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

Francivandi Coêlho Barbosa

DISPOSITIVO A BASE DE QUITOSANA PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE INSULINA VISANDO UMA ROTA NÃO CONVENCIONAL DE ADMINISTRAÇÃO

Campina Grande – PB
2021

Francivandi Coêlho Barbosa

DISPOSITIVO A BASE DE QUITOSANA PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE INSULINA VISANDO UMA ROTA NÃO CONVENCIONAL DE ADMINISTRAÇÃO

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

Orientadores: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook

Prof.ª Dr.ª Suédina Maria de Lima Silva

Agência Financiadora: CAPES

Campina Grande – PB

2021

B238d Barbosa, Francivandi Coêlho.
Dispositivo à base de quitosana para liberação controlada de insulina visando uma rota não convencional de administração / Francivandi Coêlho Barbosa. – Campina Grande, 2021.
117 f. : il. : color.

Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2021.

"Orientação: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook, Prof.ª Dr.ª Suédina Maria de Lima Silva".
Referências.

1. Quitosana. 2. Insulina. 3. Esferas. 4. Sistema de Liberação. 5. Diabete. I. Fook, Marcus Vinícius Lia. II. Silva, Suédina Maria de Lima. III. Título.

CDU 62:61(043)

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECÁRIA MARIA ANTONIA DE SOUSA CRB 15/398

VITAE DO CANDIDATO

- Farmacêutica pela Universidade Estadual da Paraíba – UEPB (2010).
- Mestre em Microbiologia Médica pela Universidade Federal do Ceará – UFC (2016).

FRANCIVANDI COÊLHO BARBOSA

DISPOSITIVO A BASE DE QUITOSANA PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE INSULINA VISANDO UMA ROTA NÃO CONVENCIONAL DE ADMINISTRAÇÃO

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

Aprovado em: 26/02/2021

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

Drª. Suédina Maria de Lima Silva
Orientadora
PPG-CEMat/UAEMa/UFCG

Dr.ª Renate Maria Ramos Wellen
Examinadora Interna
DEMAT/UFPB

Dr. Romualdo Rodrigues Menezes
Examinador Interno
PPG-CEMat/UAEMa/UFCG

Dr.ª Maria Roberta de Oliveira Pinto
Examinadora Externa
UAQ-UEPB

Dr.ª Milena Costa da Silva
Examinadora Externa
CERTBIO/UFCG

Aos meus pais e ao meu marido pela paciência, compreensão e apoio durante este período dedicado a conclusão de mais uma etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos,
À Deus e Nossa Senhora por sempre guiarem meus caminhos e conduzir minha jornada;
Aos meus pais, Vandik e Francisca, por me apoiarem e serem exemplos de todas as formas durante toda minha vida;
Ao meu irmão Vandikson, por toda a auxílio nas traduções e por sempre estar disposto a ajudar no meu crescimento pessoal e profissional;
Ao meu marido, Breno Gonzaga, pelo apoio, paciência e compreensão e carinho;
A minha irmã Vanessa, minha cunhada Eveline e meus sobrinhos, Laissa e João, pelo amor e a confiança a mim dedicadas;
À vovó Gercina, Titia Diva e meus primos Lívia Mirela e Matheus, que com amor, por toda uma vida, me receberam para dar, receber e partilhar as alegrias e as amarguras;
Ao professor Marcus Vinícius Lia Fook pela orientação, por me receber em seu laboratório com as portas abertas e confiar no meu trabalho;
À professora Suédina Maria de Lima Silva pela orientação, conselhos, amizade, compreensão em todos os momentos e confiança a mim dedicada e por ser um exemplo de pessoa e profissional a ser seguido;
Ao professor Wilton Diniz Pereira da Silva e a Cleide Diniz Pereira da Silva e Silva pelo aconselhamento e apoio para que pudesse ingressar no doutorado;
À Francisca Paula (Paulinha), uma amiga que, sempre sorridente, de braços abertos, pronta para ouvir, consolar e ajudar, fez com que cada dia fosse mais alegre e as dificuldades mais fáceis de serem superadas;
À Sérgio Pereira (Seu Sérgio) que, com bom humor, sempre esteve a disposição para ajudar e com incansáveis esforços, forneceu suporte para a realização deste trabalho;
À Maria Roberta de Oliveira Pinto que teve a ideia inicial para o desenvolvimento deste trabalho, por todas as dúvidas esclarecidas e por todos os conselhos dados;
Aos amigos Hermano e Valéria por enfrentarmos juntos e ultrapassarmos todas as barreiras e dificuldades para provar que nosso trabalho duro e árduo tem valor, nossa equipe pode ter sido desfeita, mas nossa amizade permanece;
Aos amigos Henrique e Milena por toda ajuda e incentivo, aprendizados gerados e compartilhados, cada obstáculo ultrapassado e por todas as boas risadas;
Aos amigos Otto, Nícolas, Filipe, Dayana, Maielly, Flávia, Michele, Janice e Ingred por compartilharem momentos de dificuldades e descontração na rotina da sala dos alunos e do laboratório e aos três primeiros por ajudarem na realização de ensaios;
À todos os Professores e pesquisadores que durante todo o processo contribuíram no desenvolvimento deste trabalho com correções e sugestões em cada etapa de defesa;
À Tânia e Dona Socorro que, sempre sorridentes, trouxeram alegria e energia positiva cada vez que nos encontrávamos e em especial a Dona Socorro pela realização dos ensaios de microscopia óptica;

À Pedro e Rita por toda ajuda, tempo e paciência que dedicaram para realizar os treinamentos para que eu soubesse operar adequadamente os equipamentos necessários para o desenvolvimento deste trabalho;
À Dailma, Toninho, Jaqueline e a todos que passaram pelo NGI-CERTBIO;
Ao Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (CERTBIO) e ao Laboratório de Nanopartículas (NANOPOL) pela cessão da estrutura, que foram cruciais para execução deste trabalho;
A todos que fizeram parte da equipe de limpeza dos laboratórios, representados hoje por Dona Isla, por manter o ambiente sempre limpo e agradável para que pudéssemos trabalhar;
Aos alunos da Turma de Metodologia Técnicas e Pesquisa do curso de Ciências e Engenharia de Materiais, à qual lecionei o período de 2018.1;
A todos os Docentes do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande;
Aos Funcionários da coordenação da Pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, em especial, André por toda paciência e dedicação;
À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES, pelo suporte financeiro; e
À todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para que este trabalho fosse realizado.

RESUMO

Neste estudo, foram desenvolvidos dispositivos à base de quitosana (membranas e esferas) para encapsulamento da insulina visando sua administração por uma rota não convencional. Membranas de quitosana foram preparadas e a influência do método de processamento (congelamento/liofilização e evaporação do solvente), tipo de solvente empregado para dissolução da quitosana (ácidos acético ou lático) e uso ou não de neutralização nas interações quitosana/insulina foram avaliadas por de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Observou-se que o tipo de processamento e o uso ou não de neutralização afetaram os processos de interação quitosana/insulina. Independentemente do tipo de ácido, as interações entre quitosana e insulina só foram possíveis para as membranas preparadas por evaporação do solvente com neutralização prévia da solução de quitosana. Porém, as membranas preparadas com ácido acético se apresentaram quebradiças e as preparadas com ácido lático ficaram fortemente aderidas as placas Petri. Assim, as soluções de quitosana solubilizadas em ácido acético ou lático e posteriormente neutralizadas foram utilizadas para produzir esferas de quitosana pelo método de gelificação ionotrópica empregando tripolifosfato de sódio (TPP) e carboximetilquitosana (CMQ) como solução gelificante. As esferas foram caracterizadas por FTIR, microscopia óptica (MO), intumescimento, hidrossolubilidade e teor de umidade. Interação entre quitosana e insulina foi registrada para todas as esferas (FTIR). Entretanto, reticulação efetiva só foi verificada para as esferas preparadas com TPP. Conforme imagens de MO, as esferas preparadas com TPP exibiram contornos mais uniformes, arredondados e com menor porosidade, principalmente aquelas preparadas com solução de ácido lático. O intumescimento, teor de umidade e hidrossolubilidade foram maiores para as esferas preparadas com ácido lático e reticuladas com TPP. Assim, elas foram submetidas aos ensaios de eficácia de encapsulamento, liberação *in vitro* e cinética de liberação. Houve uma boa eficácia de encapsulamento (74,36%) embora a liberação percentual cumulativa em 48 h tenha sido considerada baixa (16,8%). A cinética *in vitro* do processo de liberação foi do modelo Peppas-Sahlin, controlada tanto pela difusão quanto pelo relaxamento das cadeias poliméricas ou intumescimento. No geral, esses achados demonstram que estas esferas podem ser um carreador de insulina promissor para futura aplicação clínica por uma rota de administração não convencional.

Palavras-chave: Quitosana. Insulina. Esferas. Sistema de liberação. Diabetes.

ABSTRACT

In this study, chitosan-based devices (membranes and beads) were developed aiming insulin encapsulation for the administration by an unconventional route. Chitosan membranes were prepared and the influence of the processing method (freeze-drying and solvent evaporation), the type of solvent used to dissolve the chitosan (acetic or lactic acids), and whether or not neutralization was applied in the chitosan/insulin interactions were evaluated using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). The type of processing and the use or not of neutralization affected the chitosan/insulin interaction properties. Regardless the type of acid, interactions between chitosan and insulin were only possible for membranes prepared through solvent evaporation with prior chitosan solution neutralization. However, membranes prepared with acetic acid were brittle and those prepared with lactic acid strongly adhered to the Petri dishes. Thus, chitosan solutions solubilized in acetic or lactic acid and then neutralized were used to produce chitosan beads through the ionotropic gelation method using sodium tripolyphosphate (TPP) and carboxymethylchitosan (CMC) as a gelling solution. The beads were characterized by FTIR, optical microscopy (OM), swelling degree, water solubility, and moisture content. Interaction between chitosan and insulin was recorded for all beads (FTIR). However, effective cross-linking was only verified for beads prepared with TPP. According to OM images, the TPP prepared beads showed more uniform, rounded, and less porous contours, especially those prepared with lactic acid solutions. The swelling degree, moisture content, and water solubility were greater for the beads prepared with lactic acid and cross-linked with TPP. They were, thereby, subject to the encapsulation effectiveness, *in vitro* release, and release kinetics tests. There was good encapsulation efficiency (74.36%) although the cumulative percentage release in 48 h was considered low (16.8%). The release process *in vitro* kinetics used was the Peppas-Sahlin model, controlled both by the diffusion and the relaxation of the polymer chains or swelling degree. In general, these findings demonstrate that these beads can be a promising insulin carrier for future clinical application through an unconventional route of administration.

Keywords: Chitosan. Insulin. Beads. Release system. Diabetes

PUBLICAÇÕES

BARBOSA, F. C.; SILVA, M. C.; SILVA, H. N.; ALNBUQUERQUE, D.; GOMES, A. A. R.; SILVA, S. M. L.; FOOK, M. V. L. Progress in the Development of Chitosan Based Insulin Delivery Systems: A Systematic Literature Review. **Polymers**, v. 12, p. 2499, 2020. doi: 10.3390/polym12112499.

DA SILVA BURITI, J., BARRETO, M.E.V., BARBOSA, F.C. BURITI, B. M. A. B.; SOUZA, J. W. L.; PINA, H. V.; RODRIGUES, P. L.; FOOK, M. V. L. Synthesis and characterization of Ag-doped 45S5 bioglass and chitosan/45S5-Ag biocomposites for biomedical applications. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, v.** 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10973-020-09734-4>, acessado em: 18 de janeiro de 2021.

PINA, H. V.; FARIAS, A. J. A.; BARBOSA, F. C.; SOUZA, J. W. L.; BARROS, A. B. S.; CARDOSO, M. J. B.; FOOK, M. V. L.; WELLEN, R. M. R. Microbiological and cytotoxic perspectives of active PCL/ZnO film for food packaging. **Materials Research Express**, v. 7, n. 2, p. 25312, 2020. doi: 10.1088/2053-1591/ab7569.

SANTOS, E. P.; NICÁCIO, P. H. M.; BARBOSA, F. C.; SILVA, H. N.; ANDRADE, A. L. S.; FOOK, M. V. L.; SILVA, S. M. L.; LEITE, I. F. Chitosan/Essential Oils Formulations for Potential Use as Wound Dressing: Physical and Antimicrobial Properties. **Materials**, v. 12, p. 2223, 2019. doi: 10.3390/ma12142223.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sequência de aminoácidos da molécula de pró-insulina humana (Genth, 2008) 22
Figura 2 - Comparação dos perfis de libertação de um fármaco resultantes da administração de um sistema de libertação convencional por dose única (──) e várias doses (--) e de um sistema de libertação controlada (— —) (Moura, 2012)..... 25
Figura 3 - Esquema dos mecanismos de liberação de fármacos por sistemas poliméricos: I -Sistema matricial e II - Sistema reservatório (Aulton, 2005) 26
Figura 4 - Estrutura molecular da quitina e da quitosana (Silva *et al*., 2006) 29
Figura 5 - Representação esquemática da reticulação iônica na quitosana modificadas com TPP (Gierszewska e Ostrowska-Czubenko, 2016) 34
Figura 6 - Representação esquemática do processo de obtenção das membranas. 37
Figura 7– Representação esquemática do processo de obtenção das esferas 39
Figura 8 - Membranas não neutralizadas preparadas por congelamento e liofilização 49
Figura 9 - Membranas não neutralizadas preparadas por evaporação do solvente 50
Figura 10 - Membranas neutralizadas preparadas por congelamento e liofilização.. 51
Figura 11 - Membranas neutralizadas preparadas por evaporação do solvente 52
Figura 12 - Gráfico de FTIR das membranas Q(AA)NNc, QI(AA)NNc, Q(AA)NNe, QI(AA)NNe e pó de insulina 54
Figura 13 - Gráfico de sobreposição dos espectros de FTIR 55
Figura 14 - Gráfico de FTIR das membranas Q(AA)Nc, QI(AA)Nc, Q(AA)Ne, QI(AA)Ne e pó de insulina 56
Figura 15 - Gráfico de sobreposição dos espectros de FTIR 56
Figura 16 - Gráfico de FTIR das membranas Q(AL)NNc, QI(AL)NNc, Q(AL)NNe, QI(AL)NNe e pó de insulina 57
Figura 17 - Gráfico de sobreposição dos espectros de FTIR 58
Figura 18 - Gráfico de FTIR das membranas Q(AL)Nc, QI(AL)Nc, Q(AL)Ne, QI(AL)Ne e pó de insulina 59
Figura 19 - Gráfico de sobreposição dos espectros de FTIR 59
Figura 20 - Gráfico de FTIR das membranas não neutralizadas com ou sem incorporação de insulina e pó de insulina 60

Figura 21 - Gráfico de FTIR das membranas não neutralizadas com ou sem incorporação de insulina e pó de insulina 61
Figura 22 - Estrutura química dos ácidos utilizados para dissolução da quitosana... 63
Figura 23 - Gráfico de FTIR das membranas preparadas por dissolução da quitosana em ácido acético neutralizado e não neutralizado, com ou sem incorporação de insulina e pó de insulina 64
Figura 24 - Gráfico de FTIR das membranas preparadas por dissolução da quitosana em ácido lático neutralizado e não neutralizado, com ou sem incorporação de insulina e pó de insulina 65
Figura 25 - Esferas de quitosana e quitosana/insulina preparadas por gelificação ionotrópica com a quitosana solubilizada em ácido acético 66
Figura 26 - Esferas de quitosana e quitosana/insulina preparadas por gelificação ionotrópica com a quitosana solubilizada em ácido lático 67
Figura 27 - Gráfico de FTIR das esferas de quitosana solubilizada em ácido acético preparadas com TPP, TPP e quitosana 69
Figura 28 - Gráfico de FTIR das esferas de quitosana solubilizada em ácido acético preparadas com CMQ, CMQ e quitosana 70
Figura 29 - Gráfico de FTIR das esferas de quitosana e quitosana/insulina preparadas com CMQ como solução gelificante e do pó de insulina 71
Figura 30 - Gráfico de FTIR das esferas de quitosana e quitosana/insulina preparadas com TPP como solução gelificante e pó de insulina 72
Figura 31 - Imagens de Microscopia óptica com aumentos de X60, X100 e X160 das esferas de quitosana e quitosana/insulina preparadas pela solubilização da quitosana em ácido acético em diferentes soluções gelificantes de CMQ e TPP..... 73
Figura 32 - Imagens de Microscopia óptica com aumentos de X60, X100 e X160 das esferas de quitosana e quitosana/insulina preparadas pela solubilização da quitosana em ácido lático em diferentes soluções gelificantes de CMQ e TPP..... 75
Figura 33 - Gráfico do grau de intumescimento das esferas de quitosana e quitosana/insulina 76
Figura 34 - Gráfico do grau de intumescimento das esferas de quitosana e quitosana/insulina 77
Figura 35 - Gráfico do grau de intumescimento das esferas de quitosana e quitosana/insulina de acordo com a presença de insulina 78

Figura 36 - Comprimento de onda máximo da insulina em PBS (pH 7,4) 82
Figura 37 - Representação gráfica da linearidade da curva de calibração da insulina em PBS (pH 7,4) obtida por UV-vis (λ= 2020 nm) 83
Figura 38 - Gráfico da estabilidade da insulina durante o ensaio de liberação 90
Figura 39 - Liberação percentual cumulativa da insulina pelas esferas QI(AL)TPP em PBS (pH 7,4) a 37°C sob agitação de 100 rpm 91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tipos e características das insulinas comercialmente existentes tomando como referência 100UI de insulina humana (Milech *et al*., 2016) 23
Tabela 2- Codificação das membranas preparadas pelo método de evaporação do solvente 37
Tabela 3- Codificação das membranas preparadas pelo método de congelamento e liofilização 38
Tabela 4 - Codificação das esferas obtidas 40
Tabela 5 - Testes experimentais utilizados para definir os parâmetros de produção das esferas 40
Tabela 6 - Teor de umidade e hidrossolubilidade das esferas de quitosana e quitosana/insulina 80
Tabela 7 - Valores da exatidão em quatro níveis de concentração de insulina 84
Tabela 8 – Resultados da precisão do método analítico utilizado 85
Tabela 9 - Dados da Robustez do método analítico 86
Tabela 10 - Absorbâncias obtidas pelo UV-vis após análise das soluções PBS-insulina 87
Tabela 11 - Análise dos dados de regressão obtidos a partir da curva de calibração da insulina por espectrofotometria de absorção no ultravioleta 87
Tabela 12 - Valores de capacidade de carga e eficácia de encapsulamento das esferas QI(AL)TPP 88
Tabela 13 – Parâmetros da cinética de liberação da insulina liberada pelas esferas QI(AL)TPP 95

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO ____ 18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA ____ 20
   2.1. Diabetes Mellitus (DM) ____ 20
   2.2. Insulina ____ 21
   2.3. Sistema de Liberação Controlada de Fármacos ____ 24
   2.4. Quitosana ____ 28
   2.5. Carboximetilquitosana ____ 31
   2.6. Tripolifosfato de Sódio (TPP) ____ 33
3. MATERIAIS E MÉTODOS ____ 36
   3.1. Materiais ____ 36
   3.2. Preparação das Membranas de Quitosana ____ 36
   3.3. Preparação das Esferas de Quitosana ____ 38
   3.4. Caracterização das Amostras ____ 40
      3.4.1. Análise Macroscópica e Sensorial ____ 41
      3.4.2. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) ____ 41
      3.4.3. Intumescimento ____ 42
      3.4.4. Hidrossolubilidade e Teor de Umidade ____ 42
      3.4.5. Microscopia Óptica ____ 43
      3.4.6. Espectroscopia na Região do Ultra Violeta (UV-vis) ____ 43
      3.4.6.1. Validação do Método Analítico de Detecção da Insulina por UV-vis 44
         3.4.6.1.1. Linearidade ____ 44
         3.4.6.1.2. Precisão ____ 44
         3.4.6.1.3. Exatidão ____ 45
         3.4.6.1.4. Robustez ____ 45
         3.4.6.1.5. Limite de Detecção e Limite de Quantificação ____ 45
         3.4.6.1.6. Preparação da Curva de Calibração da Insulina ____ 46
      3.4.7. Capacidade de Carga e Eficiência de Encapsulamento ____ 46
      3.4.8. Estudo de Liberação *in vitro* ____ 47
      3.4.9. Estudo da Cinética de liberação ____ 48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO ____ 49
   4.1. Análise Macroscópica e Sensorial das Membranas Não Neutralizadas ____ 49
   4.2. Análise Macroscópica e Sensorial das Membranas Neutralizadas ____ 50
   4.3. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) das Membranas ____ 53

4.3.1. Método de Processamento 53
4.3.2. Solução Ácida Utilizada para Dissolução da Quitosana 59
4.3.3. Uso ou não de Neutralização Prévia da Solução de Quitosana 63
4.4. Análise Macroscópica e Sensorial das Esferas 66
4.5. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) das Esferas 68
4.5.1. Solução Utilizada na Gelificação 68
4.5.2. Presença de Insulina 71
4.6. Microscopia Óptica (MO) 73
4.7. Intumescimento 75
4.8. Teor de Umidade e Hidrossolubilidade 80
4.9. Validação do Método Analítico de Detecção da Insulina por Espectroscopia na Região do Ultra violeta (UV-vis) 82
4.9.1. Determinação do Comprimento de Onda de Detecção 82
4.9.2. Linearidade 83
4.9.3. Exatidão 84
4.9.4. Precisão 84
4.9.5. Robustez 85
4.9.6. Limite de Detecção e Limite de Quantificação 86
4.9.7. Preparação da Curva de Calibração da Insulina 86
4.10. Capacidade de Carga e Eficiência de Encapsulamento 87
4.11. Estudo de Liberação *in vitro* 89
4.11.1. Perfil de Liberação 91
4.12. Cinética de Liberação 94
5. CONCLUSÃO 96
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 98

1. INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus é uma doença crônica que evidencia uma epidemia mundial, seu combate é um desafio constante para os sistemas de saúde de todo o mundo. O Diabetes representa uma importante causa de cegueira, insuficiência renal, amputação de membros inferiores e outras consequências à longo prazo que impactam significativamente na qualidade de vida. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (2016), o número de portadores da doença em todo o mundo quadruplicou, passando de 108 milhões em 1980 para 422 milhões de adultos diabéticos em todo o mundo em 2020 (Seyam *et al.*, 2020). Dados da Federação Internacional de Diabetes mostraram que 8,8% da população entre 20 e 79 anos de idade (424,9 milhões de pessoas) vivia com diabetes em 2017. As projeções para 2045 são de que estes casos cheguem a 628,6 milhões (Milech, 2019). Aproximadamente 79% destes diabéticos vivem em países em desenvolvimento, nos quais deverá ocorrer o maior aumento dos casos de diabetes nas próximas décadas (Organization, 2016; Milech, 2019).

Um dos tratamentos para esta patologia consiste no uso de insulina exógena, especialmente, para os pacientes que apresentam Diabetes Mellitus Tipo 1, embora a insulina também possa ser necessária aos pacientes portadores do Diabetes Mellitus Tipo 2 (Organization, 2016). Neste século, encontram-se comercialmente diferentes tipos de insulina exógena (Korolkovas e França 2006; Milech *et al.*, 2016).

Os tratamentos à base de insulina envolvem administrações de injeções subcutâneas diárias, que apresenta várias desvantagens para o paciente, como dor e desconforto, podendo promover uma não adesão ao tratamento(American Diabetes Association, 2017), ganho de peso, hipoglicemia, edema, lipodistrofia e infecções de pele. Além disso, apenas 20% da insulina administrada por via subcutânea atinge a circulação hepática (Macedo *et al.*, 2020). Assim, para aumentar a adesão ao tratamento e melhorar a qualidade de vida dos diabéticos, abordagens alternativas para a administração controlada de insulina estão sendo amplamente exploradas (Kempe *et al.*, 2008; Robles *et al.*, 2014; Siddiqui *et al.*, 2017).

Um dos polímeros que tem sido associado à insulina na tentativa de obter um sistema de liberação eficaz é a quitosana. Os sistemas de matriz de quitosana têm sido amplamente explorados. Uma das principais vertentes aponta para o desenvolvimento de sistemas que possibilitem o uso oral da insulina (Mukhopadhyay

et al., 2014; Song *et al.*, 2014; Abbad *et al.*, 2015; Al-Kurdi *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015; Hecq *et al.*, 2015; Mansourpour *et al.*, 2015; Moghassemi *et al.*, 2015; Mukhopadhyay *et al.*, 2015; Qinna *et al.*, 2015; Sheng *et al.*, 2015; Al Rubeaan *et al.*, 2016; Liu, L. *et al.*, 2016; Liu, M. *et al.*, 2016; Lopes *et al.*, 2016; Verma *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016; Al-Remawi *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2017; He *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017; Lopes *et al.*, 2017; Wang, Y. *et al.*, 2017; Bhattacharyya *et al.*, 2018; Dai *et al.*, 2018; Ji *et al.*, 2018; Sahoo *et al.*, 2019; Hadiya *et al.*, 2021; Kumar *et al.*, 2021). No entanto, a administração oral de insulina é limitada por uma série de fatores, como degradação enzimática no trato gastrointestinal e baixa permeabilidade através das membranas intestinais, o que resulta em baixa biodisponibilidade oral (Nicoletti e Frasson, 2013). Além de sistemas orais de liberação de insulina, os sistemas transbucal (Ke *et al.*, 2015; Lancina *et al.*, 2017), bucal (Boateng *et al.*, 2014; Mortazavian *et al.*, 2014a; Mahdizadeh Barzoki *et al.*, 2016; Macedo Ana S., 2020), nasal, transdérmica, intra-peritoneal, ocular, retal, vaginal, etc (Roy e Bhattacharjee, 2020) de liberação controlada de insulina vêm sendo estudados.

Mesmo que vários estudos sobre abordagens alternativas para a administração controlada de insulina tenham sido reportados, ainda não é possível a administração oral, transbucal e bucal deste fármaco (Barbosa *et al.*, 2020). Portanto, a administração alternativa de insulina ainda é um grande desafio e mais pesquisas precisam ser conduzidas visando o desenvolvimento de uma rota alternativa para administração da insulina. Isto irá melhorar consideravelmente a adesão dos pacientes ao tratamento e proporcionará uma melhor homeostase da glicose no corpo; também reduzirá a quantidade de doses e, assim, possíveis efeitos colaterais da droga.

Desta forma, neste trabalho foram desenvolvidos dispositivos à base de quitosana, na forma de membranas e esferas, para encapsulamento da insulina visando sua administração por uma rota não convencional. A influência do método de processamento (liofilização, evaporação do solvente e gelificação ionotrópica), tipo de solvente empregado para dissolução da quitosana (ácido acético ou ácido lático) e uso ou não de neutralização no comportamento de encapsulamento e liberação da insulina mediante ensaio *in vitro* foram avaliados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Diabetes Mellitus (DM)

O diabetes é um distúrbio metabólico crônico grave que ocorre quando o pâncreas não produz insulina, hormônio que regula a glicemia, suficiente ou quando o corpo não pode efetivamente usar a insulina produzida. Essa doença evidencia uma epidemia mundial e seu combate é um desafio constante para os sistemas de saúde de todo o mundo (International Diabetes Federation, 2015). Em 2012, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (Organization, 2016), o diabetes causou 1,5 milhões de óbitos e devido à glicemia superior ao ideal aumentar os riscos cardiovasculares, aos vasos sanguíneos, olhos, rins e nervos, mais 2,2 milhões de mortes ocorreram. Dessas 3,7 milhões de mortes, 43% foram de pessoas com idade inferior a 70 anos.

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, o número de portadores da doença em todo o mundo quadruplicou, passando de 108 milhões em 1980 para 422 milhões de adultos diabéticos em todo o mundo em 2020 (Seyam *et al.*, 2020). Dados da Federação Internacional de Diabetes mostraram que 8,8% da população entre 20 e 79 anos de idade (424,9 milhões de pessoas) vivia com diabetes em 2017. As projeções para 2045 são de que estes casos cheguem a 628,6 milhões (Milech, 2019).

A classificação atual do Diabetes Mellitus (DM) baseia-se na sua etiologia e não no tipo de tratamento utilizado; portanto, a classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Associação Americana de Diabetes (ADA) inclui quatro classes clínicas: DM tipo 1 (DM1), autoimune (A) e idiopático (B); DM tipo 2 (DM2), outros tipos específicos de Diabetes Mellitus (DM) e Diabetes Mellitus gestacional (DM gestacional). Há ainda duas categorias, que são referidas como pré-diabetes, que são a glicemia de jejum alterada e a tolerância à glicose diminuída. Essas categorias não são entidades clínicas, mas fatores de risco para o desenvolvimento de DM e doenças cardiovasculares (Milech *et al.*, 2016).

A DM1 e a DM2 são doenças heterogêneas em que a apresentação clínica e a progressão podem variar consideravelmente. A classificação é importante para a determinação da terapia, mas alguns indivíduos não podem ser claramente classificados como tendo DM1 ou DM2 no momento do diagnóstico. Os paradigmas

tradicionais ditam que DM2 ocorre apenas em adultos e DM1 apenas em crianças. No entanto, esses paradigmas não apresentam um grau de precisão adequado, pois as duas formas, DM1 e DM2, ocorrem em ambos os grupos etários. Embora possam ocorrer dificuldades em distinguir o tipo de diabetes em todos os grupos etários no início, o verdadeiro diagnóstico torna-se mais óbvio ao longo do tempo (Marathe *et al.*, 2017).

Caso a doença não seja diagnosticada ou se não for bem controlada pode causar inúmeros danos à saúde, como cegueira, insuficiência renal, amputação dos membros inferiores, doenças cardiovasculares e várias outras consequências que, em longo prazo, afetam significativamente a qualidade de vida (Organization, 2016).

Dados da Federação Internacional do Diabetes (IDF) estipulam que 193 milhões de pessoas com diabetes não são diagnosticadas e, portanto, estão mais em risco de desenvolver complicações. Além disso, estimou-se que um em cada 15 adultos tenha diminuído a tolerância à glicose e um em cada sete nascimentos seja afetado pela diabetes gestacional. Ambas as condições estão associadas a um risco aumentado de desenvolver DM2 na vida adulta. Embora menos comum, a DM1 é agravada em cerca de 3% ao ano, particularmente entre as crianças. Cerca de 86.000 crianças desenvolvem DM1 a cada ano e quando a insulina não está disponível, a expectativa de vida de uma criança com DM1 é curta (International Diabetes Federation, 2015). Pois a insulina exógena é o principal tratamento para a DM1, embora também possa ser necessária aos pacientes portadores de DM2 (Organization, 2016).

2.2. Insulina

A insulina é um hormônio anabólico, sintetizado pelas células beta das ilhotas de Langerhans do pâncreas. É o hormônio responsável pelo metabolismo da glicose em todos os tecidos do corpo, com exceção das células nervosas. Normalmente, a insulina é liberada quando os níveis de glicose plasmática estão aumentados, como acontece após as refeições, variando de acordo com a quantidade e o tipo de alimento ingerido (Korolkovas e França 2006).

A massa molar da insulina humana é de, aproximadamente, 5800 Da. Sua estrutura apresenta duas cadeias de polipeptídeos ligadas por duas pontes dissulfídicas. As cadeias A e B possuem, respectivamente, 21 e 30 aminoácidos. A

insulina é produzida pelo organismo na forma de um pro-hormônio, a pro-insulina (Figura 5), que é transformada por ação proteolítica na cadeia C em hormônio ativo (Genuth, 2008). A deficiência desse hormônio provoca um distúrbio metabólico denominado diabetes e um dos tratamentos para esta patologia consiste no uso de insulina exógena.

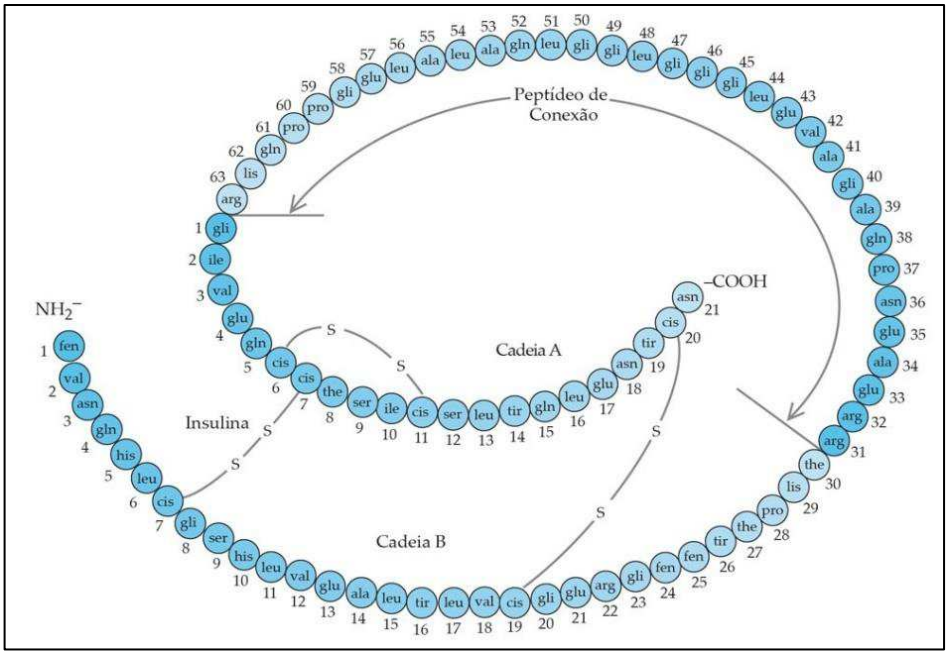


Figura 5 - Sequência de aminoácidos da molécula de pró-insulina humana (Genuth, 2008).

A insulina exógena tem sua dose expressa em “unidades internacionais” (UI). Existem vários tipos de insulina disponíveis para o tratamento de diabetes, sendo diferenciadas pela duração da ação e pelo início da ação. As insulinas encontradas para o tratamento do diabetes são: (I) insulina de ação rápida, que tem seu início de ação variando de 30 minutos a 1 hora, atinge seu pico metabólico em 2 a 4 horas e a duração da ação é de 6 a 8 horas; (II) insulina de ação ultrarrápida, com início de ação em 15 minutos, pico entre 30 e 90 minutos e duração de ação de 3 a 5 horas; (III) insulina de ação intermediária, possui início de ação de 1 a 3 horas, atinge seu efeito máximo entre 6 e 12 horas e sua ação dura, normalmente, é de 18 a 24 horas; e (IV) insulina de ação longa ou ultralonga, que apresenta início de até 4 horas, seu pico de efeito varia de 6 a 8 horas e, algumas não apresentam pico, com duração de ação de 18 a 42 horas (Korolkovas e França 2006; Milech *et al.*, 2016). As insulinas comerciais existentes estão relacionadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Tipos e características das insulinas comercialmente existentes tomando como referência 100UI de insulina humana. (Milech *et al.*, 2016).

Tipo	**Início da Ação**	**Pico**	**Duração**	**Horário para injeção**
Ultrarrápida (Análogos Ultrarrápidos) •Apidra® (Glulisina) •Humalog® (Lispro) •NovoRapid®(Asparte)	10-15 minutos	1-2 horas	3-5 horas	Utilizada junto às refeições. Deve ser injetada imediatamente antes das refeições.
Rápida (Insulina Humana Regular) •Humulin® •Novolin®	30 minutos	2-3 horas	6 horas e 30 minutos	Utilizada junto às refeições ao dia. Deve ser injetada entre 30 e 45 minutos antes do início das refeições.
Ação intermediária (NPH – humana) •Humulin® N •Novolin® N	1-3 horas	5-8 horas	Até 18 horas	Frequentemente, a aplicação começa uma vez ao dia, antes de dormir. Pode ser indicada uma ou duas vezes ao dia. Não é específica para refeições.
Longa duração (Análogos lentos) •Lantus® (Glargina) •Levemir® (Detemir) •Tresiba® (Degludeca)	90 minutos	Sem pico	Lantus: até 24 horas Levemir: de 16 a 24 horas Tresiba: > 24h	Frequentemente, a aplicação começa uma vez ao dia, antes de dormir. Levemir pode ser indicada uma ou duas vezes ao dia. Tresiba é utilizada sempre uma vez ao dia, podendo variar o horário de aplicação. Não é específica para refeições.

Desde que a insulina teve seu primeiro uso bem-sucedido e começou a ser comercializada, os cientistas vêm desenvolvendo constantemente novas pesquisas para melhorar os efeitos desejados e reduzir os colaterais. Na década de 1950, a insulina basal começou a ser usada e, na década de 1990, foi desenvolvida uma insulina de ação mais conveniente e rápida. A duração da insulina basal melhorou

com o desenvolvimento da insulina glargina, em 2000, e da insulina detemir, em 2004 (Woo, 2015). Mesmo com os diversos tipos de insulina existentes e as melhorias na insulina basal e prandial, os tratamentos básicos envolvem a administração de injeções subcutâneas diárias, o que promove um desconforto para o paciente e pode provocar uma não adesão ao tratamento (American Diabetes Association, 2017). Por muitos anos, portanto, a ciência tem sido desafiada a melhorar a qualidade de vida e aumentar a adesão ao tratamento para diabéticos através de abordagens alternativas para a administração controlada de insulina, que estão sendo amplamente exploradas, conforme descrito anteriormente. Dentre essas, encontra-se o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada para insulina.

2.3. Sistema de Liberação Controlada de Fármacos

A pesquisa de fármacos teve seu início com a busca de plantas medicinais no início das civilizações humanas. Na metade do século XX ocorreu a evolução da síntese química dos medicamentos e a descoberta dos sistemas de liberação controlada e, no século XXI, vivemos a era biotecnológica da produção de novos fármacos e novas formas farmacêuticas (Silva, 2006).

Os sistemas de liberação controlada têm por objetivo prolongar e melhorar o controle da administração de fármacos através da otimização de sua ação terapêutica com o mínimo de efeitos colaterais (Moura, 2012). Um sistema ideal de distribuição de fármacos deve apresentar características mínimas, tais como: rápido alcance da concentração terapêutica e manutenção dentro desta faixa; não deve ser sensível ou com possibilidade de bloqueio por fatores ambientais, ou ainda funcionar por vários mecanismos. Deve ser previsível por princípios físico-químicos, devendo o fármaco ser altamente disperso. Também deve ter capacidade de aumentar ou manter a estabilidade física e química do fármaco, e acima de tudo ser um sistema otimizado, ou seja, garantir eficiência, segurança e confiabilidade máximas ao medicamento (Nicoletti e Frasson, 2013).

As formas de administração convencionais permitem uma libertação rápida e indiscriminada da substância ativa. Este tipo de libertação resulta em um aumento da concentração do fármaco no sangue, a qual atinge rapidamente um máximo, seguida de uma diminuição. Desta forma a manutenção da concentração dentro do intervalo terapêutico pode ser problemática. Assim, para que a concentração do fármaco esteja

dentro do intervalo terapêutico continuadamente, é necessário administrá-lo várias vezes ao dia, resultando numa flutuação significativa dos níveis no organismo. Os sistemas de liberação controlada mantem a concentração do fármaco no organismo dentro do intervalo terapêutico por tempo prolongado, utilizando-se uma única dosagem (Silva, 2006; Moura, 2012; Nicoletti e Frasson, 2013). Na Figura 6 pode-se observar a comparação entre os perfis de libertação de um fármaco por administração convencional e de um administrado pelo sistema de libertação controlada, em função do tempo.

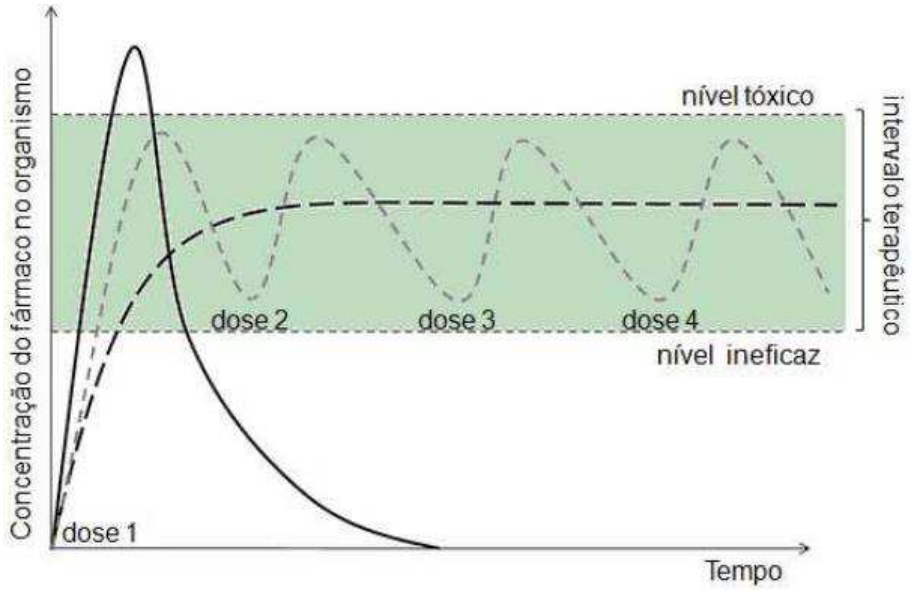


Figura 6 - Comparação dos perfis de libertação de um fármaco resultantes da administração de um sistema de libertação convencional por dose única (——) e várias doses (---) e de um sistema de libertação controlada (— — —) (Moura, 2012).

Os sistemas de liberação controlada são classificados de acordo com o mecanismo de liberação do fármaco em: controle de transporte do fármaco por difusão, controle por dissolução, controle por erosão e controle por transporte do fármaco por fluxo contínuo (Aulton, 2005).

Em sistemas de liberação com controle de transporte do fármaco por difusão, a liberação do fármaco sucede-se por dissolução por poros preenchidos. Dependendo da unidade de liberação na qual a dissolução ocorre, este sistema pode ser dividido em sistema matricial ou sistema reservatório (Figura 7). No sistema matricial (Figura 7 (I)) o material revestido é denominado de encapsulado ou núcleo e o material que forma o revestimento é conhecido como matriz, material de parede ou encapsulante.

Este sistema é caracterizado por uma esfera polimérica maciça na qual se encontra partículas do fármaco distribuídas por toda a sua extensão e a difusão acontece por finos poros localizados dentro do núcleo da unidade de liberação. Já no sistema reservatório (Figura 7 (II)) é caracterizado por um envoltório polimérico que cobre o interior onde se encontra uma matriz com fármaco ou a substância que será liberada. Neste sistema a difusão acontece por um fino filme ou uma membrana, geralmente polimérica, insolúvel em água que reveste a unidade de liberação (Aulton, 2005; Moura, 2012; Nicoletti e Frasson, 2013).

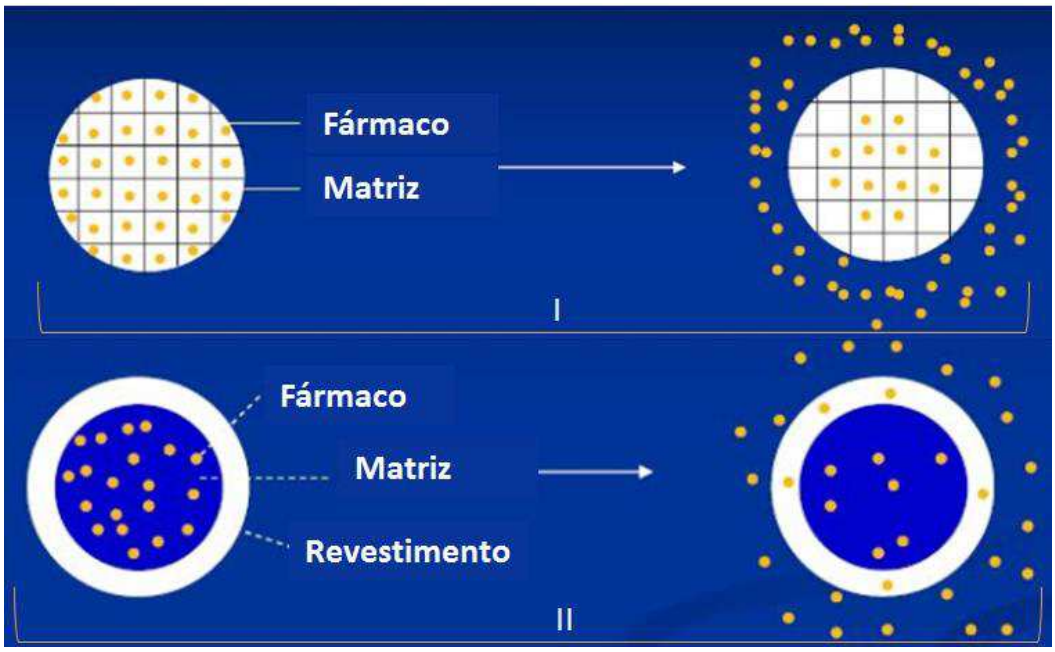


Figura 7 – Esquema dos mecanismos de liberação de fármacos por sistemas poliméricos: I - Sistema matricial e II - Sistema reservatório (Aulton, 2005).

Sistemas de liberação controlada por dissolução são regulados pela dissolução do fármaco e dos componentes do comprimido no fluido gastrointestinal. Uma forma alternativa para alcançar a liberação controlada neste sistema baseia-se na incorporação do fármaco em um carreador de dissolução lenta (Moura, 2012).

O sistema de liberação controlada por erosão tem sua regulação realizada pela erosão da matriz na qual o fármaco encontra-se disperso. A matriz é, normalmente, formada por compactação e o sistema pode ser classificado como de dose única. Na erosão pode ocorre uma liberação contínua do material formador da matriz a partir da superfície do comprimido (Bansode *et al.*, 2010).

Osmose pode ser definida como o movimento contínuo de um determinado solvente de um compartimento que possui baixa concentração do soluto para um com alta concentração. Desta forma, o sistema de liberação controlada por osmose é regulado pela pressão osmótica provocada pelo fluxo do líquido para a unidade de liberação, que promove uma diferença de pressão osmótica entre o interior e o exterior da unidade que, por sua vez, são separadas por uma membrana semipermeável que permite a passagem do solvente, mas não a do soluto (Aulton, 2005; Gupta e Dey, 2013).

Durante o desenvolvimento de um sistema de liberação controlada alguns parâmetros devem ser avaliados e os mais importantes são a capacidade de carga, ou seja, a quantidade de fármaco incorporado ao sistema; a eficácia de encapsulamento, quantidade de fármaco retida pelo sistema; e a liberação do fármaco pelo sistema. O carregamento do fármaco na matriz de suporte é o processo de incorporação do fármaco dentro da matriz e o processo inverso consiste na liberação do fármaco para o meio onde as moléculas do fármaco são liberadas e tornam-se disponíveis para que ocorra sua absorção e ação farmacológica. Os ensaios de eficiência de encapsulamento são necessários, pois a quantidade de fármaco encapsulado estabelece o desempenho do sistema de liberação, visto que influencia a taxa e extensão da liberação do fármaco pelo sistema. Tanto a carga de fármaco quanto a eficácia de encapsulação dependem das propriedades físico-químicas e das interações entre o fármaco, a matriz de suporte e o ambiente (Allen Jr *et al.*, 2013).

O fármaco interage com a matriz por meio de ligações ou interações químicas que podem ser ligação de hidrogênio, interação iônica, interação dipolo, retenção física, precipitação, ligação covalente ou, ainda, ser adsorvido na superfície. Na maioria dos sistemas de liberação controlada, mais de um mecanismo de carregamento está envolvido (Aulton, 2005). A interação entre o fármaco e a matriz determina tanto a capacidade de carga quanto a eficiência do encapsulamento e a liberação do fármaco; de forma que o aumento da interação fármaco/matriz é diretamente proporcional a capacidade de carga e eficiência de encapsulamento e inversamente proporcional a liberação do fármaco pelo sistema. Desta forma, para aumentar a eficiência de encapsulamento é necessário que o fármaco interaja, preferencialmente, com a matriz e para alimentar a liberação do fármaco a condição desejada é a de que o fármaco interaja, prioritariamente, com o meio circundante (De Villiers *et al.*, 2009).

No sistema de liberação controlada por via oral, o fármaco, após ser liberado, será absorvido e distribuído na circulação sistêmica. Neste sistema o principal objetivo é aumentar o período de tempo no qual a concentração do fármaco é mantida no sangue. A forma de liberação do fármaco pode variar de uma liberação contínua até uma liberação pulsátil; onde o fármaco pode ser liberado em pulsos de liberação rápida ou em pulsos rápidos seguidos de uma liberação lenta (Nicoletti e Frasson, 2013).

O sistema de liberação transbucal e bucal fornece uma rota atraente por apresentar-se de forma acessível, além da mucosa bucal ser mais permeável do que o epitélio da pele. A região mostra-se altamente vascularizada, de modo que os fármacos absorvidos atingem rapidamente a circulação sistêmica. O transporte de fármaco pelo sistema transbucal e bucal é semelhante ao que ocorre no sistema transdérmico, onde o fármaco é transportado ao local de ação através da difusão passiva (Aulton, 2005; Lancina *et al.*, 2017). Uma estratégia para aumentar a liberação de fármaco pelo sistema transbucal e bucal implica em incluir intensificadores de permeação que distendem as junções entre as células epiteliais e polímeros mucoadesivos capazes de manter compostos em altas concentrações locais permitindo, assim, a difusão (Lancina *et al.*, 2017). Um polímero natural com propriedade mucoadesiva que vem sendo estudado para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de insulina é a quitosana.

2.4. Quitosana

A quitosana é um polímero natural obtido da desacetilação da quitina, polímero constituído por uma sequência linear de açúcares monoméricos β-(1-4) 2-acetamido-2-desoxi-D-glicose (N-acetilglicosamina). Estruturalmente, a quitina e a quitosana (Figura 8) são semelhantes, diferenciando-se apenas pela presença dos grupos 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranose na quitosana. O grau médio de desacetilação da quitina define a porcentagem de unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranose presentes, em média, nas cadeias de quitosana (Azevedo *et al.*, 2007). É necessário que o grau de desacetilação da quitina seja maior que 50% para que o polímero obtido seja considerado quitosana. Geralmente, é pouco provável obter quitosana com alto grau de desacetilação, pois o aumento do grau de desacetilação é proporcional ao grau de degradação da cadeia polimérica. O polímero obtido deve

ser caracterizado quanto à massa molar, grau de desacetilação e distribuição de grupos NH_3 ao longo das cadeias poliméricas, pois estas características podem influenciar sua biodegradabilidade (Kumar, 2000; Silva *et al.*, 2006; Campos, 2007; Kean e Thanou, 2010).

A quitosana é classificada pela sua massa molar em: quitosana de baixa massa molar, apresenta massa molar inferior a 150K Da; quitosana de média massa molar, com massa molar que se estende de 150 KDa a menos que 700 KDa; e quitosana de alta massa molar, possui massa molar igual ou superior a 700 KDa (Wong, 2009).

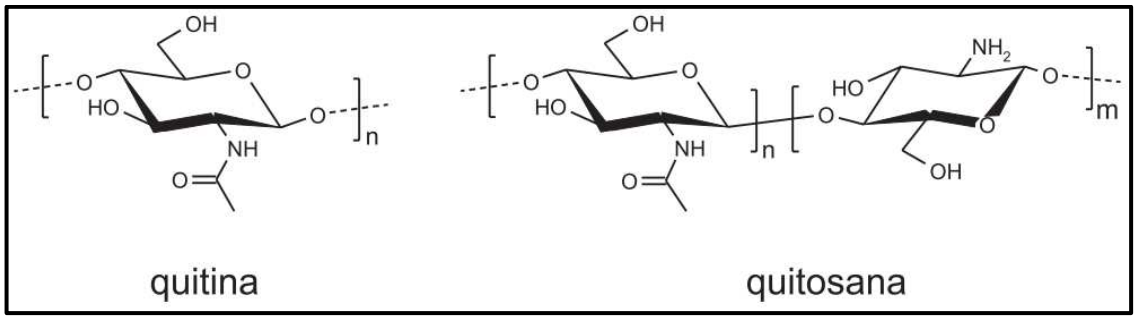


Figura 8 - Estrutura molecular da quitina e da quitosana (Silva *et al.*, 2006).

A quitosana tem a capacidade de solubilizar-se em condições ligeiramente ácidas e é degradada quando aquecida a temperaturas acima de 181ºC e pela lisozima, enzima presente na lágrima e no muco dos seres humanos. Além dessas características, a grande abundância e suas propriedades biológicas, fazem da quitosana um polímero de elevada utilidade e interesse em diversas áreas (Laranjeira e De Fávere, 2009; Homez-Jara *et al.*, 2018).

Dentre as propriedades da quitosana, as que geram maior interesse são: biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioatividade, atoxicidade, propriedades de absorção, capacidade filmogênica, atividade antimicrobiana, bioadesividade e poder hemostático. Outra característica da quitosana que desperta interesse é a presença de grupos funcionais em sua estrutura, que podem ser usados para promover a derivação química das moléculas podendo produzir materiais com uma grande variedade de propriedades físicas, mecânicas e biológicas (Campos, 2007; Moura, 2012).

Devido as suas propriedades, a quitosana tem sido amplamente utilizada na área farmacêutica, no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de

fármacos. Sua utilização para esta aplicação surgiu desde a década de 1980 e atua como agente facilitador na entrega de drogas sistêmicas e locais, capaz de proporcionar uma taxa de liberação controlada e prolongada da droga com o mínimo de efeito colateral. Por ser um material seletivamente permeável, surgiu como bom candidato para liberação controlada de medicamentos no meio gastrointestinal e na mucosa oral (Kumar, 2000).

Na busca de uma nova via de administração e redução do número de administrações, a insulina é um dos fármacos que vem sendo associados à quitosana na tentativa de obter um sistema de liberação controlada eficaz. Essa associação se deve as propriedades da quitosana que além de ser biocompatível, biodegradável, atóxica e bioadesiva, protege a insulina da degradação enzimática mantendo a atividade e estabilidade da insulina por um mês a temperatura ambiente (25°C) (Bahman *et al.*, 2021).

Algumas das pesquisas realizadas abordaram as administrações por via oral (Mukhopadhyay *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2014; Abbad *et al.*, 2015; Al-Kurdi *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015; Hecq *et al.*, 2015; Mansourpour *et al.*, 2015; Moghassemi *et al.*, 2015; Mukhopadhyay *et al.*, 2015; Qinna *et al.*, 2015; Sheng *et al.*, 2015; Al Rubeaan *et al.*, 2016; Liu, L. *et al.*, 2016; Liu, M. *et al.*, 2016; Lopes *et al.*, 2016; Verma *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016; Al-Remawi *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2017; He *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017; Lopes *et al.*, 2017; Wang, J. *et al.*, 2017; Bhattacharyya *et al.*, 2018; Ji *et al.*, 2018; Sahoo *et al.*, 2019; Yin *et al.*, 2019; Hadiya *et al.*, 2021; Kumar *et al.*, 2021), onde observa-se o desenvolvimento de carreadores de insulina preparados com quitosana associada com outros polímeros ou cerâmicas na forma de nanotransportadores para uso por via oral. Porém, os que realizaram estudos *in vivo* obtiveram uma redução pouco significante dos níveis glicêmicos e um rápido retorno aos níveis glicêmicos iniciais.

Além de sistemas orais de liberação de insulina o sistema transbucal utilizando espuma de quitosana com poli (óxido de etileno) como carreador da insulina, demonstrou que a permeabilidade da insulina na região bucal foi facilitada pela mistura com alto teor de quitosana, entretanto a eficácia de encapsulamento e liberação de insulina pelo sistema não foi avaliada (Lancina *et al.*, 2017). Outros autores investigaram o efeito da modificação da vitamina B12 na absorção de insulina encapsulada em nanopartículas de trimetil-quitosana sob a influência do muco e observaram que, quando comparado com as nanopartículas não modificadas, as

nanopartículas com vitamina B12 apresentaram um maior encapsulamento de insulina e uma maior permeabilidade do fármaco tanto na presença quanto na ausência de muco; porém, as nanopartículas com vitamina B12 ainda apresentaram-se parcialmente influenciadas pelo muco (Ke *et al.*, 2015).

Outra via de administração estudada tem sido a bucal. Géis de quitosana tiolada ou incorporada com gelatina e filmes foram desenvolvidos para a aplicação como adesivo bucal. No entanto, poucos estudos realizaram ensaios *in vitro* conclusivos demonstrando a real eficácia do gel como adesivo bucal (Boateng *et al.*, 2014; Mortazavian *et al.*, 2014b; Mahdizadeh Barzoki *et al.*, 2016; Diab *et al.*, 2021).

Apesar da quitosana ser estudada, pelo setor farmacêutico, para exercer a função de agente encapsulante, para liberação controlada de insulina, algumas aplicações farmacêuticas deste polímero são limitadas por sua incapacidade de solubilizar-se em água e em meio neutro, condição indispensável para a atividade fisiológica das enzimas (Macedo *et al.*, 2020). Devido à possibilidade de derivados da quitosana apresentar uma melhor solubilidade em água as aplicações deste polímero podem aumentar significativamente (Silva *et al.*, 2006). Um dos derivados da quitosana que apresenta solubilidade em uma ampla faixa de pH é a carboximetilquitosana (Abreu e Campana-Filho, 2005; Liu, Zhi*, et al.*, 2012).

2.5. Carboximetilquitosana

Um dos derivados da quitosana obtidos pela carboximetilação pouco investigado para aplicações médicas e farmacêuticas é a carboximetilquitosana; que pode possuir grupos carboximetil em sítios hidroxil, nos carbonos 3- e 6- da unidade glicopiranose, ou amino, onde dois grupos carboximetil podem ser introduzidos, ou, ainda, nos dois sítios presentes na cadeia de quitosana. Dependendo de onde ocorre a inserção do grupo carboximetil pode-se obter N-; O-; N,O-; ou N,N-carboximetilquitosana (Abreu e Campana-Filho, 2005; Bai *et al.*, 2017). Sendo a ordem mais provável de substituição 6-OH > 3-OH > 2-NH_2 (Jimtaisong e Saewan, 2014).

Como a reação de carboximetilação não costuma ser completa, inserções do grupo carboximetil em algumas unidades glucosamina e unidades acetilglucosamina podem ocorrer, provenientes da desacetilação parcial da quitina. Geralmente, uma

mistura complexa de derivados carboximetilados é obtida quando são utilizadas condições não controladas (Abreu e Campana-Filho, 2005).

Quando comparada a quitosana, a carboximetilquitosana apresenta-se hidrossolúvel em pH neutro. Isto se deve à inserção do grupo carboximetil, que favorece a formação de ligações de hidrogênio entre o polímero e a água, e pela presença do grupo carboxílico (COO^-) (Jimtaisong e Saewan, 2014). Além da hidrossolubilidade, a carboximetilquitosana possui a capacidade de alta viscosidade, formação de filmes e géis, além de possuir as vantajosas propriedades biológicas da quitosana, como atoxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioatividade, bioadesividade, entre outras (Jimtaisong e Saewan, 2014; Bai *et al.*, 2017).

Devido à solubilidade em água e a conservação das propriedades biológicas da quitosana, a carboximetilquitosana tornou-se um candidato atraente no campo farmacêutico. A carboximetilquitosana vem sendo investigada por pesquisadores como suplemento alimentar para redução do colesterol, dos níveis glicêmicos e regulação dos níveis plasmáticos de insulina (Liu, Yang*, et al.*, 2012).

Diferentemente da quitosana, foram encontrados poucos estudos com carboximetilquitosana como matriz polimérica de sistemas que buscam uma nova via de administração de insulina. A carboximetilquitosana vem sendo estudada por alguns pesquisadores no intuito de obter uma administração oral de insulina (Lin, C. C. e Lin, C. W., 2009; Wang *et al.*, 2016; Wang, J. *et al.*, 2017). Lin e Lin (2009) desenvolveram nanopartícuas de N,O-carboximetilquitosana e tripolifosfato (TPP) sensíveis ao pH carregadas com insulina preparadas por gelificação iônica e observaram que a liberação cumulativa de insulina foi dependente da relação N,O-carboximetilquitosana/TPP, da concentração inicial de insulina encapsulada e do aumento do pH; não sendo avaliados outros parâmetros. Em estudos realizados por Wang *et al.* (2016) e Wang *et al.* (2017), nanpartículas de carboximetilquitosana e quitosana foram preparadas pelo método iônico de gelificação, em seguida insulinas com cargas positivas e negativas foram impregnadas as nanopartículas. As nanopartículas com cargas negativas mostraram ser mais eficazes tanto nos ensaios *in vitro* como em ensaios *in vivo*, porém quando comparados com a insulina administrada por via subcutânea observou-se um aumento significativo no tempo de início da ação.

Alguns estudos utilizaram a carboximetilquitosana visando rotas não convencionais de administração de insulina foram encontrados (Bai *et al.*, 2017; Yang

et al., 2020; Zhang *et al.*, 2020). Bai e colaboradores (2017), prepararam nanopartículas de carboximetilquitosana/insulina reticulas com $CaCl_2$ pelo método de gelificação iônica. Foram avaliadas apenas as condições de fabricação das nanopartículas, capacidade de carga, eficiência de encapsulamento e liberação da insulina *in vitro*; onde os autores observaram que a eficiência de encapsulamento, capacidade de carga, e tamanho médio das nanopartículas diminuíram com as concentrações crescentes de insulina, o aumento da concentração de carboximetilquitosana diminuiu a eficiência de encapsulamento e aumentou o tamanho médio das partículas e que a liberação de insulina foi reduzida com o aumento da reticulação. Micropartículas de hidrogéis de carboximetilquitosana enxertados com carboximetil β-ciclodextrina como sistema de liberação controlada de insulina foram desenvolvidos por Yang *et al.* (2020). Os sistemas conseguiram reter a insulina, quando colocada em meio que simulava o ambiente gástrico, e liberou a insulina após a passagem para as condições intestinais; as micropartículas foram transportadas para o interior das células Caco-2 e moléculas de insulina liberadas não mostraram diferença significativa na estrutura da molécula. Ademais, em estudo *in vivo*, as micropartículas de hidrogeis mostraram uma redução significativa e sustentada (variando de 6 h a 12 h) nos níveis de glicose sanguínea de camundongos diabéticos. Zhang *et al.* (2020) desenvolveram nanopartículas a base de carboximetilquitosana e associaram a *microneedle* (sistema de microagulhas) na formação de um sistema de liberação de insulina a ser administrado pela via transdérmica. As nanopartículas obtiveram uma eficácia de encapsulamento de aproximadamente 83% e capacidade de carga de 34%; em um ensaio onde os *microneedle* foram utilizados para penetrar a pele, a penetração das nanopartículas foi 4,2 vezes maior que a penetração passiva. O estudo *in vivo* demonstrou que as nanopartículas promovem uma rápida redução dos níveis de glicose sanguínea, no entanto, estes níveis aumentaram após 1,5 horas, mas o sistema nanopartículas-*microneedle* consegue estabilizar os níveis de glicose por 6 horas.

2.6. Tripolifosfato de Sódio (TPP)

Outra forma de modificar a quitosana é através da reticulação. Um dos agentes reticulantes utilizados na reticulação da quitosana é o tripolifosfato de sódio (TPP), ânion multivalente com massa molar de 367,86 g/mol que se apresenta na

forma de pó branco, pouco higroscópico, completamente solúvel em água a 25ºC. O TPP reticula a quitosana através das interações iônicas entre as porções negativamente carregadas (PO^-) dos grupos fosfato de TPP e as porções protonadas (NH_3^+) das cadeias de quitosana (Martins *et al.*, 2012; Gierszewska e Ostrowska-Czubenko, 2016). A reticulação da quitosana pelo TPP pode ser visualizada na Figura 5.

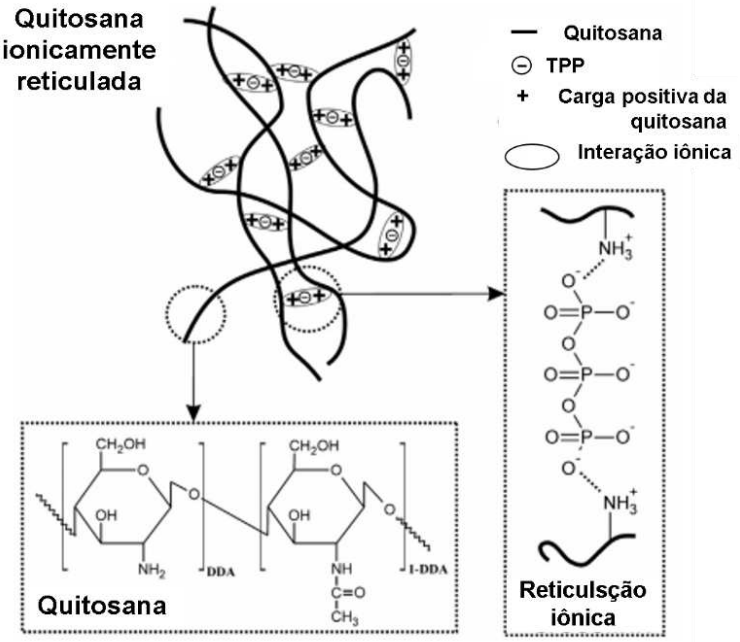


Figura 5- Representação esquemática da reticulação iônica da quitosana modificada com TPP (Gierszewska e Ostrowska-Czubenko, 2016).

A quitosana reticulada com TPP vem sendo utilizada em estudos que visam empregar a quitosana como matriz de sistemas de liberação de fármacos. Esferas de quitosana-TPP foram preparadas por gelificação ionotrópica visando a liberação controlada de glipizida e os resultados mostraram que as esferas de hidrogel de quitosana-TPP podem ser utilizadas como um sistema de liberação controlada sensível ao pH para a liberação de glipizida (Sun *et al.*, 2011). Vimal *et al.* (2012) produziram nanopartículas de quitosana-TPP por gelificação ionotrópica para a liberação de genes em diferentes tecidos de peixes quando administrado por via oral. O DNA de *Vibrio anguillarum* (pcDNA 3.1), um vetor de expressão eucariótico, foi utilizado como modelo e os resultados indicam que o pcDNA 3.1 pode ser facilmente entregue aos peixes, alimentando-os com nanopartículas de quitosana-TPP. Outros autores desenvolveram nanopartículas de quitosana-TPP por gelificação ionotrópica

para carregamento do veneno de víbora de Russell como um potencial sistema de liberação de antígeno. Os resultados mostraram que as nanopartículas foram eficazes no encapsulamento do veneno de cobra e os autores sugerem que as nanopartículas de CS/TPP sintetizadas podem ser usadas como uma alternativa para sistemas adjuvantes tradicionais para futuros medicamentos (Venkatesan *et al.*, 2013). Diferentes conteúdos TPP foram utilizados para reticular membranas de quitosana preparadas por liofilização e carregadas com 1,4-naftoquinona a fim de avaliar como a reticulação afetou a liberação do fármaco. O estudo demonstrou que a concentração de TPP afetou a estrutura molecular, porosidade e hidrofilicidade das membranas, bem como, o comportamento de liberação do fármaco, que diminuiu quando a quantidade de TPP aumentou. Além disso, o efeito antiproliferativo das membranas foi diretamente relacionado à quantidade de TPP utilizado no preparo das membranas (Tomaz *et al.*, 2018). O efeito da reticulação iônica do TPP (pH 6,0 e pH 9,0) em esferas de quitosana e quitosana / hidroxiapatita no controle das propriedades físicas e do comportamento de liberação *in vitro* da dexametasona foi investigado por Dantas *et al.* (2019). As esferas mostraram diferenças morfológicas e de reticulação ligados ao pH da solução de TPP, porém todas apresentaram liberação sustentada durante 24 horas; no entanto, a taxa de liberação do fármaco foi afetada pelo pH do TPP. As esferas de quitosana/hidroxiapatita/dexametasona preparadas com TPP com pH 9,0 apresentaram uma liberação mais lenta prolongando o período de liberação. O estudo da cinética de liberação mostrou que a dexametasona foi liberada tanto pela difusão quanto pelo relaxamento das cadeias poliméricas ou intumescimento (mecanismo de transporte anômalo), seguindo o modelo de Peppas-Sahlin.

As matrizes de quitosana-TPP também foram utilizadas para o encapsulamento da insulina. Nanopartículas carregadas com insulina foram preparadas por gelificação iônica de quitosana com TPP e os resultados demonstraram que a insulina foi encapsulada com sucesso (Azevedo *et al.*, 2011). Outro sistema desenvolvido foram membranas de quitosana e quitosana reticuladas por TPP para uso na liberação controlada do sistema de insulina e os autores afirmam que a insulina foi incorporada na membrana da quitosana com ou sem TPP, o agente de reticulante foi eficaz no controle da liberação de insulina e sugerem um possível uso das membranas em sistemas de administração controlada de medicamentos, por via transdérmica e/ou bucal (Lima *et al.*, 2014).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Quitosana de baixa massa molar (massa molar de aproximadamente 160 kDa) com grau de desacetilação de 90% a 98%, fornecida pelo Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste – CERTBIO. Carboximetilquitosana, sintetizada pelo grupo de pesquisa do CERTBIO; Tripolifosfato de sódio P.A com teor de 95% (Dinâmica Química contemporânea Ltda); ácido acético (Glacial) P.A. com grau de pureza de 99,7% (Neon); ácido lático P.A. com grau de pureza de 85% (Anidrol - Produtos para Laboratório); ácido clorídrico P.A com grau de pureza de 36,5% - 38% (Dinâmica Química contemporânea Ltda); hidróxido de sódio P.A. em micro pérolas (Neon), água ultrapura (Ultrapurificador Master System MS 2000); insulina Humana Recombinante expressa em levedura (Sigma-Aldrich); Tampão Fosfato Salina (PBS) (Sigma-Aldrich).

3.2. Preparação das Membranas de Quitosana

As membranas de quitosana foram preparadas com base na metodologia de Holanda (2011). Inicialmente foram preparadas dissoluções de 1 g de quitosana em 100 ml de uma solução ácida (ácido acético ou ácido lático) diluída em proporções estequiométricas, sob agitação magnética a temperatura ambiente (24,5°C ± 2°C) por 24 h. Em seguida, parte da solução polimérica foi neutralizada com solução de hidróxido de sódio à 1 M (pH em torno de 6,7) e filtrada à vácuo com papel filtro qualitativo para retirar impurezas e material insolúvel. O filtrado e a porção de solução de quitosana não neutralizada foram acondicionados a uma temperatura de 14°C (± 2°C); uma vez atingida temperatura, a insulina foi incorporada com o auxílio de uma bomba de infusão (Harvard Apparatus), utilizando taxa de infusão de 25 ml/h. Para tanto, 20 mg da insulina foi dissolvida em 10 ml de água com pH ajustado, por solução de ácido clorídrico à 0,1 M, para 6,8, em seguida a solução de insulina foi adicionado gota a gota à solução de quitosana, com homogeneização lenta, para obter concentrações de 0,2 mg/ml. As soluções quitosana/insulina obtidas foram vertidas em placas de Petri de teflon. Um grupo de amostras foi submetido ao congelamento em um ultra freezer (AmericanLab – 490L), a aproximadamente - 48°C por 24 horas

e, posteriormente, liofilizadas (Liofilizador L108, aço inoxidável AISI304-LIOTOP) a -56° C por 48 h (Lee *et al.*, 2007) e o outro grupo foi mantido em geladeira a uma temperatura de 10°C, visando manter a estabilidade da insulina até completa evaporação do solvente (aproximadamente 12 dias). Os mesmos procedimentos foram empregados na preparação das membranas de quitosana sem insulina para uso como controle (Figura 6).

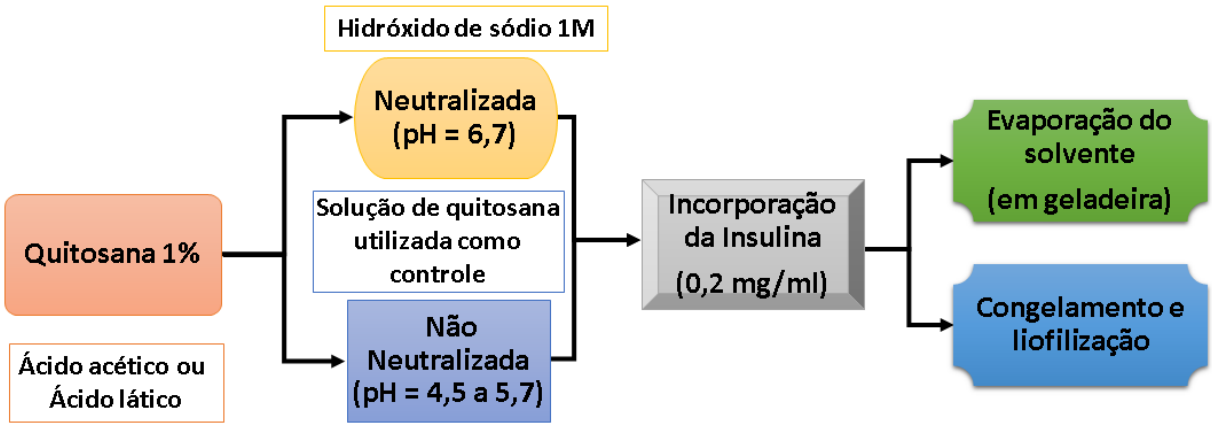


Figura 6– Representação esquemática do processo de obtenção das membranas.

As amostras de quitosana e quitosana/insulina preparadas pelos métodos de evaporação do solvente e congelamento/liofilização foram acondicionadas em geladeira (14 ± 2°C) até o momento das análises. A codificação utilizada está presente nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2- Codificação das membranas preparadas pelo método de evaporação do solvente.

Codificação	Descrição
Q(AA)NNe	quitosana diluída em solução de ácido acético/não neutralizada
QI(AA)NNe	quitosana diluída em solução de ácido acético/não neutralizada/contendo insulina
Q(AA)Ne	quitosana diluída em solução de ácido acético/neutralizada
QI(AA)Ne	quitosana diluída em solução de ácido acético/neutralizada/contendo insulina
Q(AL)NNe	quitosana diluída em solução de ácido lático/não neutralizada
QI(AL)NNe	quitosana diluída em solução de ácido lático/não neutralizada/contendo insulina
Q(AL)Ne	quitosana diluída em solução de ácido lático/neutralizada
QI(AL)Ne	quitosana diluída em solução de ácido lático/neutralizada/contendo insulina

Tabela 3- Codificação das membranas preparadas pelo método de congelamento e liofilização.

Codificação	Descrição
Q(AA)NNc	quitosana diluída em solução de ácido acético/não neutralizada
QI(AA)NNc	quitosana diluída em solução de ácido acético/não neutralizada/contendo insulina
Q(AA)Nc	quitosana diluída em solução de ácido acético/neutralizada
QI(AA)Nc	quitosana diluída em solução de ácido acético/neutralizada/contendo insulina
Q(AL)NNc	quitosana diluída em solução de ácido lático/não neutralizada
QI(AL)NNc	quitosana diluída em solução de ácido lático /não neutralizada/contendo insulina
Q(AL)Nc	quitosana diluída em solução de ácido lático/neutralizada
QI(AL)Nc	quitosana diluída em solução de ácido lático/neutralizada/contendo insulina

3.3. Preparação das Esferas de Quitosana

As esferas de quitosana foram preparadas pelo método de gelificação ionotrópica seguida de liofilização, adaptado de Dantas *et al.* (2019). Resumidamente, foram preparadas soluções de quitosana 1% (m/v) utilizando ácido acético ou ácido lático em proporções estequiométricas, sob agitação magnética a temperatura ambiente (24,5°C ± 2°C) por 24 h. Em seguida, as soluções poliméricas foram neutralizadas (pH em torno de 6,3). As soluções de quitosana 1% (m/v) foram acondicionadas a uma temperatura de geladeira (4 - 16°C); uma vez atingidas temperaturas próximas a 14ºC (± 2°C), a insulina foi incorporada a uma parte da solução de quitosana, com o auxílio de uma bomba de infusão (Harvard Apparatus), utilizando taxa de infusão de 25 ml/h. Para tanto, 20 mg da insulina foi dissolvida em 10 ml de água com pH ajustado, por solução de HCl à 0,1 M, para 6,8, em seguida a solução de insulina foi adicionado gota a gota às soluções de quitosana, com homogeneização lenta, para obter concentrações de 0,2 mg/ml. Todas as soluções foram mantidas em temperatura de geladeira (4 -16ºC) até o momento de preparo das esferas.

Para preparar as esferas, as soluções de quitosana e quitosana/insulina foram colocadas em uma seringa de 20 ml acoplada a um introdutor cirúrgico 4.5F (Bard) e gotejadas a uma taxa de infusão de 10 ml/h em dois banhos coagulantes, (a) solução de tripolifosfato de sódio (0,1 M) (TPP) ou (b) carboximetilquitosana 1% (m/v) (CMQ),

ambos com pH de, aproximadamente, 11,0 e sob agitação magnética de 300 rpm. As esferas foram deixadas nas soluções coagulantes por 24 horas, a 10 ± 1 ° C para reticulação ou para completa coagulação. Em seguida, foram lavadas com água destilada e solução de PBS a pH neutro (7,4), congeladas em um ultra freezer (AmericanLab – 490L), a aproximadamente - 48°C por 24 horas e, posteriormente, liofilizadas (Liofilizador L108, aço inoxidável AISI304-LIOTOP) a - 56° C por 48 h (Figura 7).

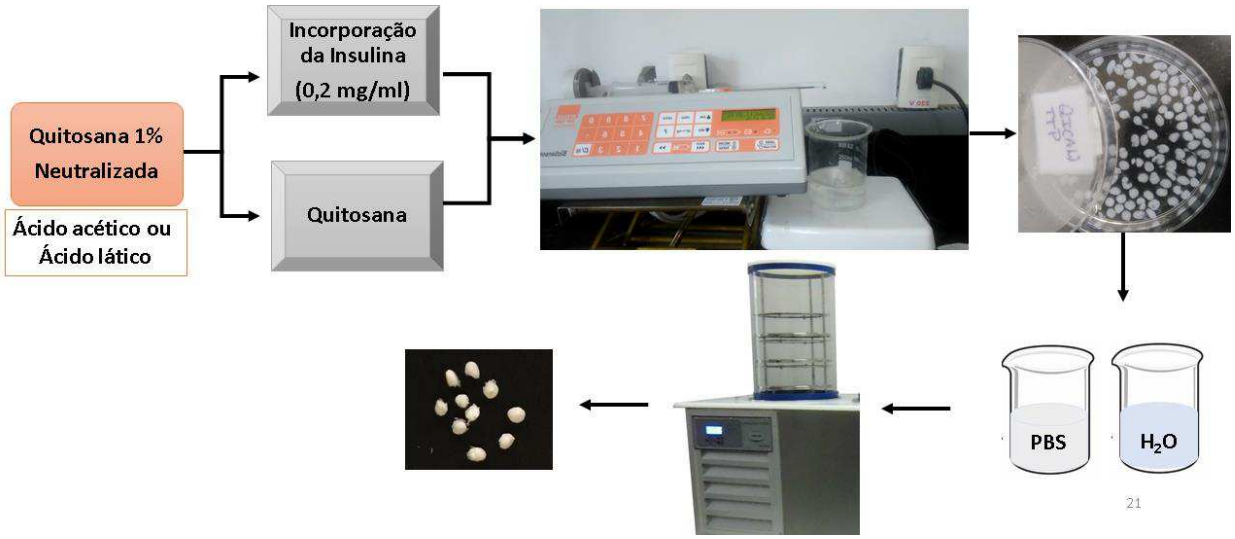


Figura 7– Representação esquemática do processo de obtenção das esferas.

Após o preparo, as esferas foram mantidas em geladeira até a realização das caracterizações. As esferas foram codificadas conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Codificação das esferas obtidas.

Codificação	Descrição
Q(AA)TPP	Esferas de quitosana diluída em solução de ácido acético com TPP como banho de coagulação.
QI(AA)TPP	Esferas de quitosana diluída em solução de ácido acético/contendo insulina, com TPP como banho de coagulação.
Q(AL)TPP	Esferas de quitosana diluída em solução de ácido lático, com TPP como banho de coagulação.
QI(AL)TPP	Esferas de quitosana diluída em solução de ácido lático/contendo insulina, com TPP como banho de coagulação.
Q(AA)CMQ	Esferas de quitosana diluída em solução de ácido acético, com CMQ como banho de coagulação.

QI(AA)CMQ	Esferas de quitosana diluída em solução de ácido acético/contendo insulina, com CMQ como banho de coagulação.
Q(AL)CMQ	Esferas de quitosana diluída em solução de ácido lático, com CMQ como banho de coagulação.
QI(AL)CMQ	Esferas de quitosana diluída em solução de ácido lático/contendo insulina, com CMQ como banho de coagulação.

Um estudo experimental foi realizado para definir os parâmetros a serem utilizados na produção das esferas. Nele foram avaliadas as variações de altura de queda da solução de quitosana no banho gelificante, taxa de infusão da solução de quitosana e taxa de agitação da solução gelificante. Os paramentos utilizados estão dispostos na Tabela 5.

Tabela 5 - Testes experimentais utilizados para definir os parâmetros de produção das esferas.

Testes	**Altura de queda (cm)**	**Taxa de infusão (mL/h)**	**Taxa de agitação (RPM)**
T1	10	20	400
T2	15	15	400
T3	10	10	300
T4	15	10	550
T5	15	10	300
T6	10	10	240

Os melhores resultados foram obtidos com T3 (Tabela 5), ou seja, uma altura de queda de 10 cm, taxa de infusão de 10 mL/h e agitação de 300 RPM. Estes parâmetros foram utilizados para produzir todas as esferas.

3.4. Caracterização das Amostras

As membranas de quitosana carregadas ou não com insulina foram caracterizadas por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para a seleção das membranas de trabalho. Nesta etapa foram selecionadas as soluções neutralizadas como soluções de trabalho para a produção das esferas de quitosana e quitosana/ insulina.

As esferas de quitosana foram caracterizadas por FTIR, Microscopia óptica, intumescimento, hidrossolubilidade, teor de umidade, eficácia de encapsulamento e ensaio de liberação *in vitro*.

As análises foram conduzidas no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais (CERTBIO) e no Laboratório de Nanopartículas (NANOPOL).

3.4.1. Análise Macroscópica e Sensorial

A análise macroscópica foi realizada através da observação, a olho nu, das amostras obtidas. Para a análise sensorial utilizou-se os sentidos da visão e tato. As análises das amostras foram realizadas por três pessoas e os resultados apresentados foram os que estavam em concordância com todos os analistas.

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

A FTIR foi realizada em um espectrômetro Perkin Elmer 400 FT Mid-IR (Perkin Elmer, Beaconsfield, UK), equipado com acessórios para refletância total atenuada (ATR), com varredura de 4000 a 600 cm^{-1}. Foi utilizada para verificar a composição das membranas e das esferas permitindo que as informações sobre os diferentes tipos de membranas e esferas fossem comparadas através de informações estruturais sobre as bandas características dos grupos funcionais das moléculas e sobre os grupos atômicos que participam da estrutura das membranas. Esse ensaio foi realizado de acordo com a norma ASTM F2778 – 09.

As membranas Q(AA)Ne e QI(AA)Ne apresentaram-se quebradiças e Q(AL)Ne e QI(AL)Ne ficaram fortemente aderidas as placas e a retirada ocorreu em pedaços pequenos e irregulares; ambas as condições impossibilitaram os demais ensaios propostos para as membranas. No entanto, as soluções de quitosana solubilizadas em ácido acético ou em ácido lático e posteriormente neutralizadas foram utilizadas para produzir esferas de quitosana e quitosana/insulina pelo método de gelificação ionotrópica. Portanto, os demais ensaios foram realizados apenas para as esferas.

3.4.3. Intumescimento

O comportamento do intumescimento das esferas de quitosana foi determinado pelo método gravimétrico adaptado de Nogueira Campos *et al.* (2005). As esferas foram mantidas em dessecador por 24 horas e a massa seca (Wd) foi determinada. Em seguida, as amostras foram imersas em água destilada a 37ºC. Após períodos pré-determinados (5, 40, 80, 120 e 160 minutos), os pesos úmidos (Ww) das esferas foram determinados; primeiro, as amostras foram transferidas para um papel de filtro para remover a água adsorvida na superfície, e depois, imediatamente pesadas em uma balança eletrônica. A razão de intumescimento (S) das esferas no meio foi calculada a partir da Equação 1:

$$S(\%) = \frac{(Ww - Wd)}{Ww} * 100 \qquad (1)$$

Cada experimento foi repetido três vezes e o valor médio foi tomado como a razão de intumescimento.

3.4.4. Hidrossolubilidade e Teor de Umidade

A porcentagem do teor de umidade nas esferas foi determinada pelo método gravimétrico adaptado de Nogueira Campos *et al.* (2005). As esferas foram mantidas em dessecador por 24 horas e pesadas para obtenção da massa inicial (M_i). Após este procedimento, as amostras foram levadas para uma estufa a 100°C por 24 horas e pesadas novamente para determinar a massa final (M_f). A porcentagem de umidade foi calculada de acordo com a Equação 2:

$$\text{Teor de umidade}(\%) = \frac{(M_i - M_f)}{M_i} * 100 \qquad (2)$$

A solubilidade em água das esferas foi determinada de acordo com Gontard *et al.* (1994). As esferas foram mantidas em dessecador por 24 h e pesadas para obter a massa inicial (W_i) e em seguida levadas a uma estufa a 100 ° C por 24 horas e, novamente, pesadas para obter sua massa seca (W_f). Após este procedimento, as

esferas foram imersas em 5 ml de água destilada por 24 horas a 25°C. As amostras foram retiradas e secas (100ºC por 24 horas) para determinar o peso da membrana não solúvel em água (Wf). A porcentagem de hidrossolubilidade (H) das esferas foi calculada a partir da Equação 3:

$$H(\%) = \frac{(W_i - W_f)}{W_i} * 100 \quad (3)$$

Cada experimento foi repetido três vezes e o valor médio foi calculado.

3.4.5. Microscopia Óptica

A morfologia da superfície das esferas foi avaliada pela microscopia óptica em um Microscópio Advanced 3D Digital, Hirox – KH7700, que permite reflexão e transmissão com profundidade de campo extendida com medições 2D e 3D, estando acoplado a uma estação de análise de imagens. Para a aplicação desta técnica foram utilizados aumentos que variaram de 40x, 160X e 350X.

3.4.6. Espectroscopia na Região do Ultra Violeta (UV-vis)

Para detectar e quantificar a insulina nos ensaios de capacidade de carga, eficácia de encapsulamento e liberação controlada do fármaco pelas esferas foi utilizado a espectroscopia na região do ultravioleta (UV-vis), que foi realizada em um Espectrômetro UV-vis, Perkin Elmer, com comprimento de onda variável, modelo Lambda 35, com cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm.

A insulina foi diluída em solução salina tamponada com fosfato (PBS) (pH ≈ 7,4) para a realização da identificação do comprimento de onda de detecção do fármaco, validação do método analítico e elaboração da curva de calibração; para posterior análise dos ensaios de capacidade de carga, eficácia de encapsulamento e liberação controlada do fármaco pelas esferas.

3.4.6.1. Validação do Método Analítico de Detecção da Insulina por UV-vis

Para a validação do método analítico foram calculadas exatidão, precisão, linearidade e robustez, conforme Resoluções da Anvisa RE nº 899/2003 (Sanitária, 2003) e RDC166/2017 (Anvisa, 2017). As análises foram realizadas utilizando soluções com concentrações de 5 μg/ml, 10 μg/ml, 15 μg/ml, 20 μg/ml, 25 μg/ml e 30 μg/ml diluídas de insulina em PBS (pH≈7,4) sob agitação de 50 rpm a uma temperatura de 37ºC por 120 minutos em agitador Shake modelo IKA-KS4000i.

Antes da realização da validação foi determinado o comprimento de onda de máxima absorbância (λmax) apresentado pela insulina. As soluções de insulina diluídas em PBS foram submetidas a uma varredura inicial pelo espectro UV-vis entre 200 a 300 nm, após a verificação de faixa útil da leitura todas as amostras foram varridas entre 200 e 240 nm.

3.4.6.1.1. Linearidade

A linearidade foi realizada utilizando seis concentrações de insulina diluídas em PBS (5 μg/ml, 10 μg/ml, 15 μg/ml, 20 μg/ml, 25 μg/ml e 30 μg/ml). Todas as análises foram realizadas em triplicata. A curva obtida foi linearizada por regressão linear utilizando o método dos mínimos quadrados, de acordo com a Equação 4:

$$Abs = k_1 * C + k_0 \quad (4)$$

Onde *Abs* representa a absorbância apresentado pelo UV-vis; K_1 o coeficiente angular da reta; *C* concentração de insulina em μg/ml; e K_0 representa o intercepto.

3.4.6.1.2. Precisão

Foi realizada a análise da precisão intra-corrida (repetibilidade) e intercorrida (intermediária), conforme preconizado pela ANVISA na RE nº 899/2003 (Sanitária, 2003) e RDC 166/2017 (Anvisa, 2017). Para a avaliação da repetibilidade foram utilizadas três concentrações de insulina diluídas em PBS (5 μg/ml, 20 μg/ml e 30 μg/ml) pelo mesmo analista e foi feito em triplicata. Para análise da precisão

intermediária foi utilizada a concentrações máxima de insulina diluídas em PBS (30 μg/ml), as leituras foram realizadas por dois analistas diferentes em dias diferentes.

3.4.6.1.3. Exatidão

A exatidão foi avaliada utilizando três concentrações de insulina diluídas em PBS, duas baixas (5 e 10 μg/ml), uma intermediária (20 μg/ml) e outra alta (30 μg/ml). Todas as análises foram realizadas em triplicata contemplado a faixa de linearidade do método. A exatidão foi avaliada pelo coeficiente de variação e pela porcentagem de recuperação de insulina, conforme Equação 5:

$$\text{Exatidão}(\%) = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} * 100 \quad (5)$$

3.4.6.1.4. Robustez

Para a avaliação da robustez do método realizou-se a análise da variação de temperatura de 37ºC para a temperatura ambiente, aproximadamente 25ºC, e o tempo de leitura após o preparo da solução (3 horas e 24 horas) para a insulina diluída em PBS na concentração de 20 μg/ml e 30 μg/ml. As análises foram realizadas em sextuplicata. De acordo com os critérios determinados para o método de espectroscopia na RE nº 899/2003 (Sanitária, 2003) e RDC 166/2017 (Anvisa, 2017).

3.4.6.1.5. Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram realizados conforme a RE nº 899/2003 (Sanitária, 2003; Anvisa, 2017). Os cálculos do LD e do LQ foram realizados a partir da curva analítica resultante da média de três curvas analíticas, utilizando-se do desvio padrão do resíduo da linha de regressão e sua relação com a inclinação da reta (coeficiente angular) de acordo com as Equações 6 e 7.

$$LD = \frac{\text{Desvio padrão de b} * 3}{IC} \quad (6)$$

$$LQ = \frac{\text{Desvio padrão de b } *10}{IC} \quad (7)$$

Onde *b* representa o intercepto com o eixo *Y* da curva analítica média construída com as concentrações decrescentes; *IC* é o coeficiente angular da curva analítica obtida pela determinação da linearidade.

3.4.6.1.6. Preparação da Curva de Calibração da Insulina

Na elaboração da curva de calibração foi preparada uma solução de 30 mg de insulina diluída em PBS (pH=7,4); esta solução foi utilizada para a preparação de soluções de PBS insulina nas concentrações de 5 μg/ml, 10 μg/ml, 15 μg/ml, 20 μg/ml, 25 μg/ml e 30 μg/ml. As diluições foram preparadas e analisadas em triplicata por espectrofotometria de absorção no UV-vis em um comprimento de onda de 202 nm, utilizando o mesmo solvente como branco. As médias das absorbâncias de cada concentração foram plotadas em um gráfico e, posteriormente, linearizadas para obtenção da curva de calibração. A equação da reta e o coeficiente de correlação foram calculados pela análise de regressão linear, conforme Equação 8.

$$Abs = A + B.C \quad (8)$$

Onde *Abs* representa o valor da absorbância; *A* a intersecção; *B* o coeficiente angular da reta; e *C* a concentração de insulina.

3.4.7. Capacidade de Carga e Eficiência de Encapsulamento

Para mensuração da capacidade de carga e da eficácia de encapsulamento as esferas foram pesadas em balança analítica e, em seguida, colocadas em contato com 50 mL PBS (pH = 7,4) por um período de 15 minutos (Jose *et al.*, 2012). Decorrido o tempo, as esferas foram retiradas e a quantidade de insulina presente na solução foi considerada como insulina livre, que foi quantificada por espectroscopia UV/Visível (UV-vis) (UV-vis Spectrometer Lambda 35 - Perkin Elmer, Beaconsfield, UK). Os resultados dos parâmetros de capacidade de carga e eficiência de encapsulamento foram obtidos de acordo com as Equações 5 e 6 (Bai *et al.*, 2017):

$$CC(\%) = \frac{\text{(Total de insulina adicionada - Insulina livre)}}{\text{Massa das esferas}} \text{ x } 100 \quad (5)$$

$$EE(\%) = \frac{\text{(Total de insulina adicionada - Insulina livre)}}{\text{Total de insulina adicionada}} \text{ x } 100 \quad (6)$$

Onde *CC(%)* representa a capacidade de carga e *EE(%)* a eficácia de encapsulamento em porcentagem.

3.4.8. Estudo de Liberação *in vitro*

A liberação de insulina pelas esferas foi avaliada pelo método adaptado de Barbari *et al.* (2017). As esferas de quitosana/insulina foram colocadas em solução de PBS (pH ≈ 7,4) a 37°C (± 0,5ºC) e agitação de 100 rpm, em períodos variados (15, 30, 45, 60, 90, 120, 360 minutos, 24 e 48 horas). Em cada período, alíquotas de aproximadamente 3 mL da solução em que as esferas estavam imersas foram retiradas e a leitura foi realizada pelo UV-vis em um comprimento de onda de 200 a 300 nm, a alíquota foi devolvida a solução de liberação.

Para avaliar a estabilidade da insulina durante o período e as condições do ensaio de liberação uma solução de insulina em PBS, com concentração de 30 µg/ml, foi submetida as mesmas condições de temperatura e agitação utilizadas na avaliação da liberação de insulina pelas esferas. Em períodos semelhantes aos estabelecidos para a liberação (15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 e 360 minutos, 24 e 48 horas) alíquotas de aproximadamente 3 mL da solução foram retiradas e foi realizada a leitura pelo UV-vis em um comprimento de onda de 200 a 300 nm, a alíquota foi devolvida a solução.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados apresentados foram obtidos pela média dos três ensaios.

3.4.9. Estudo da Cinética de liberação

A liberação de um fármaco a partir de um sistema de liberação envolve os processos de difusão e dissolução. Vários modelos matemáticos são utilizados para descrever a dissolução, difusão e/ou liberação de um fármaco pelo sistema (Kanha *et al.*, 2021). Assim, para avaliar o perfil de liberação apresentado pelas esferas os seguintes modelos matemáticos foram utilizados: ordem zero; primeira ordem; Higuchi; Korsmeyer-Peppas; e Peppas-Sahlino (Gouda *et al.*, 2017; Unagolla e Jayasuriya, 2018). As análises foram realizadas com o auxílio do programa Solver, um suplemento gratuito do Excel (Zhang *et al.*, 2010; Zuo *et al.*, 2014).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise Macroscópica e Sensorial das Membranas Não Neutralizadas

As membranas não neutralizadas preparadas por congelamento e liofilização (Q(AA)NNc, QI(AA)NNc, Q(AL)NNc e QI(AL)NNc), Figura 8, apresentaram-se uniformes e com coloração branca; embora as membranas Q(AA)NNc (Figura 8a) e QI(AA)NNc (Figura 8b) apresentem uma coloração mais intensa, não houve diferença na coloração das membranas preparadas com quitosana comparadas às preparadas com quitosana incorporadas com insulina. As membranas Q(AA)NNc e Q(AL)NNc (Figuras 8a e 8c) preencheram completamente o diâmetro da placa (6 cm) enquanto as membranas QI(AA)NNc e QI(AL)NNc (Figura 8b e 8d) tiveram um diâmetro reduzido; no entanto, todas as membranas apresentaram a mesma espessura. Ao toque, as membranas Q(AL)NNc e QI(AL)NNc mostraram-se com um aspecto mais aderente do que as Q(AA)NNc e QI(AA)NNc, porem entre Q(AL)NNc e QI(AL)NNc não foi possível perceber diferença ao toque.

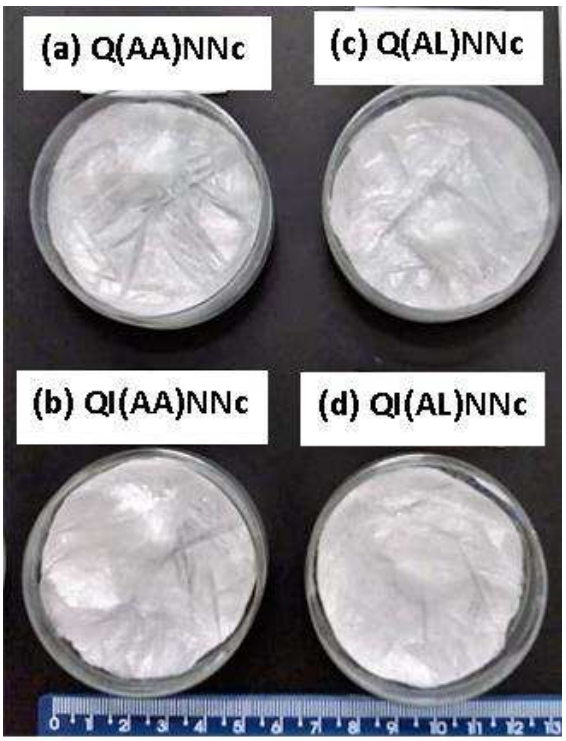


Figura 8- Membranas não neutralizadas preparadas por congelamento e liofilização. Em **a** membrana de quitosana, solubilizada em ácido acético, não neutralizada - Q(AA)NNc; **b** membrana de quitosana, solubilizada em ácido acético, não neutralizada e com incorporação de insulina - QI(AA)NNc; **c** membrana de quitosana, solubilizada em ácido lático, não neutralizada - Q(AL)NNc; e **d** membrana de quitosana, solubilizada em ácido lático, não neutralizada e com incorporação de insulina - QI(AL)NNc.

As membranas não neutralizadas preparadas pelo método de evaporação do solvente (Q(AA)NNe, QI(AA)NNe, Q(AL)NNe e QI(AL)NNe), Figura 9, apresentaram-se uniformes e transparentes, porém ocorreu a formação de bolhas na parte central das membranas Q(AL)Ne, Q(AA)Ne e QI(AA)Ne (Figuras 9a, 9c e 9d). Aquelas onde a insulina foi incorporada (QI(AA)NNe e QI(AL)NNe) tiveram um aspecto turvo. Quanto ao diâmetro e a espessura das membranas preparadas por evaporação do solvente, não houve diferença. Ao toque, as membranas em que a quitosana foi diluída em ácido lático (Q(AL)NNe e QI(AL)NNe) mostraram-se mais aderentes, sendo QI(AL)NNe a mais aderente.

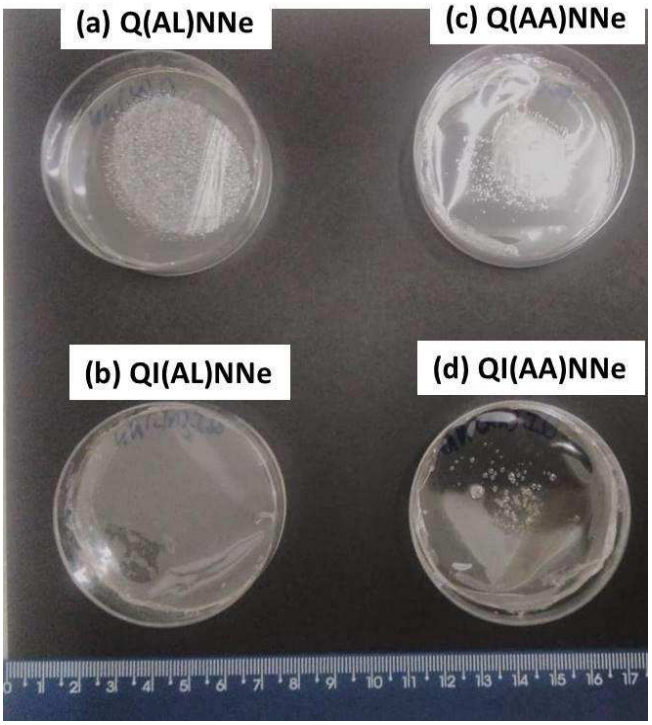


Figura 9- Membranas não neutralizadas preparadas por evaporação do solvente. Em **a** membrana de quitosana, solubilizada em ácido lático, não neutralizada - Q(AL)NNe; **b** membrana de quitosana, solubilizada em ácido lático, não neutralizada e com incorporação de insulina - QI(AL)NNe; **c** membrana de quitosana, solubilizada em ácido acético, não neutralizada - Q(AA)NNe; e **d** membrana de quitosana, solubilizada em ácido acético, não neutralizada e com incorporação de insulina - QI(AA)NNe.

4.2. Análise Macroscópica e Sensorial das Membranas Neutralizadas

Utilizando o método de congelamento e liofilização, as membranas neutralizadas (Q(AL)Nc, QI(AL)Nc, Q(AA)Nc e QI(AA)Nc), Figura 10, demonstraram cor branca uniforme, mais intensa do que as membranas não neutralizadas. As

membranas Q(AA)Nc (Figura 10c) e QI(AA)Nc (Figura 10d) preencheram completamente o diâmetro da placa e apresentaram espessuras semelhantes as membranas não neutralizadas preparadas por esta técnica; já as Q(AL)Nc e QI(AL)Nc apresentaram um encolhimento e aplainamento (Figuras 10a e 10b, respectivamente) quando comparadas com as demais membranas. Sensação tátil de suavidade, moldando-se a pele, e aderência foram perceptíveis em Q(AL)Nc e QI(AL)Nc, enquanto Q(AA)Nc e QI(AA)Nc não se moldaram a pele e não apresentaram aderência. As diferenças observadas entre as membranas podem ter ocorrido pela formação de pontes de hidrogênio nas membranas preparadas pela dissolução da quitosana em ácido lático, pois o mesmo possui dois grupos hidroxila, o que possibilita a formação de um maior número de pontes de hidrogênio.

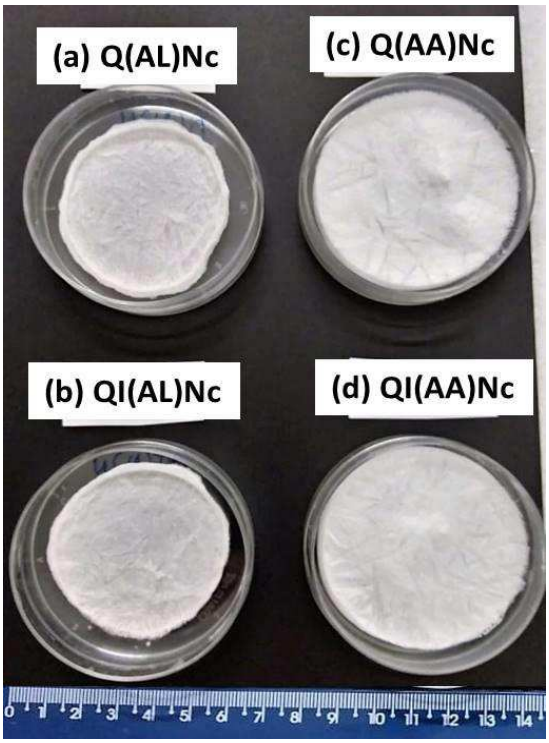


Figura 10- Membranas neutralizadas preparadas por congelamento e liofilização. Em **a** membrana de quitosana, solubilizada em ácido lático, neutralizada com hidróxido de sódio - Q(AL)Nc; **b** membrana de quitosana, solubilizada em ácido lático, neutralizada com hidróxido de sódio e com incorporação de insulina - QI(AL)Nc; **c** membrana de quitosana, solubilizada em ácido acético, neutralizada com hidróxido de sódio - Q(AA)Nc; e **d** membrana de quitosana, solubilizada em ácido acético, neutralizada com hidróxido de sódio e com incorporação de insulina - QI(AA)Nc.

As membranas neutralizadas obtidas pelo método de evaporação do solvente (Q(AA)Ne, QI(AA)Ne, Q(AL)Ne e QI(AL)Ne), Figura 11, apresentaram-se levemente turvas. Q(AA)Ne e QI(AA)Ne (Figuras 11c e 11d, respectivamente) ficaram

quebradiças, saíram facilmente da placa e pode-se observar um halo branco na parte mais externa das membranas, no entanto, não houve diferença visual entre Q(AA)Ne e QI(AA)Ne. As membranas Q(AL)Ne e QI(AL)Ne (Figuras 11a e 11b, respectivamente) aderiram a placa e houve dificuldades para serem retiradas, sendo necessário raspá-las das placas para retirada de pequenos pedaços. Em QI(AL)Ne visualizou-se um halo próximo a margem da membrana enquanto em Q(AL)Ne mostrou-se uniforme. As membranas preparadas pelos dois solventes, ácido acético e ácido lático, apresentaram-se finas e com mesmo diâmetro da placa, sendo Q(AL)Ne e QI(AL)Ne mais aderentes.

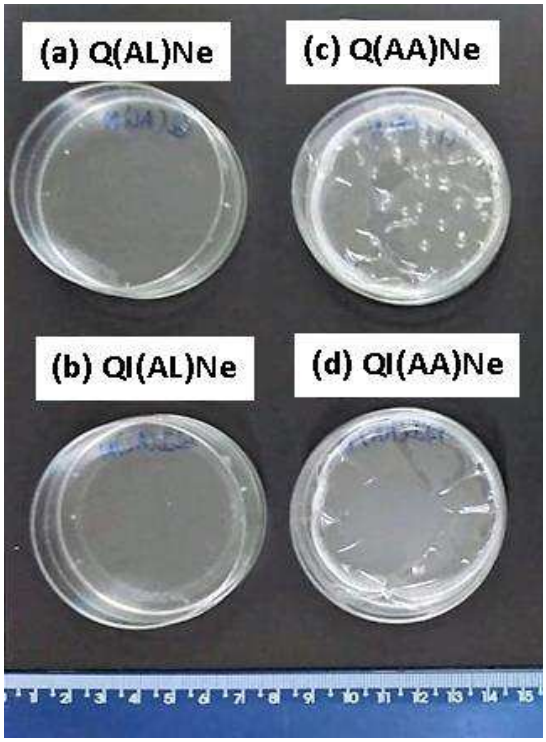


Figura 11- Membranas neutralizadas preparadas por evaporação do solvente. Em **a** membrana de quitosana, solubilizada em ácido lático, neutralizada com hidróxido de sódio - Q(AL)Ne; **b** membrana de quitosana, solubilizada em ácido lático, neutralizada com hidróxido de sódio e com incorporação de insulina - QI(AL)Ne; **c** membrana de quitosana, solubilizada em ácido acético, neutralizada com hidróxido de sódio - Q(AA)Ne; e **d** membrana de quitosana, solubilizada em ácido acético, neutralizada com hidróxido de sódio e com incorporação de insulina - QI(AA)Ne.

De acordo com as análises macroscópicas e sensoriais todas as membranas preparadas por congelamento e liofilização apresentaram-se adequadas para o uso no corpo humano, pois moldaram-se ao corpo; no entanto, aquelas preparadas com ácido lático e neutralizadas (Q(AL)Nc e QI(AL)Nc) apresentaram sensação tátil de suavidade, moldando-se a pele, e aderindo a pele e superfícies. Desta forma entre as

membranas preparadas por congelamento e liofilização Q(AL)Nc e QI(AL)Nc demonstraram melhor aplicabilidade. Já para as membranas preparadas por evaporação do solvente, as não neutralizadas apresentaram-se mais resistentes à manipulação, sendo as preparadas com ácido lático mais aderentes, principalmente QI(AL)NNe. Apesar das membranas não neutralizadas preparadas por evaporação do solvente apresentarem-se quebradiças (Q(AA)Ne e QI(AA)Ne) e demasiadamente aderentes (Q(AL)Ne e QI(AL)Ne) elas foram caracterizadas por FTIR.

4.3. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) das Membranas

As análises de FTIR foram realizadas com as membranas não neutralizadas e neutralizadas, preparadas tanto pelo método de congelamento e liofilização quanto pelo método de evaporação do solvente, com uma concentração de insulina de 0,2 mg/mL e, também, para o pó de insulina, com o intuito de comparar os resultados obtidos e visualizar possíveis interações entre quitosana e insulina. Os resultados desta análise serão apresentados considerando o método de processamento (congelamento/liofilização e evaporação do solvente), a solução ácida (ácido acético ou ácido lático) utilizada para dissolução da quitosana e o uso ou não de neutralização prévia da solução de quitosana.

4.3.1. Método de Processamento

Nas Figuras 12 e 13 estão dispostos os gráficos de FTIR, apresentados em número de onda (cm^{-1}) vs. absorbância (%), para as amostras Q(AA)NNc, QI(AA)NNc, Q(AA)NNe, QI(AA)NNe e pó de insulina. Na Figura 12 estão mostrados os espectros das amostras anteriormente citadas, com destaque para as vibrações características da quitosana. Entre 3243 cm^{-1} e 3191 cm^{-1} observa-se uma banda larga devida a sobreposição das vibrações de estiramento dos grupos OH e NH; em 1634 cm^{-1} e 1542 cm^{-1} vibrações referentes à carbonila (estiramento O=C-NHR) e ao grupo amina (deformação NH_2), respectivamente; também se observa vibrações em 1404 cm^{-1}, características da deformação angular CH_2 (Boonsongrit *et al.*, 2008; Mukhopadhyay *et al.*, 2015). O espectro exibindo o comportamento da insulina utilizada frente a

análise de FTIR também pode ser visualizado na Figura 13. O espectro de FTIR da insulina mostra bandas em 1638 cm^{-1}, referente ao estiramento C=O da amida I, característico do espectro das proteínas, e em 1528 cm^{-1}, correspondentes ao estiramento C-H e flexão N-H atribuídos a amida II (Sarmento, B. *et al.*, 2006; Boonsongrit *et al.*, 2008; Mukhopadhyay *et al.*, 2015). Nos espectros de FTIR das membranas de quitosana-insulina, QI(AA)NNc e QI(AA)NNe (Figuras 13a e 13b), nenhuma mudança de banda pôde ser detectada quando comparadas com os espectros das membranas de quitosana, Q(AA)NNc e Q(AA)NNe, apesar das vibrações referentes ao estiramento C=O (1638 cm^{-1}) e estiramento C=O-NHR (1542 cm^{-1}) coincidirem para quitosana e insulina, não houve diferença nos espectros das amostras com e sem insulina independente do processamento.

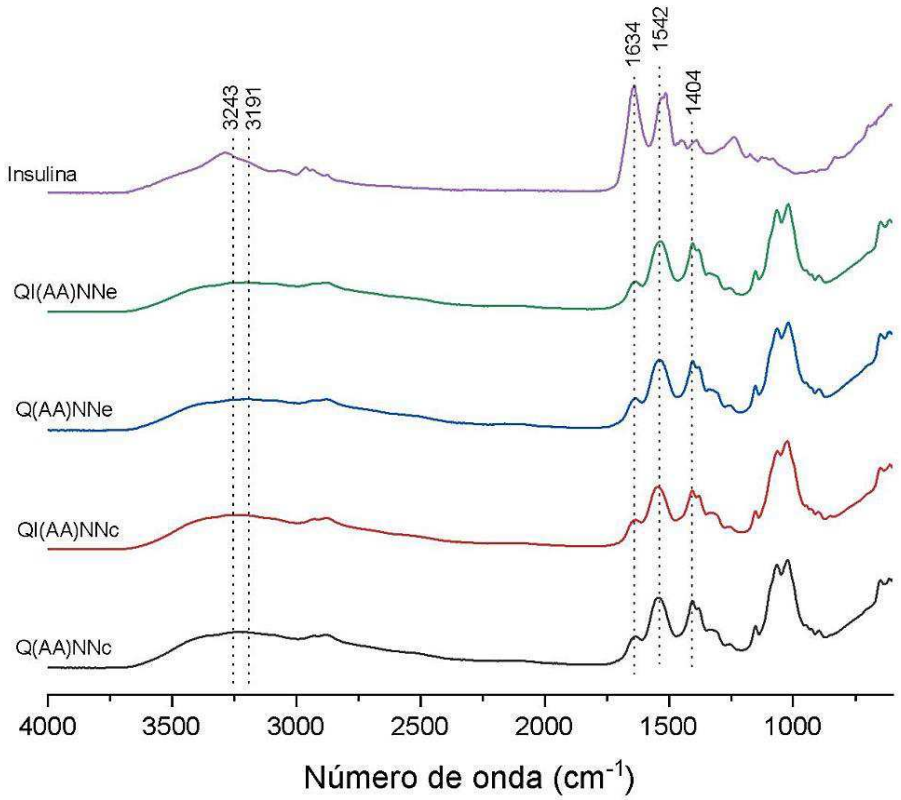


Figura 12- Gráfico de FTIR das membranas Q(AA)NNc, QI(AA)NNc, Q(AA)NNe, QI(AA)NNe e pó de insulina.

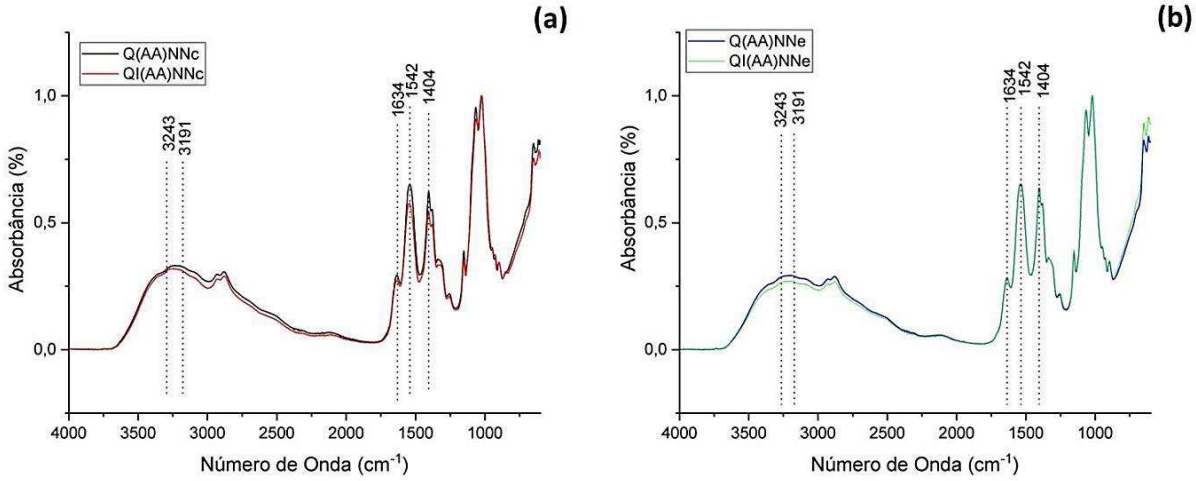


Figura 13- Gráfico de sobreposição dos espectros de FTIR. (a) sobreposição das amostras Q(AA)NNc e QI(AA)NNc; (b) sobreposição das amostras Q(AA)NNe e QI(AA)NNe.

Analisando os espectros das amostras Q(AA)Nc, QI(AA)Nc, Q(AA)Ne, QI(AA)Ne e pó de insulina (Figuras 14), verifica-se bandas características da quitosana em 1638 cm^{-1}, 1546 cm^{-1} e 1406 cm^{-1} referentes ao estiramento C=O-NHR, deformação NH_2 e deformação angular CH_2, respectivamente, em todas as membranas tanto preparadas por congelamento e liofilização quanto por evaporação do solvente. Resultado semelhante foi encontrado por Boonsongrit *et al.* (2008) e Mukhopadhyay *et al.* (2015). Na região referente as vibrações de estiramento dos grupos OH e NH observa-se que, quando o método de congelamento e liofilização foi utilizado evidenciou-se uma banda larga com picos em 3407 cm^{-1}, 3282 cm^{-1} e 3171 cm^{-1} que, segundo Paiva *et al.* (1996) podem corresponder a formação de pontes de hidrogênio, o que justifica os achados da análise macroscópica e sensorial (Figura 10). Observando-se a sobreposição dos espectros de Q(AA)Nc e QI(AA)Nc (Figura 15a), nenhuma alteração entre os espectros foi evidenciada. Nos espectros das membranas preparadas pelo método de evaporação do solvente (Figura 15b) observou-se um aumento da intensidade nas bandas das regiões 1638 cm^{-1}, 1546 cm^{-1} e 1406 cm^{-1} para o espectro da amostra em que a insulina foi incorporada, QI(AA)Ne, ao ser comparada com Q(AA)Ne, sugerindo que a insulina pode ter interagido com a quitosana, como foi observado por Boateng (2014) ao incorporar insulina em quitosana tiolada para produção de um xerogel.

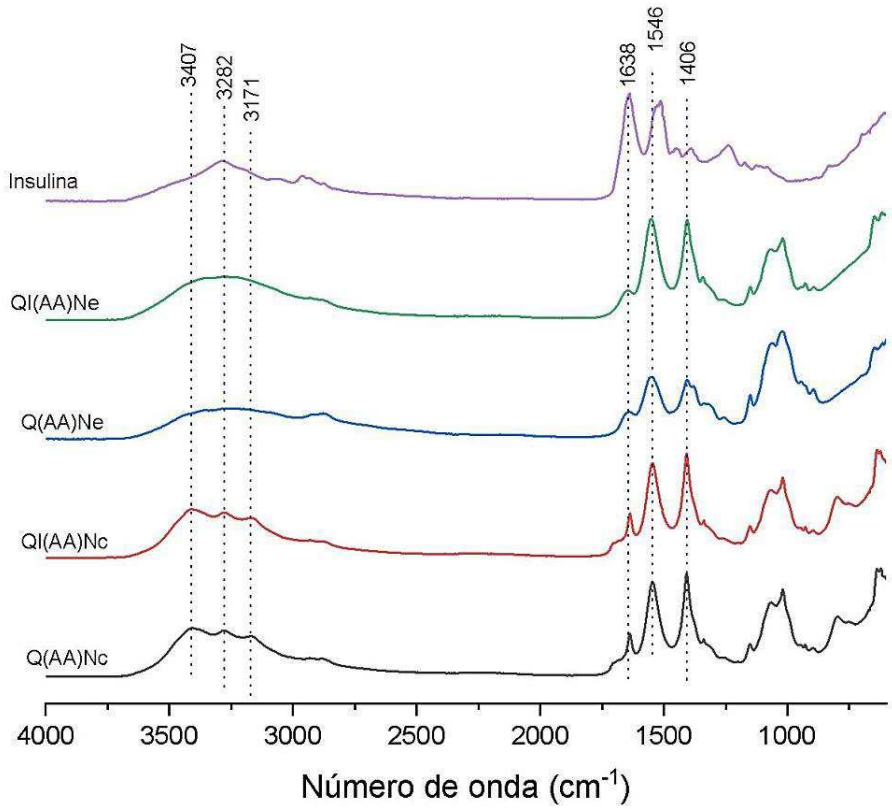


Figura 14- Gráfico de FTIR das membranas Q(AA)Nc, QI(AA)Nc, Q(AA)Ne, QI(AA)Ne e pó de insulina.

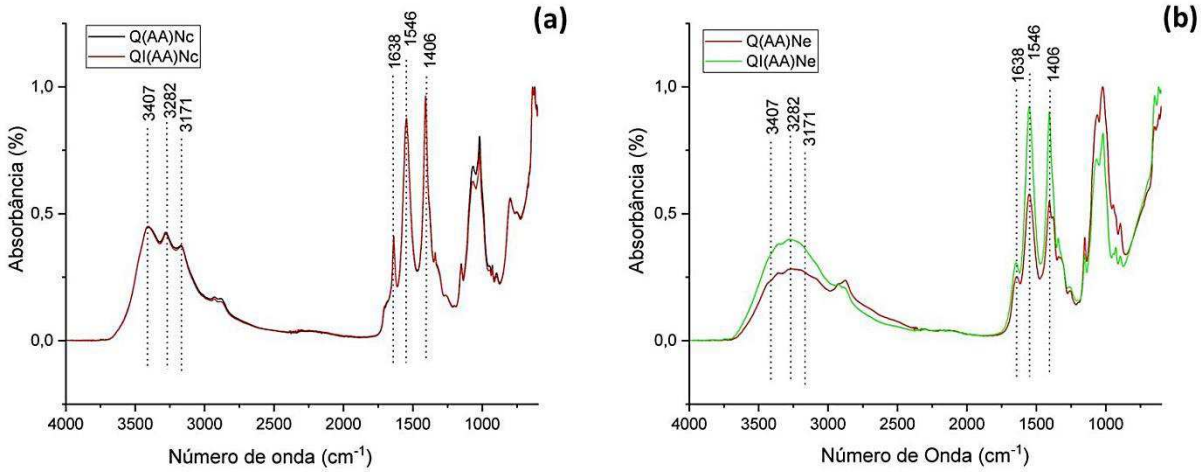


Figura 15- Gráfico de sobreposição dos espectros de FTIR. (a) sobreposição das amostras Q(AA)Nc e QI(AA)Nc e (b) sobreposição das amostras Q(AA)Ne e QI(AA)Ne.

Os espectros de FTIR das amostras Q(AL)NNc, QI(AL)NNc, Q(AL)NNe, QI(AL)NNe e pó de insulina podem ser observadas nas Figuras 16 e 17. Na Figura 16 observa-se os espectros das amostras anteriormente citadas, destacando-se as vibrações características da quitosana entre 3278 cm^{-1} e 3193 cm^{-1} e a sobreposição

das vibrações de estiramento dos grupos OH e NH da quitosana podem ser evidenciadas; observa-se um ombro em 1733 cm^{-1} que é atribuído a carbonila dos grupos éster ou carboxílico nas cadeias laterais do ácido lático; distingue-se em 1638 cm^{-1} e 1543 cm^{-1} bandas referentes as vibrações da carbonila (estiramento C=O-NHR) e ao grupo amina (deformação NH_2), respectivamente (Bhattarai *et al.*, 2006). Constata-se pela sobreposição dos espectros na Figura 17 que não houve diferença entre os das amostras com e sem incorporação de insulina em ambos os métodos analisados.

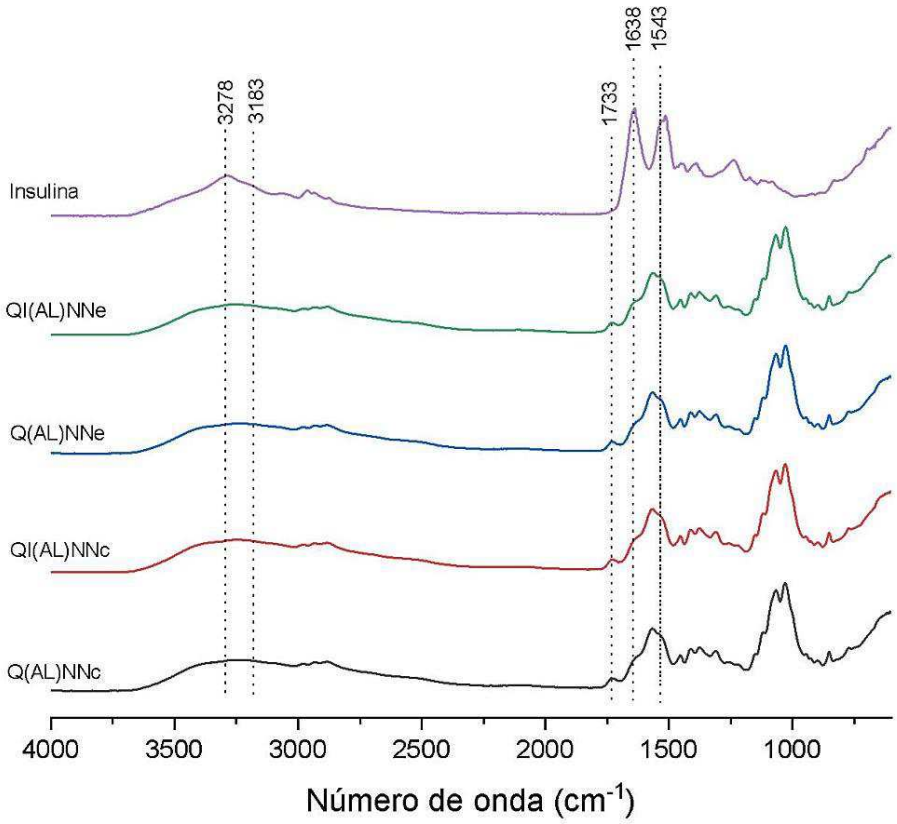


Figura 16- Gráfico de FTIR das membranas Q(AL)NNc, QI(AL)NNc, Q(AL)NNe, QI(AL)NNe e pó de insulina.

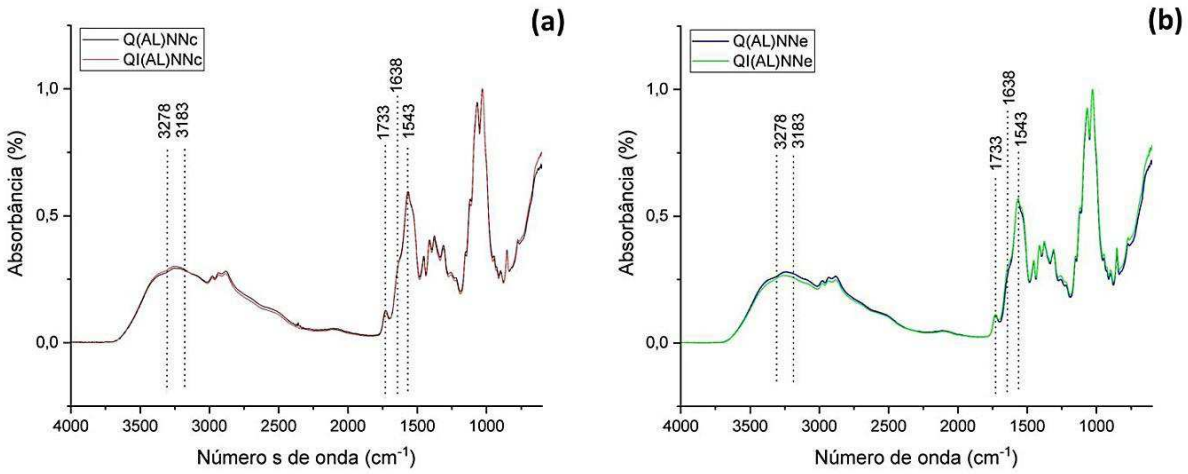


Figura 17- Gráfico de sobreposição dos espectros de FTIR. (a) sobreposição das amostras Q(AL)NNc e QI(AL)NNc; e (b) sobreposição das amostras Q(AL)NNe e QI(AL)NNe.

Observa-se nas Figuras 18 e 19 os espectros de FTIR das amostras Q(AL)Nc, QI(AL)Nc, Q(AL)Ne, QI(AL)Ne e pó de insulina. Todas as membranas apresentam bandas de vibrações características da quitosana (Figura 18); sobreposição das vibrações de estiramento dos grupos OH e NH entre 3353 cm^{-1} e 3267 cm^{-1}, um ombro atribuído a carbonila dos grupos éster ou carboxílico nas cadeias laterais do ácido lático em 1731 cm^{-1}, em 1638 cm^{-1} bandas de estiramento da carbonila da quitosana e bandas de deformação do grupo amina em 1579 cm^{-1} (Bhattarai *et al.*, 2006; Depan *et al.*, 2009). As amostras preparadas por congelamento e liofilização não mostraram nenhuma diferença entre Q(AL)Nc e QI(AL)Nc (Figura 19a). Contudo, no gráfico de sobreposição dos espectros de Q(AL)Ne vs. QI(AL)Ne (Figura 19b) observa-se que, no espectro da membrana de QI(AL)Ne ocorreu a intensificação do ombro em 1638 cm^{-1}, posição correspondente a vibração de estiramento da carbonila da quitosana e ao estiramento C=O da amida I da insulina (Sarmento, B. *et al.*, 2006; Boonsongrit *et al.*, 2008; Mukhopadhyay *et al.*, 2015). Adicionalmente, ocorreu um aumento da intensidade das bandas na região de 1453 cm^{-1} a 1232 cm^{-1}, região que diz respeito as vibrações dos grupos CH_3 e CH_2 (Paiva *et al.*, 1996). De acordo com o anteriormente exposto, acredita-se que a insulina interagiu com a quitosana quando o método de evaporação do solvente foi utilizado.

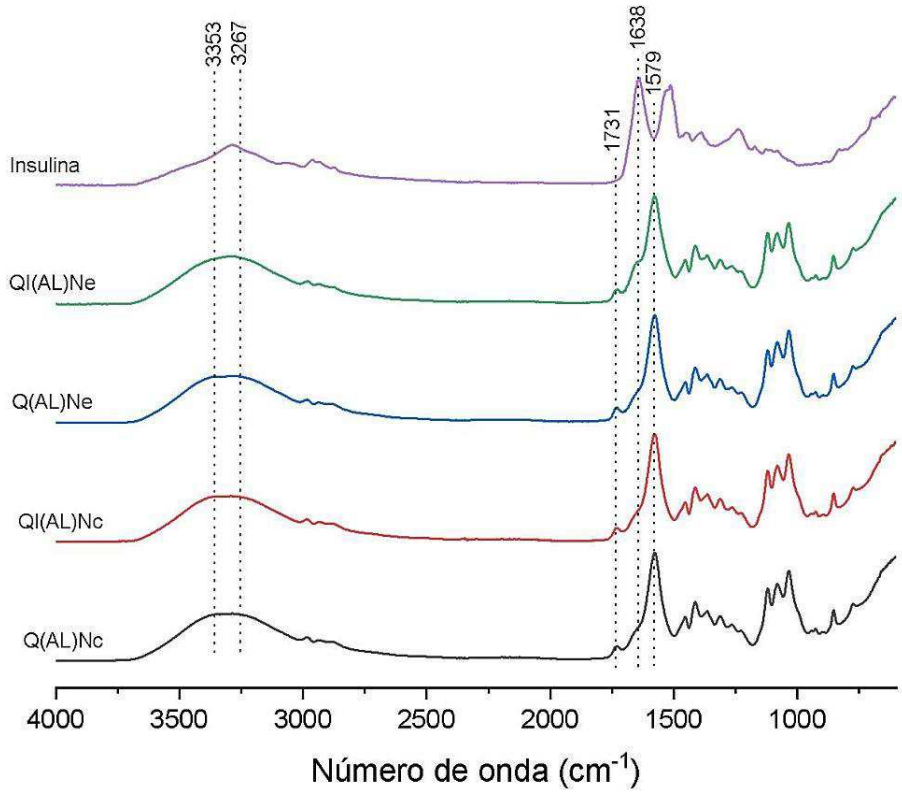


Figura 18- Gráfico de FTIR das membranas Q(AL)Nc, QI(AL)Nc, Q(AL)Ne, QI(AL)Ne e pó de insulina.

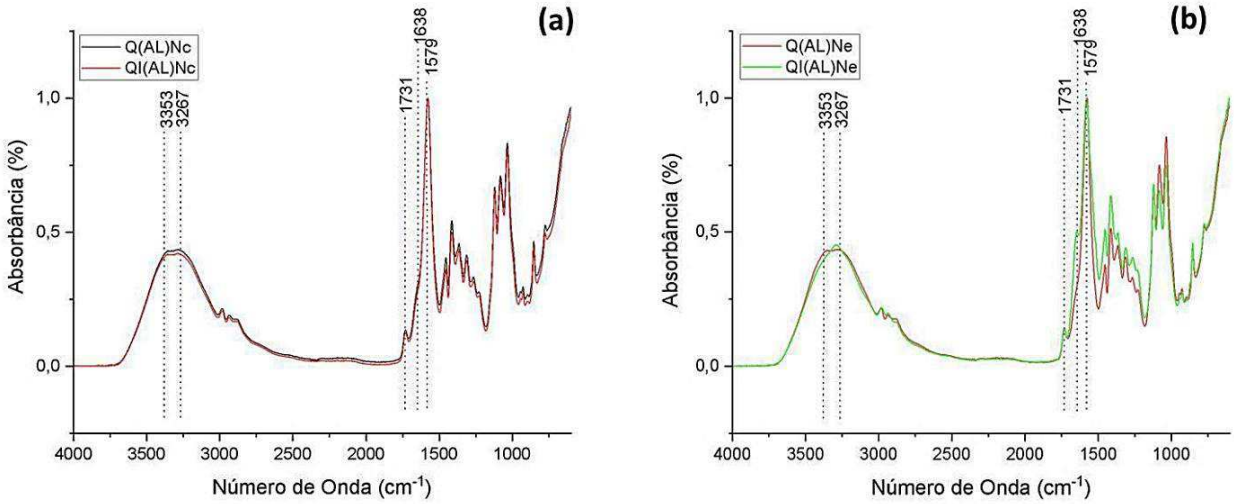


Figura 19- Gráfico de sobreposição dos espectros de FTIR. (a) sobreposição das amostras Q(AL)Nc e QI(AL)Nc; (b) sobreposição das amostras Q(AL)Ne e QI(AL)Ne.

4.3.2. Solução Ácida Utilizada para Dissolução da Quitosana

A comparação dos espectros de FTIR das membranas não neutralizadas de quitosana com a incorporação ou não de insulina, preparadas utilizando duas

soluções ácidas diferentes para dissolver a quitosana, ácido acético ou ácido lático, e pelos processamentos de congelamento e liofilização e evaporação do solvente pode ser apreciada na Figura 20. Observa-se que, independentemente da solução ácida utilizada, as regiões de vibrações características da quitosana foram conservadas para as vibrações de estiramento dos grupos OH e NH sobrepostas entre 3249 cm^{-1} e 3189 cm^{-1}; vibrações de estiramento referentes à carbonila (C=O-NHR) da quitosana em 1634 cm^{-1} para Q(AA)NNc, QI(AA)NNc, Q(AL)NNc e QI(AL)NNc e 1638 cm^{-1} para Q(AA)NNe, QI(AA)NNe, Q(AL)NNe e QI(AL)NNe; vibrações de deformação do grupo amina (NH_2) em 1543 cm^{-1}; e vibrações de deformação angular referente ao grupo CH_2 em 1404 cm^{-1} (Bhattarai *et al.*, 2006; Boonsongrit *et al.*, 2008; Depan *et al.*, 2009; Mukhopadhyay *et al.*, 2015). No entanto, apenas quando a quitosana foi diluída em ácido lático as vibrações atribuídas a carbonila dos grupos éster ou carboxílico nas cadeias laterais do ácido lático podem ser observadas em forma de um ombro em 1733 cm^{-1} (Bhattarai *et al.*, 2006). Apesar das membranas preparadas com solução de ácido lático apresentarem uma banda vibracional diferente das preparadas com ácido acético, não foram detectadas alterações que pudessem sugerir a incorporação da insulina em nenhuma das membranas.

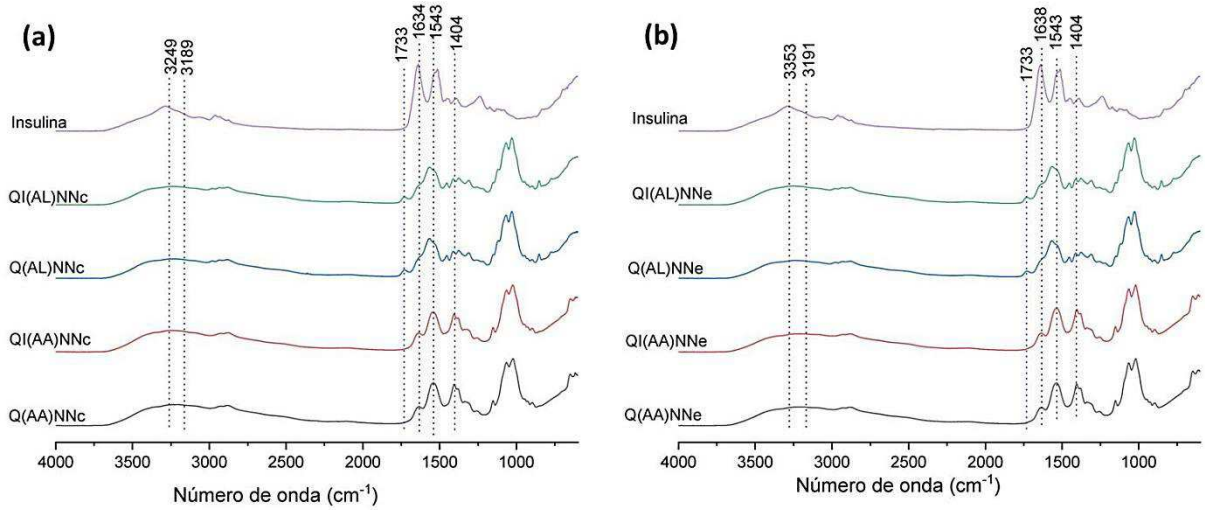


Figura 20- Gráfico de FTIR das membranas não neutralizadas com ou sem incorporação de insulina e pó de insulina. (a) Espectro das membranas preparadas por congelamento e liofilização - Q(AA)NNc, QI(AA)NNc, Q(AL)NNc e QI(AL)NNc – e pó de insulina. (b) Espectro das membranas preparadas por evaporação do solvente – Q(AA)NNe, QI(AA)NNe, Q(AL)NNe e QI(AL)NNe – e pó de insulina.

Na comparação dos espectros das membranas neutralizadas de quitosana com ou sem incorporação de insulina, Figura 21, observa-se que regiões vibracionais

características da quitosana estão presentes independente da solução ácida utilizada. Na região de sobreposição das vibrações de estiramento dos grupos OH e NH, as amostras Q(AA)Nc e QI(AA)Nc apresentaram um aumento da intensidade nas regiões 1638 cm^{-1}, 1546 cm^{-1} e 1406 cm^{-1}, porém para as demais esta vibração manteve-se entre 3353 cm^{-1} e 3267 cm^{-1}. As vibrações de estiramento referentes à carbonila (C=O-NHR) da quitosana apresentou-se em 1638 cm^{-1} para todas as membranas e um aumento de intensidade desta banda foi observado para QI(AA)Ne e QI(AL)Ne podendo indicar uma interação entre quitosana e insulina. Outra região conservada para a dissolução da quitosana com os diferentes ácidos foi a da vibração de deformação angular referente ao grupo CH_2 que pode ser observada em 1406 cm^{-1} (Boateng *et al.*, 2014; Demina *et al.*, 2016). Já as vibrações de deformação do grupo amina (NH_2) podem ser apreciadas em 1546 cm^{-1}, quando a quitosana foi diluída em solução de ácido acético (Q(AA)Nc, QI(AA)Nc, Q(AA)Ne e QI(AA)Ne), e em 1579 cm^{-1}, para as amostras diluídas em solução de ácido lático (Q(AL)Nc, QI(AL)Nc, Q(AL)Ne e QI(AL)Ne) (Yao *et al.*, 2003; Bhattarai *et al.*, 2006; Sarmento, B. *et al.*, 2006). Observa-se um aumento da intensidade nestas regiões vibracionais para QI(AA)Ne e QI(AL)Ne podendo indicar interação entre quitosana e insulina. Nas amostras em que a quitosana foi diluída em solução de ácido lático observa-se um ombro em 1731 cm^{-1} que é atribuído a carbonila dos grupos éster ou carboxílico nas cadeias laterais do ácido lático (Bhattarai *et al.*, 2006).

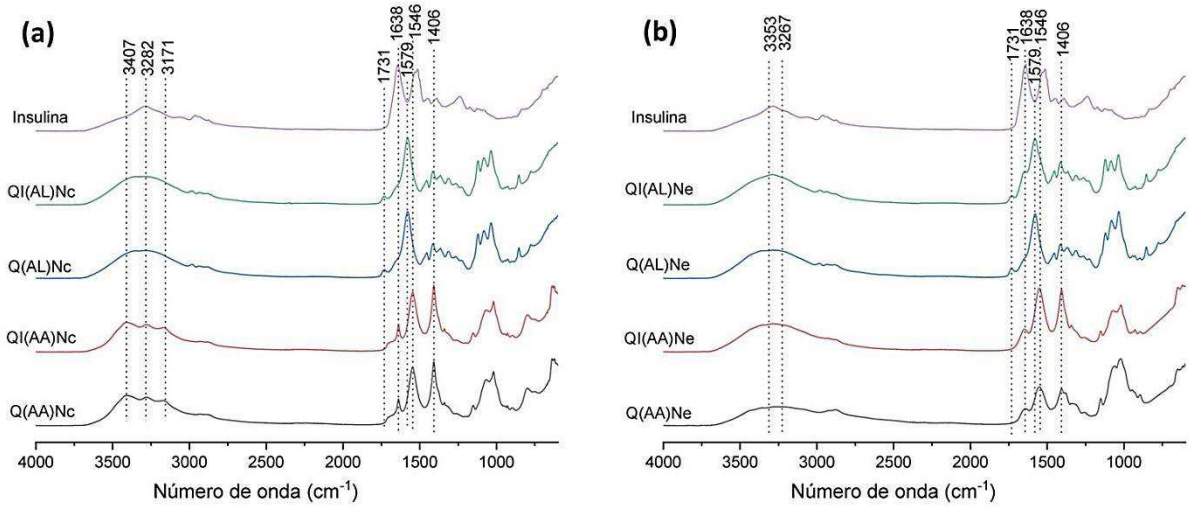


Figura 21- Gráfico de FTIR das membranas não neutralizadas com ou sem incorporação de insulina e pó de insulina. (a) Espectro das membranas preparadas por congelamento e liofilização - Q(AA)Nc, QI(AA)Nc, Q(AL)Nc e QI(AL)Nc – e pó de insulina. (b) Espectro das membranas preparadas por evaporação do solvente – Q(AA)Ne, QI(AA)Ne, Q(AL)Ne e QI(AL)Ne – e pó de insulina.

De acordo com os achados das análises macroscópicas e do FTIR sugere-se que a interação entre matriz e fármaco para a quitosana solubilizada com ácido acético (Figura 22a) e em ácido lático (Figura 22b) sejam diferentes, o que explicaria as diferentes características macroscópicas encontradas entre as membranas preparadas com os dois ácidos.

Sugere-se que a interação entre matriz e fármaco, para a quitosana solubilizada com ácido acético (Figura 22a), seja do tipo iônica, pois a quitosana permaneceu em meio levemente ácido (pH = 6,7) e, portanto, pode ter mantido alguns grupos amina protonados e hidroxilas aniônicas; enquanto os grupos amida da insulina (Figura 1), neste meio, se ligam aos íons hidrônios livres prevalecendo, assim, o caráter ácido da insulina. Desta forma, acredita-se que os grupamentos ácidos da insulina interajam ionicamente com os grupos hidroxilas da quitosana.

Já para a quitosana solubilizada em solução de ácido lático (Figura 22b), a hipótese deste trabalho é que a interação entre fármaco e matriz ocorra por interação iônica, semelhante à proposta anteriormente para o ácido acético (Figura 22a), porém com maior intensidade devido a presença de uma hidroxila a mais no ácido lático; e, também, por retenção física. O ácido lático possui cadeia carbônica maior que o ácido acético, o que possibilita um maior afastamento das cadeias poliméricas da quitosana (Callister Jr, 2008). Deste modo, sugere-se que as cadeias de insulina (Figura 1) possam se alojar no espaço entre as cadeias poliméricas da quitosana promovendo, assim, uma retenção física do fármaco pela matriz.

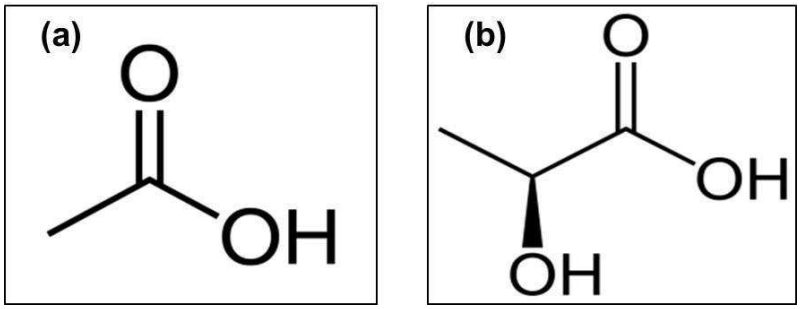


Figura 22: Estrutura química dos ácidos utilizados para dissolução da quitosana. Em (a) ácido acético; e em (b) ácido lático.

4.3.3. Uso ou não de Neutralização Prévia da Solução de Quitosana

Os espectros das membranas preparadas por dissolução da quitosana em ácido acético seguido ou não de neutralização estão dispostos na Figura 23. Observa-se que, quando o método de congelamento e liofilização foi utilizado (Figura 23a), as membranas preparadas com a solução de quitosana neutralizada apresentaram bandas na região das vibrações de estiramento dos grupos OH e NH em 3407 cm^{-1}, 3282 cm^{-1} e 3171 cm^{-1}, que podem ser atribuídas a formação de pontes de hidrogênio (Paiva *et al.*, 1996). As bandas nas regiões características da quitosana, em 1638 cm^{-1}, 1546 cm^{-1} e 1406 cm^{-1} referentes à carbonila (estiramento C=O-NHR), ao grupo amina (deformação NH_2) e deformação angular CH_2 respectivamente, mantiveram-se conservadas porém com bandas mais expressivas nas membranas preparadas com a solução de quitosana/ácido acético neutralizada (Boonsongrit *et al.*, 2008; Mukhopadhyay *et al.*, 2015). Também foi possível observar a formação de uma banda de vibração de estiramento na região de 798 cm^{-1}, que podem ser atribuídas a amina, apenas para as membranas Q(AA)Nc e QI(AA)Nc (Paiva *et al.*, 1996). Contudo, não pode ser observada diferença nos espectros das membranas neutralizadas preparadas por congelamento e liofilização quanto a incorporação ou não de insulina.

As membranas preparadas pelo método de evaporação do solvente (Figura 23b) apresentaram as mesmas regiões de vibrações nos espectros de FTIR tanto para as membranas preparadas com a solução de quitosana não neutralizada quanto para as membranas preparadas com a solução de quitosana neutralizada. As regiões de sobreposição das vibrações de estiramento dos grupos OH e NH apreciadas entre 3243 cm^{-1} e 3191 cm^{-1}; vibrações de estiramento do grupo carbonila em 1638 cm^{-1}; vibrações de deformação do grupo amina em 1546 cm^{-1}; e vibrações de deformação angular CH_2 em 1406 cm^{-1} (Mukhopadhyay *et al.*, 2015). Todavia, observou-se aumento da intensidade vibracional para QI(AA)Ne em 1638 cm^{-1}, 1546 cm^{-1} e 1406 cm^{-1}, sugerindo a ocorrência de interação entre quitosana e insulina, devido a deformação angular das ligações N-H, quando a solução de quitosana foi neutralizada.

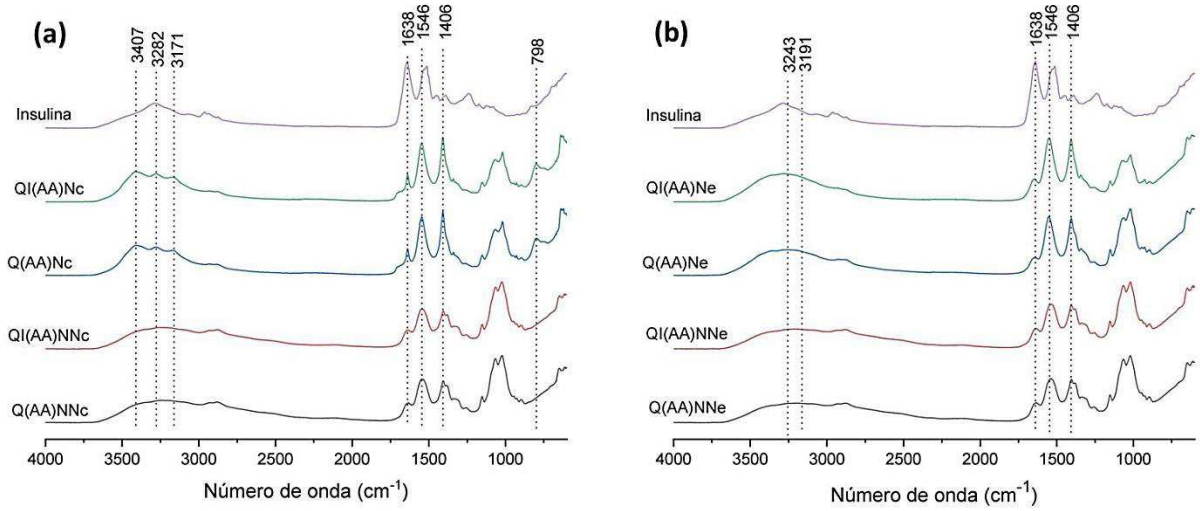


Figura 23: Gráfico de FTIR das membranas preparadas por dissolução da quitosana em ácido acético neutralizado e não neutralizado, com ou sem incorporação de insulina e pó de insulina. (a) Espectro das membranas preparadas por congelamento e liofilização - Q(AA)NNc, QI(AA)NNc, Q(AA)Nc e QI(AA)Nc – e pó de insulina. (b) Espectro das membranas preparadas por evaporação do solvente – Q(AA)NNe, QI(AA)NNe, Q(AA)Ne e QI(AA)Ne – e pó de insulina.

Analisando o espectro de FTIR das membranas preparadas por dissolução da quitosana em ácido lático seguido ou não de neutralização, Figura 24, observa-se que, tanto para as membranas preparadas pelo método de congelamento e liofilização (Figura 24a) quanto para as preparadas por evaporação do solvente (Figura 24b), as regiões características da quitosana estão presentes nas membranas neutralizadas e não neutralizadas. As regiões comuns para estas membranas são: região de vibração de estiramento em 1733 cm^{-1}, atribuída a carbonila dos grupos éster ou carboxílico nas cadeias laterais do ácido lático; 1638 cm^{-1} região de bandas de estiramento da carbonila da quitosana; e 1579 cm^{-1} região de bandas de deformação do grupo amina (Depan *et al.*, 2009). A região de sobreposição das vibrações de estiramento dos grupos OH e NH apresentam-se diferentes de acordo com o método utilizado, entre 3278 cm^{-1} e 3183 cm^{-1} para as membranas preparadas por congelamento e liofilização e entre 3353 cm^{-1} e 3267 cm^{-1} para as preparadas por evaporação do solvente. As membranas não neutralizadas, independentemente do método de preparo, apresentam um ombro na região de 1543 cm^{-1} que é atribuído a vibração de deformação do grupo amina (Bhattarai *et al.*, 2006). Ademais, observou-se aumento da intensidade vibracional para QI(AL)Ne em 1638 cm^{-1} e 1579 cm^{-1} sugerindo a ocorrência de interação entre quitosana e insulina, devido a deformação angular das ligações N-H, quando a solução de quitosana foi neutralizada.

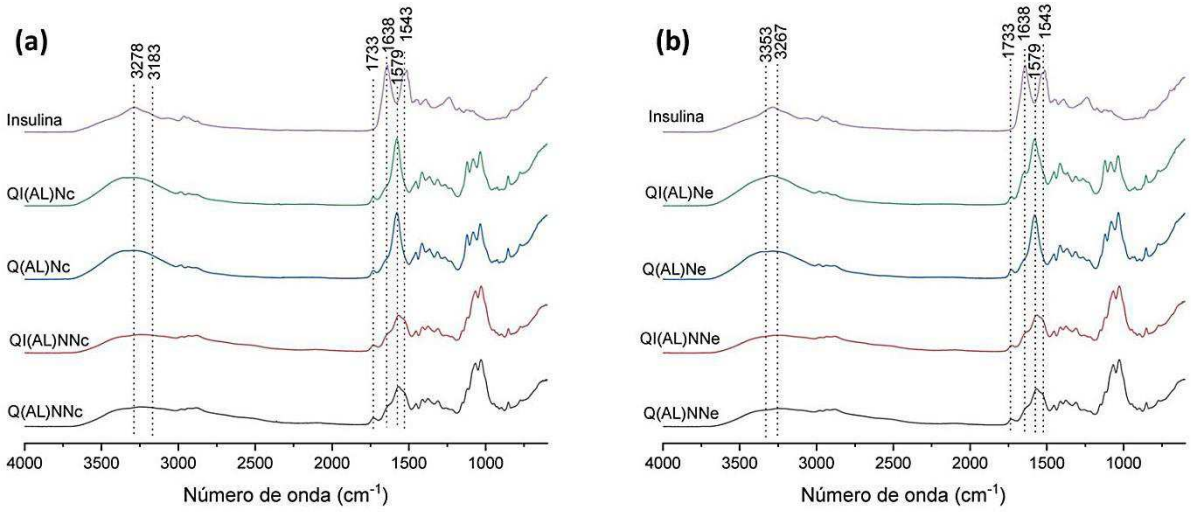


Figura 24. Gráfico de FTIR das membranas preparadas por dissolução da quitosana em ácido lático neutralizado e não neutralizado, com ou sem incorporação de insulina e pó de insulina. (a) Espectro das membranas preparadas por congelamento e liofilização - Q(AL)NNc, QI(AL)NNc, Q(AL)Nc e QI(AL)Nc – e pó de insulina. (b) Espectro das membranas preparadas por evaporação do solvente – Q(AL)NNe, QI(AL)NNe, Q(AL)Ne e QI(AL)Ne – e pó de insulina.

No presente trabalho esperava-se que a insulina fosse mantida em seu estado ativo, visto que o fato de se ter uma cadeia polimérica, por efeito indutivo, o caráter ácido fosse atenuado e, consequentemente, o estado ativo da insulina não seria alterado. Uma evidência foi o trabalho desenvolvido por Woitiski *et al.* (2011), que empregaram a quitosana não neutralizada (pH 4,6) para estabilizar a insulina; no entanto, no presente trabalho as membranas preparadas com quitosana não neutralizada não apresentaram evidências de interação entre quitosana e insulina. Este fato pode ser explicado devido a sensibilidade de pH da insulina, que se mantém estável em pH de 6,6 a 7,8, sendo as insulinas comerciais estabilizadas em pH 7,4, podendo ter sido desnaturada ou inativada uma vez que ela foi incorporada a uma solução de quitosana com pH entre 4,5 e 5,7 (Silva, 2006).

As membranas de quitosana neutralizadas, produzidas pelo método de evaporação do solvente, apresentaram interação com a insulina. Entretanto, as membranas Q(AA)Ne QI(AA)Ne são quebradiças e as membranas Q(AL)Ne e QI(AL)Ne ficaram fortemente aderidas a placa e só puderam ser removidas em pequenos pedaços irregulares. Por estas razões, as soluções de quitosana solubilizadas em ácido acético ou em ácido lático e posteriormente neutralizadas foram utilizadas para produzir esferas de quitosana e quitosana/insulina pelo método de gelificação ionotrópica.

4.4. Análise Macroscópica e Sensorial das Esferas

As esferas de quitosana e quitosana/insulina preparadas por gelificação ionotrópica onde a quitosana foi solubilizada em ácido acético, Figura 25, apresentaram coloração branca. As gelificadas em solução TPP (Figura 25a e b) apresentaram um aspecto homogêneo, rígidas ao toque e arredondas, porém, QI(AA)TPP (Figura 25a) mostrou-se com dimensões maiores quando comparadas a Q(AA)TPP (Figura 25b).

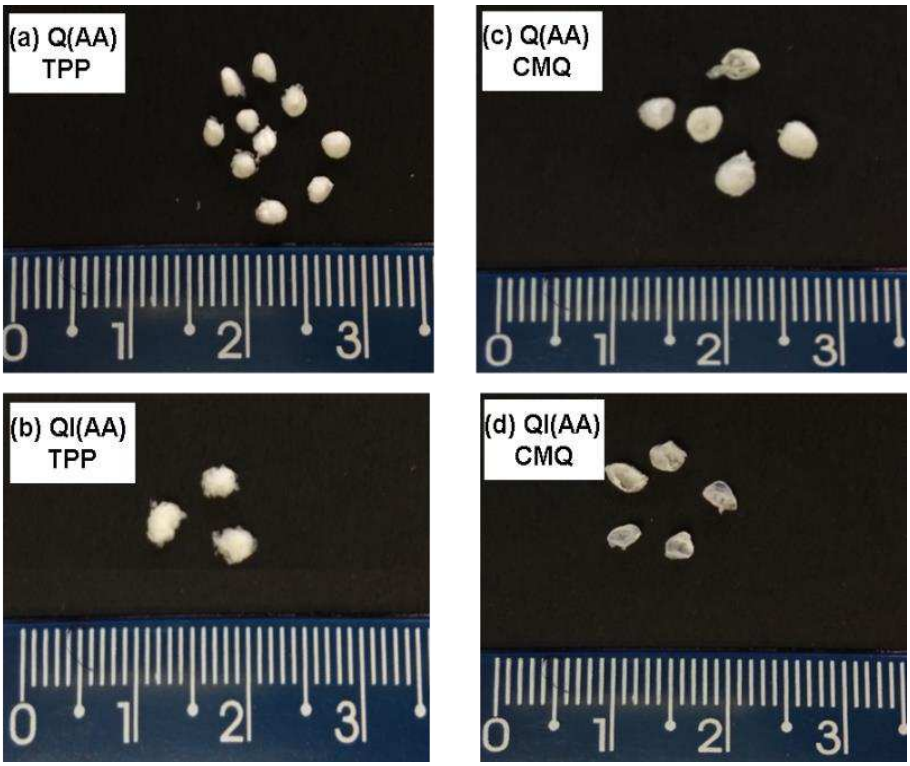


Figura 25- Esferas de quitosana e quitosana/insulina preparadas por gelificação ionotrópica com a quitosana solubilizada em ácido acético. Em **a** esferas de quitosana produzidas com TPP como solução gelificante – Q(AA)TPP; **b** esferas de quitosana/insulina produzidas com TPP como solução gelificante – QI(AA)ITPP; **c** esferas de quitosana produzidas com CMQ como solução gelificante – Q(AA)CMQ; e **d** esferas de quitosana/insulina produzidas com CMQ como solução gelificante – QI(AA)ICMQ.

As esferas gelificadas em solução de CMQ (Figura 25c e d) possuem dimensões maiores quando comparadas as produzidas com TPP (Figura 25a e b). As esferas Q(AA)CMQ (Figura 25c) exibiram-se redondas, porém QI(AA)CMQ (Figura 25d) mostrou-se achatada. Ao toque tanto Q(AA)CMQ quanto QI(AA)CMQ apresentaram uma textura esponjosa.

Na Figura 26 observamos as esferas de quitosana e quitosana/insulina, com a quitosana solubilizada em ácido lático. Todas as amostras demonstraram-se arredondas e de coloração branca. As esferas Q(AL)TPP (Figura 26a) foi a que apresentou menor tamanho e possui formato irregular. Da mesma forma, QI(AL)TPP (Figura 26b) exibiu um formato irregular, porém são maiores que Q(AL)TPP. Ambas se apresentaram rígidas ao toque.

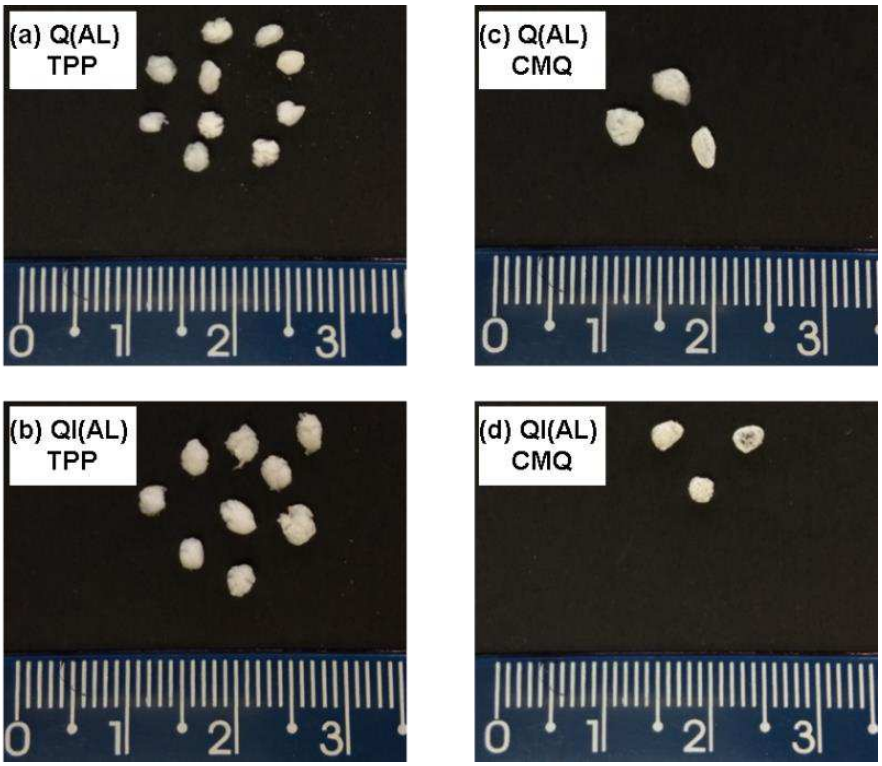


Figura 26- Esferas de quitosana e quitosana/insulina preparadas por gelificação ionotrópica com a quitosana solubilizada em ácido lático. Em **a** esferas de quitosana produzidas com TPP como solução gelificante – Q(AL)TPP; **b** esferas de quitosana/insulina produzidas com TPP como solução gelificante – QI(AL)ITPP; **c** esferas de quitosana produzidas com CMQ como solução gelificante – Q(AL)CMQ; e **d** esferas de quitosana/insulina produzidas com CMQ como solução gelificante – QI(AL)ICMQ.

As amostras preparadas com CMQ como solução gelificante apresentaram aspecto esponjoso, algumas são achatadas e QI(AL)CMQ (Figura 26d) mostrou-se menor que Q(AL)CMQ (Figura 26c).

4.5. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) das Esferas

As análises de FTIR foram realizadas com as esferas de quitosana e quitosana/insulina preparadas com TPP ou CMQ. Os resultados desta análise foram discutidos considerando as soluções utilizadas na gelificação (TPP ou CMQ) e a presença de insulina.

4.5.1. Solução Utilizada na Gelificação

Na Figura 27 estão dispostos os espectros das amostras Q(AL)TPP, Q(AA)TPP, TPP e quitosana. Observar-se que as vibrações características da quitosana foram deslocadas devido a reação de reticulação; entre 3274 cm^{-1} e 2884 cm^{-1} visualiza-se uma banda larga devido a sobreposição das vibrações de estiramento dos grupos OH e NH; as vibrações de 1634 cm^{-1}, referente as vibrações de estiramento da carbonila aparecem em 1640 cm^{-1} e as vibrações de deformação do grupo amina, que apareciam em 1542 cm^{-1}, passaram a vibrar em 1586 cm^{-1}; também observa-se vibrações em 1412 cm^{-1}, características da deformação angular -CH_2, 1374 e em 1342 cm^{-1} deformação simétrica de -CH_3. Resultados semelhantes foram encontrados por diversos autores ao produzir materiais a base de quitosana em condições semelhantes ao do presente trabalho (Pierog *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2010; Azevedo *et al.*, 2011; Dantas *et al.*, 2019).

Ademais, verifica-se em Q(AA)TPP a presença de uma banda de vibrações de alongamento PO em 1228 cm^{-1} e o surgimento de estiramento assimétrico atribuída a POP na faixa de 892 cm^{-1} (Martins *et al.*, 2012). Essas diferenças ocorreram, principalmente, pela complexação entre as moléculas de quitosana e TPP (Luo *et al.*, 2010).

Analisando o espectro de FTIR das esferas preparadas por dissolução da quitosana em ácido lático e utilizando TPP como solução gelificante, Figura 27, observa-se que, os deslocamentos das vibrações características da quitosana que ocorreram para Q(AA)TPP também ocorreram para Q(AL)TPP. As vibrações de estiramento da carbonila aparecem como um ombro em 1644 cm^{-1} e as vibrações de deformação do grupo amina como um pico em1590 cm^{-1}. Além da deformação angular -CH_2 em 1458 e 1418 cm^{-1} e deformação simétrica de -CH_3 em 1374 cm^{-1} (Paiva *et*

al., 1996). Também é possível apreciar a presença da complexação da quitosana com TPP para Q(AL)TPP (Figura 27) pela presença de um pico de pequena intensidade referente ao espectro de vibrações de alongamento PO em 1230 cm^{-1} e surgimento de estiramento assimétrico atribuída POP na faixa de 892 cm^{-1} (Martins *et al.*, 2012).

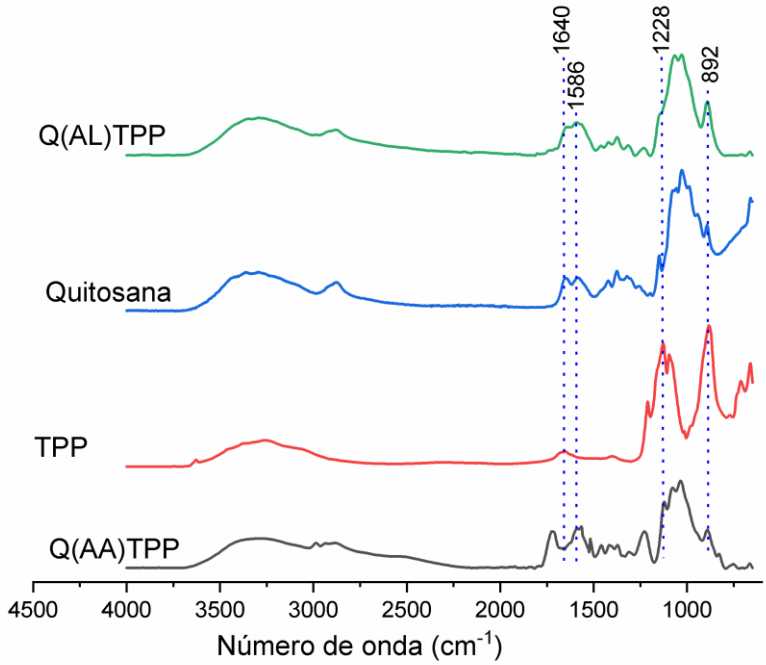


Figura 27. Gráfico de FTIR das esferas de quitosana solubilizada em ácido acético e lático preparadas com TPP (Q(AA)TPP e Q(AL)TPP, respectivamente), TPP e quitosana.

Os espectros de FTIR das amostras preparadas com CMQ como solução gelificante, da quitosana e da CMQ estão dispostos na Figura 28. Observa-se que para ambas as amostras, Q(AA)CMQ e Q(AL)CMQ, a carboximetilquitosana (CMQ) está presente. O pico em 1029 cm^{-1}, característico de $–CH_2–OH$ em álcoois primários e alongamento C–O, encontra-se reduzidos em CMQ indicando a ocorrência da carboximetilação neste grupo; nas esferas produzidas com CMQ este pico (1029 cm^{-1}) encontra-se pouco aumentado quando comparada com a CMQ. Outro indício da presença de CMQ nas esferas é o aumento da intensidade vibracional em 1590 e 1404 cm^{-1}, estiramento antissimétrico -COO- do ácido carboxílico, indicando a presença de grupos carboximetil nas amostras (Lin, C.-C. e Lin, C.-W., 2009). Também é possível observar que as vibrações de estiramento dos grupos -NH e -OH em 3272 cm^{-1} e as vibrações de deformação -CH2-, em 2922 cm^{-1}, aparecem

aumentadas com relação a CMQ, confirmando que a quitosana também está presente em ambas as esferas (Asandei *et al.*; Ardelean *et al.*, 2009).

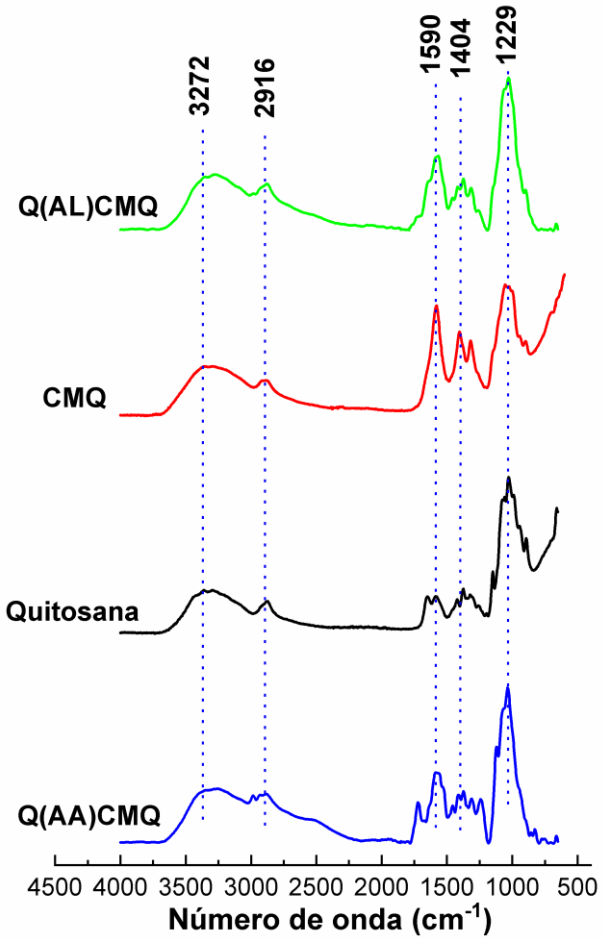


Figura 28. Gráfico de FTIR das esferas de quitosana solubilizada em ácido acético e lático preparadas com CMQ (Q(AA)CMQ e Q(AL)CMQ, respectivamente), CMQ e quitosana.

Desta forma, as informações obtidas através das comparações dos espectros de FTIR das amostras contendo TPP, da quitosana e do TPP (Figuras 27), pode-se concluir que a reticulação foi efetiva por meio de interações iônicas entre as porções PO^-, carregadas negativamente, dos grupos fosfato de TPP e as porções protonadas, NH_3^+, das cadeias de quitosana (Martins *et al.*, 2012; Gierszewska e Ostrowska-Czubenko, 2016). Ademais, a comparação entre os espectros de FTIR das amostras preparadas com CMQ (Figura 28), da quitosana e CMQ, mostra a presença da quitosana e da carboximetilquitosana nas esferas produzidas.

4.5.2. Presença de Insulina

As soluções utilizadas para o preparo das esferas foram aquelas que demonstraram interação entre quitosana e insulina na formação das membranas. Porém, devido a mudança no método de processamento das soluções, de evaporação do solvente (membranas) para gelificação ionotrópica (esferas), faz-se necessário a verificação da presença da insulina nos novos sistemas formados.

A Figura 29 mostra os espectros de FTIR das esferas de quitosana, quitosana/insulina preparadas com CMQ como solução gelificante, do pó de insulina e da quitosana. Podemos inferir que a insulina está presente em QI(AA)CMQ e QI(AL)CMQ pela formação de um ombro em 1632 cm^{-1} (Figura 29a) e 1640 cm^{-1} (Figura 29b) e aumento de intensidade vibracional e deslocamento dos picos em 1574 cm^{-1} (Figura 29a) e 1568 cm^{-1} (Figura 29b), próximos as regiões de estiramento C=O da amida I (1638 cm^{-1}), característico do espectro das proteínas, estiramento N-H atribuídos a amida II (1528 cm^{-1}) da insulina (Sarmento, Bruno *et al.*, 2006; Azevedo *et al.*, 2011; Lima *et al.*, 2014; Mukhopadhyay *et al.*, 2015). Adicionalmente, observa-se um aumento de intensidade vibracional em 3272 e 2876 cm^{-1} (Figura 27 “a” e “b”) relacionada à vibração de estiramento dos grupos -OH e -NH_2, que podem estar relacionados a presença de uma maior quantidade destes grupos devido a interação entre quitosana e insulina (Lima *et al.*, 2014).

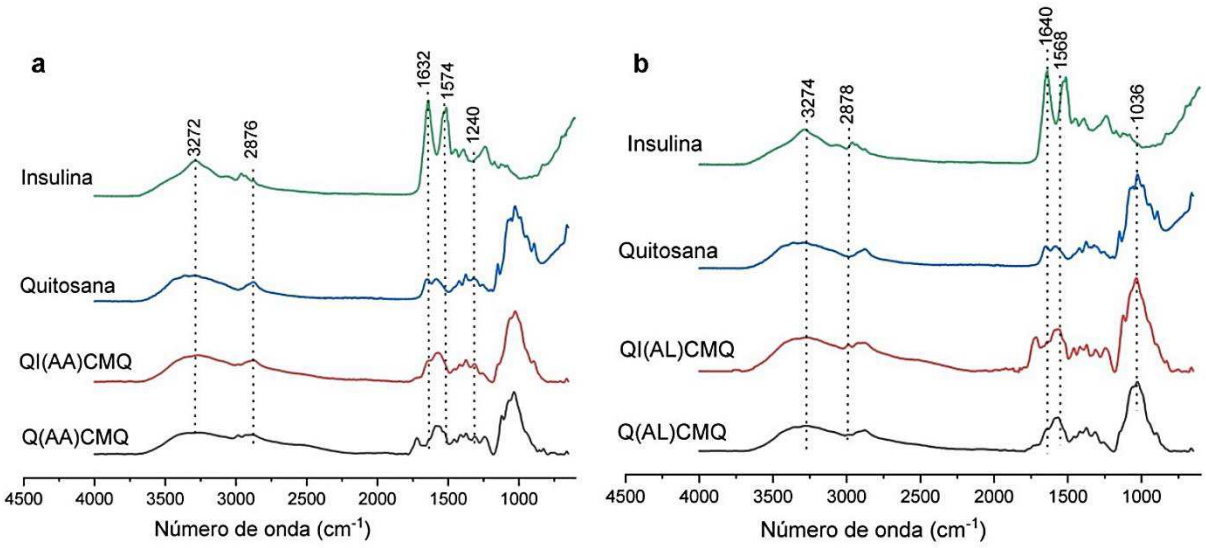


Figura 29. Gráfico de FTIR das esferas de quitosana e quitosana/insulina preparadas com CMQ como solução gelificante, quitosana e do pó de insulina. (a) Espectro das esferas onde a quitosana foi solubilizada em ácido acético – Q(AA)CMQ e QI(AA)CMQ – quitosana e pó de insulina; (b) Espectro das esferas onde a quitosana foi solubilizada em ácido lático – Q(AL)CMQ e QI(AL)CMQ – quitosana e pó de insulina.

Os espectros de FTIR das esferas de quitosana e quitosana/insulina preparadas com TPP como solução gelificante, do pó de insulina e da quitosana podem ser apreciados na Figura 30. Observa-se claras mudanças no espectro de FTIR das amostras contendo insulina, QI(AA)TPP e QI(AL)TPP que apresentaram aumento de intensidade nas regiões de vibrações de estiramento dos grupos -OH e -NH_2 (2986, 2880 e 2500 cm^{-1}), além de uma redução na banda referente ao grupo fosfato (P-O-P), 892 cm^{-1}. Neste trabalho sugere-se que esta redução ocorra devido a competição do fármaco e do agente reticulante pelo cátion ativo, NH_3^+, da quitosana.

Comparando o espectro de QI(AA)TPP com Q(AA)TPP (Figura 30b) observa-se a formação de um ombro e um deslocamento de pico em 1654 cm^{-1} atribuído a sobreposição das vibrações da carbonila da quitosana com as vibrações dos grupos amida I da insulina e um alargamento de 1566 cm^{-1}, que pode estar relacionado a presença da amida II da insulina (Lima *et al.*, 2014). Analisando os gráficos de QI(AL)TPP e Q(AL)TPP (Figura 30a), a mesma formação de um ombro associada ao deslocamento de pico são observadas em 1632 cm^{-1}, acrescentado de um aumento da intensidade vibracional em 1572 cm^{-1}, provavelmente devido a amida II da insulina.

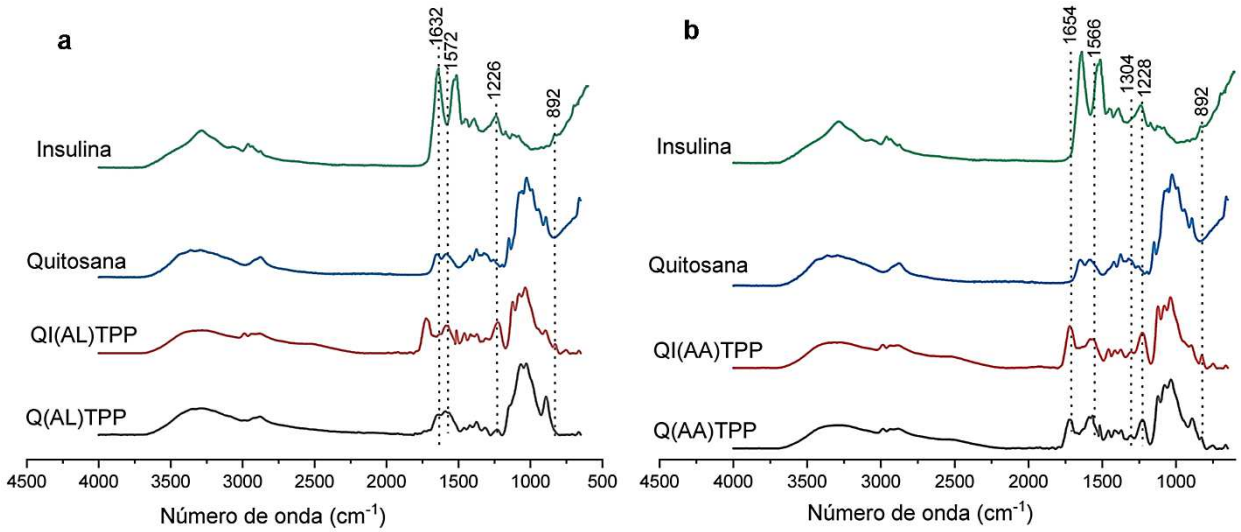


Figura 30. Gráfico de FTIR das esferas de quitosana e quitosana/insulina preparadas com TPP como solução gelificante, quitosana e pó de insulina. (a) Espectro das esferas onde a quitosana foi solubilizada em ácido lático – Q(AL)TPP e QI(AL)TPP – quitosana e pó de insulina; (b) Espectro das esferas onde a quitosana foi solubilizada em ácido acético – Q(AA)TPP e QI(AA)TPP – quitosana e pó de insulina.

Assim, com as informações obtidas através das comparações dos espectros de FTIR das amostras de quitosana, quitosana/insulina e pó de insulina (Figuras 29 e

30), é possível concluir que a insulina interagiu com a quitosana em todas as amostras, independentemente da solução ácida utilizada para solubilizar a quitosana (ácido acético ou ácido lático) e solução utilizada para gelificação (CMQ ou TPP).

4.6. Microscopia Óptica (MO)

As imagens de microscopia óptica (MO), Figuras 31 e 32, ajudam a visualizar as diferenças entre as esferas de acordo com a solução ácida utilizada para solubilizar a quitosana (ácido acético ou ácido lático) e solução utilizada para a gelificação (CMQ ou TPP).

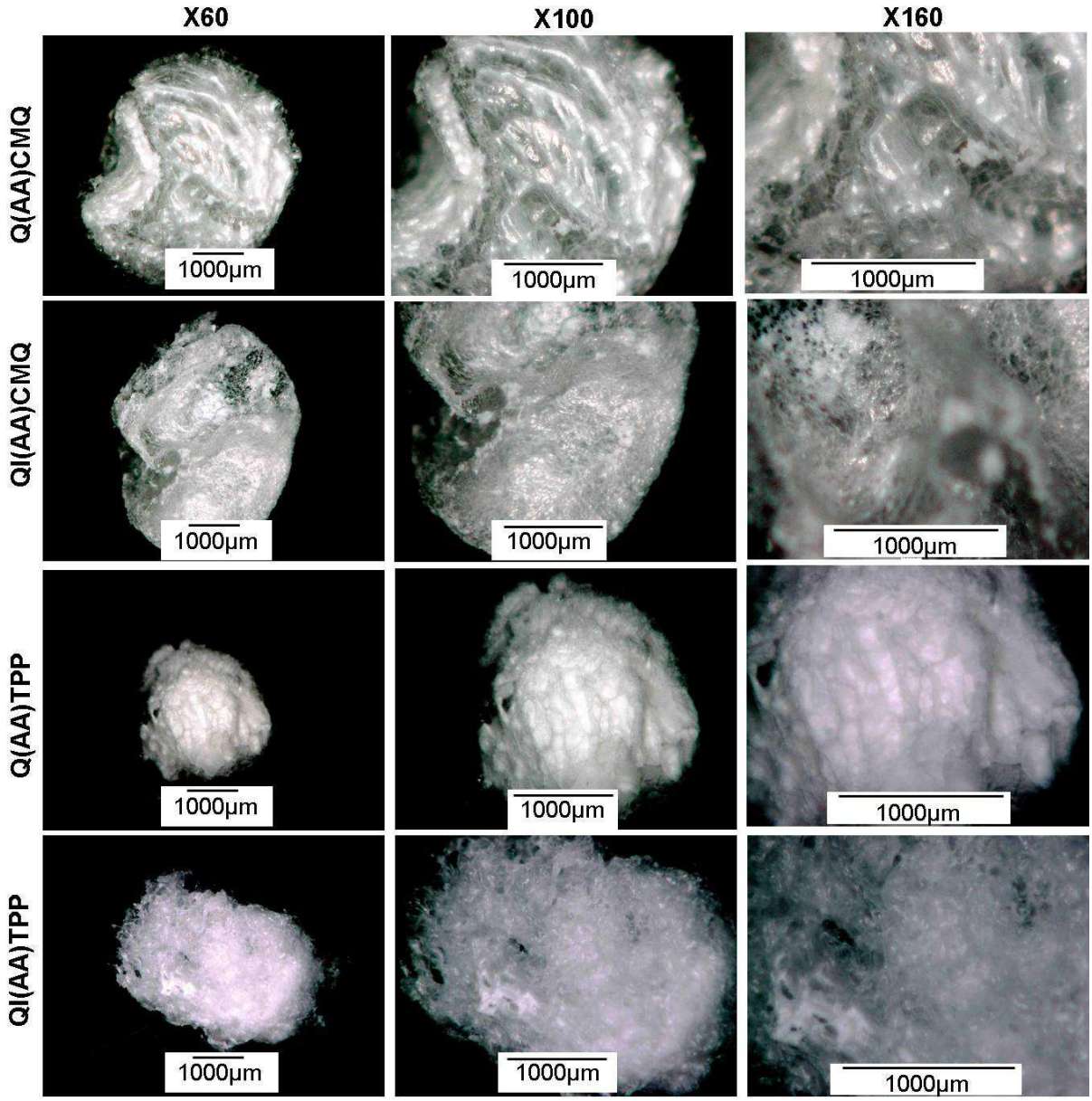


Figura 31- Imagens de Microscopia óptica com aumentos de X60, X100 e X160 das esferas de quitosana e quitosana/insulina preparadas pela solubilização da quitosana em ácido acético em soluções gelificantes de CMQ e TPP.

Na Figura 31 observamos as imagens de MO das esferas, com diferentes aumentos, preparadas com quitosana e quitosana/insulina onde a quitosana foi solubilizada em ácido acético. Pode-se perceber que nenhuma das amostras são perfeitamente esféricas.

As amostras preparadas com CMQ como solução gelificante (Q(AA)CMQ e QI(AA)CMQ) possuem reentrâncias e contornos irregulares em sua superfície e os poros podem ser percebidos, em detalhes, nas imagens com aumento de 160 vezes (Figura 31). Das amostras preparadas com TPP como solução gelificante, Q(AA)TPP foi a que apresentou contornos mais uniformes e os poros não foram visualizados, mesmo no maior aumento utilizado (X160), e menor tamanho. Observa-se que QI(AA)TPP possui formas irregulares e poros visíveis no aumento de 160 vezes.

As imagens de MO, em diferentes aumentos, das esferas preparadas com quitosana e quitosana/insulina onde a quitosana foi solubilizada em ácido lático podem ser observadas na Figura 32. Todas as amostras apresentam formato arredondado com contornos pouco uniformes (Figura 32). As amostras preparadas utilizando CMQ como solução gelificante (Q(AL)CMQ e QI(AL)CMQ) apresentaram superfície rugosa e poros visíveis no aumento de 160 vezes. Porém, quando se comparam Q(AL)CMQ e QI(AL)CMQ (Figura 32) com Q(AA)CMQ e QI(AA)CMQ (Figura 31) percebe-se que Q(AL)CMQ e QI(AL)CMQ possuem formato mais arredondado, contornos mais uniformes e regulares e poros menores.

Apreciando as imagens de MO de Q(AL)TPP e QI(AL)TPP (Figura 32) observamos que ambas possuem contornos regulares, superfície espessa e os poros não puderam ser visualizados em nenhum dos aumentos utilizados. Ao comparar Q(AL)TPP e QI(AL)TPP (Figura 32) com Q(AA)TPP e QI(AA)TPP (Figura 31), visualiza-se que Q(AL)TPP e QI(AL)TPP (Figura 32) apresentam contornos mais uniformes e regulares, formato mais arredondado e superfície menos porosa.

A visualização dos poros das amostras Q(AA)CMQ, QI(AA)CMQ, QI(AA)TPP, Q(AL)CMQ e QI(AL) CMQ pode favorecer um maior intumescimento, hidrossolubilidade e liberação do fármaco, pois em matrizes porosas permanentes a água pode se difundir livremente na matriz através dos poros (Yodkhum e Phaechamud, 2014).

Dessa forma, pela análise dos resultados de MO (Figuras 31 e 32), pode-se inferir que, apesar das análises de FTIR mostrarem a presença da CMQ nas esferas (Figura 28) a reticulação das esferas preparadas com CMQ como solução gelificante

não foi efetiva. Além disso, entre as esferas preparadas com TPP como solução gelificante, a MO mostrou que QI(AL)TPP apresenta maior potencial para ser um sistema de liberação controlada de insulina.

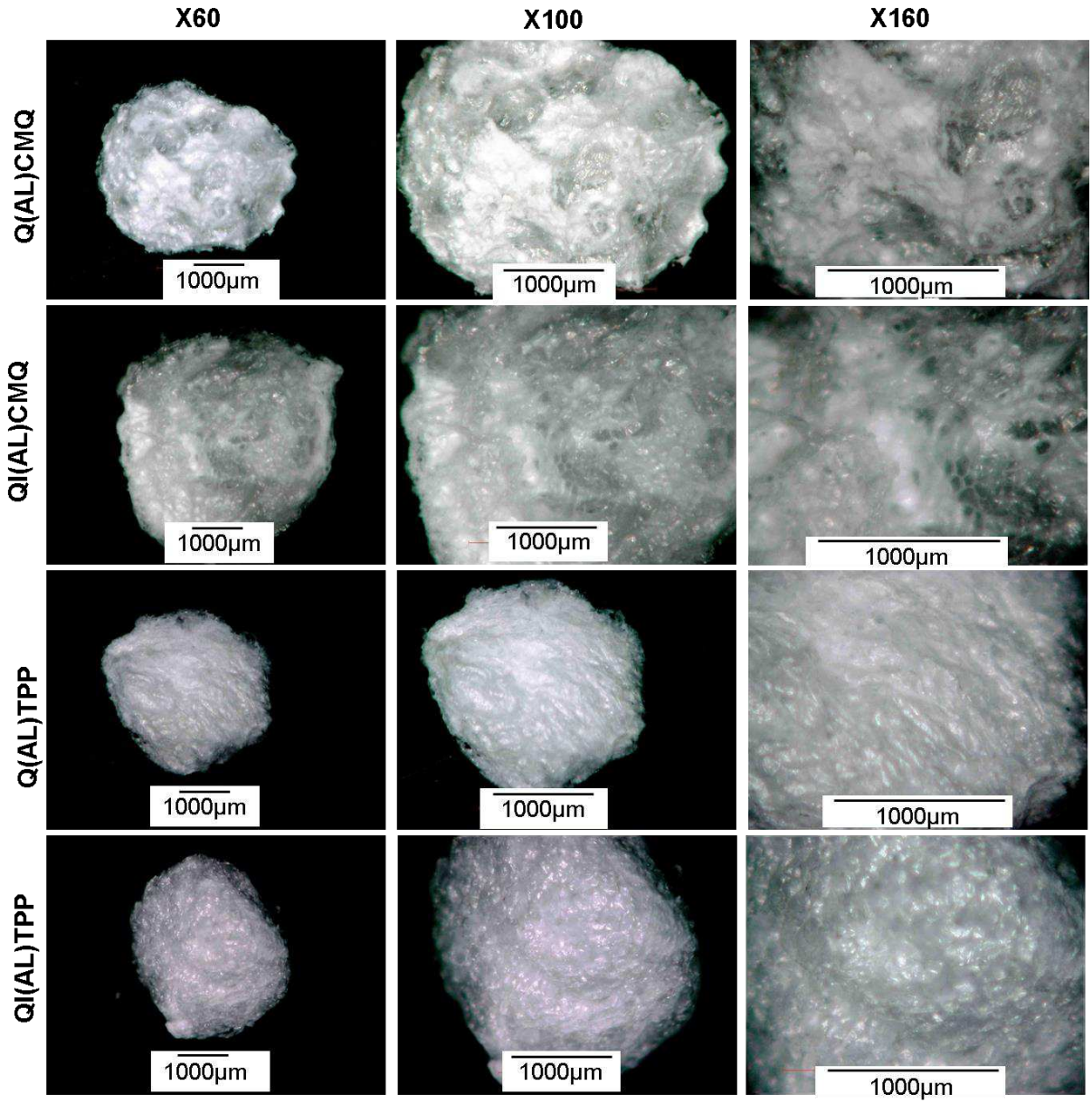


Figura 32- Imagens de Microscopia óptica com aumentos de X60, X100 e X160 das esferas de quitosana e quitosana/insulina preparadas pela solubilização da quitosana em ácido lático em soluções gelificantes de CMQ e TPP.

4.7. Intumescimento

No ensaio de intumescimento das esferas de quitosana e quitosana/insulina (concentração de insulina de 0,2 mg/mL), preparadas com TPP ou CMQ como banho coagulante, apresentam um comportamento dinâmico de intumescimento das esferas. Para uma melhor apreciação das diferenças entre as amostras, as análises de

intumescimento foram apresentadas a partir do início do intumescimento, ou seja, a partir de 5 minutos.

Neste ensaio todas as esferas apresentaram grau de intumescimento entre 78% e 89%, como pode ser observado na Figura 33. Os resultados foram apresentados de acordo com a solução ácida (ácido acético ou ácido lático) utilizada para dissolução da quitosana, o banho coagulante (TPP ou CMQ) e presença de insulina.

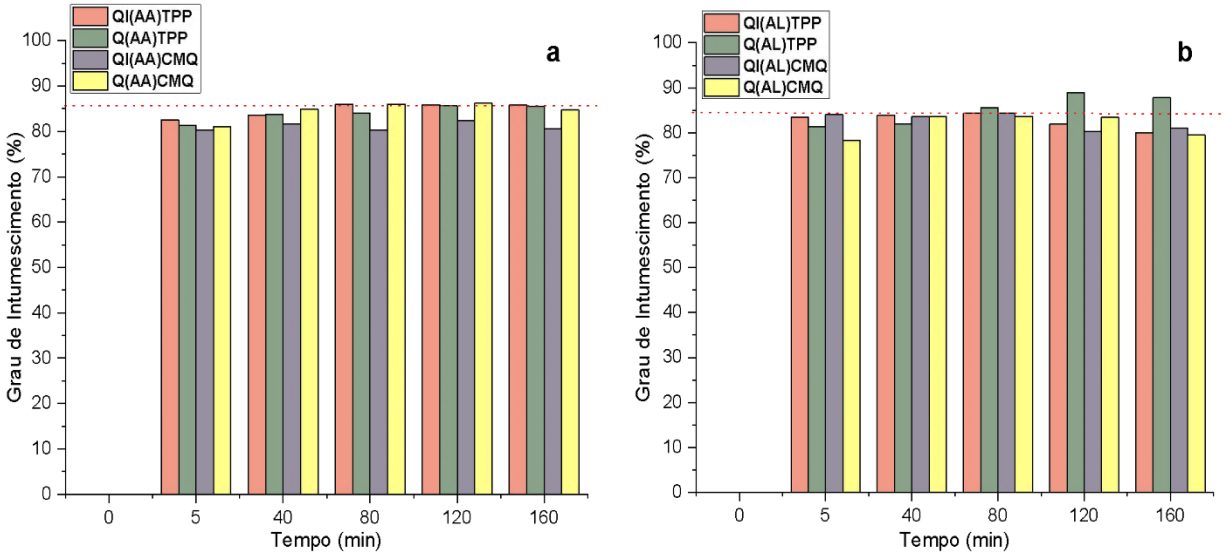


Figura 33- Gráfico do grau de intumescimento das esferas de quitosana e quitosana/insulina. Em (a) gráfico do grau de intumescimento das esferas preparadas por dissolução da quitosana em ácido acético, (b) gráfico do grau de intumescimento das esferas preparadas por dissolução da quitosana em ácido lático e (.....) média do intumescimento máximo.

Considerando a solução ácida utilizada para solubilizar a quitosana podemos observar que o comportamento das amostras preparadas com solubilização em ácido acético e lático é semelhante (Figura 33). Ambos apresentaram uma captação de água inicialmente aumentada atingindo o equilíbrio após 40 minutos. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos que produziram materiais a base de quitosana (Park *et al.*, 2006; Felinto *et al.*, 2007; Yodkhum e Phaechamud, 2014). A média do inchamento máximo para as amostras solubilizadas com ácido acético (Figura 33a (.....)) foi em torno de 86% e foi atingido em 120 minutos. Para as esferas solubilizadas em ácido lático (Figura 33b (.....)) foi aproximadamente 84% e foi atingido em cerca de 80 minutos, com exceção de Q(AL)TPP, que teve o inchamento máximo de 88,9% atingido em 120 minutos. O menor tempo que as esferas preparadas com quitosana solubilizada em ácido lático levaram para atingir o intumescimento máximo

pode ser resultado de um equilíbrio das forças osmóticas determinadas por uma maior afinidade com o solvente, a água (Felinto *et al.*, 2007).

A Figura 34 apresenta o gráfico do grau de intumescimento das esferas de quitosana e quitosana/insulina de acordo com o coagulante utilizado. Podemos observar um grau de intumescimento maior das amostras QI(AA)TPP e Q(AL)TPP quando comparadas as preparadas com CMQ. As esferas QI(AL)TPP e QI(AL)CMQ apresentam capacidade de intumescimento semelhantes e Q(AA)CMQ (Figura 34b) foi a única amostra preparada com CMQ que apresentou um maior intumescimento que sua correspondente preparada com TPP, este fato pode estar relacionado a alta porosidade que a amostra apresentou na análise de MO. A esfera que apresentou maior grau de intumescimento foi Q(AL)TPP (Figura 34a), com um máximo de 88,9%. Q(AA)CMQ possui uma maior quantidade de poros e Q(AL)TPP pode ter uma porosidade permanente, pois, segundo Yodkhum e Phaechamud (2014) em matrizes porosas permanente a água pode se difundir livremente na matriz através dos poros, o que explicaria seu maior intumescimento.

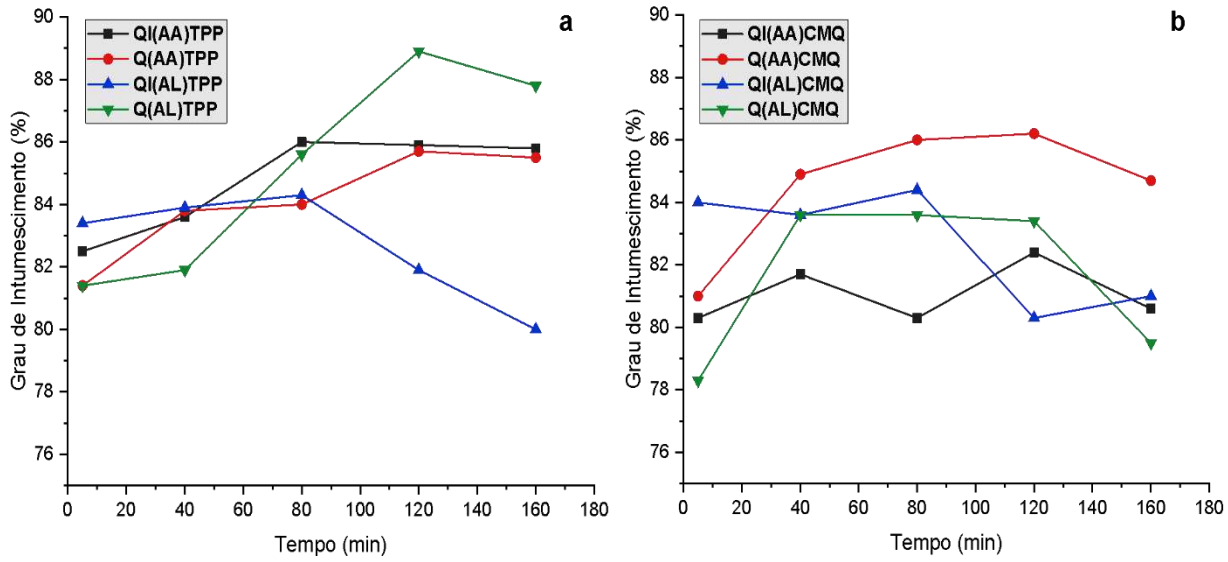


Figura 34- Gráfico do grau de intumescimento das esferas de quitosana e quitosana/insulina. Em (a) gráfico do grau de intumescimento das esferas preparadas com TPP e (b) gráfico do grau de intumescimento das esferas preparadas com CMQ.

Curiosamente apenas QI(AA)TPP (Figura 34a) teve um discreto aimento inicial e manteve um intumescimento constante até 160 minutos. Pode-se considerar que este efeito foi obtido pela reticulação da amostra pois a absorção de água é o estágio inicial da dissolução do polímero, porém em uma matriz reticulada o

intumescimento será substituído no ponto em que a dissolução for interrompida (Yodkhum e Phaechamud, 2014).

Observa-se na Figura 34 que QI(AL)TPP apresentou um comportamento de intumescimento estável até 80 minutos e uma redução, após este período. Este achado pode estar relacionado com a menor porosidade destas esferas, visualizadas pela MO (Figura 32), fortalecendo o conceito de que QI(AL)TPP tem um maior potencial para tornar-se um sistema de liberação controlada de insulina.

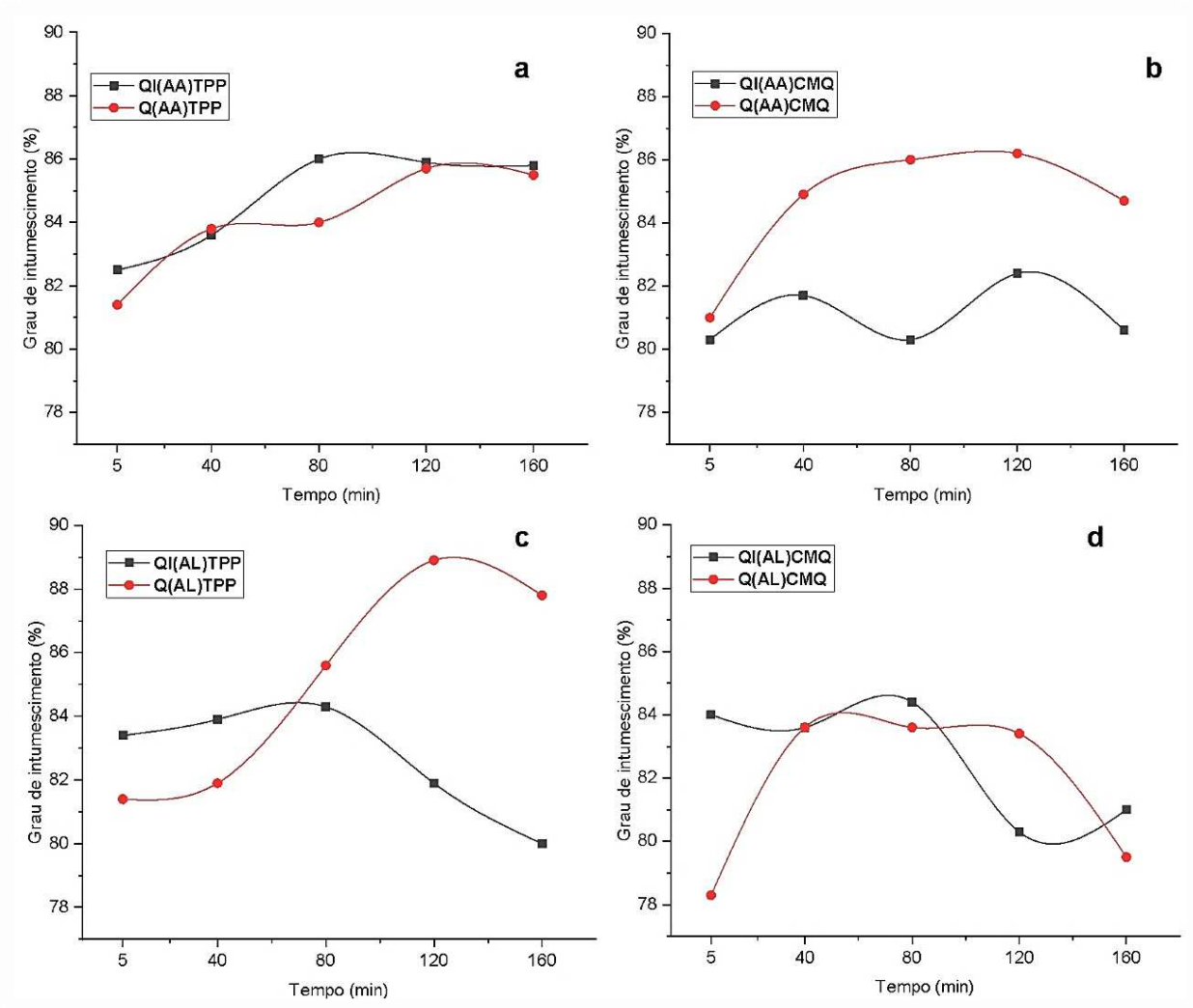


Figura 35- Gráfico do grau de intumescimento das esferas de quitosana e quitosana/insulina de acordo com a presença de insulina. Em (a) esferas preparadas com QI(AA)TPP e Q(AA)TPP; (b) esferas preparadas com QI(AA)CMQ e Q(AA)CM; (c) esferas preparadas com QI(AL)TPP e Q(AL)TPP; e (d) esferas preparadas com QI(AL)CMQ e Q(AL)CM.

Os gráficos do intumescimento das esferas de acordo com a presença de insulina estão dispostos na Figura 35. Nela, observa-se que o comportamento do intumescimento das esferas com e sem insulina são diferentes para todos os gráficos analisados. Todas as amostras produzidas apenas com quitosana apresentam uma redução no intumescimento em 160 minutos, que pode estar relacionada a hidrossolubilidade destas amostras (Tabela 5) pois, a solubilidade das esferas de quitosana dependem da penetração da água na matriz polimérica e de seu intumescimento, seguido da distribuição de hidrogênios e das interações de Vander Waals entre as cadeias poliméricas (Yoshida *et al.*, 2014).

As esferas de quitosana/insulina preparadas com CMQ (Figura 35b e d) demonstraram um intumescimento oscilante e este comportamento pode ocorrer devido a interação da insulina com a quitosana, pela porosidade das amostras e pela presença desse hidrogel no interior das esferas visto que o equilíbrio de intumescimento dos hidrogéis é direcionado principalmente pelo equilíbrio entre a pressão osmótica interna na rede polimérica e a repulsão eletrostática interna da estrutura da rede (Spinks *et al.*, 2006). Adicionalmente a rede polimérica formada pela adição de insulina na quitosana nas esferas QI(AA)CMQ e QI(AL)CMQ e/ou a liberação do fármaco podem resultar na oscilação do intumescimento, já que a estrutura da rede polimérica influencia diretamente a taxa de intumescimento, que é o fator modulante da liberação do fármaco a partir da matriz (Berger *et al.*, 2004; Yodkhum e Phaechamud, 2014).

O intumescimento das esferas de quitosana/insulina processadas com TPP (Figura 35a e c) apresenta-se em equilíbrio. QI(AA)TPP (Figura 35a) apresentou um intumescimento inicial mais lento, 80 minutos, e manteve o intumescimento constante até 160 minutos; QI(AL)TPP demonstrou um intumescimento inicial rápido, 5 minutos, que se manteve até 80 minutos, em seguida ocorreu uma queda no intumescimento. Este evento pode ter ocorrido devido a liberação de fármaco pelo sistema ou pela diferença na reticulação das amostras pois, o agente de reticulação e sua hidrofilicidade, assim como a densidade de reticulação são fatores determinantes no comportamento do intumescimento, bem como a estabilidade do hidrogel e o intumescimento é um modulador da liberação do fármaco a partir da matriz (Pierog *et al.*, 2009; Yodkhum e Phaechamud, 2014).

4.8. Teor de Umidade e Hidrossolubilidade

As análises de umidade e Hidrossolubilisade foram realizadas com as esferas de quitosana e quitosana/insulina, preparadas com TPP ou CMQ como banho coagulante a concentração de insulina foi a mesma utilizada para as membranas (0,2 mg/mL). Os resultados destas análises estão apresentados na Tabela 6 e serão apreciados considerando a solução ácida (ácido acético ou ácido lático) utilizada para dissolução da quitosana, o banho coagulante (TPP ou CMQ) e presença de insulina.

Tabela 6- Teor de umidade e hidrossolubilidade das esferas de quitosana e quitosana/insulina.

Esferas	Teor de Umidade (%)	Hidrossolubilidade (%)
Q(AA)TPP	6,73	33,63
QI(AA)TPP	14,19	33,09
Q(AA)CMQ	3,89	11,00
QI(AA)CMQ	5,43	5,22
Q(AL)TPP	7,31	47,86
QI(AL)TPP	11,09	42,59
Q(AL)CMQ	8,25	19,24
QI(AL)CMQ	9,04	23,37

Considerando a solução ácida utilizada é possível observar que as amostras preparadas com ácido lático são mais úmidas e hidrossolúveis quando comparadas as preparadas com ácido acético. Essa maior afinidade e retenção da água pode ser explicada devido a presença de uma hidroxila a mais na composição do ácido lático, o que possibilita a ocorrência de um maior número de pontes de hidrogênio e, por conseguinte, uma maior retenção da água nas esferas e caráter hidrofílico (Nogueira Campos *et al.*, 2005). Além deste fato, o ácido lático possui cadeia carbônica maior que o ácido acético, o que possibilita um maior afastamento das cadeias poliméricas da quitosana o que pode auxiliar na retenção e afinidade com a água (Callister Jr, 2008). Zhong *et al.* (2011) encontraram resultado semelhante em membranas de quitosana e amido de Kudzu(*Pueraria lobata*) solubilizadas em diferentes ácidos, as membranas solubilizadas em ácido acético apresentaram menor solubilidade quando comparadas as obtidas com ácido lático.

Comparando as amostras preparadas com TPP e CMQ (Tabela 6) pode-se observar que as amostras preparadas com TPP como solução coagulante

apresentaram-se mais úmidas e com maior hidrossolubilidade quando comparadas as produzidas com CMQ como banho coagulante. O TPP promove uma reticulação ionotrópica na cadeia de quitosana, podendo formar ligações intermoleculares ou intramoleculares, formando micro e nanogeis em um ambiente aquoso, o que pode aumentar sua hidrossolubilidade e umidade das amostras obtidas com TPP (Mi *et al.*, 1999; Huang e Lapitsky, 2012).

Com relação a incorporação de insulina na quitosana, todas as amostras contendo insulina (QI(AA)TTP, QI(AA)CMQ, QI(AL)TPP e QI(AL)CMQ) mostraram um maior teor de umidade que as preparadas apenas com quitosana (Tabela 6). A presença de insulina interagindo com a quitosana pode ter aumentado a quantidade de água ligada as esferas devido a um maior número de ânions presentes nos aminoácidos que compõem a insulina, aumentando, desta forma, a hidrofilicidade e proporcionado uma maior umidade das amostras contendo insulina. Já a análise de hidrossolubilidade mostrou que Q(AA)TPP, Q(AA)CMQ e Q(AL)TPP foram mais hidrossolúveis que suas respectivas amostras contendo insulina. Como as soluções de quitosana utilizadas não foram completamente neutralizadas (pH ≈ 6,3) os hidrogéis formados no interior das esferas continua com o caráter ácido sendo solúveis em água; o ácido remanescente pode ter solubilizado as amostras compostas por quitosana tornando essas amostras mais solúveis quando comparadas as compostas por quitosana/insulina. Semelhantes resultados foram observados por Nogueira Campos *et al.* (2005) ao preparar membranas de quitosana diluídas em ácido acético.

Ademais, observa-se na Tabela 6 que QI(AA)TPP e QI(AL)TPP apresentaram um maior teor de umidade; entre as esferas de quitosana/insulina e QI(AL)TPP foi a que apresentou maior hidrosolubilidade. Assim, estes resultados associados aos resultados obtidos pela MO (Figura 30) e pelo intumescimento (Figura 32) mostram que QI(AL)TPP tem o maior potencial de fornecer uma liberação controlada de insulina que as demais esferas. Desta forma, os ensaios de capacidade de carga, eficácia de encapsulamento e liberação controlada *in vitro* foram realizados apenas com QI(AL)TPP.

4.9. Validação do Método Analítico de Detecção da Insulina por Espectroscopia na Região do Ultra violeta (UV-vis)

Para demonstrar a eficácia do método analítico utilizado, espectroscopia na região do ultra violeta (UV-vis), foram analisados os parâmetros estabelecidos pela Agência Nacional de vigilância Sanitária (ANVISA) na RE nº 899/2003 (Sanitária, 2003) e RDC 166/2017 (Anvisa, 2017). Os parâmetros avaliados forram: linearidade, exatidão, precisão (intermediária e repetibilidade), robustez, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ). A avaliação destes parâmetros é fundamental para comprovar a validade do método analítico para a identificação e quantificação da insulina.

4.9.1. Determinação do Comprimento de Onda de Detecção

Na determinação do comprimento de onda de detecção foram realizadas varreduras através do UV-vis de soluções de insulina diluídas em tampão fosfato salina (PBS) com pH de 7,4 em diferentes concentrações. O maior comprimento de onda do fármaco foi verificado em 202 nm (Figura 36), desta forma, as demais análises foram realizadas utilizando este comprimento de onda.

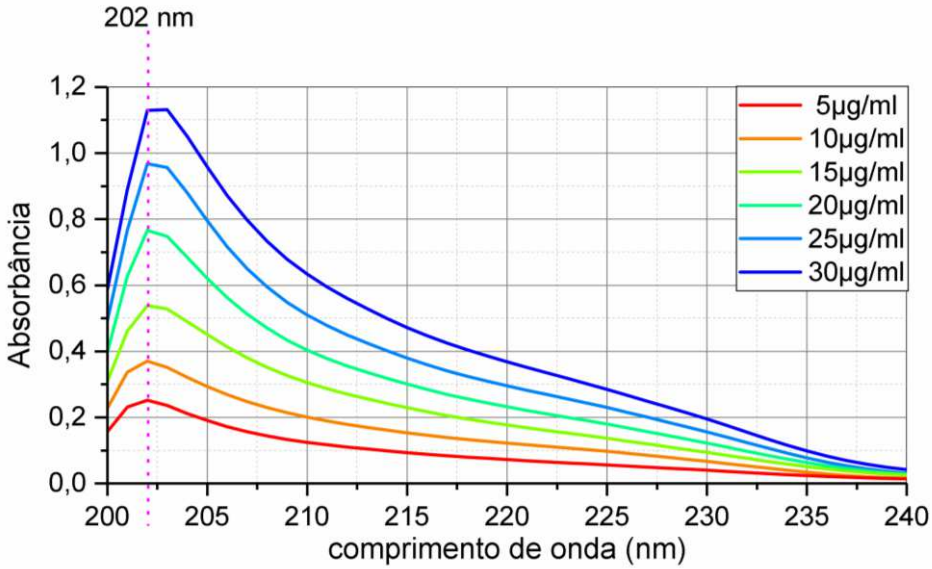


Figura 36- Comprimento de onda máximo da insulina em PBS (pH 7,4).

4.9.2. Linearidade

Segundo a RE n° 899/2003 (Sanitária, 2003) e RDC 166/2017 (Anvisa, 2017), linearidade é a capacidade que o estudo do método tem de revelar que os resultados obtidos por ele são diretamente proporcionais as concentrações do fármaco na amostra analisada dentro de um intervalo específico. A linearidade do método analítico utilizado (UV-vis) está apresentada na Figura 37, para sua obtenção foi utilizada como base a curva de calibração da insulina em PBS.

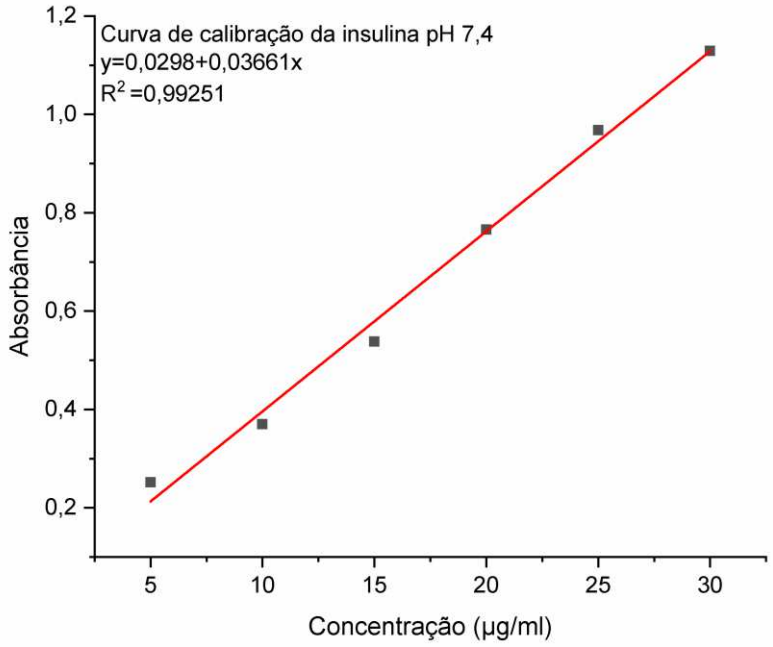


Figura 37- Representação gráfica da linearidade da curva de calibração da insulina em PBS (pH 7,4) obtida por UV-vis (λ= 202 nm).

Na Figura 37 observa-se um comportamento linear dos dados obtidos, que é confirmado pelo coeficiente de regressão calculado. A equação da reta encontrada através do método dos mínimos quadrados, Abs=0,0298+0,03661C, apresentou um coeficiente de regressão (*r*) de 0,99251. De acordo com a RE n° 899/2003 (Sanitária, 2003) e RDC 166/2017 (Anvisa, 2017), o valor mínimo aceitável de *r* deve ser de 0,99, portanto o resultado obtido está de acordo com os critérios estabelecidos pela ANVISA.

4.9.3. Exatidão

Um método analítico é considerado com exatidão adequada quando os resultados obtidos pelo método são próximos dos valores verdadeiros. Segundo as especificações o intervalo aceitável varia de 80% a 120% da concentração teórica testada (Sanitária, 2003). Para o método utilizado neste trabalho (UV-vis) obteve-se resultados de exatidão entre 100% e 118% e o coeficiente de variação foi menor que 5% (Tabela 7), estando de acordo com os padrões especificados pela ANVISA. Assim, o método utilizado é considerado exato para as concentrações analisadas (Tabela 7).

Tabela 7 - Valores da exatidão em quatro níveis de concentração de insulina.

Concentração Teórica (µg/ml)	Concentração Obtida (µg/ml)	Coeficiente de Variação (%)	Exatidão (%)
5	5,88	0,993	117,6
10	11,00	1,164	110,0
20	20,10	0,200	100,5
30	30,12	0,271	100,3

4.9.4. Precisão

A precisão avalia a regularidade da execução dos resultados obtidos por um método analítico, podendo ser avaliada em três níveis: repetibilidade (precisão intra-corrida), avalia a concordância dos resultados obtidos por um mesmo analista utilizando o mesmo equipamento em um curto período de tempo; precisão intermediária (precisão inter-corrida), considera os resultados obtidos por um mesmo equipamento, porém com analistas diferentes em dias diferentes; e reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial), aprecia os resultados obtidos em laboratórios diferentes, geralmente em estudos colaborativos afim de padronizar uma metodologia analítica (Sanitária, 2003; Anvisa, 2017).

Neste trabalho avaliamos apenas as repetibilidade e a precisão intermediária. A repetibilidade foi avaliada considerando três concentrações diferentes: baixa concentração (5 µg/mL), concentração intermediária (20 µg/mL) e alta concentração (30 µg/mL); cada varredura foi realizada em triplicata. Para determinação da precisão intermediária foi considerada a penas a leitura de maior concentração (30 µg/mL), que foi realizada por dois analistas em dias diferentes também com leituras em triplicata.

Os resultados da repetibilidade e da precisão intermediária podem ser observados na Tabela 8.

De acordo com a RE n° 899/2003 (Sanitária, 2003) e RDC 166/2017 (Anvisa, 2017) o coeficiente de variação ou desvio padrão Relativo deve ser inferior a 5%. Na Tabela 8 podemos observar que todas as concentrações apresentaram coeficiente de variação menor que 5%, o que certifica a precisão do método e demonstra que o mesmo não sofre influência da mudança de dia ou do analista.

Tabela 8 – Resultados da precisão do método analítico utilizado.

Precisão	Analista	Concentração Teórica (µg/ml)	Média da Concentração Real (µg/ml)	Coeficiente de variação (%)	Recuperação (%)
Repetibilidade (Intra-corrida)	**Analista *A***	5	6,6	0,357	132
		20	20,1	0,536	100,5
		30	29,7	1,050	99
Intermediária (Inter-corrida)	**Analista *A* (Dia1)**	30	29,6	1,305	98,6
	Analista *A* (Dia2)	30	29,8	1,305	99,3
	Analista *B* (Dia1)	30	30,6	1,305	102
	Analista *B* (Dia2)	30	29,6	1,305	98,6

4.9.5. Robustez

A robustez é definida como indicação da capacidade de um método analítico em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos (Brasil, 2003(Anvisa, 2017)). Na avaliação da robustez do método analítico foram realizadas variações da temperatura, para a temperatura ambiente (25°C) e do tempo de leitura após o preparo das amostras (24 horas). Os resultados da robustez do método estão apresentados na Tabela 9. Observou-se que o coeficiente de variação obtido foi inferior a 5%, conforme preconizam as resoluções da ANVISA (Sanitária, 2003; Anvisa, 2017), sendo, portanto, o método considerado robusto.

Tabela 9 - Dados da Robustez do método analítico.

Temperatura (°C)	Tempo (horas)	Concentração teórica (µg/ml)	Média da concentração (µg/ml)	Coeficiente de variação (%)	Recuperação (%)
25	**24**	**30**	29,52	0,016	98,4
		20	21,05	0,053	105,2

4.9.6. Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Limite de detecção, segundo as resoluções da ANVISA, é a menor concentração do analito em uma amostra que pode ser diferenciada confiavelmente do ruido de fundo pelo processo analítico. Assim, o limite de detecção representa a mais baixa concentração do analito em uma amostra que pode ser detectada de forma confiável. O limite de quantificação consiste na menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis estabelecidas pelo método analítico (Sanitária, 2003; Anvisa, 2017). De acordo com as condições experimentais estabelecidas os limites de detecção e de quantificação encontrados foram, respectivamente, iguais a 2,9 µg/ml e 9,0 µg/ml.

4.9.7. Preparação da Curva de Calibração da Insulina

Antes de realizar o ensaio de liberação *in vitro* das esferas de quitosana insulina, a curva de calibração do fármaco foi construída. Utilizando PBS (pH 7,4) como diluente para insulina preparou-se soluções em concentrações variáveis entre 5 a 30 µg/ml, conforme descrito no item 3.3.5.1.6. Os valores das absorbâncias obtidas de acordo com as diferentes concentrações de insulina estão dispostos na Tabela 10 e curva de calibração, equação da reta e coeficiente de correlação foram reportados na Figura 35.

Tabela 10 - Absorbâncias obtidas pelo UV-vis após análise das soluções PBS-insulina.

Concentração de insulina (µg/ml)	Absorbância ± σ
5	0,252362 ± 0,000416
10	0,370436 ± 0,002654
15	0,538395 ± 0,003587
20	0,766182 ± 0,000414
25	0,968147 ± 0,004174
30	1,129784 ± 0,02163

O coeficiente de regressão calculado mostrou um comportamento linear e não houve desvio da linearidade. A avaliação do ponto de intersecção e os limites de confiança demonstram a ausência de erro sistemático na metodologia utilizada, uma vez que os limites de confiança incluem o valor zero (Tabela 11).

Tabela 11 - Análise dos dados de regressão obtidos a partir da curva de calibração da insulina por espectrofotometria de absorção no ultravioleta.

Parâmetros de Regressão	Valores
Intercepto (intervalo de confiança)	0,0298 (0,06076 a -0,00116)
Inclinação (Intervalo de confiança)	0,03661 (0,0382 a 0,03502)
R^2	0,99064

4.10. Capacidade de Carga e Eficiência de Encapsulamento

O ensaio de eficiência de encapsulamento é uma característica importante para sistemas de liberação porque a quantidade de fármaco encapsulado estabelece o desempenho do sistema de liberação influenciando a taxa e extensão da liberação do fármaco. A eficiência do encapsulamento depende da capacidade de carga, pois determina a quantidade de fármaco incorporada ao sistema de liberação (De Villiers *et al.*, 2008).

A capacidade de carga e eficácia de encapsulamento da insulina nas esferas QI(AL)TPP foram obtidas pela pesagem das esferas e pela análise da concentração obtida após as esferas serem colocadas em contato com PBS por 15 minutos (Jose *et al.*, 2013), como descrito no item 3.3.6. Os resultados da capacidade de carga e eficiência de encapsulamento obtidas estão apresentadas na Tabela 12.

Acredita-se que a associação entre quitosana e insulina foi mediada por interações iônicas entre os grupos ácidos da insulina e os grupos amino da quitosana. Desta forma, a associação entre quitosana e insulina pode ter influenciado na capacidade de carga e na eficiência de encapsulamento das esferas QI(AL)TPP.

Tabela 12 - Valores de capacidade de carga e eficácia de encapsulamento das esferas QI(AL)TPP.

Ensaio	**Valores**
Capacidade de carga	3,369 % (± 0,625 %)
Eficácia de encapsulamento	74,36 % (± 1,01 %)

A capacidade de carga encontrada neste estudo (Tabela 12) é considerada baixa, porém estudos que produziram sistemas de liberação com quitosana encontraram resultados semelhantes ou inferiores (Li *et al.*, 2006; Tahtat *et al.*, 2013; Omid *et al.*, 2014; Dai *et al.*, 2018). Li *et al.* (2006) obtiveram uma capacidade de carga de 0,87% a 3,10% e eficácia de encapsulamento de 62,04% a 72,57% ao avaliar suas nanopartículas sensíveis ao pH, onde utilizaram quitosana como carga positiva e um copolímero de poli (metilmetacrilato/ácido metilmetacrílico) como carga negativa, inferiores às encontradas no presente estudo. Tahtat *et al.* (2013) produziram pérolas de alginato/quitosana e observaram que a capacidade carga do sistema aumentou com o aumento da porcentagem de quitosana no sistema; porém a maior capacidade de carga que foi alcançada foi de 2,16%. Outro sistema que obteve uma baixa capacidade de carga (2,296% ± 0,120%) foi o produzido por microcápsulas embutidas em micropartículas sintetizadas a partir de alginato de cálcio e quitosana (Dai *et al.*, 2018).

Alguns estudos observaram uma maior capacidade de carga e eficácia de encapsulamento semelhantes as aqui encontradas (Wu *et al.*, 2011; Al-Qadi *et al.*, 2012; Balabushevich *et al.*, 2013; Ji *et al.*, 2018; Yin *et al.*, 2019). Curiosamente, utilizando quitosana, TPP e insulina Wu *et al.* (2011) e Al-Qadi *et al.* (2012) desenvolveram micropartícula e nanopartículas, respectivamente, como sistema de liberação de insulina. Tanto as micropartículas quanto as nanopartículas de quitosana/TPP/insulina apresentaram capacidade de carga (9,52% e 31%, respectivamente) maior que a deste estudo. As nanopartículas demonstraram uma eficácia de encapsulamento (75%) semelhante as do presente estudo, enquanto as

micropartículas mostraram resultados de eficácia de encapsulamento (48,28%) inferiores.

Wu *et al.* (2011), Al-Qadi *et al.* (2012) e Ji *et al.* (2018) observaram que a quantidade de insulina incorporada no sistema influenciou os resultados de capacidade de carga e eficácia de encapsulamento. Neste estudo a concentração de insulina nas esferas QI(AL)TPP foi mantida constante, portanto, sugere-se que uma maior quantidade de insulina incorporada pode aumentar os resultados da capacidade de carga e de eficácia de encapsulamento.

Micropartículas de dextrana sulfato de sódio, quitosana, proteínas (mucina, tripsina e α-quimiotripsina) e insulina foram produzidas por centrifugação e apresentaram uma elevada capacidade de carga (≈ 55%) e uma eficiência de encapsulamento entre 62% e 65% (Balabushevich *et al.*, 2013). Insulina incorporada a nanopartículas de carboximetil amilose de cadeia curta e quitosana demonstraram uma capacidade de carga e eficácia de encapsulamento (3,85% a 6,55% e 35,2% a 85,2%, respectivamente) variáveis com a concentração de insulina incorporada (Ji *et al.*, 2018). Yin *et al.* (2019), projetaram *scaffolds* através da integração de hidrogéis de quitosana com microesferas responsivas à glicose carregadas de insulina para agir como um pâncreas artificial sintético. O sistema demonstrou uma capacidade de carga de 10,0% e uma eficácia de encapsulamento de 78,0%. Resultados de encapsulamento semelhantes foram encontrados para as esferas QI(AL)TPP.

4.11. Estudo de Liberação *in vitro*

A espectroscopia de absorção no ultra violeta é uma das metodologias utilizadas na quantificação de fármacos. Este método é considerado simples, rápido, econômico e permite a determinação do fármaco com confiabilidade suficiente (Mendez *et al.*, 2003). Neste estudo a validação do método demonstrou que a espectroscopia de absorção no ultra violeta (UV-vis) é um método preciso, robusto, exato e sensível para a detecção e quantificação da insulina.

Sabendo-se que a insulina um hormônio peptídico hidrofílico, é sensível à desnaturação quando armazenada em temperatura fisiológica por um longo período (Sharma *et al.*, 2020), a estabilidade da insulina nas condições do ensaio foi avaliada submetendo uma concentração conhecida de insulina em PBS (30 µg/ml) as mesmas condições de temperatura (37°C ± 0,5°C), agitação (100 rpm), tempo de exposição

(48 horas) e de leitura utilizadas no ensaio de liberação. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 38.

Observa-se, na Figura 38a, que a concentração da solução de insulina em PBS inicialmente (tempo de 0,25h) apresentou a concentração esperada (30 µg/ml); porém, no período de 0,5h ocorreu um aumento na concentração da solução (Figura 38a e b), no entanto, os limites estabelecidos pela ANVISA nas RE 899/2003 e RDC 166/2017 para exatidão do método não foram ultrapassados (Sanitária, 2003; Anvisa, 2017). Nos períodos de 0,75h a 24h a concentração da solução manteve-se constante, entre 29 µg/ml e 30 µg/ml (Figura 38a). Com 48h a concentração da solução reduziu para 18 µg/ml (Figura 38a e c), demonstrando uma degradação da insulina na solução de aproximadamente 40%.

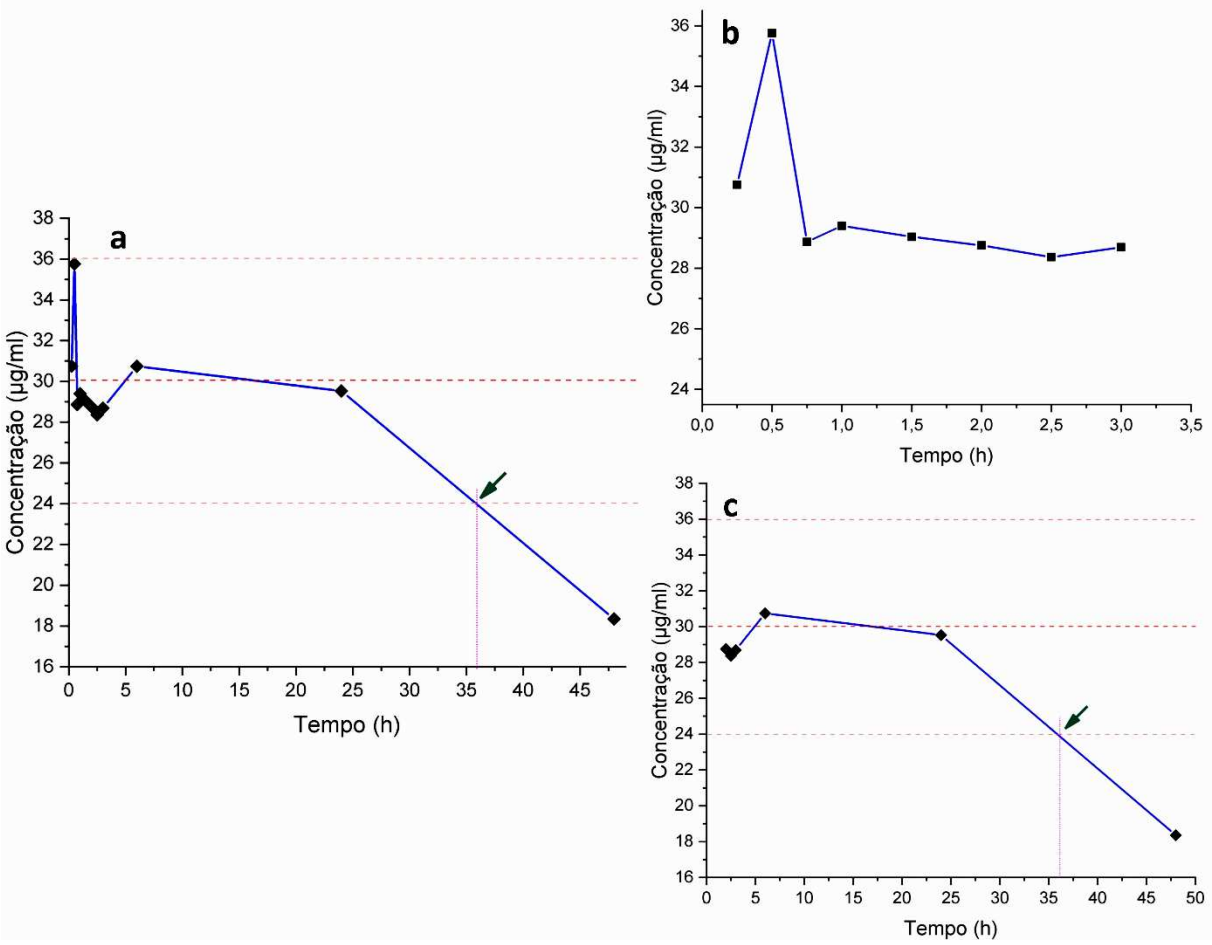


Figura 38. Gráfico da estabilidade da insulina durante o ensaio de liberação. (a) estabilidade de 0,25h a 48h; (b) ampliação do gráfico de estabilidade de 0,25h a 3h; e (c) ampliação do gráfico de estabilidade de 2h a 48h.

Pela análise do gráfico (Figura 38) é possível inferir que a insulina permanece com leituras aceitáveis, de acordo com os parâmetros de exatidão estabelecidos pela ANVISA nas resoluções RE 899/2003 e RDC 166/2017, até 36h. A seta nas Figura 38a e c mostram o limite mínimo aceitável da concentração da solução de insulina em PBS (Sanitária, 2003; Anvisa, 2017).

4.11.1. Perfil de Liberação

O comportamento da liberação *in vitro* da insulina pelas esferas QI(AL)TPP foi investigado por UV-vis. O meio utilizado no ensaio de liberação foi o PBS com pH de 7,4, que foi colocado a uma temperatura de 37°C, sob agitação de 100 rpm e um período de 48h (Figura 39).

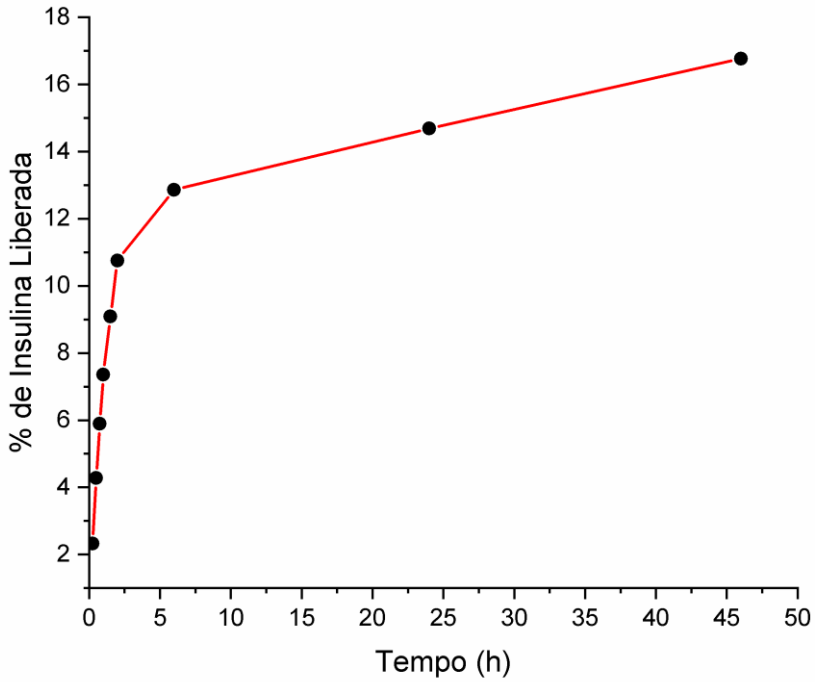


Figura 39- Liberação percentual cumulativa da insulina pelas esferas QI(AL)TPP em PBS (pH 7,4) a 37°C sob agitação de 100 rpm.

De acordo com o perfil de liberação (Figura 39), as esferas QI(AL)TPP apresentaram uma liberação sustentada durante todo o período do estudo (48h). A taxa de liberação do fármaco foi constante nas primeiras horas e 10,7% da insulina foi liberada após 2h. Até o final do ensaio (48h) a liberação da insulina manteve-se

crescente, porém, apenas 16,8% da insulina foi liberada. Também é possível observar um comportamento bifásico da liberação do fármaco, com uma liberação inicial acelerada (4,27% em 0,5h), conhecida como efeito *burst*, seguida de uma liberação sustentada. Acredita-se que esta liberação *burst* pode estar associada a liberação do fármaco fracamente ligado a área da superfície da esfera, enquanto o efeito prolongado da liberação está relacionado ao fármaco que permanece aprisionado na matriz (Huang e Brazel, 2001).

Apesar da baixa taxa de liberação apresentada por QI(AL)TPP resultados semelhantes foram encontrados na literatura. O sistema de microcápsulas embutidas em micropartículas sintetizadas a partir de alginato de cálcio e quitosana produzidos por Dai *et al.* (2018), demonstrou uma liberação cumulativa de insulina em 24 h de 28,875% (± 8,310%) quando as micropartículas foram carreadas no espaço interno das microcápsulas e de 11,437% (± 3,816%) quando as micropartículas foram carreadas no espaço exterior. Ghasemi Tahrir *et al.* (2014) obtiveram uma liberação cumulativa variada em hidrogéis de quitosana /β-glicerolfosfato em PBS (pH 7,4). Nas amostras onde houve uma maior incorporação de insulina (1 mg/mL) a liberação cumulativa variou entre 23,6% a 19,1%. Outro estudo produziu nanopartículas de quitosana/alginato e a liberação cumulativa em meio fisiológico com pH 1,2, 6,8 e 7,4 foi avaliada. Os resultados mostraram uma liberação cumulativa de 15,6% quando realizada em meio com pH 1,2, no entanto, quando a liberação foi realizada em meio com pH 7,4 a insulina cumulativa liberada foi de 97,34%, ambas após 15h de ensaio (Bhattacharyya *et al.*, 2018). Wu *et al.* (2011) produziram micropartículas de quitosana-TPP-insulina e observaram uma liberação sustentada de insulina por 24 horas com uma liberação cumulativa de insulina em PBS (pH 7,4) de aproximadamente 60%.

O perfil de liberação das esferas QI(AL)TPP pode ter sofrido influência de alguns fatores relacionados ao sistema como: propriedades do fármaco e sua interação com a matriz; capacidade de carga e eficácia de encapsulamento do sistema; geometria do dispositivo; condições de processamento; característica do material polimérico da matriz; morfologia, estrutura porosa e degradação do sistema (Huang e Brazel, 2001; Wu *et al.*, 2011; Yodkhum e Phaechamud, 2014).

As formas como a interação da insulina com a quitosana solubilizada em ácido lático sugerida neste trabalho após as análises de FTIR são capazes de facilitar o entendimento do baixo percentual de insulina liberada. Sugere-se que a interação

quitosana - ácido lático -insulina ocorra por interação iônica entre os grupos ácidos da insulina e os grupos hidroxila da quitosana. Porém o ácido lático possui dois grupos hidroxila o que possibilita a interação do ácido com a quitosana e o fármaco simultaneamente, fazendo com que o mesmo fique mais fortemente ligado ao sistema QI(AL)TPP. Ademais, o ácido lático possui uma cadeia carbônica maior que a do ácido acético, geralmente utilizado para solubilizar a quitosana, o que possibilita um maior afastamento das cadeias poliméricas e, assim, as cadeias de insulina podem ter se alojado no espaço entre as cadeias poliméricas da quitosana promovendo, assim, uma retenção física do fármaco pela matriz. Desta forma a insulina ficaria retida nas camadas mais internas do sistema QI(AL)TPP e só seria totalmente liberada com a degradação das esferas. Porém, o ensaio de liberação foi conduzido em meio fisiológico neutro (PBS com pH 7,4) no qual a matriz de quitosana não é solúvel, o que pode ser um provável fator para a baixa taxa de liberação encontrada neste estudo (Boonsongrit *et al.*, 2006).

Sabe-se que a porosidade do sistema influencia a liberação do fármaco (Moura, 2012; Nicoletti e Frasson, 2013; Tomaz *et al.*, 2018). Neste trabalho a esfera com menor porosidade foi a escolhida como potencial sistema de liberação controlada de insulina (QI(AL)TPP), no entanto, os poros de QI(AL)TPP podem ser visualizados pela microscopia óptica (MO) em um aumento de 100X (Figura 32). Esta amostra também mostrou uma pequena variação no grau de intumescimento (Figura 35), entre 84% a 80% em um período de 2,5h. Mesmo com uma porosidade visível no MO e um grau de intumescimento pouco variável as esferas QI(AL)TPP apresentaram uma liberação cumulativa percentual baixa (16,8%). Este efeito pode ter ocorrido pelo tempo de exposição e quantidade de TPP utilizados na produção das esferas, pois em estudo realizado com membranas de quitosana carregadas com 1,4-naftoquinona e reticuladas com TPP mostrou que a quantidade de TPP utilizada influencia o comportamento de liberação, que diminuiu com o aumento da quantidade de TPP (Tomaz *et al.*, 2018).

As condições de processamento também podem influenciar na liberação do fármaco (Huang e Brazel, 2001). Deste modo é importante mencionar que as esferas QI(AL)TPP podem ter iniciado a liberação da insulina durante o processo de preparo das amostras, assim parte do fármaco não seria registrado pelo ensaio de liberação. Outro possível elemento influenciador da liberação do sistema é a massa molar da quitosana. Um estudo com complexos de quitosana-zinco-insulina preparados com

quitosana de diferentes tamanhos de cadeia (5, 30, 50 e 200 kDa) avaliou a influência do tamanho das cadeias de quitosana no perfil de liberação de insulina. Os resultados demonstraram que o comprimento da cadeia de quitosana afetou significativamente a taxa de liberação de insulina, onde o maior comprimento de cadeia (200 kDa) apresentou uma taxa de liberação mais rápida (40 dias) e o menor comprimento (5 kDa) apresentou uma taxa mais lenta (60 dias) (Sharma *et al.*, 2020). No presente trabalho foi utilizada quitosana com massa molar de aproximadamente 160 kDa, o que pode ter favorecido o início da liberação de insulina durante o preparo das amostras.

Além dos fatores citados anteriormente, deve-se observar que a insulina perdeu sua estabilidade nas condições do ensaio de liberação em um período aproximado de 36h (Figura 38). Assim, parte da insulina presente em solução durante a liberação pode ter sido degradada e, desta forma, não foi contabilizada na última leitura realizada. Desse modo, a liberação percentual cumulativa de insulina por QI(AL)TPP pode ter sido maior.

4.12. Cinética de Liberação

A avaliação do perfil de liberação da insulina apresentado pelas esferas QI(AL)TPP foi analisada pelos modelos matemáticos de (i) ordem zero, que define se o processo de liberação do fármaco pelo sistema é constante; (ii) primeira ordem, aquele que a taxa de liberação é diretamente proporcional a concentração do fármaco, ou seja, quanto maior for a concentração mais rápida será a liberação; (iii) Higuchi, evidencia a liberação do fármaco como um processo de difusão baseado na lei de Fick, porém o modelo supõem que a concentração inicial do fármaco é maior do que a solubilidade da matriz, a difusividade da droga é constante e o intumescimento do sistema polímero é insignificante; (iv) Korsmeyer Peppas, o modelo é usado para identificar se a dissolução segue a forma de dosagem convencional, de dosagem dispersível ou de liberação imediata, por tanto, este modelo determina se a mudança na área de superfície durante o processo de dissolução tem um efeito significativo na liberação; e (v) Peppas-Sahlin, avalia a cinética de liberação de fármacos que tem matriz polimérica hidrofílica sendo aplicável para diferentes formas geométricas (Jain e Jain, 2016; Gouda *et al.*, 2017; Unagolla e Jayasuriya, 2018; Dantas *et al.*, 2019; Kanha *et al.*, 2021).

Na escolha do modelo matemático mais adequado para o estudo do mecanismo de liberação da insulina pelas esferas QI(AL)TPP, utilizou-se os melhores ajustes dos resultados experimentais com base nos valores estatisticamente mais altos do coeficiente de determinação ajustado (r^2), o valor mais baixo do Critério de Informação de Akaike (AIC), e o maior valor do critério de seleção de modelo (MSC) (Zhang *et al.*, 2010). A Tabela 13 apresenta o comportamento de liberação *in vitro* da insulina pelas esferas QI(AL)TPP de acordo com os modelos estudados através da avaliação dos valores obtidos para r^2, AIC e MSC.

Tabela 13 – Parâmetros da cinética de liberação da insulina liberada pelas esferas QI(AL)TPP.

Modelo	**Ordem zero**	**Primeira ordem**	**Higuchi**	**Korsmeyer Peppas**	**Peppas-Sahlin**
r^2	-1,165	-1,089	0,195	0,814	0,922
AIC	56,128	55,808	47,221	38,002	30,329
MSC	-0,995	-0,959	-0,005	1,019	1,882

Pode-se observar que a liberação da insulina pelas esferas QI(AL)TPP pode ser melhor descrita usando o modelo de Peppas-Sahlin, o qual foi obtido o maior valor de r^2 associado a valores de AIC autos e baixos valores de MSC (Tabela 13). O modelo cinético encontrado indica que o mecanismo de liberação é dependente dos efeitos da difusão Fickiana e relaxamento das cadeias poliméricas ou intumescimento, ou seja, um mecanismo anômalo. Desta forma, o comportamento de liberação do fármaco pode ser considerado como a superposição da difusão Fickiana absoluta, na qual a liberação do fármaco é controlada por difusão, e a de ordem zero ou caso II, no qual a liberação do fármaco é controlada pelo relaxamento das cadeias poliméricas ou intumescimento (Anirudhan e Parvathy, 2018; Dantas *et al.*, 2019).

5. CONCLUSÃO

Foi possível produzir membranas de quitosana pelos métodos de processamento propostos (congelamento/liofilização e evaporação do solvente). O tipo de processamento e o uso ou não de neutralização afetaram as propriedades de interação entre quitosana/insulina, que só foram obtidas para as membranas preparadas por evaporação do solvente com neutralização da solução de quitosana. No entanto, as membranas preparadas com ácido acético e ácido lático só puderam ser removidas em pequenos pedaços irregulares impossibilitando a realização de outros ensaios. Por estas razões, as soluções de quitosana neutralizadas foram utilizadas para produzir esferas de quitosana e quitosana/insulina pelo método de gelificação ionotrópica utilizando CMQ ou TPP como solução gelificante. Todas as esferas apresentaram coloração branca e formato arredondado, porém as preparadas com TPP exibiram contornos mais uniformes, arredondados e menor porosidade, principalmente aquelas preparadas com solução de ácido lático. Foi observada interação entre quitosana e insulina em todas as condições de preparo das esferas. Entretanto, reticulação efetiva só foi verificada para as esferas preparadas com TPP. As análises de FTIR, MO, intumescimento, teor de umidade e hidrosolubilidade mostraram que a esfera com maior potencial para uso como sistema de liberação controlada de insulina foi a preparada com ácido lático e reticulada com TPP (QI(AL)TPP). Com estas esferas foram realizados os ensaios de capacidade de carga, eficácia de encapsulamento, liberação *in vitro* e cinética de liberação pelo método da UV-vis, que se mostrou exato, preciso e robusto na detecção e quantificação da insulina. A insulina permaneceu estável por 36h, conforme ensaios *in vitro*. As esferas QI(AL)TPP apresentaram uma boa eficácia de encapsulamento (74,36%), porém a capacidade de carga obtida foi baixa (3,369%). Elas foram capazes de liberar insulina por um período de 48h, no entanto a liberação percentual cumulativa apresentada pelo sistema foi considerada baixa (de 16,8%). O modelo matemático mais adequado para o estudo do mecanismo de liberação da insulina foi o de Peppas-Sahlin, evidenciando um mecanismo anômalo de liberação. Esses resultados demonstram que, mesmo sendo necessários ajustes no processamento da amostra visando aumentar o teor de insulina liberado, esferas de quitosana preparadas com ácido lático e reticuladas com TPP têm potencial para tornar-se um sistema de liberação de insulina a ser administrado por uma rota não convencional.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a liberação da insulina das esferas produzidas com ácido acético e reticuladas com TPP;
- Reavaliar o processo de produção das esferas, a fim de melhorar a capacidade de carga, eficácia de encapsulamento e liberação cumulativa;
- Avaliação do potencial tóxico das esferas (citotoxicidade, multagenicidade, genotoxicicdade, DL50 e CL50);
- Análise da atividade da insulina nas esferas (confirmação da atividade da insulina após liberação através de ensaios enzimáticos e avaliar o comportamento da insulina liberada *in vivo* – ensaio *in vivo*).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAD, S.; ZHANG, Z.; WADDAD, A. Y.; MUNYENDO, W. L. L.; LV, H.; ZHOU, J. Chitosan-Modified Cationic Amino Acid Nanoparticles as a Novel Oral Delivery System for Insulin. **Journal of Biomedical Nanotechnology,** v. 11, n. 3, p. 486-499, 2015.

ABREU, F. R. D.; CAMPANA-FILHO, S. P. Preparation and characterization of carboxymethylchitosan. **Polímeros,** v. 15, n. 2, p. 79-83, 2005.

AL-KURDI, Z. I.; CHOWDHRY, B. Z.; LEHARNE, S. A.; AL OMARI, M. M.; BADWAN, A. A. Low molecular weight chitosan-insulin polyelectrolyte complex: characterization and stability studies. **Marine Drugs,** v. 13, n. 4, p. 1765-84, 2015.

AL-QADI, S.; GRENHA, A.; CARRIÓN-RECIO, D.; SEIJO, B.; REMUÑÁN-LÓPEZ, C. Microencapsulated chitosan nanoparticles for pulmonary protein delivery: in vivo evaluation of insulin-loaded formulations. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society,** v. 157, n. 3, p. 383-90, 2012.

AL-REMAWI, M.; ELSAYED, A.; MAGHRABI, I.; HAMAIDI, M.; JABER, N. Chitosan/lecithin liposomal nanovesicles as an oral insulin delivery system. **Pharmaceutical Development and Technology,** v. 22, n. 3, p. 390-398, 2017.

AL RUBEAAN, K.; RAFIULLAH, M.; JAYAVANTH, S. Oral insulin delivery systems using chitosan-based formulation: a review. **Expert Opinion Drug Delivery,** v. 13, n. 2, p. 223-37, 2016.

ALLEN JR, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos-9**. Artmed Editora, 2013. ISBN 8565852857.

American Diabetes Association. **Diabetes care: Standards of medical care in diabetes—2017**

2017. ISSN 1935-5548. Disponível em: < http://care.diabetesjournals.org/content/diacare/suppl/2016/12/15/40.Supplement_1.DC1/DC_40_S1_final.pdf >. Acesso em: 12/12/2017.

ANIRUDHAN, T. S.; PARVATHY, J. Novel thiolated chitosan-polyethyleneglycol blend/Montmorillonite composite formulations for the oral delivery of insulin. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre,** v. 16, p. 22-29, 2018.

ANVISA, A. N. D. V. S.-. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA-RDCRDC No 166, de 24 de julho de 2017**. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e da

outras providencias. SAÚDE, M. D. DOU nº141, de 25 de julho de 2017: Ministério da Saúde 2017.

ARDELEAN, E.; NICU, R.; ASANDEI, D.; BOBU, E. Carboxymethyl-chitosan as consolidation agent for old documents on paper support. **European Journal of Science and Theology,** v. 5, n. 4, p. 67-75, 2009.

ASANDEI, D.; MOISE, A.; LISĂ, G.; BOBU, E. CHARACTERISATION OF CHITOSAN MODIFIED BY CARBOXYMETHILATION.

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. Porto Alegre: Artmed, 2005.677 ISBN 85-363-0152-X.

AZEVEDO, J.; SIZILIO, R.; BRITO, M.; COSTA, A.; SERAFINI, M.; ARAÚJO, A.; SANTOS, M.; LIRA, A.; NUNES, R. Physical and chemical characterization insulin-loaded chitosan-TPP nanoparticles. **Journal of thermal analysis and calorimetry,** v. 106, n. 3, p. 685-689, 2011.

AZEVEDO, V.; CHAVES, S.; BEZERRA, D.; LIA FOOK, M.; COSTA, A. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista eletrônica de Materiais e processos,** v. 2, n. 3, p. 27-34, 2007.

BAHMAN, F.; GREISH, K.; TAURIN, S. Insulin nanoformulations for nonparenteral administration in diabetic patients. **Theory and Applications of Nonparenteral Nanomedicines**, p. 409-443, 2021.

BAI, X.; KONG, M.; XIA, G.; BI, S.; ZHOU, Z.; FENG, C.; CHENG, X.; CHEN, X. Systematic investigation of fabrication conditions of nanocarrier based on carboxymethyl chitosan for sustained release of insulin. **International Journal of Biological Macromolecules,** v. 102, p. 468-474, 2017.

BALABUSHEVICH, N. G.; PECHENKIN, M. A.; SHIBANOVA, E. D.; VOLODKIN, D. V.; MIKHALCHIK, E. V. Multifunctional polyelectrolyte microparticles for oral insulin delivery. **Macromolecular Bioscience,** v. 13, n. 10, p. 1379-1388, 2013.

BANSODE, S.; BANARJEE, S.; GAIKWAD, D.; JADHAV, S.; THORAT, R. Microencapsulation: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research,** v. 1, n. 2, p. 38-43, 2010.

BARBARI, G. R.; DORKOOSH, F. A.; AMINI, M.; SHARIFZADEH, M.; ATYABI, F.; BALALAIE, S.; TEHRANI, N. R.; TEHRANI, M. R. A novel nanoemulsion-based method to produce ultrasmall, water-dispersible nanoparticles from chitosan, surface

modified with cell-penetrating peptide for oral delivery of proteins and peptides. **International journal of nanomedicine,** v. 12, p. 3471, 2017.

BARBOSA, F. C.; SILVA, M. C. D.; SILVA, H. N. D.; ALBUQUERQUE, D.; GOMES, A. A. R.; SILVA, S. M. D. L.; FOOK, M. V. L. Progress in the Development of Chitosan Based Insulin Delivery Systems: A Systematic Literature Review. **Polymers,** v. 12, n. 11, p. 2499, 2020.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O.; PEPPAS, N.; GURNY, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,** v. 57, n. 1, p. 19-34, 2004.

BHATTACHARYYA, A.; NASIM, F.; MISHRA, R.; BHARTI, R. P.; KUNDU, P. Polyurethane-incorporated chitosan/alginate core–shell nano-particles for controlled oral insulin delivery. **Journal of Applied Polymer Science,** v. 135, n. 26, p. 46365, 2018.

BHATTARAI, N.; RAMAY, H. R.; CHOU, S.-H.; ZHANG, M. Chitosan and lactic acid-grafted chitosan nanoparticles as carriers for prolonged drug delivery. **International journal of nanomedicine,** v. 1, n. 2, p. 181, 2006.

BOATENG, J.; C MITCHELL, J.; PAWAR, H.; AYENSU, I. Functional characterisation and permeation studies of lyophilised thiolated chitosan xerogels for buccal delivery of insulin. **Protein and peptide letters,** v. 21, n. 11, p. 1163-1175, 2014.

BOATENG, J., MITCHELL, JOHN, PAWAR, HARSHAVARDHAN, AYENSU, ISAAC. Functional characterisation and permeation studies of lyophilised thiolated chitosan xerogels for buccal delivery of insulin. **Protein and peptide letters,** v. 21, n. 11, p. 1163-1175, 2014.

BOONSONGRIT, Y.; MITREVEJ, A.; MUELLER, B. W. Chitosan drug binding by ionic interaction. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,** v. 62, n. 3, p. 267-274, 2006.

BOONSONGRIT, Y.; MUELLER, B. W.; MITREVEJ, A. Characterization of drug-chitosan interaction by 1H NMR, FTIR and isothermal titration calorimetry. **Eur J Pharm Biopharm,** v. 69, n. 1, p. 388-95, 2008.

CALLISTER JR, W. D. **Ciência e engenharia de materiais: uma introdução.** .7ª. Rio de Janeiro, RJ: Livros Técnicos e Científicos Editora SA, 2008.

CAMPOS, M. G. N. **Desenvolvimento e caracterização de membranas de quitosana para recobrimento de feridas e liberação controlada de fármacos**. 2007. 130. (Doutorado). Engenharia Química, Universidade de Capmpinas, Campinas, SP.

CHEN, J.; LIU, C.; SHAN, W.; XIAO, Z.; GUO, H.; HUANG, Y. Enhanced stability of oral insulin in targeted peptide ligand trimethyl chitosan nanoparticles against trypsin. **Journal of microencapsulation,** v. 32, n. 7, p. 632-41, 2015.

CHEN, S.; GUO, F.; DENG, T.; ZHU, S.; LIU, W.; ZHONG, H.; YU, H.; LUO, R.; DENG, Z. Eudragit S100-Coated Chitosan Nanoparticles Co-loading Tat for Enhanced Oral Colon Absorption of Insulin. **American Association of Pharmaceutical Scientists,** v. 18, n. 4, p. 1277-1287, 2017.

DAI, Q.; ZHOU, X.; WU, K.; LONG, R.; WANG, S.; HUANG, H.; XIA, Y.; LIU, Y. The influence of spatial distribution on add-on therapy of designed Ca-Alg/CS MEMs system. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition,** v. 29, n. 11, p. 1319-1330, 2018.

DANTAS, L.; JUCÉLIA, M.; DOS SANTOS, F.; FERNANDA, B.; A TAVARES, A.; MACIEL, M. A.; LUCENA, B. D. M.; FOOK, L.; VINÍCIUS, M.; DE L, S. The Impact of the Ionic Cross-Linking Mode on the Physical and In Vitro Dexamethasone Release Properties of Chitosan/Hydroxyapatite Beads. **Molecules,** v. 24, n. 24, p. 4510, 2019.

DE VILLIERS, M. M.; ARAMWIT, P.; KWON, G. S. **Nanotechnology in drug delivery**. Springer Science & Business Media, 2008. ISBN 0387776680.

_____. **Nanotechnology in Drug Delivery**. Springer Science & Business Media, 2009. ISBN 987-0-387-77667-5.

DEMINA, T.; AKOPOVA, T.; VLADIMIROV, L.; ZELENETSKII, A.; MARKVICHEVA, E.; GRANDFILS, C. Polylactide-based microspheres prepared using solid-state copolymerized chitosan and D, L-lactide. **Materials Science and Engineering: C,** v. 59, p. 333-338, 2016.

DEPAN, D.; KUMAR, A. P.; SINGH, R. P. Cell proliferation and controlled drug release studies of nanohybrids based on chitosan-g-lactic acid and montmorillonite. **Acta Biomaterialia,** v. 5, n. 1, p. 93-100, 2009.

DIAB, M.; SALLAM, A.-S.; HAMDAN, I.; MANSOUR, R.; HUSSAIN, R.; SILIGARDI, G.; QINNA, N.; KHALIL, E. Characterization of Insulin Mucoadhesive Buccal Films: Spectroscopic Analysis and In Vivo Evaluation. **Symmetry,** v. 13, n. 1, p. 88, 2021.

FELINTO, M. C.; PARRA, D. F.; DA SILVA, C.; ANGERAMI, J.; OLIVEIRA, M.; LUGAO, A. The swelling behavior of chitosan hydrogels membranes obtained by UV- and γ-radiation. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms,** v. 265, n. 1, p. 418-424, 2007.

GENUTH, S. Type 1 diabetes mellitus. **ACP Medicine**, 2008. Disponível em: < http://www.medicinanet.com.br/conteudos/acp-medicine/4497/diabetesmelitotipo1.htm >. Acesso em: 18/08/2017.

GHASEMI TAHRIR, F.; GANJI, F.; MANI, A. R.; KHODAVERDI, E. In vitro and in vivo evaluation of thermosensitive chitosan hydrogel for sustained release of insulin. **Drug Deliv,** v. 23, n. 3, p. 1038-46, 2014.

GIERSZEWSKA, M.; OSTROWSKA-CZUBENKO, J. Chitosan-based membranes with different ionic crosslinking density for pharmaceutical and industrial applications. **Carbohydrate polymers,** v. 153, p. 501-511, 2016.

GONTARD, N.; DUCHEZ, C.; CUQ, J. L.; GUILBERT, S. Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapour permeability and other physical properties. **International journal of food science & technology,** v. 29, n. 1, p. 39-50, 1994.

GOUDA, R.; BAISHYA, H.; QING, Z. Application of mathematical models in drug release kinetics of carbidopa and levodopa ER tablets. **J. Dev. Drugs,** v. 6, n. 02, p. 1-8, 2017.

GUPTA, A.; DEY, B. Microencapsulation for controlled drug delivery: a comprehensive review. **Sunsari Technical College Journal,** v. 1, n. 1, p. 48-54, 2013.

HADIYA, S.; RADWAN, R.; ZAKARIA, M.; EL-SHERIF, T.; HAMAD, M. A.; ELSABAHY, M. Nanoparticles integrating natural and synthetic polymers for in vivo insulin delivery. **Pharmaceutical development and technology,** v. 26, n. 1, p. 30-40, 2021.

HE, Z.; SANTOS, J. L.; TIAN, H.; HUANG, H.; HU, Y.; LIU, L.; LEONG, K. W.; CHEN, Y.; MAO, H. Q. Scalable fabrication of size-controlled chitosan nanoparticles for oral delivery of insulin. **Biomaterials,** v. 130, p. 28-41, 2017.

HECQ, J.; SIEPMANN, F.; SIEPMANN, J.; AMIGHI, K.; GOOLE, J. Development and evaluation of chitosan and chitosan derivative nanoparticles containing insulin for oral administration. **Drug Development and Industrial Pharmacy,** v. 41, n. 12, p. 2037-44, 2015.

HOLANDA, A. D. **Membranas de quitosana para uso em sistema de liberação controlada de insulina: síntese e caracterização**. 2011. (Doutor). Engenharia de processos, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande: Universidade Federal de Campina Grande

HOMEZ-JARA, A.; DAZA, L. D.; AGUIRRE, D. M.; MUÑOZ, J. A.; SOLANILLA, J. F.; VÁQUIRO, H. A. Characterization of chitosan edible films obtained with various polymer concentrations and drying temperatures. **Int J Biol Macromol,** v. 113, p. 1233-1240, 2018.

HUANG, X.; BRAZEL, C. S. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. **Journal of controlled release,** v. 73, n. 2-3, p. 121-136, 2001.

HUANG, Y.; LAPITSKY, Y. Salt-assisted mechanistic analysis of chitosan/tripolyphosphate micro-and nanogel formation. **Biomacromolecules,** v. 13, n. 11, p. 3868-3876, 2012.

International Diabetes Federation. **Diabetes Atlas**, p. 1-163, 2015. ISSN 978-2-930229-81-2. Disponível em: < https://www.idf.org/e-library/epidemiology-research/diabetes-atlas.html >. Acesso em: 12/12/2017.

JAIN, A.; JAIN, S. K. In vitro release kinetics model fitting of liposomes: an insight. **Chemistry and physics of lipids,** v. 201, p. 28-40, 2016.

JI, N.; HONG, Y.; GU, Z.; CHENG, L.; LI, Z.; LI, C. Fabrication and characterization of complex nanoparticles based on carboxymethyl short chain amylose and chitosan by ionic gelation. **Food & function,** v. 9, n. 5, p. 2902-2912, 2018.

JIMTAISONG, A.; SAEWAN, N. Utilization of carboxymethyl chitosan in cosmetics. **International Journal of Cosmetic Science,** v. 36, n. 1, p. 12-21, 2014.

JOSE, S.; FANGUEIRO, J.; SMITHA, J.; CINU, T.; CHACKO, A.; PREMALETHA, K.; SOUTO, E. Predictive modeling of insulin release profile from cross-linked chitosan microspheres. **European journal of medicinal chemistry,** v. 60, p. 249-253, 2013.

JOSE, S.; FANGUEIRO, J. F.; SMITHA, J.; CINU, T. A.; CHACKO, A. J.; PREMALETHA, K.; SOUTO, E. B. Cross-linked chitosan microspheres for oral delivery of insulin: Taguchi design and in vivo testing. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,** v. 92, p. 175-9, 2012.

KANHA, N.; REGENSTEIN, J. M.; SURAWANG, S.; PITCHAKARN, P.; LAOKULDILOK, T. Properties and kinetics of the in vitro release of anthocyanin-rich microcapsules produced through spray and freeze-drying complex coacervated double emulsions. **Food Chemistry,** v. 340, p. 127950, 2021.

KE, Z.; GUO, H.; ZHU, X.; JIN, Y.; HUANG, Y. Efficient peroral delivery of insulin via vitamin B12 modified trimethyl chitosan nanoparticles. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences,** v. 18, n. 2, p. 155-170, 2015.

KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Advanced drug delivery reviews,** v. 62, n. 1, p. 3-11, 2010.

KEMPE, S.; METZ, H.; BASTROP, M.; HVILSOM, A.; CONTRI, R. V.; MÄDER, K. Characterization of thermosensitive chitosan-based hydrogels by rheology and electron paramagnetic resonance spectroscopy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,** v. 68, n. 1, p. 26-33, 2008.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA , F. F. A. C. **Dicionário terapêutico guanabara**.13. Guanabara Koogan, 2006. ISBN 8527712121.

KUMAR, A.; THAKUR, P.; KUMAR, A. In Vitro Evaluation of Insulin Release from Chitosan-Alginate Macrobeads. **Journal of Pharmaceutical Innovation**, p. 1-9, 2021.

KUMAR, M. N. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and functional polymers,** v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.

LANCINA, M. G., 3RD; SHANKAR, R. K.; YANG, H. Chitosan nanofibers for transbuccal insulin delivery. **Journal of Biomedical Materials Research Part A,** v. 105, n. 5, p. 1252-1259, 2017.

LARANJEIRA, M. C.; DE FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico Chitosan: functional byopolymer with biomedical industrial potential. **Química Nova,** v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.

LEE, E.-J.; KOH, Y.-H.; YOON, B.-H.; KIM, H.-E.; KIM, H.-W. Highly porous hydroxyapatite bioceramics with interconnected pore channels using camphene-based freeze casting. **Materials letters,** v. 61, n. 11-12, p. 2270-2273, 2007.

LI, L.; JIANG, G.; YU, W.; LIU, D.; CHEN, H.; LIU, Y.; TONG, Z.; KONG, X.; YAO, J. Preparation of chitosan-based multifunctional nanocarriers overcoming multiple barriers for oral delivery of insulin. **Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications,** v. 70, n. Pt 1, p. 278-286, 2017.

LI, M.-G.; LU, W.-L.; WANG, J.-C.; ZHANG, X.; ZHANG, H.; WANG, X.-Q.; WU, C.-S.; ZHANG, Q. Preparation and characterization of insulin nanoparticles employing chitosan and poly (methylmethacrylate/methylmethacrylic acid) copolymer. **Journal of nanoscience and nanotechnology,** v. 6, n. 9-10, p. 2874-2886, 2006.

LIMA, H. A.; LIA, F. M. V.; RAMDAYAL, S. Preparation and characterization of chitosan-insulin-tripolyphosphate membrane for controlled drug release: Effect of cross linking agent. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology,** v. 5, n. 04, p. 211, 2014.

LIN, C.-C.; LIN, C.-W. Preparation of N, O-carboxymethyl chitosan nanoparticles as an insulin carrier. **Drug delivery,** v. 16, n. 8, p. 458-464, 2009.

LIN, C. C.; LIN, C. W. Preparation of N,O-carboxymethyl chitosan nanoparticles as an insulin carrier. **Drug delivery,** v. 16, n. 8, p. 458-64, 2009.

LIU, L.; ZHOU, C.; XIA, X.; LIU, Y. Self-assembled lecithin/chitosan nanoparticles for oral insulin delivery: preparation and functional evaluation. **International Journal of Nanomedicine,** v. 11, p. 761-9, 2016.

LIU, M.; ZHANG, J.; ZHU, X.; SHAN, W.; LI, L.; ZHONG, J.; ZHANG, Z.; HUANG, Y. Efficient mucus permeation and tight junction opening by dissociable "mucus-inert" agent coated trimethyl chitosan nanoparticles for oral insulin delivery. **Journal of Controlled Release,** v. 222, p. 67-77, 2016.

LIU, X.; YANG, F.; SONG, T.; ZENG, A.; WANG, Q.; SUN, Z.; SHEN, J. Therapeutic effect of carboxymethylated and quanternized chitosan on insulin resistance in high-fat-diet-induced rats and 3T3-L1 adipocytes. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition,** v. 23, n. 10, p. 1271-84, 2012.

LIU, X.; ZHI, X.; LIU, Y.; WU, B.; SUN, Z.; SHEN, J. Effect of chitosan, O-carboxymethyl chitosan, and N-[(2-hydroxy-3-N,N-dimethylhexadecyl ammonium)propyl] chitosan chloride on overweight and insulin resistance in a murine diet-induced obesity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 60, n. 13, p. 3471-6, 2012.

LOPES, M.; ANICETO, D.; ABRANTES, M.; SIMOES, S.; BRANCO, F.; VITORIA, I.; BOTELHO, M. F.; SEICA, R.; VEIGA, F.; RIBEIRO, A. In vivo biodistribution of antihyperglycemic biopolymer-based nanoparticles for the treatment of type 1 and type 2 diabetes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,** v. 113, p. 88-96, 2017.

LOPES, M.; SHRESTHA, N.; CORREIA, A.; SHAHBAZI, M. A.; SARMENTO, B.; HIRVONEN, J.; VEIGA, F.; SEICA, R.; RIBEIRO, A.; SANTOS, H. A. Dual chitosan/albumin-coated alginate/dextran sulfate nanoparticles for enhanced oral delivery of insulin. **Journal of Control Release,** v. 232, p. 29-41, 2016.

LUO, Y.; ZHANG, B.; CHENG, W.-H.; WANG, Q. Preparation, characterization and evaluation of selenite-loaded chitosan/TPP nanoparticles with or without zein coating. **Carbohydrate polymers,** v. 82, n. 3, p. 942-951, 2010.

MACEDO, A.; FILIPE, P.; THOMÉ, N. G.; VIEIRA, J.; OLIVEIRA, C.; TEODÓSIO, C.; FERREIRA, R.; ROQUE, L.; FONTE, P. A Brief Overview of the Oral Delivery of Insulin as an Alternative to the Parenteral Delivery. **Current molecular medicine,** v. 20, n. 2, p. 134-143, 2020.

MACEDO ANA S., C., PEDRO M ROQUE, LUÍS THOMÉ, NATÁLIA G REIS, CATARINA P PINTADO, MANUELA E FONTE, PEDRO. Novel and revisited approaches in nanoparticle systems for buccal drug delivery. **Journal of controlled release,** v. 320, p. 125-141, 2020.

MAHDIZADEH BARZOKI, Z.; EMAM-DJOMEH, Z.; MORTAZAVIAN, E.; AKBAR MOOSAVI-MOVAHEDI, A.; RAFIEE TEHRANI, M. Formulation, in vitro evaluation and kinetic analysis of chitosan-gelatin bilayer muco-adhesive buccal patches of insulin nanoparticles. **Journal of Microencapsulation,** v. 33, n. 7, p. 613-624, 2016.

MANSOURPOUR, M.; MAHJUB, R.; AMINI, M.; OSTAD, S. N.; SHAMSA, E. S.; RAFIEE-TEHRANI, M.; DORKOOSH, F. A. Development of acid-resistant alginate/trimethyl chitosan nanoparticles containing cationic beta-cyclodextrin polymers for insulin oral delivery. **American Association of Pharmaceutical Scientists,** v. 16, n. 4, p. 952-62, 2015.

MARATHE, P. H.; GAO, H. X.; CLOSE, K. L. American Diabetes Association standards of medical care in diabetes 2017. **Journal of diabetes,** v. 9, n. 4, p. 320-324, 2017.

MARTINS, A. F.; DE OLIVEIRA, D. M.; PEREIRA, A. G.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. Chitosan/TPP microparticles obtained by microemulsion method applied in controlled release of heparin. **Int J Biol Macromol,** v. 51, n. 5, p. 1127-1133, 2012.

MENDEZ, A. S.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E. E. Validation of HPLC and UV spectrophotometric methods for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis,** v. 33, n. 5, p. 947-954, 2003.

MI, F. L.; SHYU, S. S.; LEE, S. T.; WONG, T. B. Kinetic study of chitosan-tripolyphosphate complex reaction and acid-resistive properties of the chitosan-

tripolyphosphate gel beads prepared by in-liquid curing method. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics,** v. 37, n. 14, p. 1551-1564, 1999.

MILECH, A.; ANGELUCCI, A.; GOLBERT, A.; CARRILHO, A.; RAMALHO, A.; AGUIAR, A. Sociedade Brasileira de Diabetes. **Diretrizes da sociedade brasileira de diabetes (2015-2016)**, 2016. Disponível em: < http://www.diabetes.org.br/profissionais/images/docs/DIRETRIZES-SBD-2015-2016.pdf >. Acesso em: 12/12/2017.

MILECH, A. A., A. P.; GOLBERT, A.; MATHEUS, A.; CARRILHO, A.; RAMALHO, A. **Diretrizes da sociedade brasileira de diabetes 2019 - 2020**. São Paulo: Clanadd Editora Científica, 2019.

MOGHASSEMI, S.; PARNIAN, E.; HAKAMIVALA, A.; DARZIANIAZIZI, M.; VARDANJANI, M. M.; KASHANIAN, S.; LARIJANI, B.; OMIDFAR, K. Uptake and transport of insulin across intestinal membrane model using trimethyl chitosan coated insulin niosomes. **Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications,** v. 46, p. 333-40, 2015.

MORTAZAVIAN, E.; DORKOOSH, F. A.; RAFIEE-TEHRANI, M. Design, characterization and ex vivo evaluation of chitosan film integrating of insulin nanoparticles composed of thiolated chitosan derivative for buccal delivery of insulin. **Drug Dev Ind Pharm,** v. 40, n. 5, p. 691-8, 2014a.

_____. Design, characterization and ex vivo evaluation of chitosan film integrating of insulin nanoparticles composed of thiolated chitosan derivative for buccal delivery of insulin. **Drug Development and Industrial Pharmacy,** v. 40, n. 5, p. 691-8, 2014b.

MOURA, M. J. Aplicações Do Quitosano Em Libertação Controlada De Fármacos: Algumas Considerações. **Enciclopédia Biosfera,** v. 8, n. 14, p. 1489-1509, 2012.

MUKHOPADHYAY, P.; CHAKRABORTY, S.; BHATTACHARYA, S.; MISHRA, R.; KUNDU, P. P. pH-sensitive chitosan/alginate core-shell nanoparticles for efficient and safe oral insulin delivery. **International Journal of Biological Macromolecules,** v. 72, p. 640-8, 2015.

MUKHOPADHYAY, P.; SARKAR, K.; BHATTACHARYA, S.; BHATTACHARYYA, A.; MISHRA, R.; KUNDU, P. pH sensitive N-succinyl chitosan grafted polyacrylamide hydrogel for oral insulin delivery. **Carbohydrate Polymers,** v. 112, p. 627-637, 2014.

NICOLETTI, C. D.; FRASSON, A. P. P. Z. FORMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA: Revisão Bibliográfica e Avaliação Comparativa da Qualidade de Comprimidos Retard de Nifedipina 20mg de Referência e Similar. **Revista Contexto & Saúde,** v. 6, n. 10, p. 65-74, 2013.

NOGUEIRA CAMPOS, M. G.; FERREIRA GROSSO, C. R.; CÁRDENAS, G.; INOCENTINNI MEI, L. H. Effects of neutralization process on preparation and characterization of chitosan membranes for wound dressing. In: Macromolecular symposia, Wiley Online Library, p.253-257, 2005.

OMID, N. J.; BABANEJAD, N.; AMINI, H.; AMINI, M.; TEHRANI, M. R.; DORKOOSH, F. Preparation and characterization of novel derivatives of chitosan and trimethyl chitosan conjugated with dipeptides and vitamin B12 as candidates for oral delivery of insulin. **Journal of Polymer Research,** v. 21, n. 8, p. 510, 2014.

ORGANIZATION, W. H. Global Report on Diabetes. **Global report on diabetes**, , 2016. ISSN 924156525X. Disponível em: < http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf >. Acesso em: 12 December 2017.

PAIVA, D.; LAMPMAN, G.; KRIZ, G. **Introduction to spectroscopy.** .2rd. Whashington: Saunders College Publishing, 1996. ISBN 0030584272.

PARK, H.; PARK, K.; KIM, D. Preparation and swelling behavior of chitosan-based superporous hydrogels for gastric retention application. **Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials,** v. 76, n. 1, p. 144-150, 2006.

PIEROG, M.; GIERSZEWSKA-DRUŻYŃSKA, M.; OSTROWSKA-CZUBENKO, J. Effect of ionic crosslinking agents on swelling behavior of chitosan hydrogel membranes. **Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives. Polish Chitin Society, Łódź,** v. 75, p. 82, 2009.

QINNA, N. A.; KARWI, Q. G.; AL-JBOUR, N.; AL-REMAWI, M. A.; ALHUSSAINY, T. M.; AL-SO'UD, K. A.; AL OMARI, M. M.; BADWAN, A. A. Influence of molecular weight and degree of deacetylation of low molecular weight chitosan on the bioactivity of oral insulin preparations. **Marine Drugs,** v. 13, n. 4, p. 1710-25, 2015.

ROBLES, E.; JUÁREZ, J.; BURBOA, M. G.; GUTIÉRREZ, L. E.; TABOADA, P.; MOSQUERA, V.; VALDEZ, M. A. Properties of insulin–chitosan complexes obtained by an alkylation reaction on chitosan. **Journal of Applied Polymer Science,** v. 131, n. 6, 2014.

ROY, L.; BHATTACHARJEE, M. Overview of novel routes of insulin: current status. **International Journal of Advances in Medicine,** v. 7, n. 10, p. 1597, 2020.

SAHOO, P.; LEONG, K. H.; NYAMATHULLA, S.; ONUKI, Y.; TAKAYAMA, K.; CHUNG, L. Y. Chitosan complexed carboxymethylated iota-carrageenan oral insulin particles: Stability, permeability and in vivo evaluation. **Materials Today Communications,** v. 20, p. 100557, 2019.

SANITÁRIA, A. N. D. V. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, 2003.

SARMENTO, B.; RIBEIRO, A.; VEIGA, F.; FERREIRA, D. Development and characterization of new insulin containing polysaccharide nanoparticles. **Colloids Surf B Biointerfaces,** v. 53, n. 2, p. 193-202, 2006.

SARMENTO, B.; RIBEIRO, A.; VEIGA, F.; FERREIRA, D. Development and characterization of new insulin containing polysaccharide nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,** v. 53, n. 2, p. 193-202, 2006.

SEYAM, S.; NORDIN, N. A.; ALFATAMA, M. Recent Progress of Chitosan and Chitosan Derivatives-Based Nanoparticles: Pharmaceutical Perspectives of Oral Insulin Delivery. **Pharmaceuticals,** v. 13, n. 10, p. 307, 2020.

SHARMA, D.; ARORA, S.; SINGH, J. Smart thermosensitive copolymer incorporating chitosan–zinc–insulin electrostatic complexes for controlled delivery of insulin: effect of chitosan chain length. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials,** v. 69, n. 16, p. 1054-1068, 2020.

SHENG, J.; HAN, L.; QIN, J.; RU, G.; LI, R.; WU, L.; CUI, D.; YANG, P.; HE, Y.; WANG, J. N-trimethyl chitosan chloride-coated PLGA nanoparticles overcoming multiple barriers to oral insulin absorption. **ACS Applied Materials & Interfaces,** v. 7, n. 28, p. 15430-41, 2015.

SIDDIQUI, N. A.; BILLA, N.; ROBERTS, C. J. Multiboronic acid-conjugated chitosan scaffolds with glucose selectivity to insulin release. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition,** v. 28, n. 8, p. 781-793, 2017.

SILVA, H.; DOS SANTOS, K.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova,** v. 29, n. 4, p. 776, 2006.

SILVA, P. **Farmacologia**.7. Guanabara Koogan, 2006.

SONG, L.; ZHI, Z. L.; PICKUP, J. C. Nanolayer encapsulation of insulin-chitosan complexes improves efficiency of oral insulin delivery. **Internatinal Journal of Nanomedicine,** v. 9, p. 2127-36, 2014.

SPINKS, G. M.; LEE, C. K.; WALLACE, G. G.; KIM, S. I.; KIM, S. J. Swelling behavior of chitosan hydrogels in ionic liquid− water binary systems. **Langmuir,** v. 22, n. 22, p. 9375-9379, 2006.

SUN, P.; LI, P.; LI, Y. M.; WEI, Q.; TIAN, L. H. A pH-sensitive chitosan-tripolyphosphate hydrogel beads for controlled glipizide delivery. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials,** v. 97, n. 1, p. 175-183, 2011.

TAHTAT, D.; MAHLOUS, M.; BENAMER, S.; KHODJA, A. N.; OUSSEDIK-OUMEHDI, H.; LARABA-DJEBARI, F. Oral delivery of insulin from alginate/chitosan crosslinked by glutaraldehyde. **Int J Biol Macromol,** v. 58, p. 160-168, 2013.

TOMAZ, A. F.; DE CARVALHO, S. M. S.; BARBOSA, R. C.; SILVA, S. M.; GUTIERREZ, M. A. S.; DE LIMA, A. G. B.; FOOK, M. V. L. Ionically Crosslinked Chitosan Membranes Used as Drug Carriers for Cancer Therapy Application. **Materials,** v. 11, n. 10, 2018.

UNAGOLLA, J. M.; JAYASURIYA, A. C. Drug transport mechanisms and in vitro release kinetics of vancomycin encapsulated chitosan-alginate polyelectrolyte microparticles as a controlled drug delivery system. **European Journal of Pharmaceutical Sciences,** v. 114, p. 199-209, 2018.

VENKATESAN, C.; VIMAL, S.; HAMEED, A. S. Synthesis and characterization of chitosan tripolyphosphate nanoparticles and its encapsulation efficiency containing Russell's viper snake venom. **Journal of biochemical and molecular toxicology,** v. 27, n. 8, p. 406-411, 2013.

VERMA, A.; SHARMA, S.; GUPTA, P. K.; SINGH, A.; TEJA, B. V.; DWIVEDI, P.; GUPTA, G. K.; TRIVEDI, R.; MISHRA, P. R. Vitamin B12 functionalized layer by layer calcium phosphate nanoparticles: A mucoadhesive and pH responsive carrier for improved oral delivery of insulin. **Acta Biomaterials,** v. 31, p. 288-300, 2016.

VIMAL, S.; TAJU, G.; NAMBI, K. N.; MAJEED, S. A.; BABU, V. S.; RAVI, M.; HAMEED, A. S. Synthesis and characterization of CS/TPP nanoparticles for oral delivery of gene in fish. **Aquaculture,** v. 358, p. 14-22, 2012.

WANG, J.; KONG, M.; ZHOU, Z.; YAN, D.; YU, X.; CHENG, X.; FENG, C.; LIU, Y.; CHEN, X. Mechanism of surface charge triggered intestinal epithelial tight junction opening upon chitosan nanoparticles for insulin oral delivery. **Carbohydrate Polymers,** v. 157, p. 596-602, 2017.

WANG, J.; XU, M.; CHENG, X.; KONG, M.; LIU, Y.; FENG, C.; CHEN, X. Positive/negative surface charge of chitosan based nanogels and its potential influence on oral insulin delivery. **Carbohydrate Polymers,** v. 136, p. 867-74, 2016.

WANG, Y.; HUANG, F.; SUN, Y.; GAO, M.; CHAI, Z. Development of shell cross-linked nanoparticles based on boronic acid-related reactions for self-regulated insulin delivery. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition,** v. 28, n. 1, p. 93-106, 2017.

WOITISKI, C. B.; SARMENTO, B.; CARVALHO, R. A.; NEUFELD, R. J.; VEIGA, F. Facilitated nanoscale delivery of insulin across intestinal membrane models. **International journal of pharmaceutics,** v. 412, n. 1-2, p. 123-131, 2011.

WONG, T. W. Chitosan and its use in design of insulin delivery system. **Recent patents on drug delivery & formulation,** v. 3, n. 1, p. 8-25, 2009.

WOO, V. C. New insulins and new aspects in insulin delivery. **Canadian journal of diabetes,** v. 39, n. 4, p. 335-343, 2015.

WU, Z.; ZHANG, S.; ZHANG, X.; SHU, S.; CHU, T.; YU, D. Phenylboronic acid grafted chitosan as a glucose-sensitive vehicle for controlled insulin release. **Journal of Pharmaceutical Sciences,** v. 100, n. 6, p. 2278-86, 2011.

YANG, Y.; LIU, Y.; CHEN, S.; CHEONG, K.-L.; TENG, B. Carboxymethyl β-cyclodextrin grafted carboxymethyl chitosan hydrogel-based microparticles for oral insulin delivery. **Carbohydrate polymers,** v. 246, p. 116617, 2020.

YAO, F.; CHEN, W.; WANG, H.; LIU, H.; YAO, K.; SUN, P.; LIN, H. A study on cytocompatible poly (chitosan-gL-lactic acid). **Polymer,** v. 44, n. 21, p. 6435-6441, 2003.

YIN, R.; HE, J.; BAI, M.; HUANG, C.; WANG, K.; ZHANG, H.; YANG, S.-M.; ZHANG, W. Engineering synthetic artificial pancreas using chitosan hydrogels integrated with glucose-responsive microspheres for insulin delivery. **Materials Science and Engineering: C,** v. 96, p. 374-382, 2019.

YODKHUM, K.; PHAECHAMUD, T. Hydrophobic chitosan sponges modified by aluminum monostearate and dehydrothermal treatment as sustained drug delivery system. **Materials Science and Engineering: C,** v. 42, p. 715-725, 2014.

YOSHIDA, C. M.; MACIEL, V. B. V.; MENDONÇA, M. E. D.; FRANCO, T. T. Chitosan biobased and intelligent films: Monitoring pH variations. **LWT-food science and technology,** v. 55, n. 1, p. 83-89, 2014.

ZHANG, P.; ZHANG, Y.; LIU, C.-G. Polymeric nanoparticles based on carboxymethyl chitosan in combination with painless microneedle therapy systems for enhancing transdermal insulin delivery. **RSC Advances,** v. 10, n. 41, p. 24319-24329, 2020.

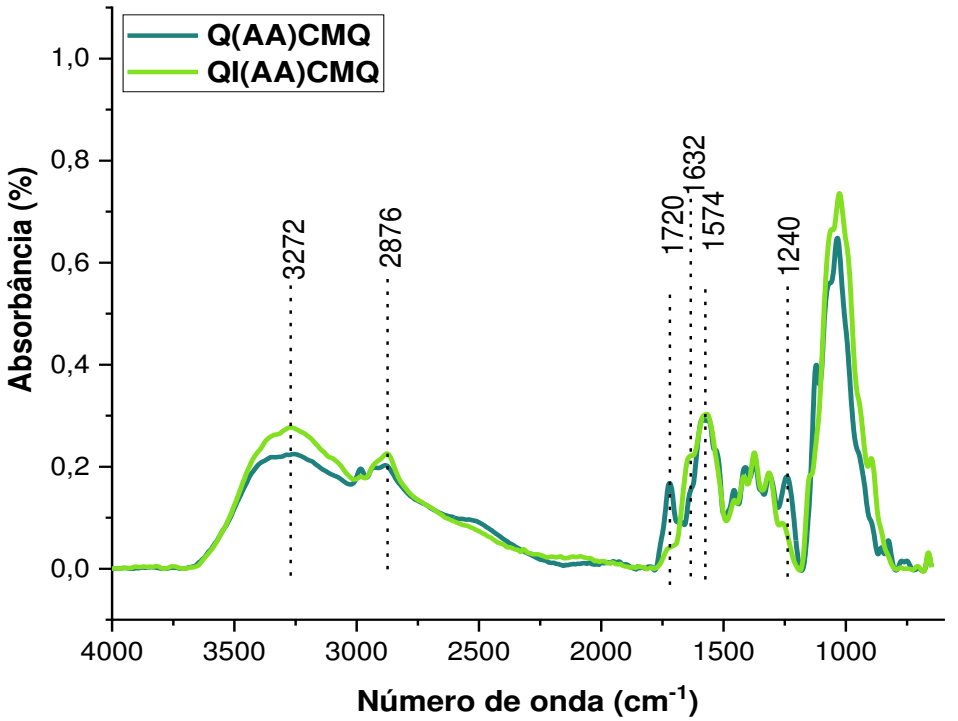
ZHANG, Y.; HUO, M.; ZHOU, J.; ZOU, A.; LI, W.; YAO, C.; XIE, S. DDSolver: an add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. **The AAPS journal,** v. 12, n. 3, p. 263-271, 2010.

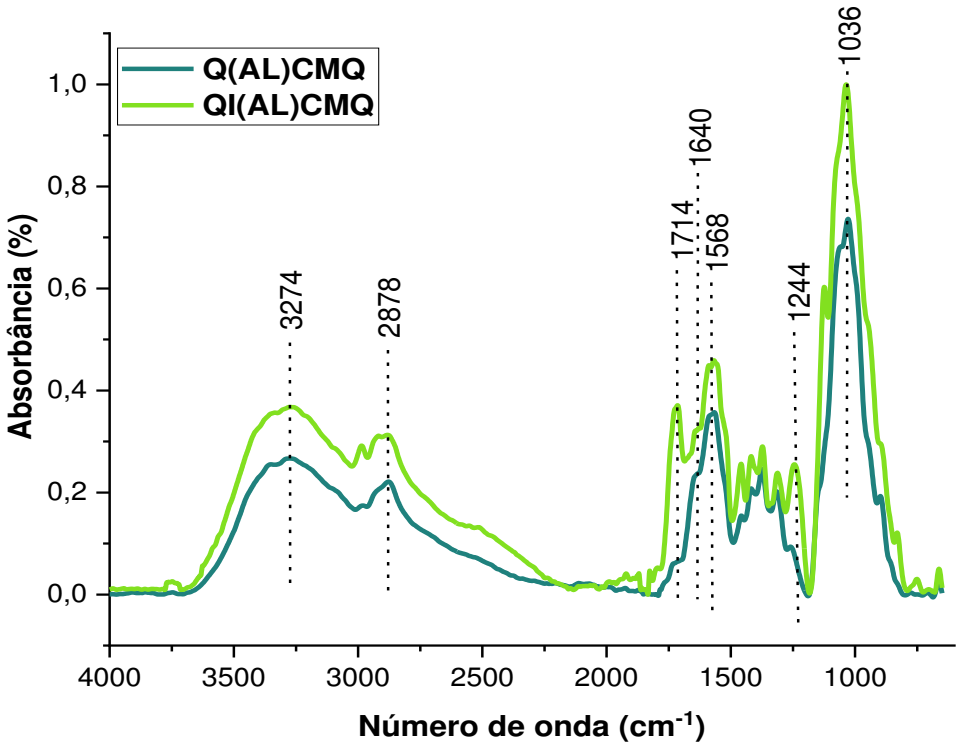
ZHONG, Y.; SONG, X.; LI, Y. Antimicrobial, physical and mechanical properties of kudzu starch–chitosan composite films as a function of acid solvent types. **Carbohydrate Polymers,** v. 84, n. 1, p. 335-342, 2011.

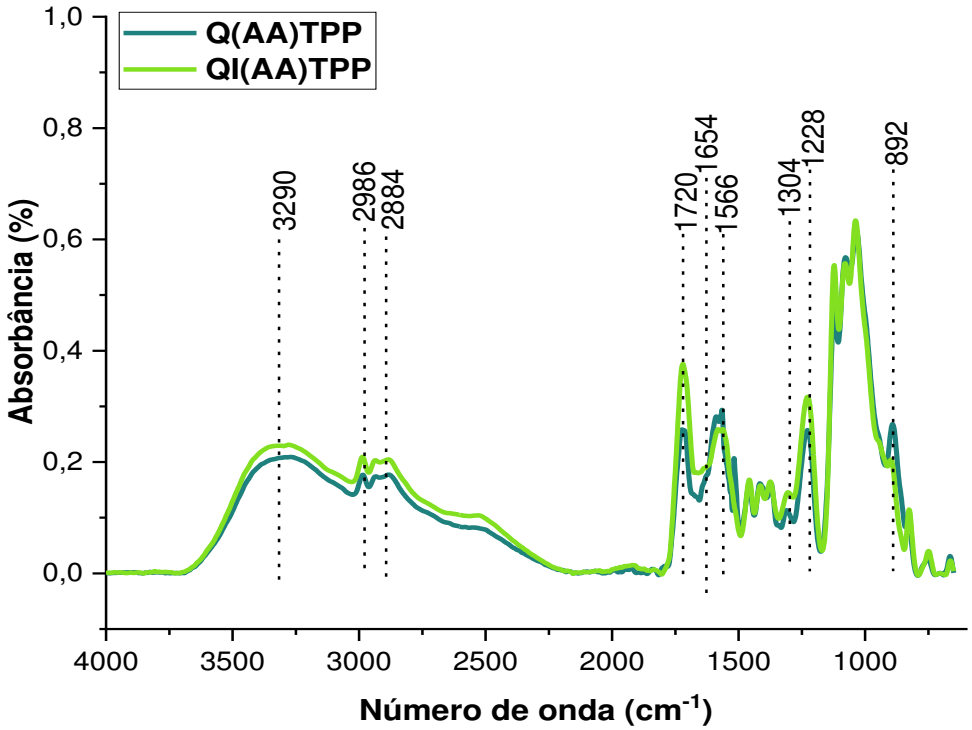
ZUO, J.; GAO, Y.; BOU-CHACRA, N.; LÖBENBERG, R. Evaluation of the DDSolver software applications. **BioMed research international,** v. 2014, 2014.

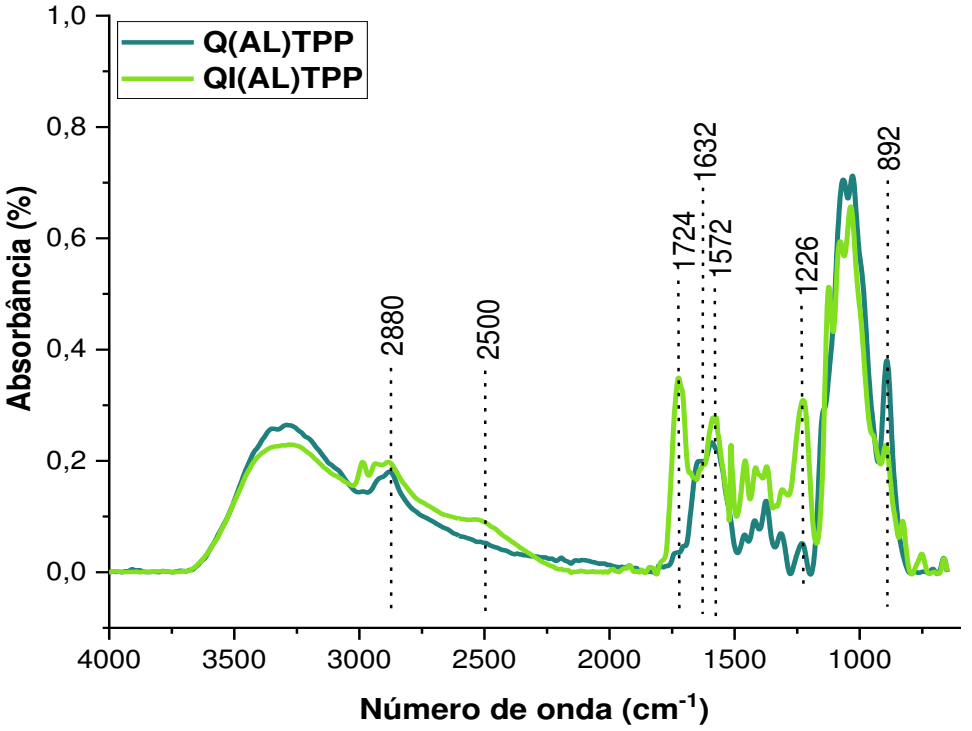
APÊNDECE A

Gráficos comparativo dos espectros de FTIR das esferas

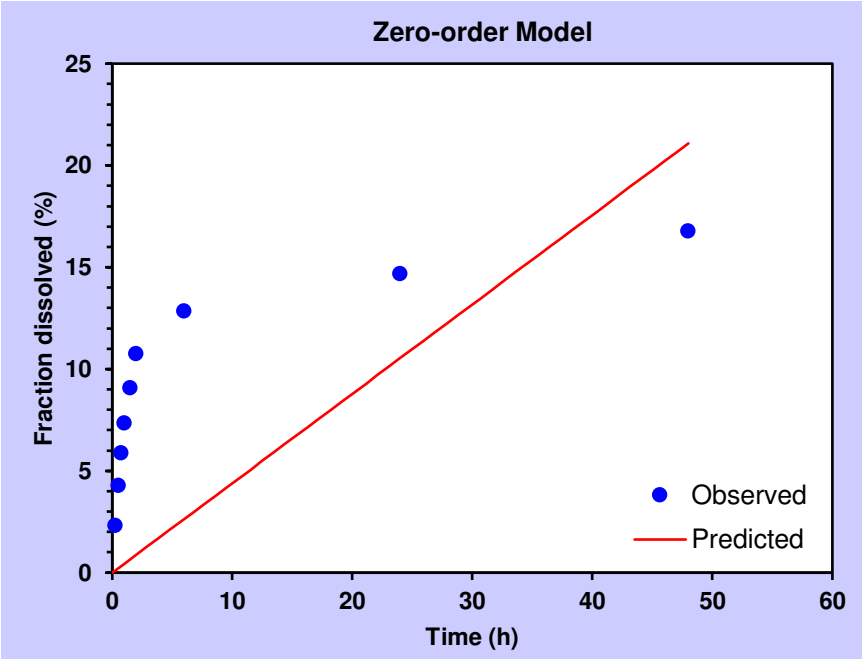


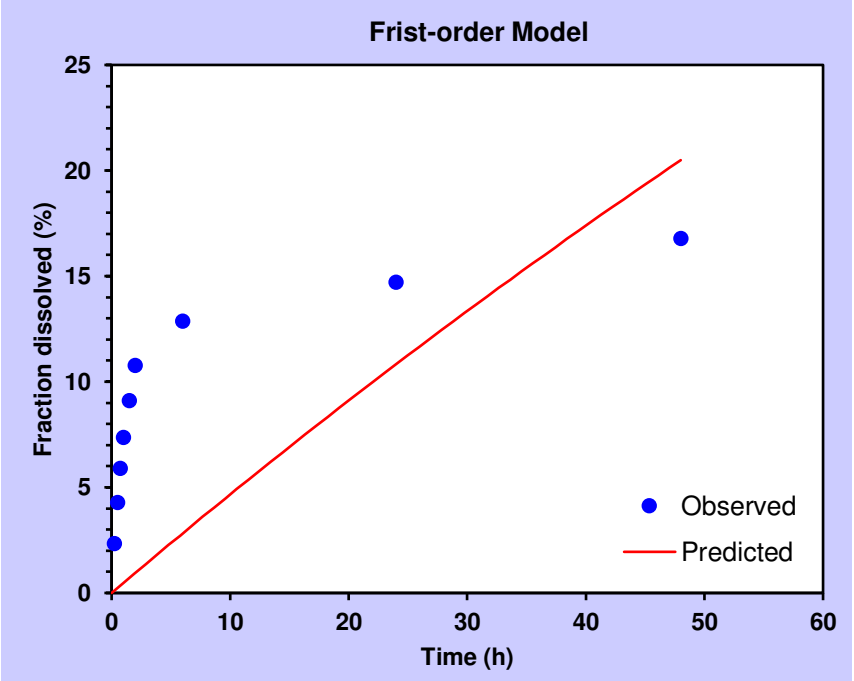


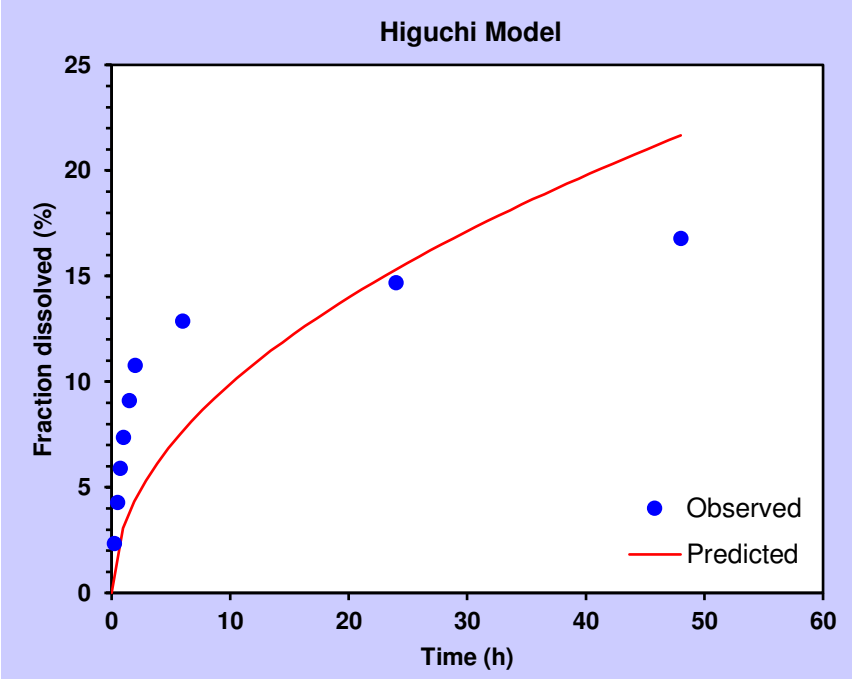

Q(AA)TPP
QI(AA)TPP
Absorbância (%)
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
3290
2986
2884
1720
1654
1566
1304
1228
892
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
Número de onda (cm-1)

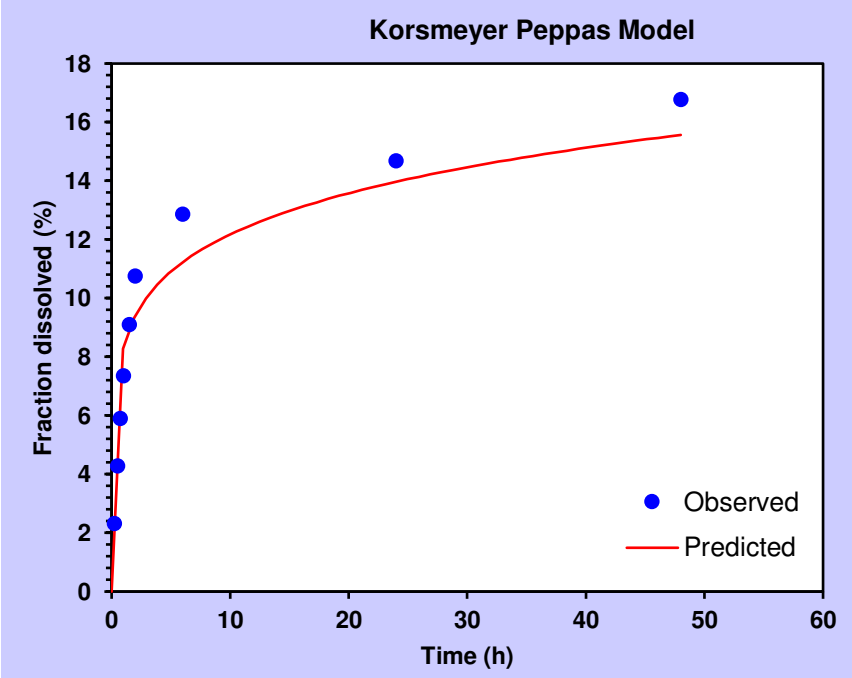

Q(AL)TPP
QI(AL)TPP
Absorbância (%)
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
2880
2500
1724
1632
1572
1226
892
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
Número de onda (cm-1)

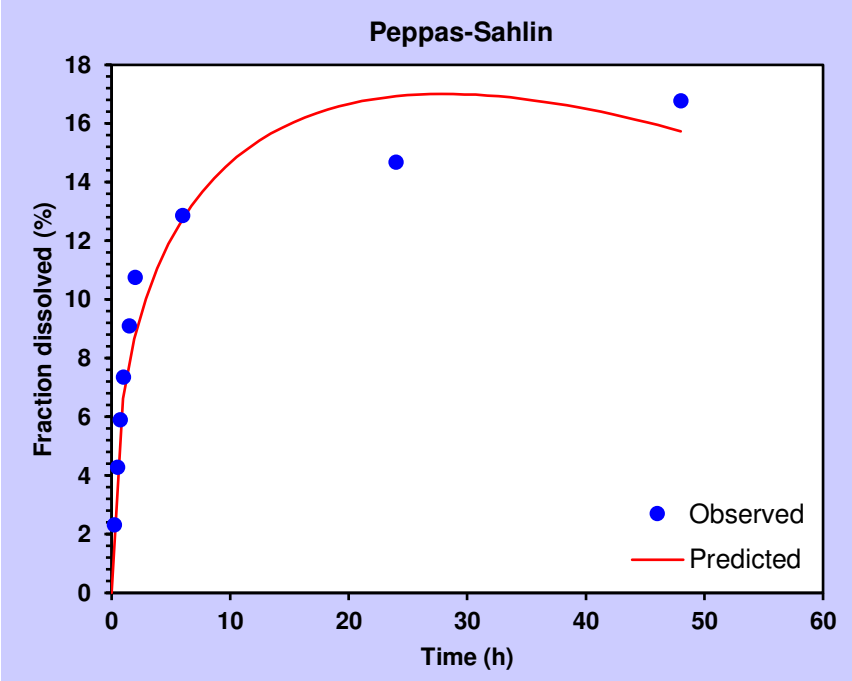
Gráficos modelos da cinética de liberação






Higuchi Model
Fraction dissolved (%)
Time (h)
Observed
Predicted
0
5
10
15
20
25
0
10
20
30
40
50
60


Korsmeyer Peppas Model
Fraction dissolved (%)
Time (h)
Observed
Predicted
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
0
10
20
30
40
50
60


Peppas-Sahlin
Fraction dissolved (%)
Time (h)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
0
10
20
30
40
50
60
Observed
Predicted