes iniciais para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos, escolheu-se o teste de avaliação da viabilidade celular dos macrófagos por MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio]. De uma forma geral, neste teste realizam-se ensaios quantitativos para avaliar a interrupção da atividade mitocondrial pela quantificação da formação de cristais de formazana, a partir da redução do tetrazólio MTT, ou seja, avalia-se a viabilidade celular partindo-se do princípio de que as células viáveis, uma vez em contato com o MTT, metabolizam o tetrazólio de metiltiazol na mitocôndria, utilizando enzimas ativas, havendo um acúmulo de cristais de tetrazólio ou formazana, que pode ser detectado pela leitura da absorbância em 540 nm, com filtro de referência em 620 nm.

Para a concretização desta etapa, fez-se necessária a obtenção das células do exsudato peritoneal utilizando-se 6 camundongos *Swiss*, previamente estimulados pela inoculação intraperitoneal de 3,0 mL de Tioglicolato de Sódio (Difco Lab. LTDA) a 3,0 %, três dias antes da coleta de células. Após esse período, os animais foram eutanasiados por inalação em câmara de CO₂. Os macrófagos do exsudato peritoneal foram coletados para preparo da suspensão celular. O número de células foi determinado pela contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer (Boeco, Germany) em uma diluição 1:100 do Líquido de Lázarus. As células foram ajustadas à concentração de 5. 10⁶ células em meio RPMI-1640-C.

Em uma placa estéril de 96 poços de fundo plano (Corning, Inc.) foram distribuídos 100 µL por poços das suspensões de células do exsudato peritoneal de

camundongos, em seguida foi adicionado um disco, confeccionado a partir das membranas de quitosana, quitosana/insulina e quitosana/insulina/TPP. Foram utilizados 3 discos de cada composição de membrana para cada animal.

Em outras cavidades da referida placa, com as mesmas condições anteriores, foram adicionadas 100 μ L de LPS (lipopolissacarídeo bacteriano derivado de *E. coli*, adquirido da Sigma Aldrich a uma concentração de 10 μ L, ou apenas meio de cultura (controle negativo). As placas foram incubadas por 24 h, a 37 °C, em estufa contendo tensão constante de 5 % de CO₂ (Forma Scientific, EUA). Após esse período, sobre a cultura celular foram adicionados 100 μ L de uma solução de MTT (Across Organics) a 0,5 mg/mL em RPMI-1640. A placa foi então incubada por mais 3 horas, nas mesmas condições anteriores. Após esta incubação, os sobrenadantes foram descartados e as células aderentes tratadas com 100 μ L de isopropanol (Mallinckrodt) para solubilizar os cristais de formazana formados. A leitura da densidade ótica foi determinada em espectrofotômetro (*Multiskan Ascent, Labsystems Research Tech. Div., Helsinki, Finland*) em UV/visível a 540 nm com filtro de referência de 620 nm (MOSMANN, 1983). A viabilidade celular foi calculada em porcentagem, considerando-se o controle negativo como 100 % de viabilidade.

4.2.2.10 Determinação da Produção de Óxido Nítrico

O óxido nítrico foi quantificado pelo acúmulo de nitrito em meio de cultura e medido espectrofotometricamente utilizando o reagente de Griess, constituído de 0,1 % de N-1-naftil-etilenodiamina, 1 % de sulfanilamida em solução de ácido fosfórico a 2,5 %, utilizando NaNO₂ como padrão (GREEN et al, 1982).

As células obtidas do exsudado peritoneal de camundongos foram ajustadas à concentração de 5×10^6 células/mL, em meio RPMI-1640-C e distribuídas em placas de cultura de tecidos, de 96 poços. A cada poço foram adicionados 100 μ L dessa suspensão celular e as placas foram incubadas a 37°C, por 60 min, em estufa contendo tensão constante de 5 % de CO₂ (Thermo electron Hepa Class 100). Aos macrófagos que ficaram aderidos à placa foi adicionado volume igual ao inicial de RPMI-1640-C, divididos em dois volumes iguais de 50 μ L, sendo que entre eles, foi adicionado um disco, confeccionado a partir de membranas de quitosana, quitosana/insulina e quitosana/insulina/TPP, ou ainda 100 μ L de LPS (lipopolissacarídeos) a 10 μ g/mL, como controle positivo, ou somente de RPMI-

1640-C, como controle negativo. Estas placas foram novamente incubadas a 37 °C, em estufa com tensão constante de 5 % de CO₂ (Thermo Electron Hepa Class 100), por 24 horas. Então, alíquotas de 50 µL dos sobrenadantes das culturas de macrófagos foram transferidas para uma placa de cultura de células, não estéril, contendo 96 poços de fundo plano e acrescidas de igual volume de reagente de Griess. Após 10 minutos de incubação, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a absorbância foi determinada com filtro de 540 nm em espectrofotômetro. As concentrações de NO liberadas nos sobrenadantes das culturas celulares foram calculadas, a partir de uma curva padrão, previamente estabelecida, e os valores foram expressos em µmols de nitrito.

A análise estatística foi realizada utilizando um método de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste *t-Student* na versão de comparações múltiplas de *Tukey-Kramer* para avaliar a diferença significativa entre pares. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Foi utilizado o programa *GraphPad InStat 3.00* (*GraphPad software*, San Diego, Califórnia, Estados Unidos).

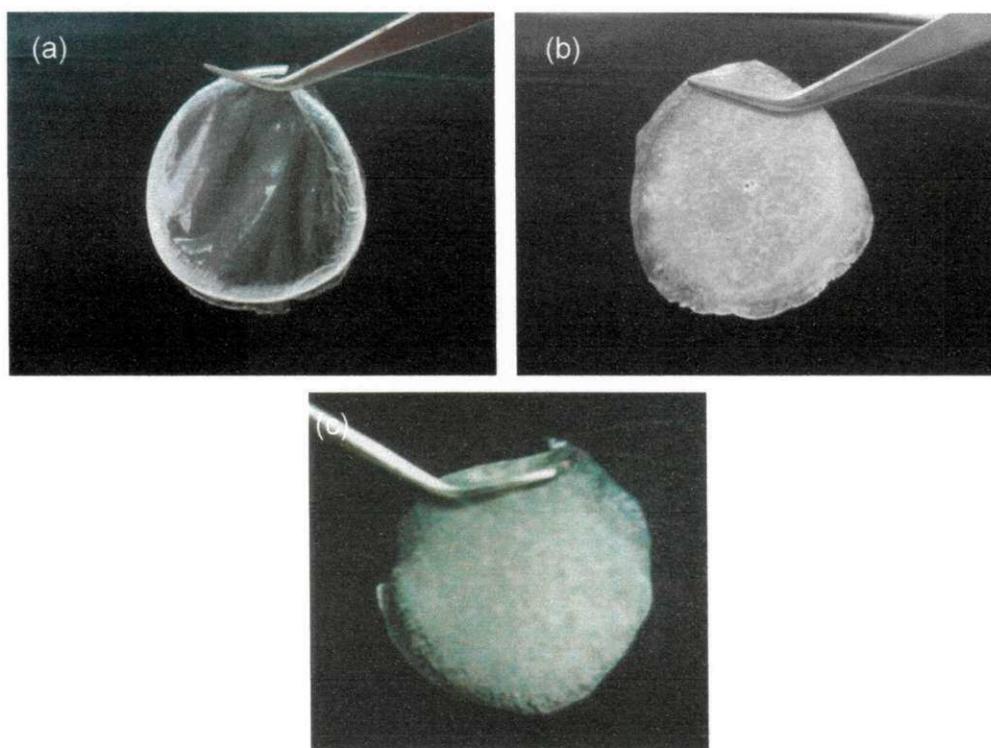


RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As membranas obtidas pelo método descrito no item 4.2.1, denominadas de Q (membrana de quitosana pura), QI (membrana de quitosana com insulina) e QIT (membrana de quitosana, insulina e tripolifosfato), apresentaram, macroscopicamente, coloração clara, aspecto homogêneo, elástico e flexível conforme pode ser observado na Figura 17.

Figura 17: Membranas confeccionadas no CERTBIO (a) Membrana Q (b) Membrana QI e (c) Membrana QIT.



Comparando-se as membranas apresentadas na Figura 17 percebe-se uma alteração na coloração da membrana de quitosana pura (17a) em relação às de quitosana/insulina (17b) e quitosana/insulina/TPP (17c). A presença da insulina torna a membrana mais esbranquiçada contrastando com a transparência da membrana sem insulina. Não foi observada diferença macroscópica entre as membranas QI e QIT.

Apesar do caráter subjetivo, utilizando-se uma propriedade organoléptica (olfato), percebeu-se que as membranas que contêm insulina apresentam um odor característico dessa substância.

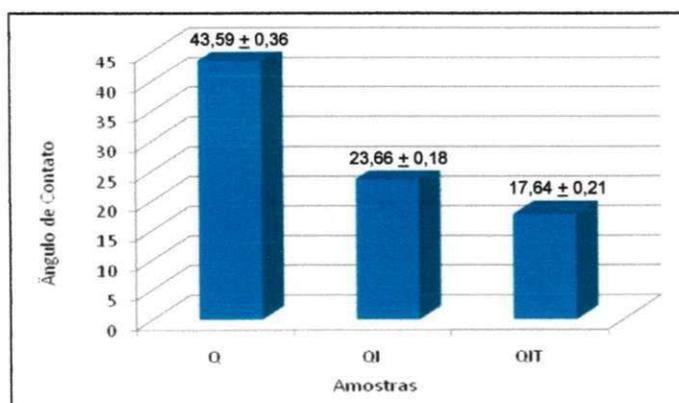
Todas as membranas foram caracterizadas pelas técnicas descritas na metodologia, sendo obtidos os resultados apresentados a seguir.

5.1 Tensão Superficial/Molhabilidade

A Figura 18 ilustra o resultado do teste de tensão superficial das membranas Q, QI e QIT. Foram utilizadas três amostras de cada tipo de membrana e realizadas 5 medições em cada uma delas. Os resultados expressos na Figura 18 foram obtidos a partir da média dos ângulos de contato encontrados nas amostras.

De acordo com os resultados, verifica-se que todas as membranas apresentaram uma medida de ângulo de contato menor que 90° , o que indica hidrofiliicidade. Como as membranas foram confeccionadas para entrar em contato com o corpo humano e liberar a insulina nelas contida, era desejável que elas fossem hidrofílicas mesmo com a via de administração ainda a ser definida.

Figura 18: Medida do ângulo de contato para os diferentes tipos de membranas



Fonte: Arquivo Próprio

Quanto menor o ângulo de contato maior é a hidrofiliicidade do material e os resultados encontrados mostraram que a presença da insulina potencializou o perfil hidrofílico da membrana, com valor de ângulo de contato ($23,66 \pm 0,18$) abaixo da medida do ângulo da membrana de quitosana pura ($43,59 \pm 0,36$), utilizada como

controle. Esses resultados corroboram os encontrados por Lima (2010) em seu estudo sobre a molhabilidade de biofilmes de quitosana com insulina.

Analisando, ainda, os resultados, percebe-se um ângulo de contato mais baixo ($17,64 \pm 0,21$) nas amostras com insulina-tripolifosfato de sódio. O Tripolifosfato de Sódio (TPP) tem sido utilizado como agente reticulante alternativo ao glutaraldeído que é considerado antigênico (CALVO et. al, 1997). Para uso farmacêutico, o TPP, um ânion de baixa massa molar, vem sendo utilizado para reticular a quitosana (BODMEIER; OH; PRAMAR, 1989). Fidèles (2010) analisando a molhabilidade de filmes reticulados de quitosana concluiu que o processo de reticulação aumentou a hidrofiliidade dos filmes quando comparados aos filmes não reticulados, em consonância com os resultados encontrados na presente pesquisa.

Dessa forma, a presença da insulina e do TPP influenciaram a molhabilidade da membrana de quitosana o que corrobora o resultado observado no FTIR a seguir.

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

A técnica de FTIR é proposta em muitas referências como uma maneira possível para investigar a interação entre substâncias. Neste estudo membranas de quitosana (Q), quitosana-insulina (QI) e quitosana-insulina-tripolifosfato de sódio (QIT), foram analisadas por FTIR para observar a possível interação entre os grupos funcionais das moléculas que compõem essas substâncias.

O espectro de infravermelho obtido da amostra de quitosana está apresentado na Figura 19, onde observa-se um pico de absorção em 3331 cm^{-1} . Wang, Du, Liu (2004) e Fidèles (2010) observaram em seus espectros bandas de estiramento entre 3400 a 3500 cm^{-1} e atribuíram a vibrações de estiramentos dos grupos funcionais O-H e/ ou N-H, assim como as ligações de hidrogênio intermoleculares das cadeias do polissacarídeo.

As bandas em 2918 cm^{-1} (menor intensidade) e 2880 cm^{-1} (maior intensidade) são atribuídas às vibrações de estiramento do grupo C-H assimétrico e simétrico, respectivamente. Além disso, uma banda característica da deformação angular do CH_2 aparece na região de 1407 cm^{-1} . As bandas a 1643 cm^{-1} e 1553 cm^{-1} correspondem ao modo de vibração por estiramento da ligação C=O e à deformação da ligação N-H, respectivamente. A existência dessas duas bandas (C=O e N-H),

conjuntamente, indicam a presença de grupos amidas (AROF; OSMAN, 2003), da mesma forma, a banda na região de 1378 cm^{-1} é característica da vibração de deformação angular simétrica dos grupos metil (CH_3) do grupo acetamido (KOLHE, KANNAN, 2003; TORRES et al., 2005), dados que confirmam que a quitosana utilizada neste estudo é um produto parcialmente desacetilado (SIONKOWSKA et al., 2004). As bandas de absorção na região de 1152 e 895 cm^{-1} (estiramento de ligações C-O-C), 1057 e 1027 cm^{-1} (vibrações de estiramento do grupo C-O) são características da estrutura sacarídica da quitosana (MINCHEVA et. al, 2004).

As freqüências vibracionais das bandas e suas atribuições estão resumidas na Tabela 2.

A razão entre as bandas da absorção a 1643 cm^{-1} e 3331 cm^{-1} é indicada por muitos autores para a determinação do grau de desacetilação do biopolímero quitosana (BRUGNEROTTO et al., 2001).

Figura 19: Espectro do FTIR da Membrana de Quitosana.

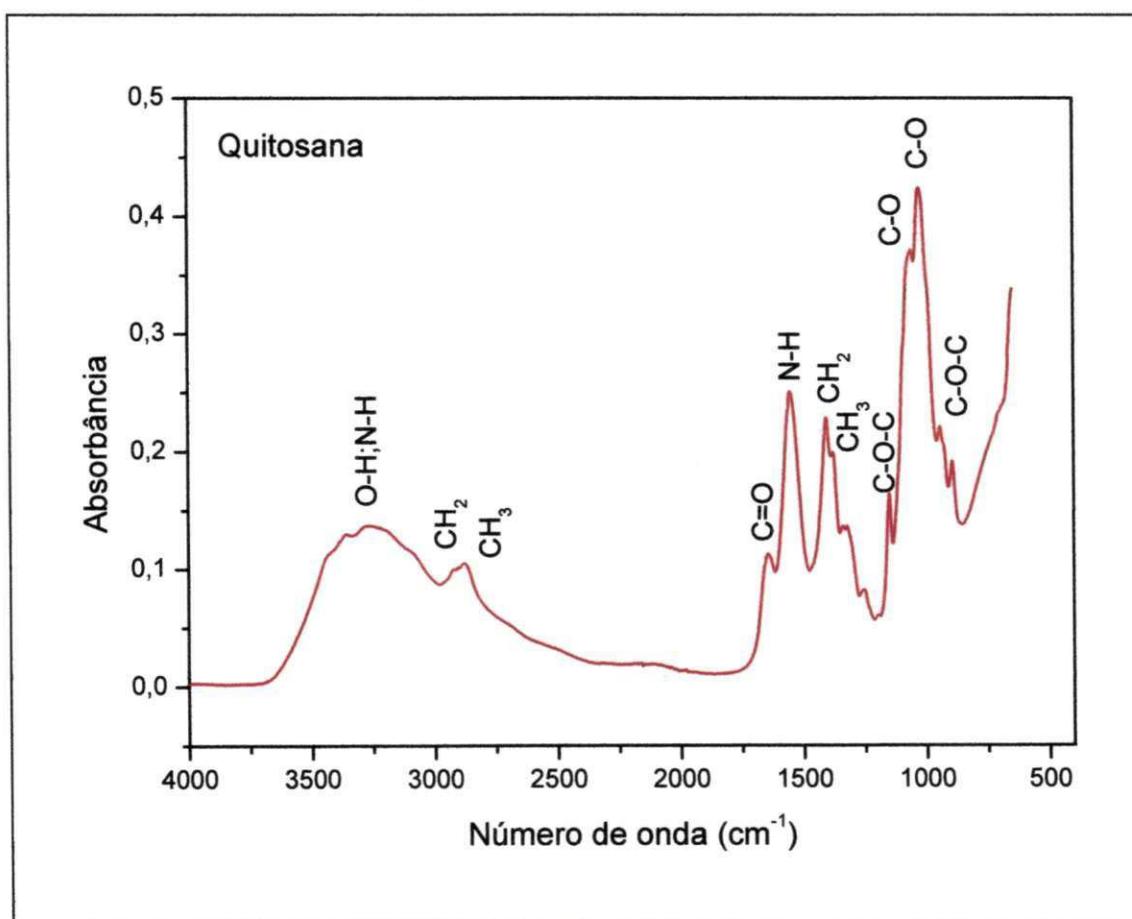
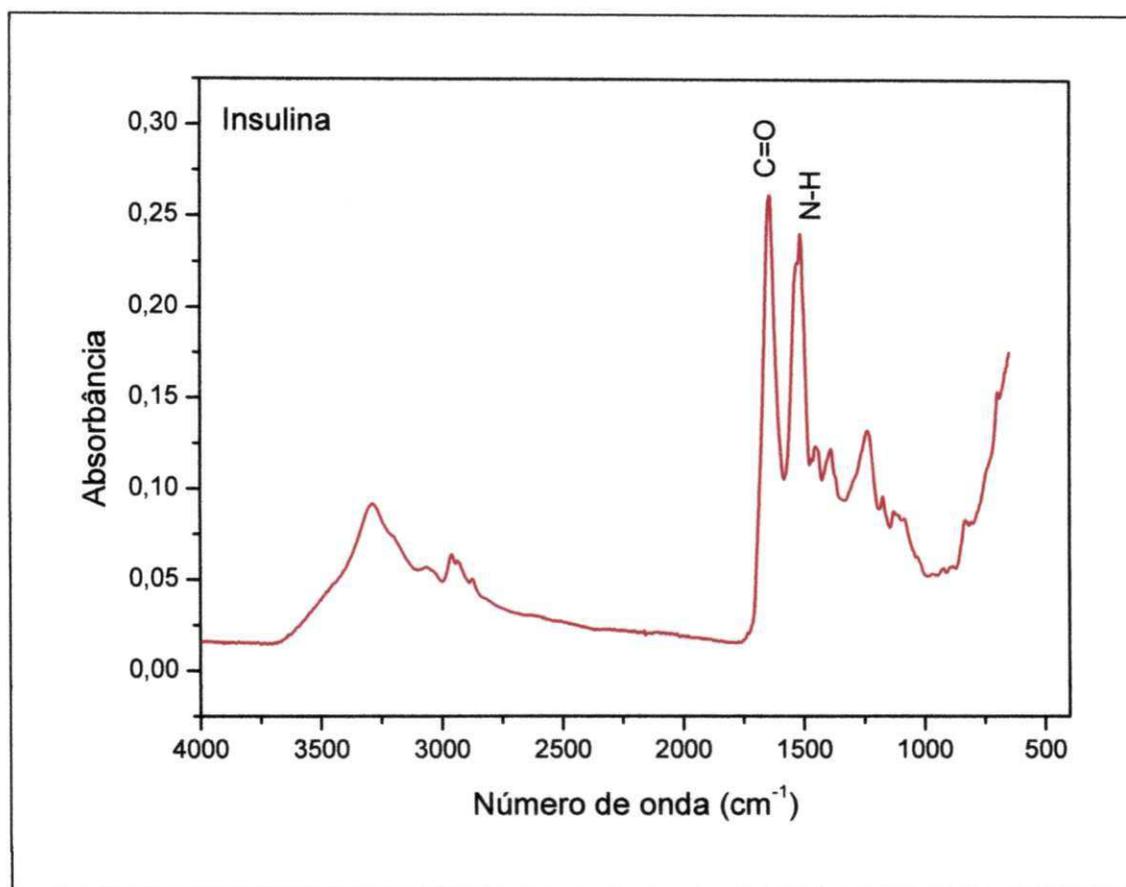


Tabela 2: Atribuições das frequências vibracionais observadas no espectro de FTIR apresentado na Figura 19.

Atribuições	Frequências vibracionais (cm ⁻¹)
OH, N-H	3331
CH ₂	2918
CH ₃	2880
C=O	1643
N-H(Amidas)	1553
CH ₂	1407
CH ₃	1378
ν(C-O-C)	1152
ν(C-O)	1057
ν(C-O)	1027
ν(C-O-C)	895

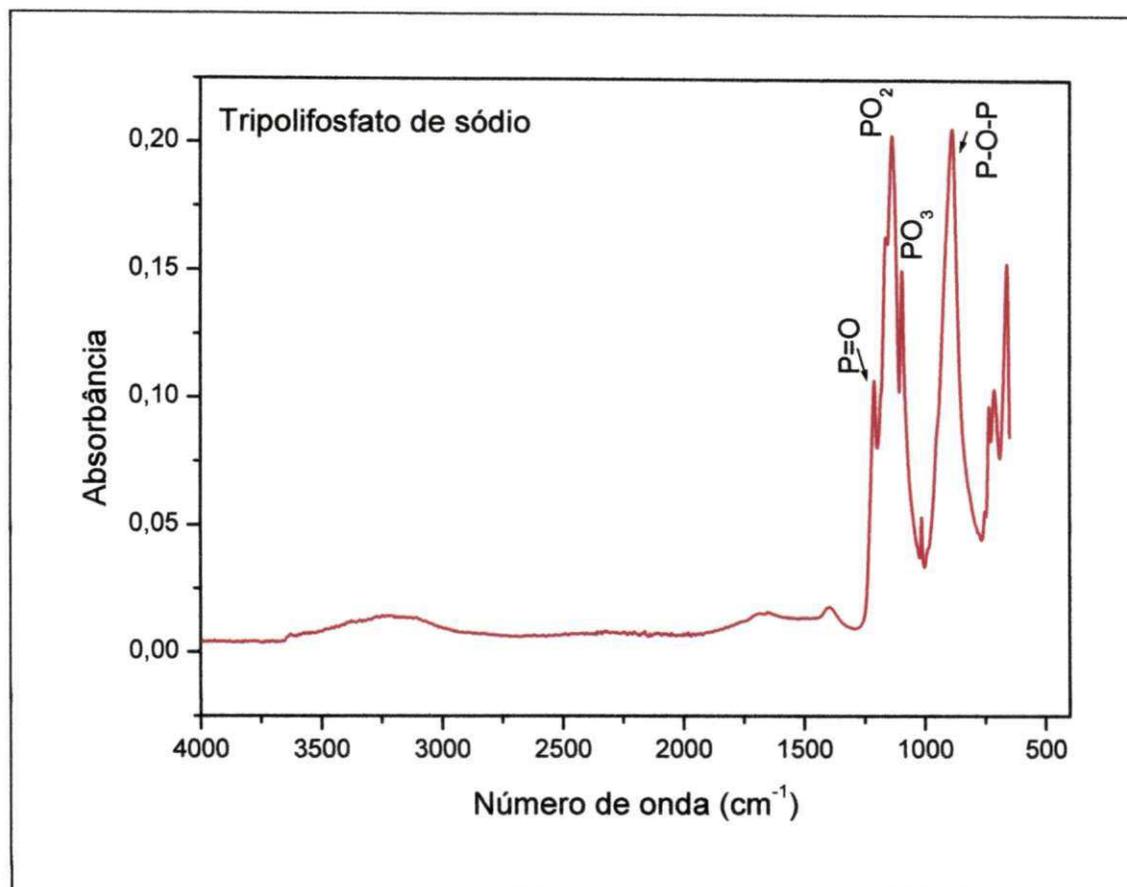
O espectro de FTIR da insulina (Figura 20) revela duas intensas bandas de absorção referentes à amida I em 1642 cm⁻¹ e a amida II em 1512 cm⁻¹. Sarmiento et al (2006) encontraram resultados semelhantes em seu estudo sobre desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de polissacarídeos contendo insulina. No espectro da insulina do referido estudo, bandas em 1650 cm⁻¹ (Amida I) e em 1540 cm⁻¹ (Amida II) foram descritas como bandas características de espectros de proteínas.

Figura 20: Espectro de FTIR da Insulina



Observando-se a Figura 21, referente ao espectro de FTIR do Tripolifosfato de Sódio (TPP), as seguintes bandas características foram percebidas: 1210 cm^{-1} (estiramento $\text{P}=\text{O}$), 1137 cm^{-1} (vibrações de estiramento simétricas e antisimétricas no grupo PO_2), 1095 cm^{-1} (vibrações de estiramento simétricas e antisimétricas no grupo PO_3), 888 cm^{-1} (estiramento antisimétrico $\text{P}-\text{O}-\text{P}$). Esses resultados corroboram os encontrados por Gierszewska-Drużyńska e Ostrowska-Czubenko (2010) em seu estudo sobre o efeito de interações iônicas nas propriedades térmicas de membranas de quitosana. Essas autoras confirmaram a interação entre quitosana e TPP através de FTIR onde as bandas atribuídas ao TPP foram semelhantes às encontradas na presente pesquisa.

Figura 21: Espectro de FTIR do Tripolifosfato de Sódio

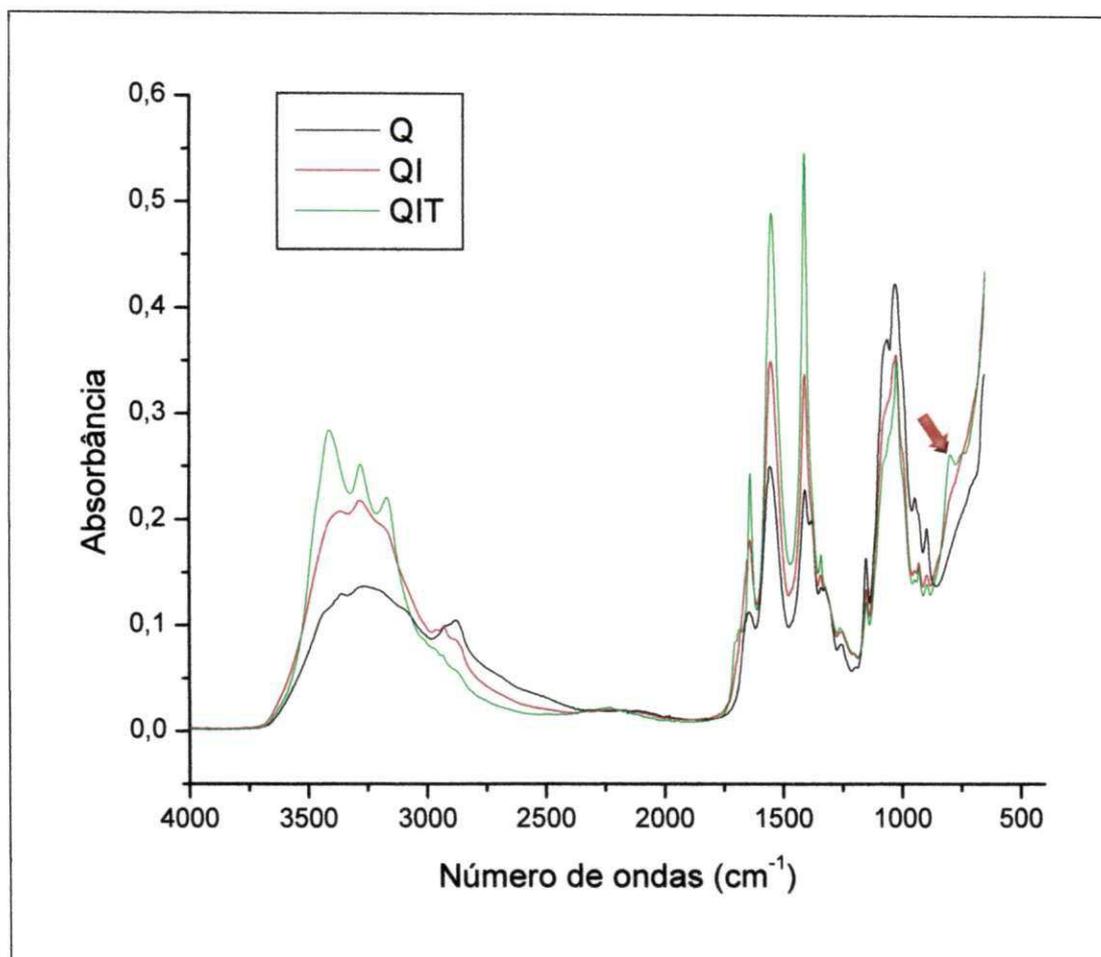


A Figura 22 ilustra o espectro de infravermelho das membranas contendo quitosana (Q), quitosana-insulina (QI) e quitosana-insulina-tripolifosfato (QIT).

Comparando-se os espectros Q e QI percebeu-se, no espectro da quitosana com insulina, para além do aumento da intensidade de absorvância, um discreto deslocamento das bandas características da amida I (1646 cm⁻¹) e da amida II (1555 cm⁻¹). Essas modificações do espectro podem sugerir uma possível interação entre a quitosana e a insulina.

Boonsongrit, Mueller e Mitrejev (2007) estudando a interação entre quitosana e alguns fármacos encontraram, nos espectros de FTIR de micropartículas de quitosana-insulina, 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 a interação entre a quitosana e a insulina.

Figura 22: Espectro FTIR das Membranas Q, QI e QIT.



No espectro da membrana contendo insulina foi observada uma alteração no valor da intensidade de absorvância da banda na faixa 3331 cm^{-1} , quando comparado à membrana de quitosana sem insulina. Este evento pode estar relacionado ao fato de que a insulina contém os mesmos grupos funcionais nesta faixa de absorvância, ocorrendo assim, aumento na intensidade desta banda devido ao aumento da concentração de grupos OH. Igualmente, deve-se destacar que, nas condições deste experimento, não houve inibição do modo de vibração do grupo funcional hidroxila. Resultado semelhante foi encontrado no estudo de Lima (2010) onde se constatou um aumento da intensidade de absorção dos picos referentes aos grupos funcionais comuns à quitosana e à insulina nos biofilmes analisados.

Observou-se no espectro de quitosana-insulina-tripolifosfato (Figura 22) um aumento na absorvância entre 3000-3500 cm^{-1} com alteração do perfil na região 3412 cm^{-1} . Certamente estes resultados podem estar associados ao efeito

reticulante iônico do agente reticulante utilizado que determinou uma alteração no modo de vibração do grupo OH e indicou uma vibração específica do grupo NH₂.

Observou-se, também, um aumento na intensidade das bandas em 1639, 1547 e 1409 cm⁻¹, possivelmente em virtude da interação entre a quitosana, a insulina e o tripolifosfato. Wu et. al (2005) analisando nanopartículas de quitosana com Tripolifosfato encontraram resultados semelhantes e concluíram que os grupos tripolifosfato do TPP foram ligados com os grupos amônio da quitosana. Percebeu-se, ainda, uma banda em 794 cm⁻¹ característica do TPP. Talvez em virtude da baixa concentração de TPP utilizada no estudo, observou-se a ausência de uma banda na região de ~1220cm⁻¹ (P=O do TPP), relatada por Gierszewska-Drużyńska; Ostrowska-Czubenko (2010) e Pieróg et al (2009).

5.2.1 Cálculo do grau de desacetilação (GD) da quitosana

O grau de desacetilação da quitosana calculado pela técnica de FTIR está apresentado na Tabela 3.

Tabela 3: Grau de desacetilação (GD) da quitosana em ar (25°C) calculado pela técnica de FTIR.

Condições	Temperatura °C	GD (%)
Ar atmosférico	25	80,4

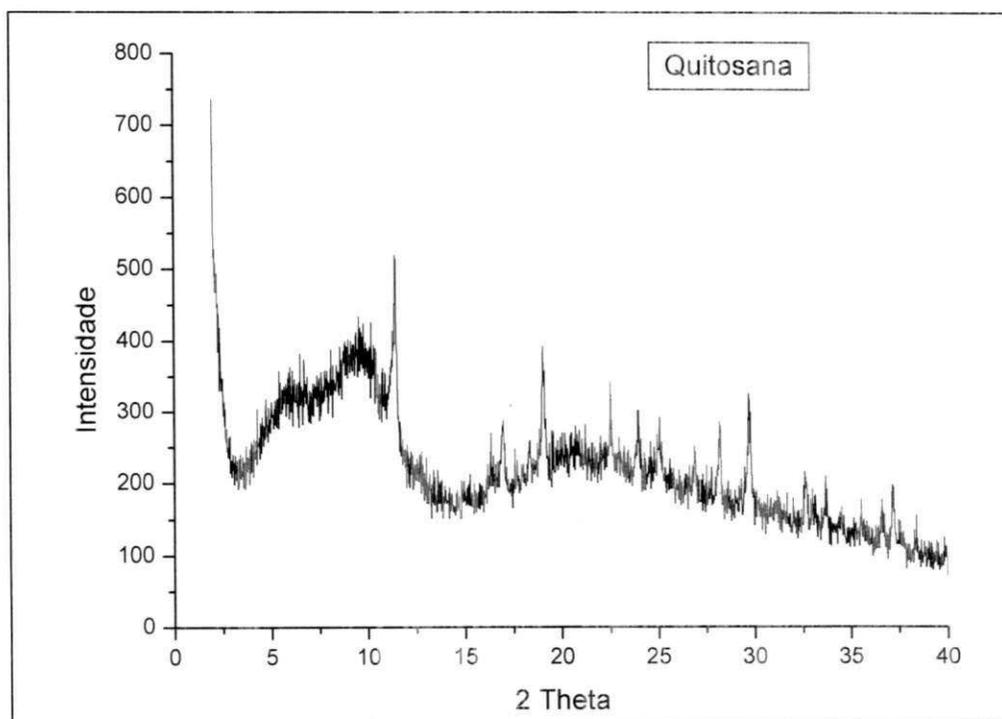
O GD da quitosana obtido confirma o valor declarado pelo fornecedor (75-85%). O grau de desacetilação (GD), que indica os grupos amina livres ao longo da cadeia de quitosana, é um parâmetro chave que muda a suas propriedades físico-químicas, tais como solubilidade, conformação de cadeia e propriedades eletrostáticas (JAYAKUMAR et al., 2011).

Um alto grau de desacetilação da quitosana, isto é, maior número de grupos amina catiônicos, proporciona um ambiente adequado para a adesão celular. A viabilidade de fibroblastos nos *scaffolds* de quitosana com diferentes graus de desacetilação foi investigado. Um aumento significativo no número de células foi observado em *scaffolds* de quitosana com GD acima de 80% (ZHANG et al., 2002).

5.3 Espectroscopia por Difração de Raios X

O difratograma de Raios X obtido da membrana de quitosana está apresentado na Figura 23. Observou-se um comportamento típico de polímeros semicristalinos, com picos de bases largas iniciados entre 7° e 10° e entre 17° e 20° , condizentes com os difratogramas apresentados por Barbosa (2011), Lima (2010), Fidéles (2010), Baskar; Kumar (2009) e Campana Filho et al.(2007).

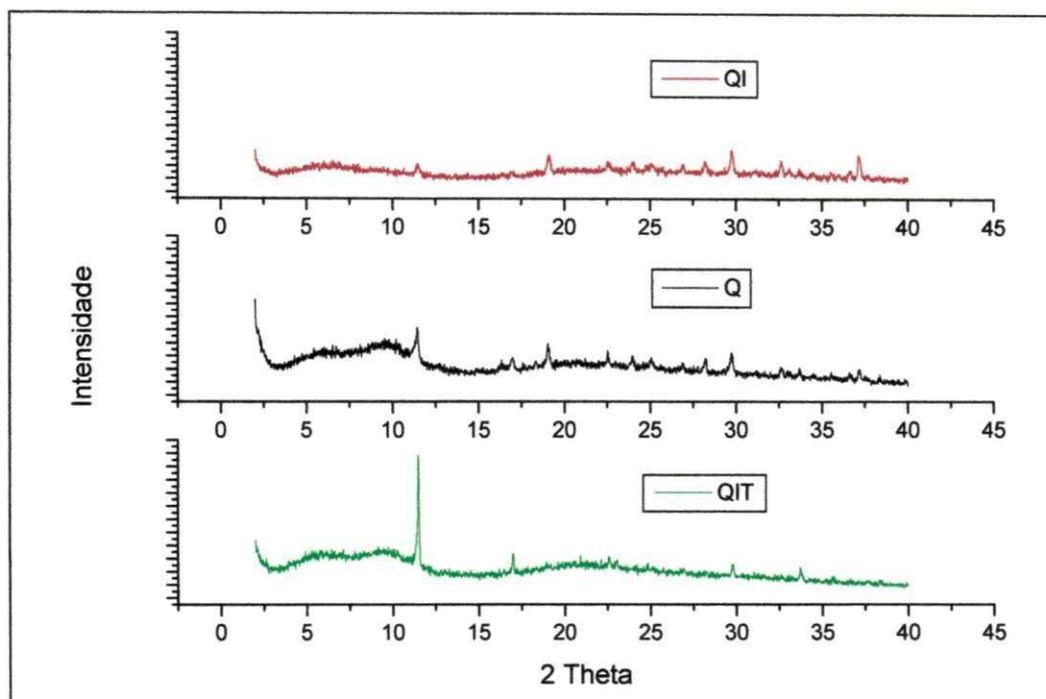
Figura 23: Difratograma de Raios X da membrana de quitosana.



A quitosana possui um perfil semicristalino devido às 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. Essas fortes interações fornecem certa organização à estrutura cristalina da quitosana (URAGAMI; TOKURA, 2006).

A Figura 24 ilustra os difratogramas das membranas contendo quitosana (Q), quitosana-insulina (QI) e quitosana-insulina-tripolifosfato (QIT).

Figura 24: Difractogramas de Raios X das Membranas Q, QI e QIT.



Ao analisar a Figura 24 notou-se que a presença da insulina diminuiu discretamente a cristalinidade da quitosana, tornando a membrana mais amorfa quando comparada à de quitosana pura. Dados semelhantes foram encontrados por Lima (2010). Já na membrana contendo tripolifosfato ocorreu um discreto aumento na cristalinidade com pico característico em $2\theta=12^\circ$ que pode ser atribuído à cristalinidade do sal (Tripolifosfato). O Tripolifosfato funciona como agente reticulante iônico e as reticulações iônicas são caracterizadas por produzir ligações reversíveis. O discreto aumento na cristalinidade da membrana conduz a um espectro similar ao da membrana de quitosana pura. Dado igualmente relatado por Fidèles (2010) em seu estudo sobre filmes de quitosana reticulados ionicamente com ácido sulfúrico para aplicação como biomaterial.

O ensaio de DRX confirmou a interação química ocorrida entre a quitosana, a insulina e o TPP, observada no ensaio de FTIR.

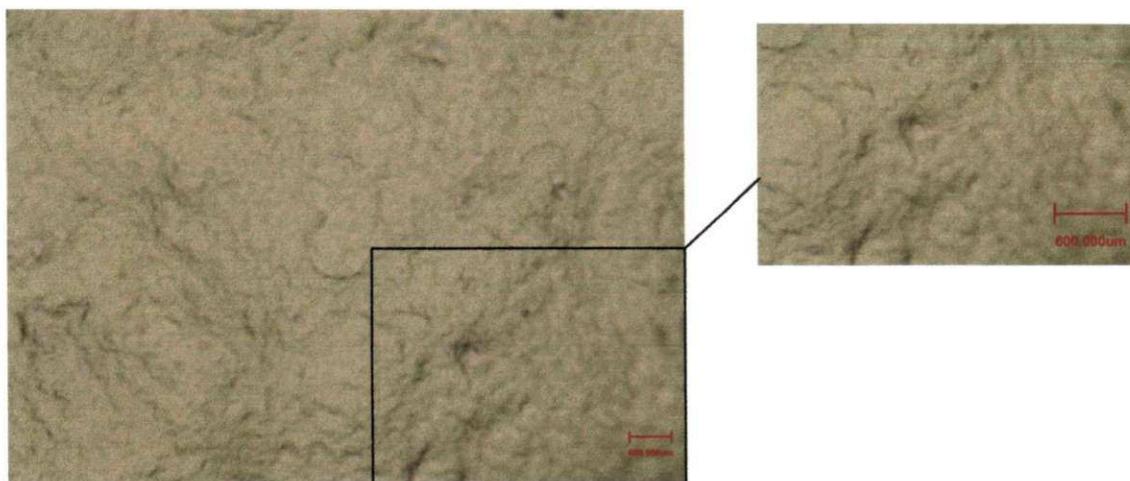
5.4 Microscopia Óptica

As Figuras 25, 26 e 27 apresentam as imagens da microscopia óptica das membranas de Quitosana, Quitosana com insulina (QI) e Quitosana com Insulina e

tripolifosfato (QIT), respectivamente. Ressalta-se ao lado de cada imagem um destaque para melhor visualização da escala de aumento.

Ao analisar a Figura 25, percebeu-se uma morfologia homogênea, típica de um filme polimérico.

Figura 25: Microscopia Óptica da Membrana Q x 1750.



Observando-se a membrana com a incorporação da insulina (Figura 26), constata-se a dispersão de uma nova fase, na matriz de quitosana, com forma regular que pode ser atribuída à presença da insulina.

Figura 26: Microscopia Óptica da Membrana QI x1750.

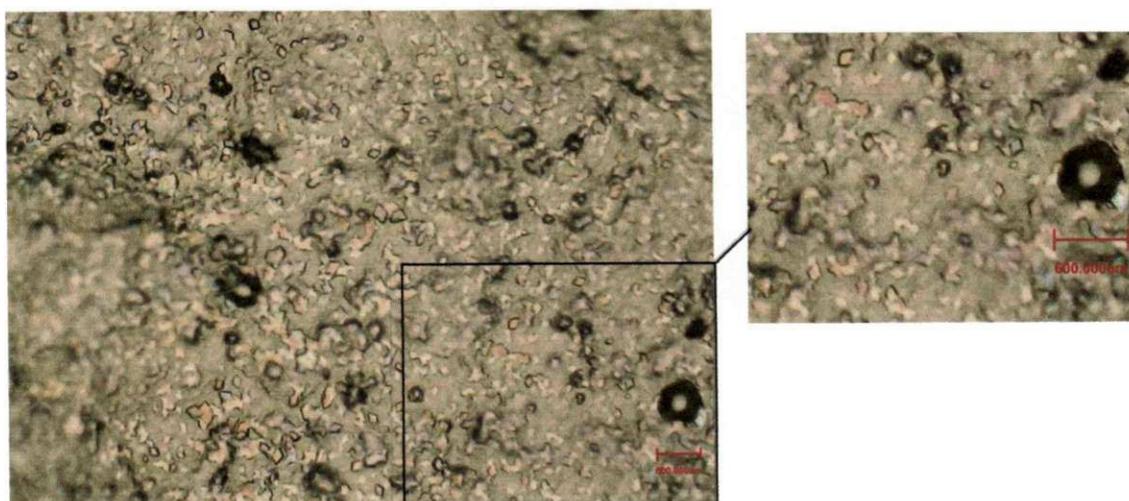
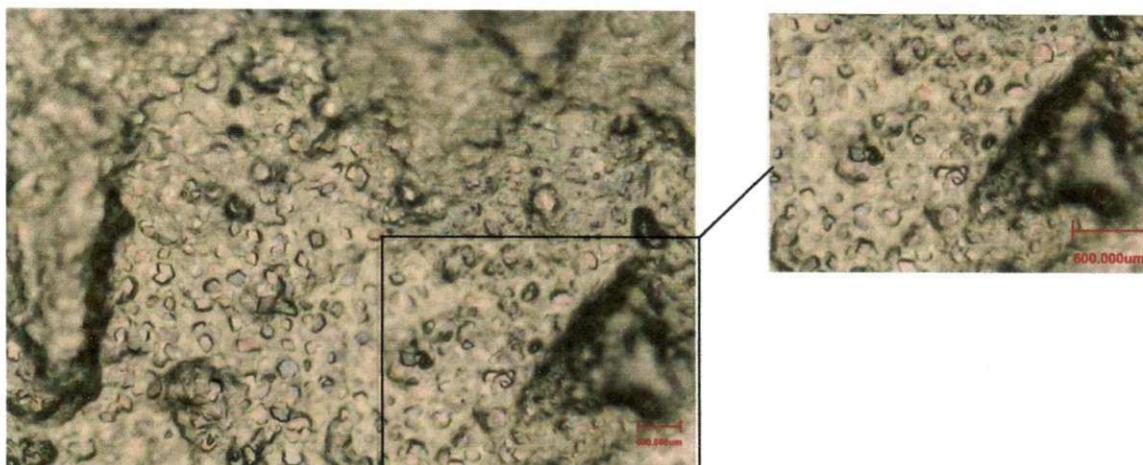


Figura 27: Microscopia Óptica da Membrana QIT X1750.

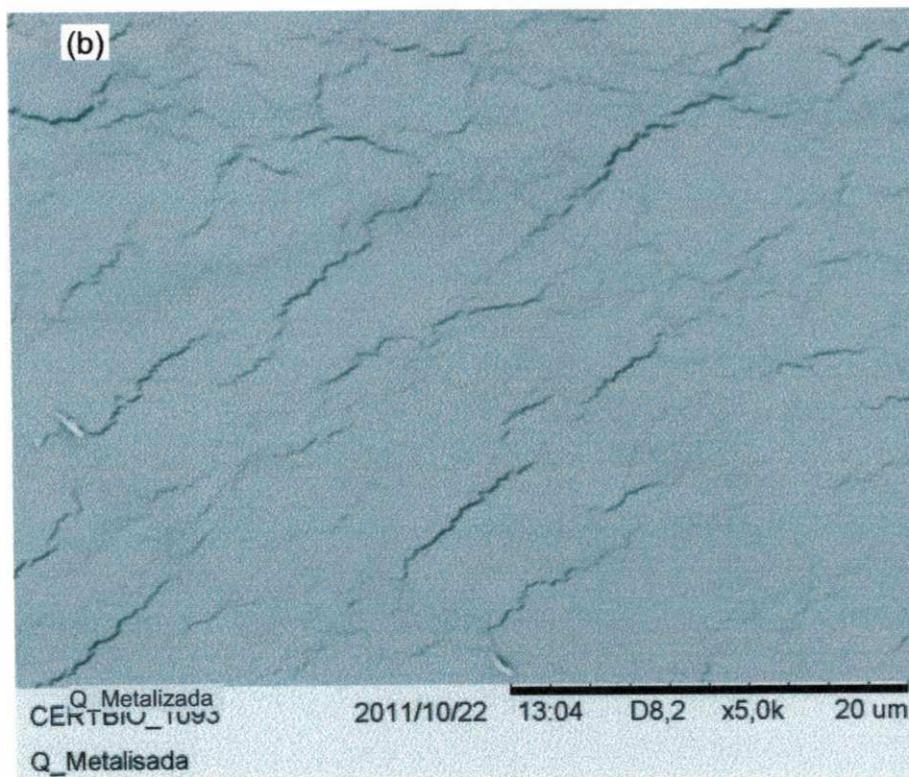
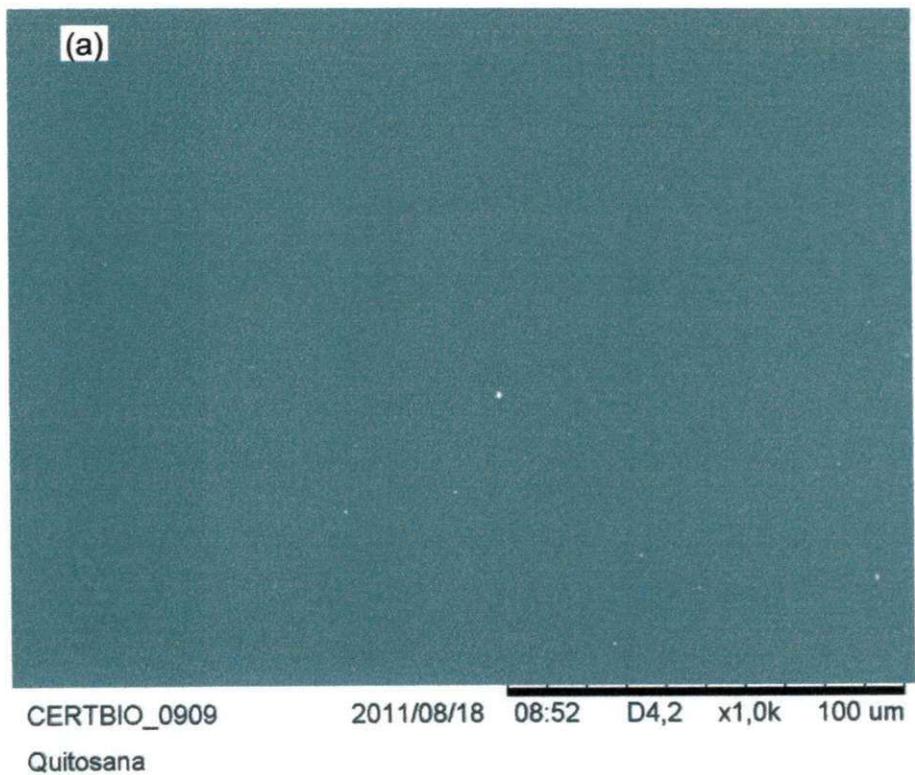


Na Figura 27, a incorporação do agente reticulante (Tripolifosfato de Sódio) sugere a mesma morfologia da condição quitosana/insulina e mesmo de forma tênue, percebe-se uma formação de grãos maiores e com contornos mais nítidos, provavelmente devido ao aumento da viscosidade da solução quando da incorporação do Tripolifosfato.

5.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDX)

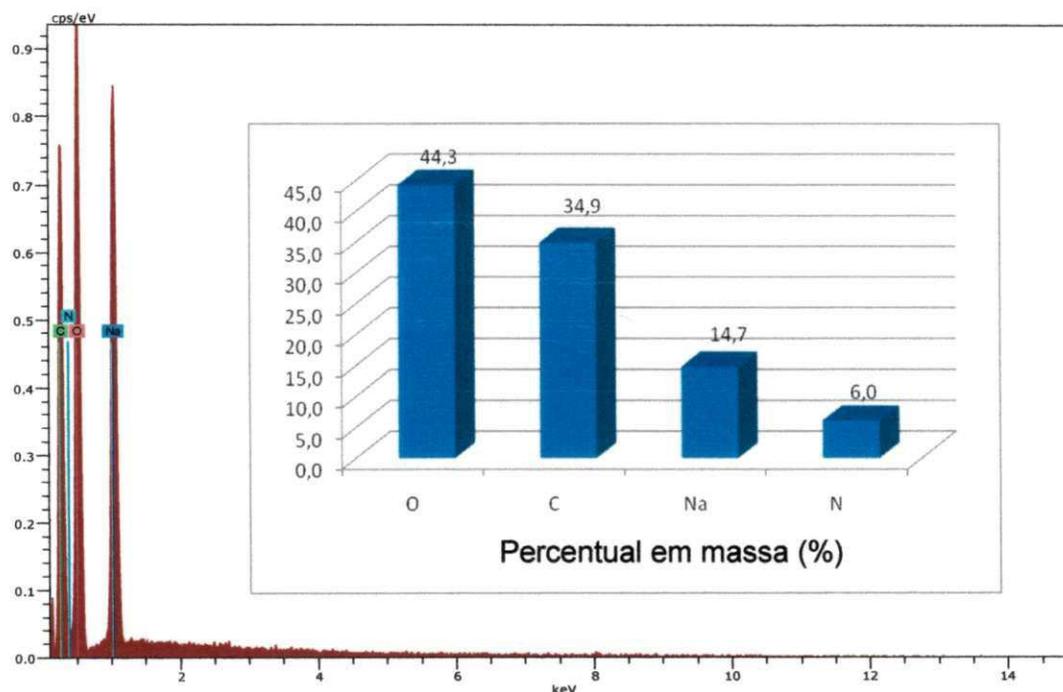
Ao analisar a morfologia da membrana de quitosana pura (Figura 28 a), sem a introdução de insulina, observa-se uma superfície uniforme, lisa e plana, sem a presença de poros visíveis, caracterizando as membranas como densas. Lima (2010); Fidèles (2010); Marreco et. al (2004) e Dallan (2005) estudaram a morfologia de filmes de quitosana e encontraram, igualmente, uma superfície plana e densa. Ressalte-se que a membrana de quitosana, apresentada na Figura 28 b, foi metalizada antes desta análise numa tentativa de melhorar a visualização. Percebeu-se, após a metalização, a orientação molecular no sentido das cadeias do polímero. Certamente, essa orientação, ocorreu em virtude da técnica utilizada para secagem da membrana em placa de Petri, conforme descrita na metodologia desta pesquisa.

Figura 28: MEV da Membrana de Quitosana a) 1000 X, b) 5000X.



Na Figura 29 observa-se, no espectro de EDX, a presença dos elementos O, C, N próprios da membrana de quitosana, além do Na provavelmente resquício do processo de neutralização.

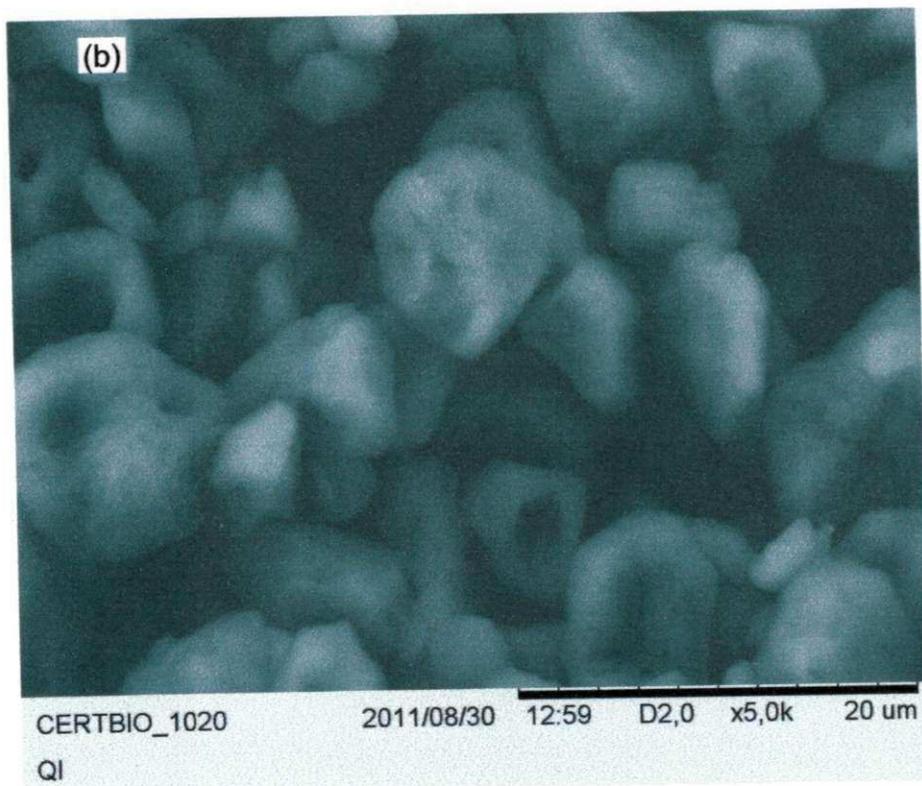
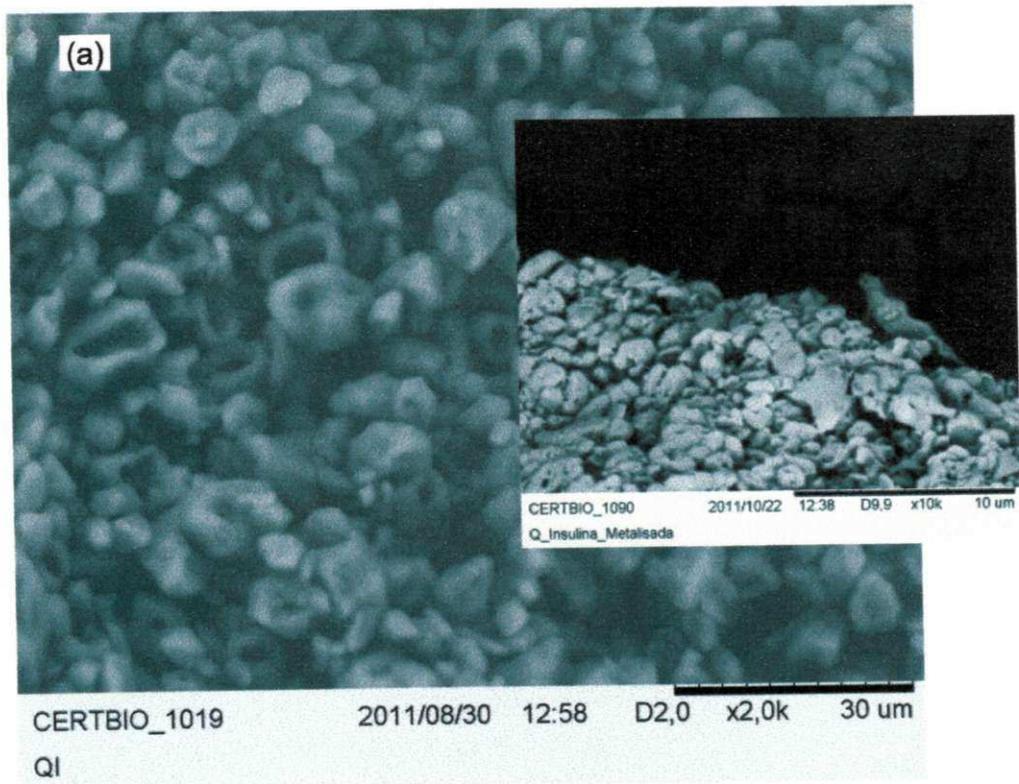
Figura 29: EDX e Percentual de Massa da Membrana de Quitosana.



Ao se introduzir a insulina na membrana de quitosana (Figura 30 a e b), percebeu-se a presença de partículas granulares de tamanhos variados. A presença da insulina pode ser atribuída a uma atividade química suficiente para formação de aglomerados cuja morfologia diferenciou-se da estrutura deste polímero isoladamente. Esse fenômeno pode ser associado a um tipo de encapsulamento.

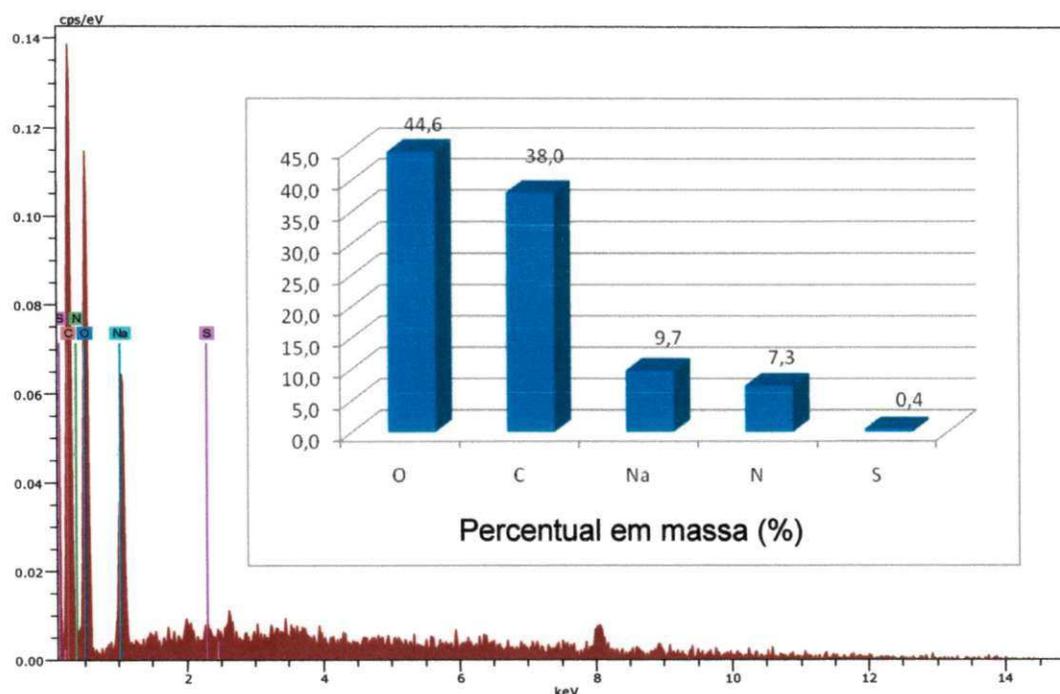
Salienta-se que a micrografia de menor dimensão associada a imagem (a) refere-se à seção transversal da membrana (QI) metalizada com aumento de 10000X.

Figura 30: MEV da Membrana QI a) 2000 X, b) 5000X.



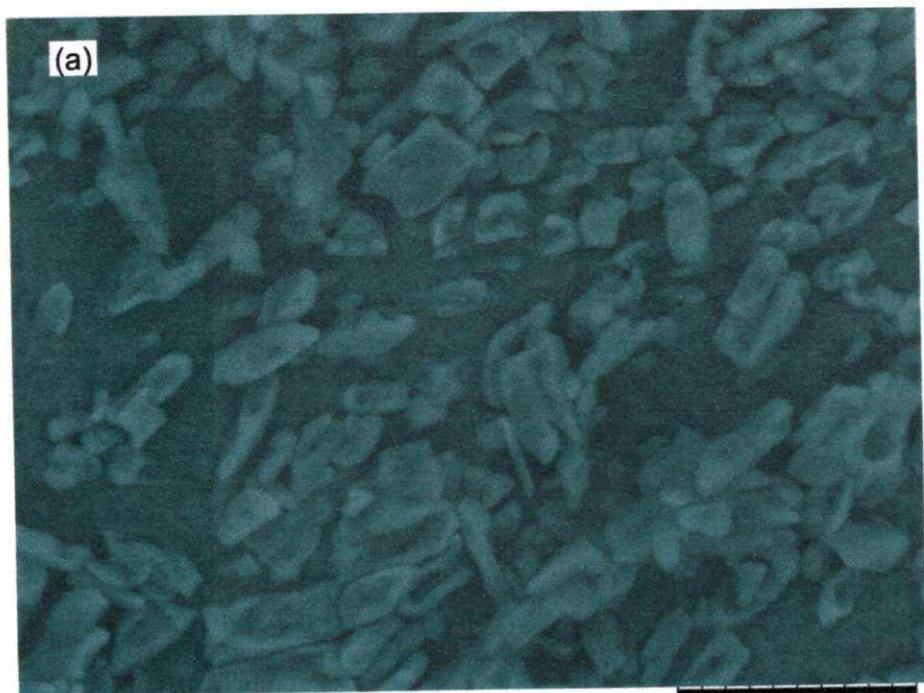
Na análise química pontual obtida por EDX (Figura 31), constatou-se a alteração da composição química da membrana. Esta análise elemental, demonstrou ainda, a presença da insulina devido ao elemento químico enxofre.

Figura 31: EDX e Percentual de Massa da Membrana QI.

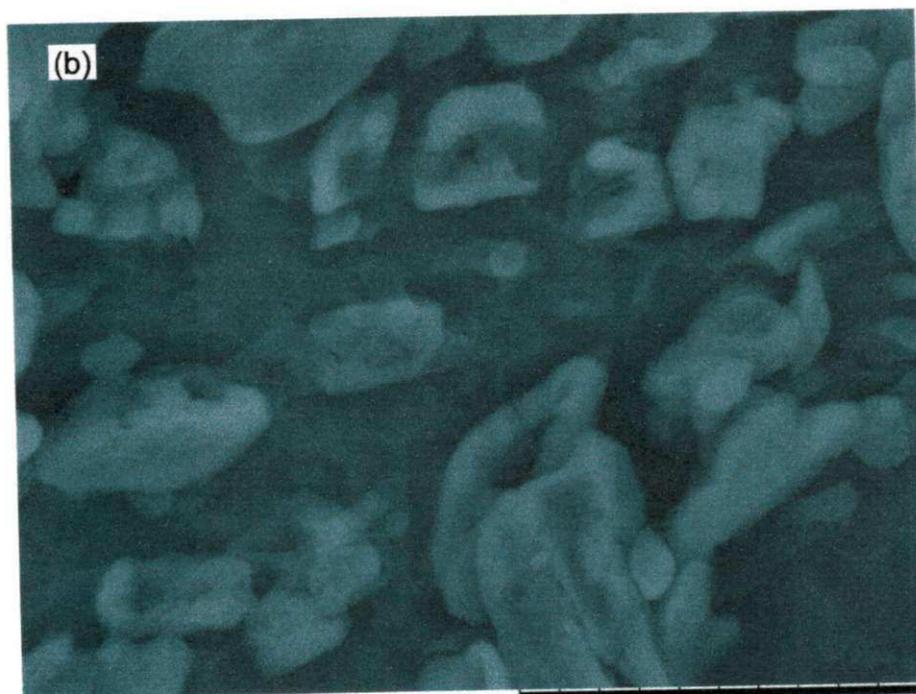


A micrografia da membrana de quitosana com a introdução tripolifosfato de sódio (TPP) e da insulina está representada na Figura 32. Constatou-se uma morfologia em forma de bastões de tamanhos variados e distribuídos em toda superfície da membrana. Certamente essa alteração na morfologia, quando comparada as micrografias apresentadas nas Figuras 28 e 30, pode ser atribuída, ao fenômeno de reticulação ocorrido primeiramente entre as cadeias de quitosana e do TPP. Dessa forma, a associação do elemento de reticulação e da insulina alterou a morfologia da membrana de quitosana. Destaca-se na análise por EDX (Figura 33) a presença do fósforo (P) e do enxofre (S).

Figura 32: MEV da Membrana QIT a) 2000 X, b) 5000X.

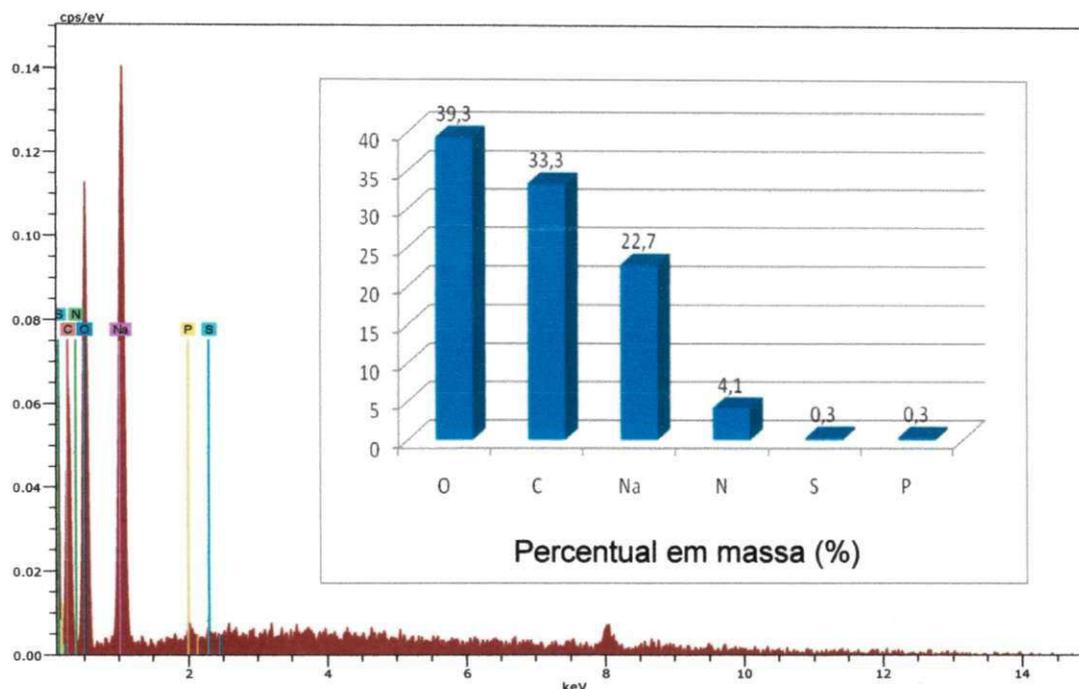


CERTBIO_1016 2011/08/30 12:41 D7,4 x2,0k 30 um
QIT



CERTBIO_1017 2011/08/30 12:42 D7,3 x5,0k 20 um
QIT

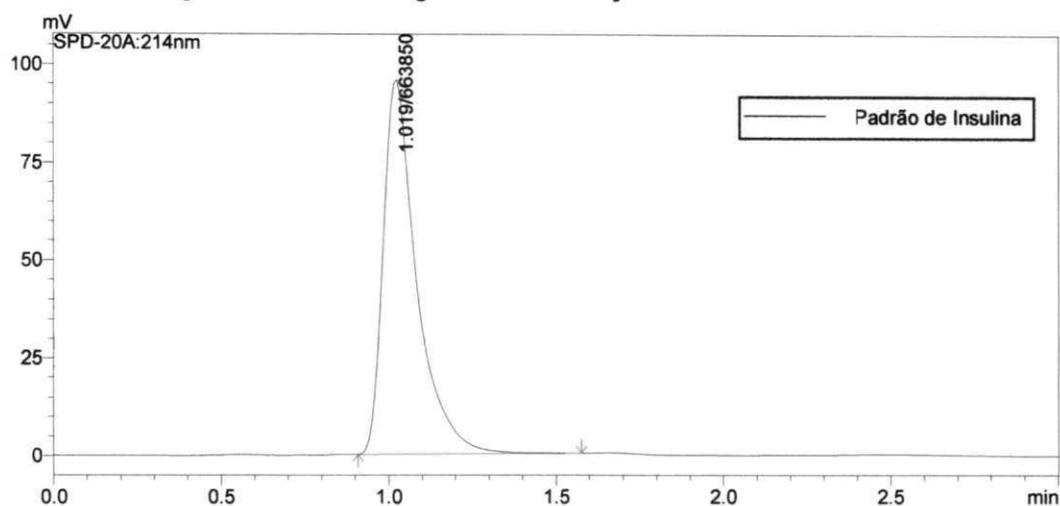
Figura 33: EDX e Percentual de Massa da Membrana QIT.



5.6 Avaliação do Ensaio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

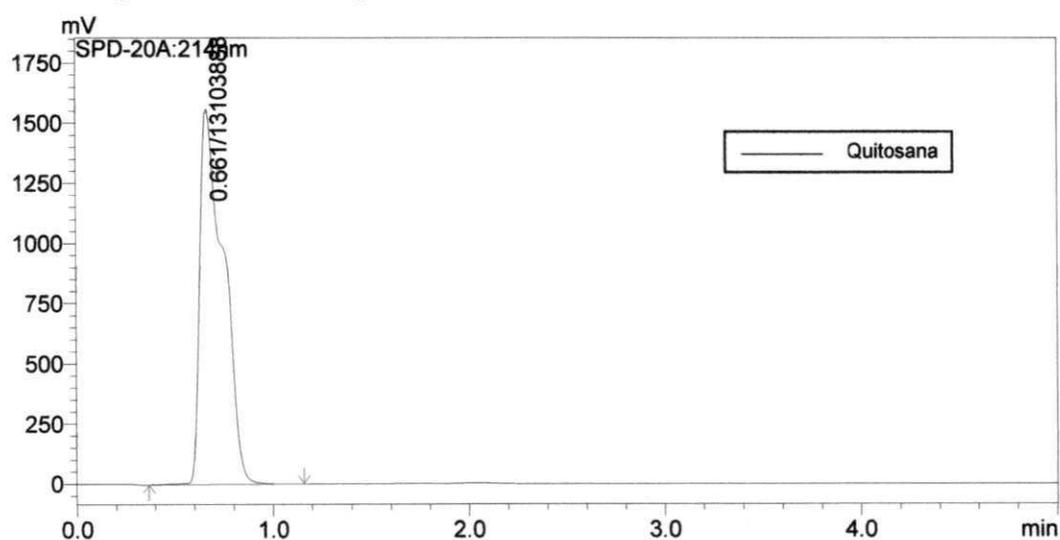
O objetivo desse ensaio foi detectar, qualitativamente, a presença da insulina na solução tampão sulfato de sódio, após a separação desta substância da membrana de quitosana sem reticulação e reticulada pelo Tripolifosfato de Sódio (TPP). Foi utilizada uma solução padrão de insulina em pó (2mg/ml) diluída na fase móvel, Acetonitrila: Tampão de Sulfato de Sódio (30:70 v/v), baseada na metodologia proposta por Xua et.al.(2006) e Yilmaz; Kadioglu (2010). Pela técnica de CLAE, a solução de insulina apresentou um pico único característico da insulina, sem arrastamento e com Tempo de Retenção (T_r) de 1,02 minutos conforme ilustra a Figura 34. Essa análise foi feita em triplicata e apresentou boa reprodutibilidade e, por essa razão, apenas um dos ensaios se encontra graficamente representado.

Figura 34: Cromatograma da Solução Padrão de Insulina



O cromatograma apresentado na Figura 35 foi resultante da análise do sobrenadante da solução tampão Sulfato de Sódio previamente agitada com a membrana contendo apenas quitosana (grupo controle). Percebeu-se um pico único com tempo de retenção de 0,66 minuto.

Figura 35: Cromatograma da Membrana de Quitosana sem insulina



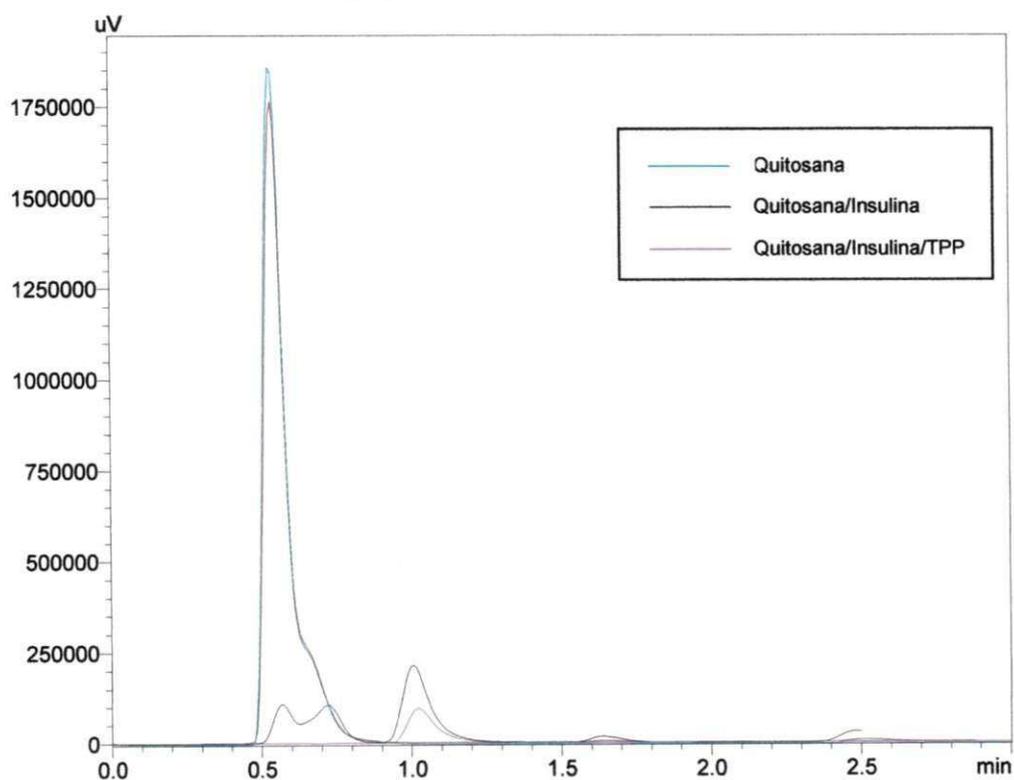
De acordo com Martins (2007) a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) pode ser utilizada para a identificação de compostos, comparando-se a

amostra a um padrão de referência, através de seu tempo de retenção. Essa orientação foi seguida nesta pesquisa.

A Figura 36 ilustra os cromatogramas dos sobrenadantes das membranas de quitosana, quitosana com insulina e quitosana reticulada pelo tripolifosfato com insulina.

Observou-se na região entre 0,5 e 0,8 minuto picos característicos da quitosana sobrepostos. Percebeu-se, também, que a insulina separada das duas outras formulações testadas (picos preto e rosa) apresentou um tempo de retenção de aproximadamente 1(un) minuto, idêntico ao do padrão de insulina, o que sugere que a insulina foi identificada e separada da membrana de quitosana sem sofrer alteração estrutural. Ressalte-se, ainda, que o pico rosa de menor tamanho corresponde a insulina liberada com dificuldade da membrana de quitosana reticulada pelo TPP.

Figura 36: Cromatograma das Membranas de Quitosana ,Quitosana com insulina e Quitosana/TPP com insulina



5.7 Biodegradação Enzimática

De acordo com Dallan (2005) a degradação de um biomaterial em meios biológicos é uma das variáveis de grande relevância para sua caracterização, já que tal propriedade está diretamente relacionada ao tempo de vida útil dos materiais após o início de sua utilização pelo paciente. Dessa forma, o objetivo deste ensaio foi observar a ação da solução tampão fosfato (PBS) sem e com lisozima no processo de degradação das membranas de quitosana nas diversas condições pesquisadas. Para esta avaliação foi considerada a perda de massa no período de 7 dias, das amostras degradadas como apresentado na Tabela 4.

Comparando-se os valores obtidos com a degradação enzimática das membranas quando da exposição ao tampão PBS e à lisozima/PBS no período de 7 dias (Tabela 4), percebeu-se que, em todas as amostras, a degradação foi mais intensa sob a ação da lisozima, o que indica a eficiência desta enzima na degradação da quitosana.

Tabela 4: Perda de massa percentual das membranas de Quitosana (Q), Quitosana/Insulina (QI) e Quitosana/Insulina/TPP (QIT) submetidos a ensaio de biodegradação e seus respectivos desvios padrão.

Ensaio	Perda de massa das membranas 7 dias de ensaio			
	PBS (pH= 7,0)		Lisozima/PBS (pH= 7,3)	
	Média (%)	D. Padrão	Média (%)	D. Padrão
Quitosana (Q)	0,536	0,006	0,824	0,010
Quitosana/Insulina (QI)	0,848	0,003	1,474	0,009
Quitosana/Insulina/TPP (QIT)	0,554	0,007	1,228	0,008

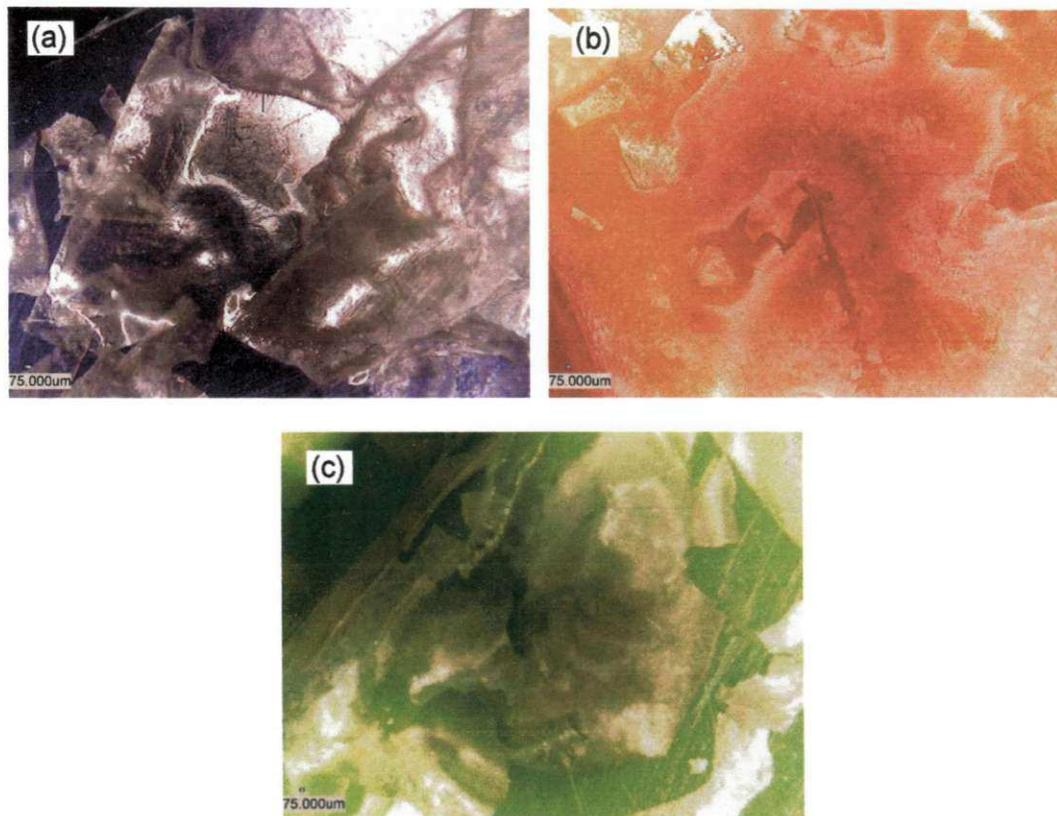
A lisozima é uma das enzimas responsáveis pela degradação da quitosana. Essa degradabilidade é dependente, dentre outros fatores, do grau de desacetilação da quitosana, uma vez que a lisozima se liga aos grupamentos N-acetilglicosamina presentes na estrutura deste polissacarídeo (SUH; MATTHEW, 2000). Estes grupamentos apresentam um papel fundamental no reconhecimento da quitosana como substrato para a lisozima (KURITA et al , 2000).

Ponciano (2010) em seu estudo sobre as propriedades de membranas de quitosana obtidas com diferentes níveis de orientação molecular, concluiu que a velocidade de degradação da quitosana é inversamente proporcional ao seu grau de desacetilação e cristalinidade. Como na presente pesquisa foi utilizado apenas um tipo de quitosana com um mesmo grau de desacetilação, essa variável não pôde ser considerada. No entanto, corroborando os estudos de Ponciano (2010) e revendo o ensaio de DRX, as membranas (Q e QIT) com maior cristalinidade sofreram a menor degradação seja quando expostas apenas a solução PBS ou ao PBS com a Lisozima. A membrana mais amorfa (QI) foi a que apresentou a maior degradabilidade. Dessa forma, o tripolifosfato de sódio pode ser utilizado para controlar a velocidade de degradação da membrana de quitosana e consequentemente a velocidade de liberação da insulina presente nessa membrana.

Os resultados deste ensaio demonstraram, também, que seja na presença apenas do PBS ou com a Lisozima, o efeito biodegradante nas membranas, foi potencializado pela insulina. Quando se comparou as membranas Q e QI percebeu-se que a biodegradação foi maior na membrana QI nas duas condições estudadas. Comparando-se, posteriormente, as membranas QI e QIT constatou-se o efeito reticulante do tripolifosfato (TPP) na quitosana com uma menor perda de massa na membrana QIT, porém, quando se comparou as membranas Q e QIT, a degradação foi maior na membrana QIT mesmo na presença do agente reticulante (TPP), fato que comprova o efeito potencializador da insulina no processo de biodegradação das membranas. Esses dados corroboram os encontrados por Lima (2010) cujos biofilmes desenvolvidos que continham insulina também apresentaram maior degradação.

As membranas referentes ao 2º lote (14 dias), não puderam ser analisadas, em relação à perda de massa, pois, nas duas condições (expostas apenas ao PBS e expostas ao PBS/Lisozima) estavam quase que completamente degradadas ao final desse tempo, conforme pode ser observado na Figura 37.

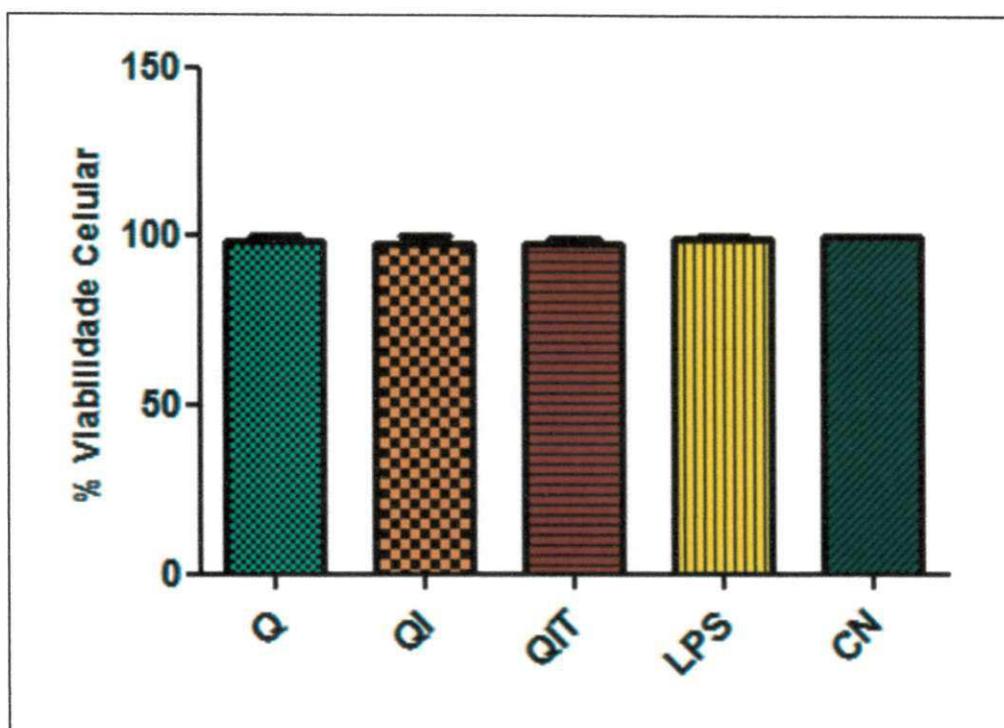
Figura 37: Microscopia Óptica de Membranas Degradadas 20 X a) Quitosana, b) Quitosana/Insulina e c) Quitosana/Insulina/TPP



5.8 Avaliação da Viabilidade Celular dos Macrófagos

O objetivo deste ensaio foi avaliar a viabilidade das células em face do material produzido para uso em organismos vivos. A Figura 38 ilustra o resultado deste teste.

Figura 38: Viabilidade de macrófagos de camundongos Swis na presença das membranas. Q - Quitosana, QI – Quitosana/Insulina, QIT - Quitosana/Insulina/TPP, LPS – controle positivo e CN – controle negativo



As células em meio de cultura (RPMI-16400) foram utilizadas como controle, equivalendo a 100% de viabilidade e estão representadas na última coluna (CN = controle negativo). A coluna LPS diz respeito a um teste efetuado com lipopolissacarídeo (LPS) com o objetivo de comprovar a viabilidade das células utilizadas.

O LPS é uma endotoxina da qual é constituída a membrana exterior de bactérias gram-negativas, protegendo a membrana de certos tipos de ataque químico. Essa endotoxina provoca uma forte resposta por parte de sistemas imunitários em animais normais (ESTRELA; PÉCOR, 1997).

Os resultados expressos na Figura 38 foram obtidos através da média \pm desvio padrão de 6 animais e 3 membranas de cada composição por animal.

Comparando-se com um valor mínimo de 50% requerido para o teste de citotoxicidade de acordo com Bispo (2009), os resultados ilustrados na Figura 38 demonstram que as membranas Q, QI e QIT, colunas 1, 2 e 3 respectivamente, submetidas a análise neste ensaio, apresentaram viabilidade para serem utilizadas como biomaterial uma vez que as amostras exibiram comportamentos semelhantes

entre si, sendo equivalentes ao controle negativo e os valores obtidos encontraram-se acima de 90%.

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* é considerado o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade dos materiais usados na área de saúde e após ser comprovada a sua não toxicidade é que pode ser dada continuidade aos estudos realizando-se os ensaios necessários em animais de laboratório (DAGUANO; SANTOS; ROGERO, 2007). Dessa forma, a partir dos resultados obtidos, na presente pesquisa, pode-se inferir que todas as membranas produzidas mostraram-se promissoras para serem testadas em ensaios *in vivo*.

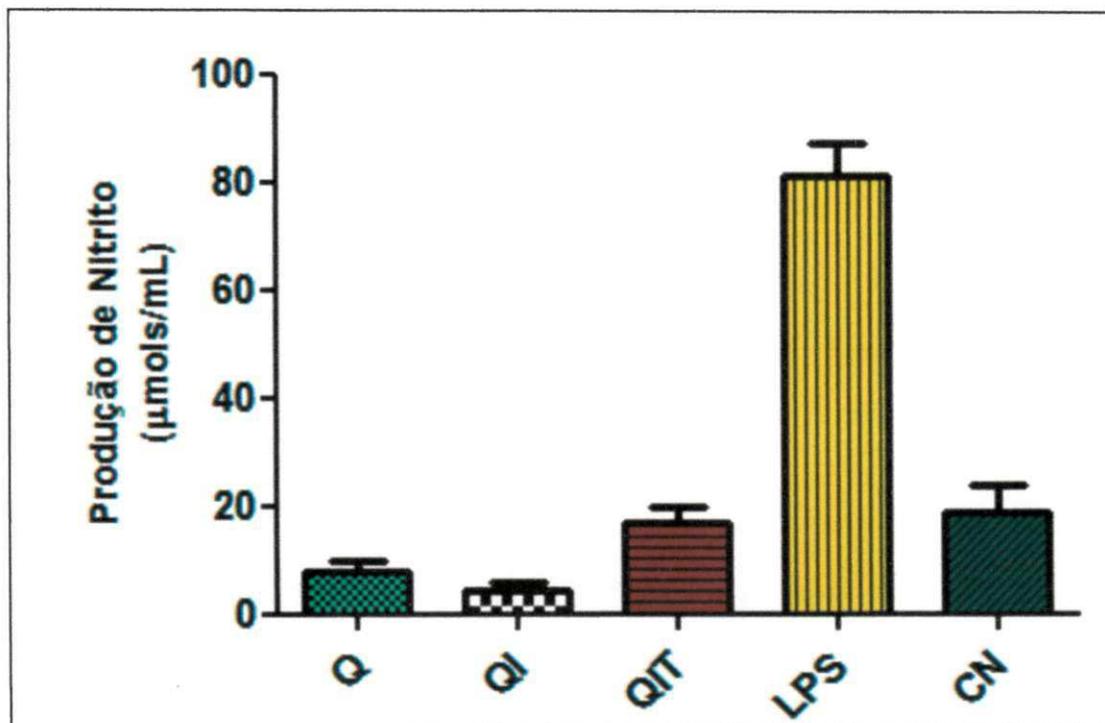
5.9 Determinação da Produção de Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é uma molécula reguladora produzida principalmente por macrófagos ativados, de extrema importância nos processos de resposta imune, inflamação, metabolismo ósseo e apoptose. Essa molécula gasosa pode apresentar efeitos benéficos, tais como atividade antimicrobiana e modulação da resposta imune. Por outro lado, quando presente em altas concentrações, pode atuar como influente molécula citotóxica desencadeando prejuízos aos tecidos adjacentes (KENDAL, MARSHALL, BARTOLD, 2001).

Para a determinação da produção de óxido nítrico pelos macrófagos foi utilizado um controle negativo (células em cultura) e um controle positivo (células em cultura estimuladas por LPS).

A produção de óxido nítrico pelos macrófagos a partir da exposição as membranas testadas situou-se de 20 $\mu\text{mols/mL}$ que são considerados valores positivos. A Figura 39 ilustra a produção de óxido nítrico e a Tabela 5 apresenta os valores obtidos pelo testes de Tukey para as membranas testadas e suas respectivas significâncias.

Figura 39: Produção de óxido nítrico por macrófagos de camundongos Swiss na presença das membranas: Q - Quitosana, QI - Quitosana/Insulina, QIT - Quitosana/Insulina/TPP, LPS - controle positivo e CN - controle negativo. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de 6 animais.



Neste trabalho, como pode ser observado na Figura 39, as membranas Q, QI e QIT apresentaram valores abaixo do grupo controle (CN), o que segundo Barbosa (2011) e Lima (2010) é um indicativo da ação antiinflamatória da quitosana. Observou-se também que a membrana QIT estimulou uma maior produção de óxido nítrico se comparada às outras membranas. Esse aumento de óxido nítrico provavelmente aconteceu devido a presença do Tripolifosfato de Sódio que induziu a uma resposta pró-inflamatória, porém sem significância se comparada ao controle negativo, conforme pode-se perceber analisando-se a Tabela 5. Esses resultados confirmam a não toxicidade das membranas e corroboram os resultados obtidos no ensaio de viabilidade celular.

Tabela 5: Análise de Variância – ANOVA Teste de Tukey para as membranas testadas confrontadas com o padrão positivo e negativo

Comparações	Valores
Q vs QI	3.463 0.8832 ns P>0.05
Q vs QIT	-8.860 2.260 ns P>0.05
Q vs LPS	-73.607 18.771 *** P<0.001
Q vs CN	-11.219 2.861 ns P>0.05
QI vs QIT	-12.324 3.143 ns P>0.05
QI vs LPS	-77.071 19.654 *** P<0.001
QI vs CN	-14.682 3.744 ns P>0.05
QIT vs LPS	-64.747 16.511 *** P<0.001
QIT vs CN	-2.358 0.6014 ns P>0.05
LPS vs CN	62.389 15.910 *** P<0.001

Os testes de citotoxicidade mostraram que a quitosana, na forma de membranas pode ser utilizada *in vivo* sem causar reações adversas nas células de origem animal, pois, mesmo após o processo de fabricação das membranas onde são utilizados reagentes ácidos e alcalinos, o material não se mostrou citotóxico, ou seja não houve alteração na sua biocompatibilidade (BARBOSA, 2011).

É essencial que os biomateriais não estimulem a produção exacerbada de óxido nítrico (NO), nem inibam sua síntese por células estimuladas, uma vez que ambos estes eventos levariam a problemas na sua utilização em médio e longo prazo (LIMA, 2010). Na presente pesquisa os níveis de produção de NO foram extremamente baixos, classificando o material em estudo como não-citotóxico, permitindo a sua aplicação experimental *in vivo* com segurança.



CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados chegou-se as seguintes constatações:

- Com as medidas de tensão superficial, foi possível observar um aumento no caráter hidrofílico das membranas contendo insulina e tripolifosfato em comparação àquelas de quitosana pura.
- A técnica de espectroscopia na região do infravermelho identificou a interação entre a quitosana, a insulina e o tripolifosfato através de mudanças nas absorções das regiões de 3000 a 3500 cm^{-1} e 1600 a 1700 cm^{-1} , atribuídas aos grupos hidroxila e amino, respectivamente, além do surgimento de uma banda em 794 cm^{-1} característica do tripolifosfato.
- A técnica de Difração de Raios X demonstrou discretas alterações no caráter semicristalino da quitosana com a presença da insulina (menor cristalinidade) e do tripolifosfato (maior cristalinidade).
- A técnica de Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDX) demonstrou a presença dos elementos químicos presentes na quitosana, na insulina e no tripolifosfato de sódio.
- Com a técnica de Microscopia Óptica (MO) foi possível perceber nas membranas contendo quitosana e insulina, uma nova fase na matriz de quitosana que pode ser atribuída à presença da insulina.
- Com a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura foi possível perceber uma alteração na morfologia da membrana com a presença de partículas granulares de tamanhos variados. A presença dessas partículas e do elemento químico enxofre (visualizado no EDX) é um indicativo da presença da insulina nas membranas desenvolvidas.
- O ensaio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) mostrou que a insulina foi identificada e separada, sem sofrer alteração estrutural, da membrana de quitosana mesmo quando esta membrana estava reticulada pelo TPP.
- Os ensaios de biodegradação mostraram que todas as membranas foram biodegradadas, resultando numa maior degradação para a composição que continha quitosana e insulina.

- A biocompatibilidade das membranas foi confirmada com os ensaios de MTT e NO que revelaram pouca ou nenhuma citotoxicidade.

Diante do exposto pode-se concluir que o processo descrito na metodologia para a obtenção das membranas Q, QI e QIT mostrou-se eficaz. Os resultados apresentados indicaram alterações que sugerem a presença da insulina incorporada na membrana de quitosana com e sem a presença do tripolifosfato. Esse agente de reticulação mostrou-se viável para controlar a velocidade de degradação da membrana de quitosana e, conseqüentemente, a velocidade de liberação da insulina dessa membrana.

As membranas desenvolvidas apresentam viabilidade para serem utilizadas como biomaterial em sistema de liberação controlada de insulina, renovando a esperança de uma melhor qualidade de vida para milhares de pessoas portadoras de Diabetes *mellitus* que esperam ansiosamente por alternativas menos invasivas para a administração da insulina.

REFERÊNCIAS

ALLEN JR, L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL H. Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos. 8. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, , 2007.

ALHANATI, L.S. Tensão Superficial. Alfa Virtual School – Física. Disponível em: http://alfaconnection.net/pag_avsf/fqm0101.htm. Acesso em 25/08/2011.

ARANAZ, I. et al. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current Chemical Biology*, v.3, p. 203-230, 2009.

AROF, A.K.; OSMAN, Z. FTIR studies of chitosan acetate based polymer electrolytes. *Electrochim. Acta*, v. 48, p.993-999, 2003.

ASSIS, O.B.G.; SILVA,V.L. Caracterização Estrutural e da Capacidade de Absorção em Água em Filmes Finos de Quitosana Processadas em Diversas Concentrações. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v.13, nº4, p.223-228, 2003.

ASTM International: F1635-04 *Standard Test Method for in vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants*. Disponível em: <http://www.astm.org/DATABASE.CART/HISTORICAL/F1635-04.htm>>. Acesso em: 10 mar. 2010.

ASTM International: F2103-01 *Standard Guide for Characterization and Testing of Chitosan Salts as Starting Materials Intended for Use in Biomedical and Tissue-Engineered Medical Product Applications*, 2007.

AZEVEDO, J.R. et. al. Physical and chemical characterization insulin-loaded chitosan-TPP nanoparticles. *J Therm Anal Calorim*, 2011.

AZEVEDO, M. M. M. Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos. Monografia disponível em <http://lqes.iqm.unicamp.br>, 2002. Acesso 02/10/2009.

BAKER, R. *Controlled release of biologically active agents*. New York: Willey-Interscience, 1987, 279p.

BANDEIRA, F.; GRAF, H.; GRIZ, L.; FARIA, M.; CASTRO, M. L. *Endocrinologia e Diabetes*. 2. ed. Rio de Janeiro: Medbook, 2009.

BARBOSA, R. C. *Compósitos quitosana/carbonato de cálcio para utilização em cânulas de fistula ruminal*. Tese (Doutorado em Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Campina Grande, 2011, 119 f.

BASKAR,D.; KUMAR,T.S.S. Effect of deacetylation time on the preparation, properties and swelling behavior of chitosan films. *Carbohydrate Polymers* v.78, p.767-772, 2009.

BAYNES, J. W.; DOMINICZAK, M. H. *Bioquímica Médica*. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

BENNETT, J. C.; PLUM, F. Tratado de medicina interna. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

BIANCO, G.; NONATO, B. Roteiro de aulas práticas. Universidade Federal do Espírito Santo, 2011. Disponível em: <http://www.ceunes.ufes.br/downloads/2/brenomelo-APOSTILA%20FQII.pdf>. Acesso em 25/08/2011.

BISPO, V. M. Estudo do Efeito da Reticulação por Genipin em suportes biocompatíveis de Quitosana-PVA. 2009. 206f. Tese (Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas), Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

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.

BODMEIER, R.; OH, K.; PRAMAR, Y. Preparation and evaluation of drug-containing chitosan beads. *Drug Dev.Ind. Pharm*, v. 15, p. 1475-1494, 1989.

BRANGE, J.; HAVELUND, S.; HOUGAARD, P. Chemical stability of insulin. *Pharm. Res.* 9, 727-734, 1992.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção Básica. *Diabetes Mellitus*. Ministério da Saúde. Cadernos de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Brasília. Ministério da Saúde, 2006. 64p.

BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Síntese de Indicadores Sociais: uma análise das condições de vida da população brasileira. IBGE: Rio de Janeiro, 280p, 2008.

BRAZMO-INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA. Tripolifosfato de Sódio. Disponível em: http://www.brazmo.com.br/html/detail_alt.asp?name=TRIPOLIFOSFATO+DE+S%D3DIO&cat=Produtos. Acesso em 02/10/2010.

BRUGNEROTTO, J, et al. An infrared investigation and solid state structures of acylated chitosan characterization. *Polymer*, vol. 42, p. 3569-3580, 2001.

CALVO, P.; REMUÑÁN-LOPEZ, C.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharm. Res.*, v.14, p. 1431-1436, 1997.

CAMPANA FILHO et al. Extração, estrutura e propriedades de α e β -quitina. *Química Nova*, v. 3, n. 3, p. 644-650, 2007.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A.;FERRIER, D.R. *Bioquímica Ilustrada*. Porto Alegre: Artmed, 2006, 533p.

CHIEN, Y. W. Human Insulin: basic sciences to therapeutic uses. *Drug Dev. Ind. Pharm.* v. 22, p.753-789, 1996.

CRAIG, C. R.; STITZEL, R. E. *Farmacologia Moderna com Aplicações Clínicas*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

CRINI, G.; BADOT, P. Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: a review of recent literature. *Progress in polymer science*, p. 1-49, 2007.

CUNHA, R.M.S. *Produção de Formas Farmacêuticas contendo Insulina para Administração Pulmonar*. Universidade Fernando Pessoa, Portugal (Monografia). 50f, 2009.

DAGUANO, J.K.M.F.; SANTOS, C.; ROGERO, S.D. Avaliação da Citotoxicidade de Bocerâmicas Desenvolvidas para uso em Sistemas de Implantes. *Revista Matéria*, v.12, n. 1, p.134-139, 2007.

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.

DAMIAN, C.; BEIRÃO, L.H.; FRANCISCO, A.; ESPÍRITO SANTO, M.L.P.; TEIXEIRA, E. Quitosana: Um Amino Polissacarídeo com Características Funcionais. *Alim. Nutri, Araraquara*, v.16, n. 2, p.195-205, 2005.

DONG, L.C.; WONG, P.; WAN, J.; SHAFI, K. L-OROS® SOFTCAP™ for Controlled Release of Non-aqueous Liquid Formulations. V.2, 2002. Disponível em: <http://www.drugdeliverytech.com/ME2/dirmod.asp?sid=&nm=&type=Publishing&mod=Publications%3A%3AArticle&mid=8F3A7027421841978F18BE895F87F791&tier=4&id=64CC3A058EE4485A87488F9A44261279>. Acesso em 03/09/2011.

EMTD, Equipe Multiprofissional de Tecnologia em Diabetes. Manuseio da insulina. Disponível em: http://www.emtd.com.br/orientacoes/orientacoes_insulinoterapia.htm. Acesso em 22 jul.2011.

ESTRELA, C.; PÉCORA, J.D. Hidróxido de Cálcio na Endodontia, 1997. Disponível em: <http://www.forp.usp.br/restauradora/calcao/introhc.htm>. Acesso em 20/10/2011.

FIDÉLES, T.B. Filmes Reticulados de Quitosana para Aplicação como Biomaterial. Programa de pós-graduação em Ciência e engenharia de Materiais. Universidade federal de Campina Grande (Dissertação), 72f, 2010.

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

GIERSZEWSKA-DRUZZNSKA, M.; OSTROWSKA-CZUBENKO, J. The Effect of ionic crosslinking on thermal properties of hidrogel chitosan membranes. *Progress on Chemistry and Application of Chitin*. v. 15, 2010.

- GIL, M. H.; FERREIRA, P. Polissacarídeos como biomateriais. Química 100, Jan-mar 2006.
- GOY, R.C.; BRITTO, D.; ASSIS, O.B.G. A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan. Polímeros: Ciência e Tecnologia, v.19, n° 3, p. 241-247, 2009.
- GREEN L. C, WAGNER D. A, GLOGOWSK J, SKIPPER P. L, WISHNOK J. S, TANNEMBAUM S. R.. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. Analytical Biochemistry. v. 126, p. 131-138, 1982.
- GROSS, J. L. et al. Diagnóstico, classificação e tratamento do diabetes mellitus. Recomendações da sociedade brasileira de Diabetes. Archivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo. v. 44, n.4, p.09-35, 2000.
- GUIMARÃES, T.F.; Nanopartículas de quitosana como carreadoras de Etoposide. Universidade Estadual Paulista (Dissertação), 101f, 2005.
- GUPTA, K. C.; JABRAIL, F. H. Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. Carbohydrate Polymers. v. 66, p. 43–54, 2006.
- HELLER, S.; KOZLOVSKI, P.; KURTZHALS, P. Insulin's 85th anniversary – An enduring medical miracle. Denmark. Diabetes Research and Clinical Practice , 2007
- 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 28/10/2009.
- HENCH, L.L.; DIOLLON, C. An introduction to bioceramics. Singapore: London,World Scientific, p. 386,1993.
- HOFFMAN, A.; ZIV, E. Pharmacokinetic considerations of new insulin formulations and routes of administration. Clin. Pharmacokinet. v. 33, p.285-301, 1997.
- JAYAKUMA, R. Novel Chitin and Chitosan Materials in Wound Dressing. Disponível em: http://www.intechopen.com/source/pdfs/12794/InTech-Novel_chitin_and_chitosan_materials_in_wound_dressing.pdf. Acesso em 27/08/2011.
- KAHN, H. Difração de Raios X. Disponível em: http://www.angelfire.com/crazy3/qfl2308/1_multipart_xF8FF_2_DIFRACAO.pdf. Acesso em 19/11/2011.
- KATZUNG, B. G. Hormônios pancreáticos e fármacos antidiabéticos. Farmacologia. v. único, 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 579-597, 2005.
- KENDALL, H. K.; MARSHALL, R. I.; BARTOLD, P. M. Nitric oxide and tissue destruction. Oral Diseases. v. 7, n. 1, p. 2-10, 2001.

KHAFAGY, EL-S.; MORISHITA, M.; ONUKI, Y.; TAKAYAMA, K. Current challenges in non-invasive insulin delivery systems: A comparative review. *Japan. Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 59, p.1521-1546, 2007.

KMANN, J. *Biomaterials*, v.11, p. 615-618, 1990.

KOLHE, P.; KANNAN, R. M. Improvement in ductility of chitosan through blending and copolymerization with PEG: FTIR investigation of molecular interactions. *Biomacromolecules*, v. 4, n.1, p.173-180, 2003.

KURITA, K.; KAJI, Y.; MORI, T.; NISHIYAMA, Y. Enzymatic degradation of b-chitin: susceptibility and the influence of deacetylation. *Carbohydrate Polymers*, v.42, p.19-21, 2000.

LAMIM, R. Quitosana e N-Carboximetilquitosana: Desenvolvimento de biofilmes para aplicações farmacêuticas. Dissertação de mestrado disponível em: http://biblioteca.universia.net/html_bura/ficha/params/id/17368966.html, 2006. Acesso em 14/10/2009.

LARANJEIRA, M.C.M; FÁVERE, V.T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. *Química Nova*. v.32 n. 3. São Paulo, 2009.

LEE, T.W.Y; ROBINSON, J.R. Sistema de Liberação Controlada de Drogas. In: GENNARO, A.R.(Ed.) *Remington: A Ciência e a Prática da Farmácia*, 20.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap.47, p.931-960, 2004.

LIM, L. Y.; WAN, L. S. C. Heat treatment of chitosan films. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v. 21, n. 7, p. 839-846, 1995.

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.

LOURENÇO, V.A. Desenvolvimento e avaliação de micropartículas de quitosana para veiculação de dimetilaminoetanol (DMAE) na pele. 2006. 118f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Rio Preto, 2006.

LUCAS, F.E.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E. Caracterização de Polímeros. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais. 366p. 2001

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.

MARSCHUTZ, M. K.; CALECETI, P. Design and in vivo evaluation of na oral delivery system for insulin. *Pharm. Res.* v.17, p. 1468-1471, 2000.

MARTINS, M. T. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos, estudo preliminar de estabilidade e ensaio de dissolução do antiepiléptico triazínico

lamotrigina na forma farmacêutica comprimido, 162 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Porto Alegre, 2007.

MINCHEVA, R. et. al. Hydrogels from chitosan crosslinked with poly(ethyleneglycol) diacid as bone regeneration materials, *e-Polymers*, v.58, p.1-11, 2004.

MOELLER, E.H.; JORGENSEN, L. Alternative routes of administration for systemic delivery of protein pharmaceuticals. Denmark. *Drug Discovery Today: Technology*, 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. v. 65, p. 55-63, 1983.

OLIVEIRA, R. B.; LIMA, E. M. Polímeros na obtenção de sistemas de liberação de fármacos. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 3, p. 29-35, 2006.

O'NEIL, M.J.; et.al. *The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biological*. Ed. Whitehouse Station, N.J: Merck. 13 ed, 2001.

ORÉFICE, Rodrigo. Biomateriais. Minas Gerais, 2008. Disponível em: <<http://www.demet.ufmg.br/docentes/rodrigo/biomateriais.htm>> Acesso em: 20 ago.2008.

ORÉFICE, R.; PEREIRA, M.; MANSUR, H.; *Biomateriais Fundamentos e Aplicações*. Rio de Janeiro: Cultura médica, 2006.

OSORIO, S.M.L. Novel polymeric systems based on natural materials: development and biological performance. 2007, 146p. Dissertação (Mestrado em Processamento e Caracterização de Materiais), Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2007.

PANDIT, N.K. *Introdução às Ciências Farmacêuticas*. Porto Alegre: Artmed, 2008.

PARK, J. *Biomaterials Science and Engineering*. New York, Plenum Press, 1984. p.171-192.

PATTON, J.S.; BYRON, P.R. *Inhaling Medicines: Delivering drugs to the body through the lungs*. *Nature Reviews Drug Discovery*. v.6, n.1, p. 67-74, 2007.

PEZZINI, B. R.; SILVA, M.A.S.; FERRAZ, H.G. Fórmulas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.43, n.4, p.491-502, 2007.

PIERÓG, M.; GIERSZEWSKA-DRUZZNSKA, M.; OSTROWSKA-CZUBENKO, J. Effect of ionic crosslinking agents on swelling behavior of chitosan hydrogel membranes. *Progress on Chemistry and Application of Chitin*. v. 14, 2009.

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.

PORTAL FATOR BRASIL. A evolução da insulina humana e a revolução no tratamento da diabetes. Disponível em: <http://www.revistafatorbrasil.com.br>. Acesso em 20.07.2011.

PRATT, C. W.; CORNELLY, K. Bioquímica Essencial. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. O Pâncreas endócrino e o controle da glicemia. Farmacologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

REIS, A.C.B.P. Encapsulação de fármacos peptídicos pelo método de emulsificação/gelificação interna. Tese de Doutorado. Universidade de Coimbra, Coimbra, 2007.

RIBEIRO, G.; FREUDENRICH, C. Como funciona o diabetes, 2007. Disponível em: <http://saude.hsw.uol.com.br/diabete.htm> . Acesso em 24 jul. 2011.

RIOS, M. Polymers for Controlled Release: Formulation Follows Function. Pharm. Technol., New York, v. 29, n. 6, p. 42-50, 2005.

RODRIGUES, I.R. Síntese e Caracterização de Redes Poliméricas a base de Quitosana com PVP e PVA para Aplicação na Liberação Controlada de Fármacos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e Materiais. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Dissertação), 107f, 2006.

SANTOS J. E., Preparação, caracterização e estudos termoanalíticos de bases de Schiff biopoliméricas e seus complexos de cobre. 2004, 124f. Tese Doutorado-Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

SANTOS, R. M. M. O futuro aponta para novas formas de administrar medicamentos. Disponível em: http://www.moreirair.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=102. Acesso em 22 nov. 2010.

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.

SHARMA, A.; MONDAL, K.; GUPTA, M.N. Some studies on characterization of three phase partitioned chitosan. Carbohydr. Pol, v.52, p.433-438, 2002.

SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, v.13, p.383-420, 1995.

- SHU, X.Z.; ZHU, K.J. The influence of multivalent phosphate structure on the properties of ionically cross-linked chitosan films for controlled drug release. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* v. 54, p.235-243, 2002.
- SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados Hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química nova*, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.
- SILVA, P. Insulina e Antidiabéticos Oraís. *Farmacologia*. 7. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 805-823 , 2006.
- SILVA JÚNIOR, P. E.; ORÉFICE, R. L. Compósitos bioativos obtidos a partir da inserção de vidro bioativo em matriz de poli (metacrilato de metila). *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 11, p. 109-115, 2001.
- SILVER, F; DOILLON, C. *Biocompatibility, interations and implantable materials*, New York, VCH. v. 1. p. 1-76, 1989.
- SINKO, P.J. *Físico- Farmácia e Ciências Farmacêuticas*. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- SIONKOWSKA, A.; WISNIEWSKI, M.; SKOPINSKA, J.; KENNDY, C.J.; WESS, T.J. Molecular interactions in collagen and chitosan blends. *Biomaterials*, v. 25, p.795–801, 2004.
- SMITH, C.; MARKS, A. D.; LIEBERMAN, M. *Bioquímica Médica Básica de Marks*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- 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.
- STEVES, M.P. *Polymer Chemistry an introduction*. 3 ed. Oxford University Press, 1999.
- SUH, J.K.F.; MATTHEW, H.W.T. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review, *Biomaterials*, v.21, p.2589-2598, 2000.
- SZYCHER, M. *Biocompatible polymers, metals and composites*, Lancaster, Technomic, 1983.
- TORRES, M.A; VIEIRA, R.S.; BEPPU, M.M.; SANTANA, C.C.. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. Associação Brasileira de Polímeros: São Carlos. v.15; n.4, p.306-312, 2005.

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

VILLANOVA, J.C.O.; ORÉFICE, R.L. CUNHA, A.S. *Aplicações Farmacêuticas de Polímeros*. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v.20, n. 1, p. 51-64, 2010.

VULCANI, V.A.S. *Matrizes de Colágeno para liberação controlada de Progesterona*. Dissertação de mestrado, São Carlos, 2004.

WANG, X.; DU, Y.; LIU. Preparation, characterization and antibacterial activity of chitosan-Zn complex, *Carbohydr. Polym.* v.56, p.21-26, 2004.

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 25/08/2011.

WONG, T.W. *Chitosan and Its Uses in Design of Insulin Delivery System*. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, v. 3, p.8-25, 2009.

WU, Y.; YANG, W.; WANG, C.; HU, J.; FU, S.; Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. *Pharmaceutical Nanotechnology*, 295, p. 235-245, 2005.

XUA, X.; YAO FUA, X.; HUA, H.; DUANB, Y.; ZHANG, Z. Quantitative determination of insulin entrapment efficiency in triblock copolymeric nanoparticles by high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* v.41, 266–273, 2006.

YILMAZ, B.; KADIOGLU, Y. Development and Validation of HPLC Method for Determination of Human Insulin in Pharmaceutical Preparation. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. v.2 p.40, 2010.

ZHANG, M.; et al. Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PEG. *Biomaterials*, v.23, p. 2641-2648, 2002.