



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



**MEMBRANAS POROSAS DE QUITOSANA/ GELATINA PARA LIBERAÇÃO  
CONTROLADA DE INSULINA**

**PAULA CHRISTIANNE GOMES GOUVEIA SOUTO MAIA**

CAMPINA GRANDE  
2015

**PAULA CHRISTIANNE GOMES GOUVEIA SOUTO MAIA**

**MEMBRANAS POROSAS DE QUITOSANA/ GELATINA PARA LIBERAÇÃO  
CONTROLADA DE INSULINA**

Dissertação apresentado à banca examinadora do Programa de Pós Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande, Área de Concentração: Materiais Avançados: Polímeros, como exigência final para obtenção do título de Mestre em Ciências e Engenharia de Materiais.

**Orientador:** Prof. Dr. ROMUALDO RODRIGUES DE MENEZES

**Orientador:** Prof. Dr. MARCUS VINÍCIUS LIA FOOK

CAMPINA GRANDE

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

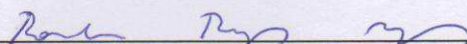
- M217d     Maia, Paula Christianne Gomes Gouveia Souto.  
            Membranas porosas de quitosana/gelatina para liberação controlada de insulina / Paula Christianne Gomes Gouveia Souto Maia. – Campina Grande, 2015.  
            70 f. : color.
- Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2015.
- "Orientação: Prof. Dr. Romualdo Rodrigues de Menezes, Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook".
- Referências.
1. Quitosana. 2. Insulina. 3. Gelatina. 4. Biomateriais. 5. Liberação Controlada. I. Menezes, Romualdo Rodrigues de Menezes. II. Fook, Marcus Vinicius Lia. III. Título.

CDU 677.473(043)

**MEMBRANAS POROSAS DE QUITOSANA/GELATINA PARA LIBERAÇÃO  
CONTROLADA DE INSULINA**

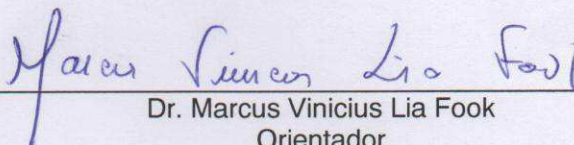
PAULA CHRISTIANNE GOMES GOUVEIA SOUTO MAIA

Dissertação aprovada em 19/06/2015 pela banca examinadora constituída dos  
seguintes membros:



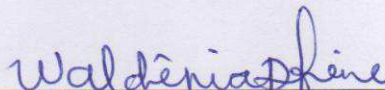
---

Dr. Romualdo Rodrigues de Menezes  
Orientador  
PPG-CEMat/UAEMA/UFCG



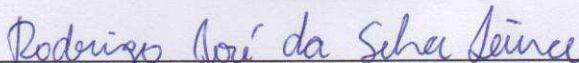
---

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



---

Dr.<sup>a</sup> Waldênia Pereira Freire  
Examinadora Externa  
CCBS/UEPB



---

Dr. Rodrigo José da Silva Lima  
Examinador Externo  
UFCG

***DEDICO*** a Deus, minha eterna fonte de inspiração.

## **AGRADECIMENTOS**

Ter um coração grato em todas as circunstâncias é a vontade de Deus para nós. Mas conseguir agradecer a todos aqueles que foram imprescindíveis para a realização desse trabalho, torna essa tarefa muito difícil de realizar.

Ao meu orientador, professor Marcus Vinícius Lia Fook que, com carinho, aceitou a tarefa de me orientar num momento em que poucos acreditavam que esta dissertação viesse a ser concluída. Sem a sua paciência de me escutar, de enxugar minhas lágrimas e de ouvir minhas inquietudes, certamente não teria conseguido ordenar as ideias e concluí-las. A ele, pela amizade e atenção, devo essa dissertação.

Ao pesquisador Rossemberg Cardoso Barbosa pela infinita disponibilidade, por todos os ensinamentos e pela impecável ajuda na condução desse trabalho.

Ao doutorando Wladymyr Jefferson Bacalhau de Sousa pela colaboração inestimável, por cuidar das revisões e de meus prazos.

A Gildenia Pinto dos Santos Trigueiro verdadeira companheira de fé e de pesquisa, gostaria de registrar que é sempre muito acalentador poder contar com um ombro amigo. A ela, que nos momentos de angústias e dificuldades, sempre teve uma palavra de incentivo além de não ter me deixado desistir. Nós percorremos este caminho juntas, nos complementando e nos fortalecendo, agradeço eternamente.

Aos colaboradores (servidores públicos) do CERTBIO/ UFCG, pela atenção e solicitude com que me atenderam durante a realização da pesquisa. Numa época de governo neoliberal, que procura denegrir e dizimar o serviço público brasileiro, é muito encorajador encontrar pessoas que permanecem entendendo a importância desse tipo de serviço.

Aos amigos e colegas da UFCG e das Faculdades Integradas de Patos, pelo incentivo e pelo apoio constantes percebi que o aprendizado é uma construção diária cujo ingrediente principal é o afeto. A Tiago Bezerra e Neomiza Costa (Miza) pela incrível disponibilidade oferecida. Vocês foram simplesmente essenciais.

A Igreja que se reúne em Patos, pelas incansáveis orações, palavras de apoio e encorajamento em todos os momentos.

Por fim agradeço ao meu esposo Eumar Maia (Jr Maia), aos meus filhos (Igor, Marina, Maria Izabel, Manoel Neto e Felipe), as minhas mães (Tia Edna – in memoriam e Diraci), minhas irmãs de sangue e de fé (Andréa, Deborah, Lúcia, Tamires, Anna Carolina, Brígida e Marta). Deixei vocês por último, porque sempre deixo o melhor para o final, e vocês são o melhor da minha vida.

Obrigada amor, pelo seu apoio incondicional a longo deste processo de dissertação e de muitos outros. Obrigada por acreditar em mim, mesmo quando eu não acreditava. Você é o melhor de Deus para mim.

Aos meus filhos, por estar ao meu lado sempre e por terem tido paciência de esperar que a tarefa chegasse ao final.

A minha tia-mãe, Tia Edna que sempre me apoiou e incentivou em tudo que fiz na vida, e com certeza se estivesse desse lado da vida estaria comigo incondicionalmente. Obrigada minha tia-mãe, por tudo que você me deu e pelo amor e cumplicidade em todas as circunstâncias.

A minha mãe, pelo amor incondicional, pelo carinho e afeto. Por compreender minhas ausências. Reparto a alegria e a satisfação do trabalho concluído. As minhas irmãs, pelo afeto, solidariedade e compreensão. A Brígida e Marta, que comigo partilharam e preencheram, para meus filhos, a ausência da mãe, agradeço profundamente.

*Examinai tudo. Retende o bem.*

(Tessalonicenses 5:21)



## RESUMO

O estudo sobre sistema de liberação controlada de fármaco está em constante crescimento, pois visa melhorar e prolongar o controle da administração de fármacos. Insulina oral é um sonho dos pacientes e um desafio para os cientistas. Para os doentes, não é apenas o alívio da dor da aplicação de múltiplas injeções, mas também a proteção das células betas do pâncreas. A quitosana é um biomaterial considerado atóxico, não alergênica, biodegradável, biofuncional, biocompatível e as suas atividades biológicas compreendem a ação antioxidante, antimicrobiana, analgésica, aceleração da cicatrização, anti-inflamatórias além de ser muito estudada como matriz polimérica em sistemas de liberação controlada de fármacos. A gelatina por sua vez está sendo muito utilizada na área farmacêutica com a finalidade de favorecer o intumescimento do sistema e conseqüentemente acelerar o processo de liberação. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo desenvolver membranas de quitosana, gelatina e insulina para uso em sistema de liberação controlada de fármacos. As membranas desenvolvidas foram caracterizadas pelas técnicas de Difração de raios-X (DRX), Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDS) e Microscopia Óptica (MO). Na técnica de DRX verificou que o que não ocorreu alteração significativa na cristalinidade das membranas. Com a técnica de FTIR verificou que a gelatina, insulina e o tripolifosfato de sódio não interferiram nos grupos funcionais de superfície da quitosana, mantendo desta forma as propriedades da mesma. No EDS foi possível detectar os elementos químicos característicos do material. Foi possível perceber, através das técnicas de MO e MEV, alteração na morfologia da membrana contendo insulina, gelatina e tripolifosfato de sódio quando comparada a de quitosana pura. Baseado nos resultados pode-se concluir que a insulina foi encapsulada pela quitosana e que a presença da gelatina influenciou no tamanho e forma dos poros das membranas e que a neutralização com NaOH diminuiu a quantidade de aglomerados nas superfícies dos arcabouços reticulados com tripolifosfato de sódio.

Palavras-chaves: Quitosana. Insulina. Gelatina. Biomateriais. Liberação Controlada.

## ABSTRACT

The study of drug controlled release system is constantly growing, it aims to improve and extend the control of drug administration. Oral insulin is a dream of patients and a challenge for scientists. For patients, it's not just pain relief applying multiple injections, but also the protection of beta cells of the pancreas. Chitosan, a biomaterial is considered non-toxic, non-allergenic, biodegradable, biofunctional, biocompatible and their biological activities include the antioxidant action, antimicrobial, analgesic, acceleration of wound healing, anti-inflammatory as well as being widely studied as polymer matrix systems controlled drug release. Gelatin turn is being widely used in the pharmaceutical field for the purpose of favoring the system swelling and consequently accelerate the release process. Thus, this study aimed to develop chitosan membranes, gelatin and insulin for use in controlled release system of drugs. The developed membranes were characterized by powder Diffraction X-ray (XRD), spectroscopy in the infrared region with a Fourier transform (FTIR) analysis, Scanning Electron Microscopy (SEM) with Energy Dispersive Spectroscopy X-ray (EDS) and Microscopy optical (MO). In XRD technique we found that what was no significant change in the crystallinity of the membranes. With FTIR technique found that gelatin, insulin and sodium tripolyphosphate did not affect the surface functional groups of chitosan, thereby maintaining the properties thereof. The EDS was possible to detect the characteristic chemical elements of the material. It was possible to see, through the techniques of OM and SEM, change in morphology of the membrane containing insulin, gelatin and sodium tripolyphosphate compared to pure chitosan. Based on the results it can be concluded that insulin was encapsulated by chitosan and the presence of the gelatin influence the size and shape of the pores of the membranes and neutralization with NaOH decreased the amount of agglomerates on the surfaces of scaffolds crosslinked with sodium tripolyphosphate.

Keywords: Chitosan. Insulin. Gelatin. Biomaterials. Controlled Delivery.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - sistema endócrino e seus hormônios.....	22
Figura 2 - Pâncreas.....	23
Figura 3 - Insulina.....	24
Figura 4 - Representação esquemática da obtenção da quitosana. ....	35
Figura 5 - Representação da fórmula química da quitina e da quitosana. ....	36
Figura 6 - Estrutura dos principais aminoácidos da gelatina e típica estrutura da gelatina – Ala-Gly-Pro-Arg-Gly-Glu-Hyp-Gly-Pro .....	37
Figura 7 - Perfil de liberação de fármacos convencional e controlada em função do tempo. ....	39
Figura 8 - Interação entre o STPP e a quitosana. ....	40
Figura 9 - Difração de raios x do pó de quitosana, da gelatina e do tripolifosfato. ....	48
Figura 10 – Difração de raios x dos arcabouços de quitosana com Tripolifosfato de sódio, insulina e gelatina. ....	49
Figura 11 – Difração de raios x dos arcabouços de quitosana com Tripolifosfato de sódio, insulina e gelatina .....	49
Figura 12 – Difração de raios x dos arcabouços de quitosana com Tripolifosfato de sódio, insulina e gelatina .....	50
Figura 13 – Espectro do pó da gelatina e das membranas de quitosana sem e com gelatina e com insulina. ....	51
Figura 14 - Espectro do pó da gelatina e das membranas de quitosana sem e com gelatina e com insulina. ....	52
Figura 15 – Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier do pó da gelatina e das membranas de quitosana sem e com gelatina e com insulina. ....	53
Figura 16 – Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier do pó da gelatina e das membranas de quitosana sem e com gelatina e com insulina. ....	53
Figura 17– Micrografia da superfície de corte, superfície em contato com a placa de Petri (inferior) e da superfície em contato com o ar (superior) dos arcabouços de quitosana sem neutralização com hidróxido de sódio e reticulada com o tripolifosfato. Aumento de 500x .....	54

Figura 18 – Micrografia da superfície de corte, superfície em contato com a placa de Petri e da superfície em contato com o ar dos arcabouços de quitosana sem neutralização, com insulina e reticulada com o tripolifosfato. Aumento de 500x.....	56
Figura 19 – Micrografia da superfície de corte, superfície em contato com a placa de Petri e da superfície em contato com o ar dos arcabouços de quitosana sem neutralização, com 3% de gelatina e reticulado com tripolifosfato. Aumento de 500x. ....	57
Figura 20 – Micrografia da superfície de corte, superfície em contato com a placa de Petri e da superfície em contato com o ar dos arcabouços de quitosana sem neutralização, com 3% de gelatina, com insulina e reticulado com tripolifosfato de sódio. Aumento de 500. ....	58
Figura 21 – Microscopia Eletrônica da superfície de corte, superfície em contato com a placa de Petri e da superfície em contato com o ar dos arcabouços de quitosana neutralizada com hidróxido de sódio e reticulados com tripolifosfato de sódio. Aumento de 500x. ....	58
Figura 22 – Micrografia da superfície de corte, superfície em contato com a placa de Petri e da superfície em contato com o ar dos arcabouços de quitosana neutralizada com hidróxido de sódio, com insulina e reticulado com o tripolifosfato. Aumento de 500x. ....	59
Figura 23 – Micrografia da superfície de corte, superfície em contato com a placa de Petri e da superfície em contato com o ar dos arcabouços de quitosana neutralizados com hidróxido de sódio, com gelatina, com insulina e reticulado com tripolifosfato. Aumento de 500x. ....	59
Figura 24 – Micrografia da superfície de corte, superfície em contato com a placa de Petri e da superfície em contato com o ar dos arcabouços de quitosana neutralizados com hidróxido de sódio, com 3% de gelatina e reticulado com tripolifosfato. Aumento de 500x. ....	60
Figura 25 – Micrografia da superfície de corte, superfície em contato com a placa de Petri e da superfície em contato com o ar dos arcabouços de quitosana neutralizados com hidróxido de sódio, com 5% de gelatina e reticulado com tripolifosfato. Aumento de 500x. ....	60
Figura 26 – Micrografia da superfície de corte, superfície em contato com a placa de Petri e da superfície em contato com o ar dos arcabouços de quitosana	

neutralizados com hidróxido de sódio, com 1% de gelatina, com insulina e reticulado com tripolifosfato. Aumento de 500x. ....	61
Figura 27 – Micrografia da superfície de corte, superfície em contato com a placa de Petri e da superfície em contato com o ar dos arcabouços de quitosana neutralizados com hidróxido de sódio, com 3% de gelatina, com insulina e reticulado com tripolifosfato. Aumento de 500x. ....	61
Figura 28 – Micrografia da superfície de corte, superfície em contato com a placa de Petri e da superfície em contato com o ar dos arcabouços de quitosana neutralizados com hidróxido de sódio, com 5% de gelatina, com insulina e reticulado com tripolifosfato. Aumento de 500x. ....	62
Figura 29 – Micrografia da superfície de superior dos dos arcabouços de quitosana sem e com insulina e com diferentes proporções de gelatina, não reticulados e reticulados com tripolifosfato.. Aumento de 350x. ....	63

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	19
2.1 OBJETIVO GERAL .....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	22
3.1 SISTEMA ENDÓCRINO .....	22
3.2 PÂNCREAS .....	23
3.3 INSULINA .....	23
<b>3.3.1 Tipos de Insulina</b> .....	25
<b>3.3.2 Armazenagem da Insulina</b> .....	25
<b>3.3.2 Distribuição e degradação da insulina</b> .....	26
<b>3.3.3 Distúrbios no metabolismo Insulina</b> .....	28
3.4 DIABETES MELLITUS TIPO 2 .....	30
<b>3.4.1 Diagnóstico do Diabetes mellitus tipo 2</b> .....	31
<b>3.4.2 Formas de tratamento do Diabetes Mellitus tipo 2</b> .....	32
3.5 BIOMATERIAIS .....	33
3.6 QUITINA E QUITOSANA .....	34
3.7 GELATINA .....	37
3.8 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS .....	38
3.9 TRIPOLIFOSFATO DE SÓDIO (STPP) .....	39
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	42
4.1 LOCAL DA PESQUISA .....	42
4.2 MATERIAIS .....	42
4.2.1 Biopolímero .....	42
<b>4.2.2 Reagentes</b> .....	42
4.3. MÉTODOS .....	42
<b>4.3.1 Preparo das membranas</b> .....	42
<b>4.3.2 Incorporação da Insulina</b> .....	43
<b>4.3.3 Incorporação de Gelatina</b> .....	43
<b>4.3.4 Incorporação do Tripolifosfato de Sódio (STPP) nas membranas de quitosana</b> .....	43
4.4 CARACTERIZAÇÃO .....	44

<b>4.4.1 Microscopia Ótica - MO</b> .....	45
<b>4.4.2 Difração de raios X (DRX)</b> .....	45
<b>4.4.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</b> .....	45
<b>4.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) / Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDS)</b> .....	45
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	48
5.1 DIFRAÇÃO DE RAIOS X .....	48
5.2 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER .....	50
5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA.....	54
5.4 MICROSCOPIA ÓPTICA.....	62
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	65
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	66



## **INTRODUÇÃO**



## 1 INTRODUÇÃO

A quitosana é um polissacarídeo obtido, normalmente, a partir da quitina, onde é possível obter quitosana com diferentes graus de desacetilação e diferentes massas moleculares, sendo estes fatores extremamente importantes no que diz respeito às suas propriedades funcionais (EMBUSCADO; HUBER, 2009). É insolúvel em água a pH neutro, contudo, devido a protonação dos grupos amina, é possível solubilizá-lo em soluções aquosas de ácidos orgânicos, como ácidos acético, láctico, fórmico e cítrico, e em ácidos inorgânicos diluídos, como o ácidos clorídrico, nítrico e perclórico (ROMANAZZI et al., 2009; SANTOS, 2006). Ela é considerada atóxica, não alergênica, biodegradável, biofuncional, biocompatível e as suas atividades biológicas compreendem a ação anti-oxidante, antimicrobiana, analgésica, aceleração da cicatrização, anti-inflamatórias além de ser muito estudada como matriz polimérica em sistemas de liberação controlada de fármacos (AIDER, 2010, YANG et al., 2010).

Características da quitosana como tempo de degradação, capacidade de intumescimento, hidrofiliabilidade entre outras podem ser potencializadas quando a mesma está associada outros polímeros biodegradáveis como a gelatina. Silva, (2013) afirma que a interação entre a quitosana e a gelatina em sistema para liberação de heparina é efetiva e que a adição da gelatina favoreceu o intumescimento do sistema e conseqüentemente acelera o processo de liberação da heparina.

A gelatina é um produto reconhecido pelas pessoas na sua forma tradicional para sobremesa e é utilizada na área alimentícia, mas também na área farmacêutica e técnica (adesivos, têxtil, etc.).

Holanda, (2011) concluiu que membranas de quitosana desenvolvidas para liberação controlada de insulina apresentam viabilidade para serem utilizadas como biomaterial, renovando a esperança de uma melhor qualidade de vida para milhares de pessoas portadoras de Diabetes Mellitus que esperam ansiosamente por alternativas menos invasivas para a administração da insulina.

Insulina oral é um sonho de pacientes e um desafio para os cientistas. Para os doentes, não é apenas o alívio da dor da aplicação de múltiplas injeções, mas também a proteção das células beta do pâncreas, o ganho de peso associado com

as injeções de insulina e correção do pico de insulina inicial na aplicação parenteral (IYER, 2010).

O estudo sobre sistema de liberação controlada de fármaco está em constante crescimento, pois visa melhorar e prolongar o controle da administração de fármacos. Desta forma, este trabalho propõe à investigação de membranas de quitosana com gelatina para utilização como sistema controlado de insulina.



**OBJETIVOS**

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver membranas de quitosana/gelatina/insulina para uso em sistema de liberação controlada de fármacos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer condições de processamento para preparação de membranas de quitosana/ gelatina pelo processo de congelamento e liofilização;
- Produzir membranas de quitosana/gelatina/insulina com e sem neutralização;
- Avaliar a influência da incorporação da gelatina com a quitosana no sistema de liberação controlada;
- Comparar as membranas quitosana/gelatina/insulina com e sem neutralização quanto às suas propriedades químicas, morfológicas e cristalinidade;



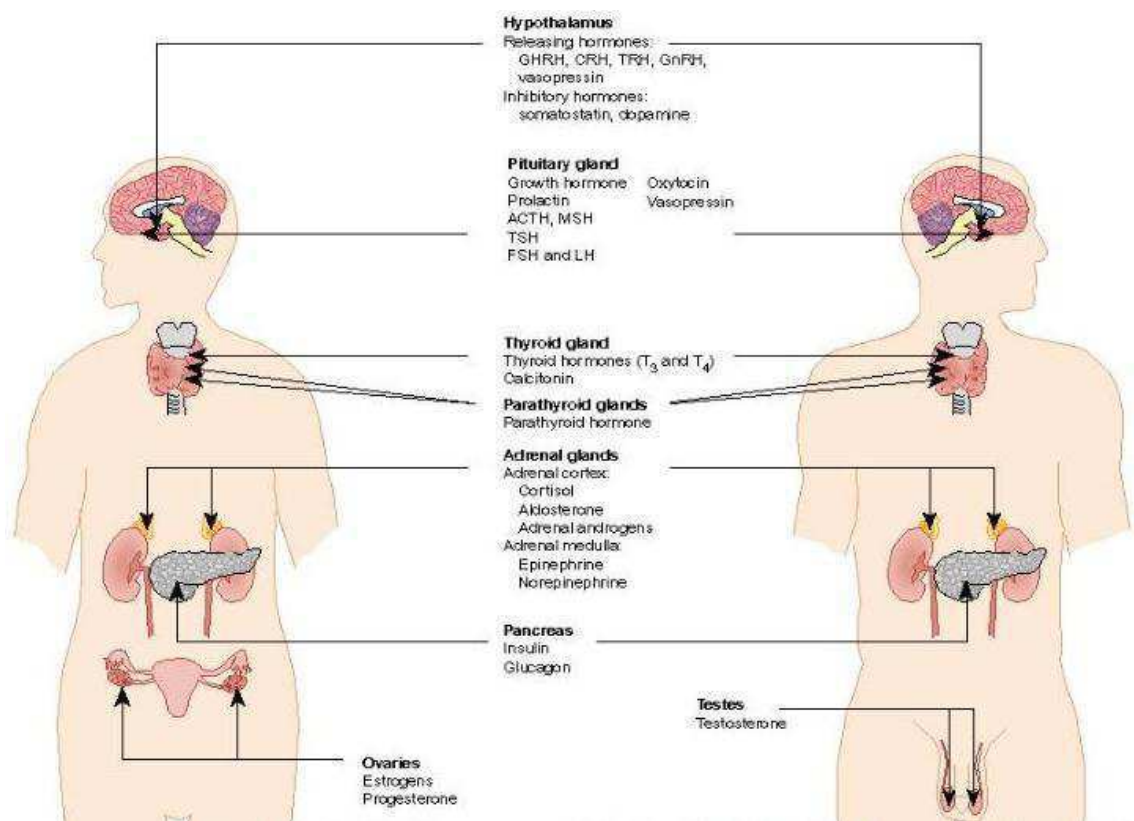
**FUNDAMENTAÇÃO  
TEÓRICA**

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 SISTEMA ENDÓCRINO

O sistema endócrino, em conjunto com o sistema nervoso, regula e controla todas as funções de nosso organismo (CORTEZ, 2008). O sistema endócrino comporta um conjunto de órgãos que atuam secretando hormônios, esses órgãos recebem o nome de glândulas endócrinas os hormônios sintetizados são secretados no sangue, que serve como veículo para a distribuição. Entretanto, esse termo vem adquirindo um significado mais amplo, sendo utilizado para designar qualquer molécula sinalizadora capaz de gerar respostas em determinada célula. (SILVERTHORN, 2010). A Figura 1 ilustra o sistema endócrino e seus hormônios.

**Figura 1** - Sistema endócrino e seus hormônios.

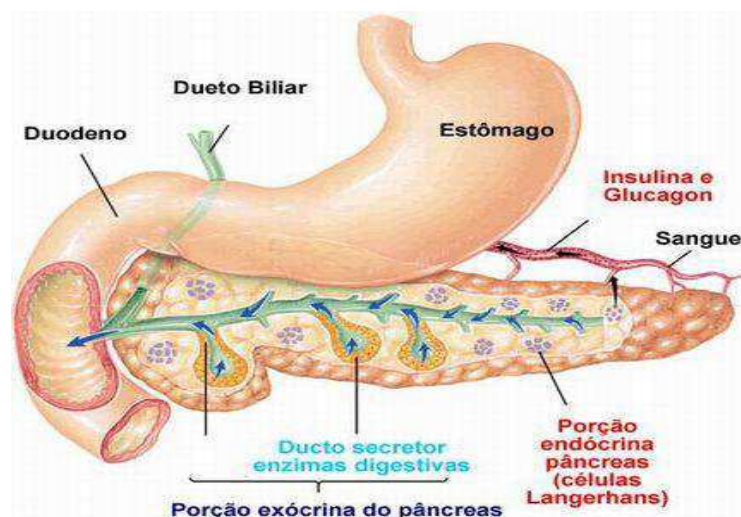


Fonte: <http://www.oup.co.uk/best.textbooks/medicine/humanphys/illustrations>, 2015.

### 3.2 PÂNCREAS

O pâncreas é glândula mista, cuja porção exócrina constitui 98% de seu volume e envolve a porção endócrina. Além da proximidade anatômica das duas porções, há uma interação morfológica e funcional entre ambas. A porção endócrina ou ilhotas de Langerhans é, por sua vez, constituída por quatro tipos celulares que produzem hormônios distintos e que tem uma interação parácrina, ou seja, um hormônio produzido por uma célula age sobre células vizinhas a ele; são elas: células  $\beta$  (61%) que produzem insulina, células  $\alpha$  (16%) glucagon, células  $\delta$  (9%) somatostatina e células produtoras do polipeptídeo pancreático (14%) (MENDES, et al., 2009). A Figura 2 ilustra o pâncreas.

**Figura 2 - Pâncreas**



**Fonte:** <http://www.diabetes.org.br/>, 2015

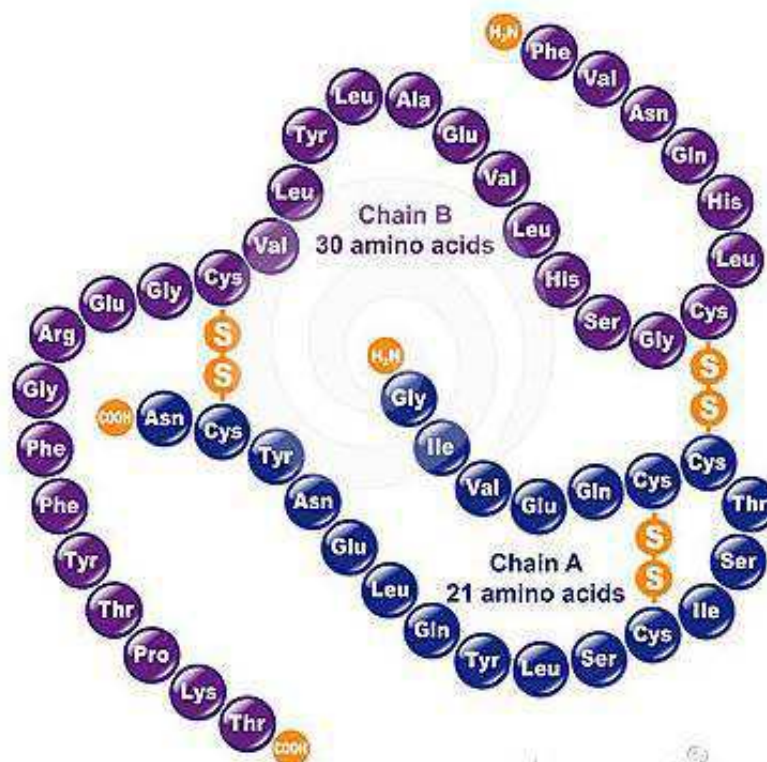
### 3.3 INSULINA

A descoberta da insulina em 1921 foi um dos mais importantes avanços da medicina, embora houvesse muitos efeitos colaterais, devido às impurezas. Na década de 60, utilizando um processamento mais apropriado para purificação houve uma atenuação dos efeitos colaterais e em 1978 juntamente com a tecnologia do DNA recombinante, foi introduzido o gene da insulina no genoma de uma bactéria fazendo com que ela reproduzisse uma insulina idêntica à humana (NEWS MEDICAL, 2013).

Hoje em dia, a insulina utilizada é de origem humana, fabricada a partir da técnica do DNA recombinante, utilizando uma cepa não patogênica da *Escherichia coli*. Há uma codificação e a insulina humana é introduzida na bactéria que é cultivada por fermentação, produzindo as cadeias A e B da insulina humana. Após purificação essas cadeias são reunidas, constituindo uma cadeia de insulina que é química, física e imunologicamente equivalente a do pâncreas humano (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007)

A insulina humana é um polipeptídeo formado por duas cadeias (alfa e beta) de aminoácidos, conectadas por pontes dissulfeto, com massa molar 5808. A cadeia  $\alpha$  possui 21 aminoácidos e a cadeia  $\beta$  30 aminoácidos. Seu precursor é a pré-pró-insulina, que após sofrer proteólise transforma-se em hormônio ativo. É o principal hormônio regulador do metabolismo energético é sintetizada pelas células beta das ilhotas pancreáticas (BLISS, 1983). A Figura 3 ilustra a insulina

**Figura 3 - Insulina**



**Fonte:** SMITH; MARKS; LIEBERMAN, 2007.



### 3.3.1 Tipos de Insulina

A média diária de insulina necessária para manutenção da terapia do paciente com diabetes tipo 2 é frequentemente mais baixa, por exemplo 0,3 a 0,6 UI/kg/dia, dependendo do paciente. Insulina Humana Recombinante - NPH também pode ser usada em combinação com agentes hipoglicemiantes orais (AHO) em diabetes do tipo 2, quando a terapia usando somente agentes hipoglicemiantes orais for insatisfatória no controle dos níveis de glicose sanguínea (NATHAN, 2009).

#### **Interações Medicamentosas**

Várias drogas são conhecidas por interagir com o metabolismo da glicose. Portanto, estas possíveis interações devem ser consideradas pelo médico.

#### **As seguintes substâncias podem reduzir as necessidades de insulina:**

Agentes hipoglicemiantes orais (AHO), octreotídeo, inibidores da monoamino oxidase (IMAO), agentes betabloqueadores não-seletivos, inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA), salicilatos, álcool, antibióticos sulfonamida, esteróides anabólicos, quinina, quinidina e agentes bloqueadores alfa-adrenérgicos (KOROLKOVAS, 2013).

#### **As seguintes substâncias podem aumentar as necessidades de insulina:**

Contraceptivos orais, tiazidas, glicocorticóides, hormônios da tireóide, simpatomiméticos, hormônio do crescimento, diazóxido, asparaginase, ácido nicotínico. Os agentes beta-bloqueadores podem mascarar os sintomas da hipoglicemia. O álcool pode intensificar e prolongar o efeito hipoglicêmico da insulina.

### 3.3.2 Armazenagem da Insulina

Manter os frascos-ampola, que não está utilizando dentro da embalagem original entre 2°C e 8°C, por até 24 meses, na geladeira, não muito próximos do compartimento do congelador. Se a insulina for congelada, não poderá mais ser utilizada.

O frasco-ampola que você estiver usando deve ser mantido, referencialmente, na geladeira, entre 2°C e 8°C. Mas também pode ser mantido em temperatura ambiente (até 25°C) por até 6 semanas .

O medicamento não deve ser exposto à luz solar direta ou a altas temperaturas. (KOROLKOVAS, 2013).

### 3.3.2 Distribuição e degradação da insulina

A meia-vida da insulina circulante em seres humanos é de aproximadamente 8 minutos e sua degradação dentro de aproximadamente uma hora após a sua liberação inicial na circulação, ocorrendo principalmente no fígado (NEWS MEDICAL, 2012).

Os efeitos da insulina sobre a glicose e o metabolismo lipídico ocorrem minutos após a exposição de células sensíveis a este hormônio. Desta forma, o início da ação da insulina após injeções endovenosas é muito rápido, mas de curta duração e sua depuração ocorre dentro de 1 hora (LAWRENCE, 1997).

Uma vez a insulina secretada no sangue, ela é removida quase tão rapidamente e, a seguir, degradada. O fígado é o maior responsável por isso. Por conseguinte a insulina circula durante menos de 10 minutos. Essa rápida destruição é importante porque, às vezes, é tão essencial que as funções do controle da insulina sejam interrompidas rapidamente, quão importantes é o rápido acionamento de sua atividade. (PESSIN; SALTIEL, 2000).

**Ação da insulina sobre o metabolismo dos carboidratos:** Logo após uma grande refeição com carboidratos, a glicose absorvida no sangue ocasiona rápida secreção de insulina. Essa, por sua vez, ocasiona rápida captação, armazenamento e uso da glicose, por quase todos os tecidos orgânicos, porém especialmente pelo fígado, pelos músculos e pelo tecido adiposo (CZECH; CORVERA, 1999).

Efeito da insulina na promoção da captação hepática, do armazenamento e uso da glicose: Um dos efeitos mais importantes da insulina é fazer com que a maior parte da glicose absorvida após a refeição seja armazenada quase que imediatamente. Então, entre as refeições, quando não existe insulina e a concentração de glicemia começa a cair, o glicogênio hepático é novamente desdobrado em glicose, que é liberada de volta ao sangue, para evitar que a concentração de glicemia caia demasiadamente. O mecanismo do qual a insulina ocasiona a captação e o armazenamento da glicose no fígado inclui várias fases quase simultâneas (OGG et. al., 1997):

- A insulina inibe a fosforilase, a enzima que faz com que o glicogênio seja desdobrado em glicose.
- A insulina determina o aumento da captação de glicose no sangue pelas células hepáticas. Ocasionalmente o aumento da atividade da enzima glicoquinase que é a enzima causadora da fosforilação inicial da glicose, após sua difusão nas células hepáticas. Uma vez fosforilada, a glicose é aprisionada no interior das células hepáticas, portanto a glicose fosforilada não pode difundir-se de volta através da membrana celular. Porém as células hepáticas são altamente permeáveis à glicose livre, de forma que novas quantidades de glicose continuam a difundir-se para o interior.
- A insulina aumenta a atividade das enzimas que promovem a síntese de glicogênio, incluindo a fosfofrutoquinase, que age na segunda fase de fosforilação da glicose, e a sintetase do glicogênio, que é responsável pela polimerização das unidades de monossacarídeos para formar as moléculas de glicogênio.
- O efeito final destas reações acima é aumentar a quantidade de glicogênio no fígado.

**Liberção de glicogênio no fígado entre as refeições:** Após o término da refeição e o início da queda de glicemia a baixos níveis, ocorrem, então, vários eventos que fazem com que o fígado libere a glicose de volta à circulação sanguínea (PUIGSERVER et. al. 2003).

- A diminuição da glicemia faz com que o pâncreas diminua a secreção da insulina.
  - A falta de insulina inverte, então, todos os efeitos assinalados antes para o armazenamento de glicogênio, interrompendo, praticamente, nova síntese de glicogênio no fígado. Isso impede, também, nova captação de glicose do sangue pelo fígado.
  - A falta de insulina ativa, também, a enzima fosforilase, que causa a degradação do glicogênio em fosfato de glicose.
  - A enzima glicose-fosfatase faz com que o radical fosfato separe-se da glicose e isso permite com que a glicose livre difunda-se de volta na corrente sanguínea.

**Ação da insulina sobre o metabolismo lipídico:** um dos efeitos mais rápidos e potentes é o armazenamento de gordura no tecido adiposo que ocorre da seguinte forma: a insulina promove a entrada de glicose nas células adiposas, e grande parte desta glicose é degradada imediatamente através da glicólise, com produção de glicerolfosfato no interior da célula. O glicerolfosfato tem alta afinidade para combinar-se com ácido graxo livre presente na célula adiposa, independente de sua origem, será depositada na forma de triglicerídio. Desta forma, a insulina inibe a mobilização de ácidos graxos livres e glicerol do tecido adiposo (FORETZ et. al., 1999).

**Ação da insulina no metabolismo protéico:** os principais efeitos da insulina no metabolismo protéico são: estimulação da síntese de enzimas hepáticas ligadas à síntese protéica; estimulação da entrada de aminoácidos na célula, independente do efeito sobre o transporte da glicose e estimulação da incorporação de aminoácidos para a formação de proteínas no fígado, músculo (SAKAKURA et al., 2001).

### 3.3.3 Distúrbios no metabolismo Insulina

A falta de ação insulínica resulta em diminuição da síntese de glicogênio (diminuição do glicogênio hepático e muscular) e também uma deficiência grave de absorção e utilização da glicose pelas células, em virtude da diminuição no transporte através da membrana celular. Ao mesmo tempo, ocorre aumento na glicogenólise, perda de glicose e queda de captação da glicose pelo fígado. Todos esses fenômenos levam a uma hiperglicemia e, conseqüentemente, ao aparecimento dos sinais e sintomas característicos do diabetes mellitus (CNOP et. al., 2005).

**Poliúria e Polidipsia:** a deficiência de insulina é acompanhada por uma diminuição na utilização da glicose, provocando hiperglicemia com conseqüente elevação da osmolaridade sanguínea e urinária. Quando a glicemia ultrapassa o limiar renal (aproximadamente 180mg/dl), a glicose é excretada através da urina. A glicosúria é acompanhada por perda de água e eletrólitos apresentando o paciente poliúria e conseqüentemente polidipsia.

**Astenia:** com a deficiência de insulina, a glicose não penetra nas células, levando à diminuição da glicólise, do oxalacetato e do ciclo de Krebs; a produção de ATP diminui drasticamente e o paciente apresenta astenia, característica do estado diabético.

**Polifagia:** a deficiência de insulina e a consequente diminuição da utilização da glicose como fonte principal de energia é responsável pelo aparecimento do quadro de inanição, pois mesmo o diabético apresentando níveis elevados de glicemia, a glicose não penetra nas células. Este quadro ativa o centro regulador do apetite no hipotálamo e o diabético apresenta polifagia.

**Corpos Cetônicos e Hálito Cetônico:** a deficiência ação da insulina com quadro de inanição instalado pela não utilização da glicose como fonte de energia obriga o organismo a uma mobilização intensa de ácidos graxos livres e glicerol para o sangue, provocando lipemia; isto, na tentativa de formação da acetil CoA através da beta oxidação dos ácidos graxos, o que levaria a um bom funcionamento do ciclo de Krebs e produção de energia.

O aumento na utilização de ácidos graxos origina grande produção de acetil CoA e NADH. O excesso de NADH resulta em queda na formação de oxalacetato. Por outro lado, ácidos graxos de cadeia longa unidos à CoA, provocam inibição da Citrato Sintetase. Esses fenômenos prejudicam a reação inicial do ciclo de Krebs e favorecem o acúmulo de acetil CoA. Como ácidos graxos de cadeia longa também inibem a acetil- CoA carboxilase (enzima que, na síntese de ácidos graxos, permite aproveitar a acetil CoA) resta ao organismo um único caminho metabólico para eliminação de excesso de acetil CoA formado: condensando duas moléculas de acetil CoA, formando acetoacetil CoA iniciando, assim a síntese dos corpos cetônicos (ácido acetoacético, ácido betahidroxibutírico e acetona).

Quando a deficiência de insulina é grave, a produção de corpos cetônicos pode ultrapassar a capacidade metabólica dos tecidos resultando em hipercetonemia. A eliminação dos corpos cetônicos na urina (cetonúria) contribui para perda de água e sua eliminação pelos pulmões é responsável pelo hálito cetônico nos diabéticos descompensados.

**Perda de Peso:** a deficiência insulina promove uma diminuição na síntese protéica, seja pelo aumento das enzimas gliconeogénicas ou por outros mecanismos; assim, um acelerado catabolismo proteico acontece. É evidente que

isto pode refletir no crescimento, na regeneração tecidual, na perda de massa muscular e defeito na secreção de hormônios protéicos. O aumento no catabolismo protéico também é responsável pela maior produção de nitrogênio urinário e aminoacidemia (GIACAGLIA, et al., 2010).

### 3.4 DIABETES MELLITUS TIPO 2

O diabetes mellitus tipo 2 é condição clínica geralmente insidiosa e que está associada à obesidade na maioria dos casos (80-85%). É o tipo de diabetes mellitus mais frequente em toda a população diabética, correspondendo a 90% das pessoas acometidas pela doença (FILHO et al., 2002). Caracteriza-se por defeitos na ação e secreção de insulina, pode ocorrer em qualquer idade, mas geralmente é diagnosticado após os 40 anos de idade (SBD, 2007). As pessoas com diabetes mellitus do tipo 2 apresentam também sobrepeso e obesidade e não necessitam de insulina exógena para a sobrevivência, mas podem necessitar durante o tratamento para a obtenção de controle metabólico adequado (FENNELL et al., 2008).

O diabetes mellitus tipo 2 está associado à chamada síndrome metabólica, que inclui, além de resistência à insulina com hiperglicemia, obesidade centrípeta, hipertensão arterial, dislipidemia, hiperuricemia, estado de hipercoagulabilidade, hiperhomocisteinemia e outros distúrbios metabólicos que levam à disfunção endotelial e progressão da aterosclerose (VALENSI et al., 2001).

Os usuários com diabetes mellitus tipo 2, frequentemente, apresentam uma série de fatores de risco para as doenças aterotrombóticas, entre os quais a dislipidemia que exerce o papel mais importante. O perfil lipídico mais comum nesses usuários consiste em hipertrigliceridemia e baixo HDL-C (SBD, 2007).

Outro fator importante é a presença da hipertensão arterial, sendo que 40% das pessoas já se encontram com hipertensão arterial quando do estabelecimento do diagnóstico da doença (SBD, 2007).

As alterações no estilo de vida, como a má alimentação e a redução da atividade física estão associadas ao acentuado aumento na prevalência do diabetes mellitus tipo 2.

Os programas de prevenção primária do diabetes mellitus tipo 2 estão fundamentados em intervenções relacionadas à alimentação saudável e à prática da atividade física, visando combater o excesso de peso.

O estudo denominado Diabetes Prevention Program Research Group mostrou redução de 58% na incidência de casos de diabetes mellitus quando introduzida dieta saudável e a prática de atividade física entre a população, sendo que essas intervenções foram mais efetivas do que o uso de metformina (DIABETES PREVENTION PROGRAM RESEARCH GROUP, 2002).

O Finnish Diabetes Prevention Study-DPS- mostrou que a redução do peso corporal em torno de 3 a 4 kg, em quatro anos, reduz a incidência do diabetes mellitus em 8% (TUOMILEHTO et al., 2001).

Reconhece-se que a maioria das pessoas acometidas por diabetes mellitus tipo 2 apresentam obesidade, hipertensão arterial sistêmica e dislipidemia. Cabe destacar que a hiperinsulinemia é o elo entre os distúrbios metabólicos, portanto, as intervenções terapêuticas devem abranger as múltiplas anormalidades metabólicas envolvidas no diabetes mellitus tipo 2 (SBD, 2007).

Estudo mostrou que o tratamento da hipertensão arterial é importante nos pacientes com diabetes mellitus, tanto para a prevenção da doença cardiovascular quanto para minimizar a progressão da doença renal e da retinopatia diabética (UKPDS, 1998).

Ao considerar que o tratamento da hipertensão arterial e a dislipidemia reduzem substancialmente o risco de complicações crônicas do diabetes mellitus é recomendado o controle rigoroso dos níveis de pressão arterial e de lipídios (VALENSI et al., 2001).

Nessa direção, a Organização Mundial da Saúde, recomenda que para o diabetes mellitus tipo 2, uma epidemia global, deve haver ações de prevenção e controle em nível primário e secundário, englobando todas as faixas etárias, classes sociais, raças e sexo (OPAS, 2007).

### **3.4.1 Diagnóstico do Diabetes mellitus tipo 2**

**Glicemia capilar** – considerada a glicemia capilar registrada para o usuário. Para avaliação dos resultados da glicemia capilar, são utilizadas as recomendações

da Sociedade Brasileira de Diabetes. Para glicemia de jejum, foram considerados os valores entre 90 a 120mg/dl; glicemia pré-prandial até 140mg/dl; glicemia pós-prandial até 180mg/dl (SBD, 2007).

**Glicemia plasmática de jejum** – considerada a glicemia plasmática de jejum registrada para o usuário. Para a avaliação dos resultados da glicemia plasmática de jejum, foram usadas as recomendações da Associação Americana de Diabetes. Com glicemia plasmática de jejum, foram considerados os valores entre 80 a 120mg/dl (ADA, 2009).

**Curva glicêmica ou teste de tolerância oral à glicose (TTOG)** – considerada a glicemia registrada para o usuário. Para avaliar a resposta do organismo em metabolizar a glicose após uma sobrecarga da mesma por via oral, foram usadas as recomendações da Associação Americana de Diabetes. Com glicemia de jejum, foram considerados os valores entre 110 a 140mg/dl (ADAM, 2009).

**Curva glicêmica sensibilizada pela Cortisona** – este teste é definitivo para diagnosticar o diabetes mellitus. Raramente é utilizado, sendo indicado apenas quando a curva glicêmica simples não é suficiente para fechar o diagnóstico, administrando cortisona e retirando amostras de sangue aos 60', 90' e 120' minutos, foram usadas as recomendações da Associação Americana de Diabetes. Com glicemia, foram considerados os valores a 60' não mais que 160mg/dl, 90' não mais que 140mg/dl e 120' não mais que 110mg/dl (ADAM, 2009).

### **3.4.2 Formas de tratamento do Diabetes Mellitus tipo 2**

O tratamento não medicamentoso para prevenção da pressão arterial, obesidade e dislipidemia tem baixo custo para o usuário e envolve a redução do peso corporal, o incremento da atividade física, a moderação no consumo de sal, do álcool e o abandono do fumo. Por outro lado, quando os usuários com diabetes mellitus são considerados de alto risco para eventos cardiovasculares, apresentando valores de pressão arterial maior que 130 x80mmHg, recomenda-se também, o uso de medicamento protetor (ADAM, 2009).



Estudos demonstram que as complicações crônicas do diabetes mellitus podem ser prevenidas, ou postergadas, com melhor controle glicêmico e tratamento concomitante para outros fatores de risco cardiovascular (UKPDS,1998).

O consumo de alimentos em quantidade e qualidade adequadas, a regularidade da atividade física, o uso correto dos medicamentos, a monitorização da glicemia capilar no domicílio, o cuidado com os pés e a manutenção dos valores glicêmicos e lipídicos, e da pressão arterial dentro de parâmetros de normalidade contribuem para a adesão do usuário com diabetes mellitus ao tratamento medicamentoso e não medicamentoso.

Nessa direção, os profissionais de saúde devem fornecer as ferramentas necessárias para o manejo da doença. Dentre as ferramentas, destaca-se o conhecimento da doença e a prontidão do usuário com diabetes mellitus para a tomada de decisão no cotidiano frente às demandas impostas pela doença.

### 3.5 BIOMATERIAIS

Os biomateriais são materiais desenvolvidos com o propósito de interagir com a interface de sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função no corpo humano, produzido ou modificado artificialmente. Deve apresentar características e propriedades tais como biocompatibilidade, biofuncionalidade e não deve alterar o meio biológico nem reagir com o sangue (HENCH, 1998).

São utilizados desde as civilizações mais antigas. Os biomateriais podem ser classificados, quanto ao tipo de material, em sintéticos (cerâmicos, metais, polímeros sintéticos), naturais (colágeno, queratina, polissacarídeos) e compósitos (compostos por mais de um tipo de material). Aplicam-se em diferentes campos como: próteses em ortopedia ou cirurgias cardiovasculares, órgãos artificiais, materiais para reparação de tecidos e sistemas de liberação de fármacos (SILVER; DOILLON,1989; SCHILLING et al., 2004).

Silver e Doillon (1989) realçam as características principais na seleção dos materiais a serem utilizados em organismo vivo, como: biocompatibilidade, estabilidade química, estabilidade mecânica adequada, peso, densidade e forma

adequados ser relativamente barato, reprodutível e de fácil fabricação e ser biofuncional, ou seja, desempenhar a função para a qual foi projetado com o máximo de eficiência.

A biocompatibilidade é a capacidade de um material dar uma resposta tecidual adequada numa aplicação específica, não causando reação inflamatória crônica, reação de corpo estranho ou toxicidade, podendo ser reabsorvido ou substituído por tecido natural (WILLIAMS, 2008; SANTOS; WADA, 2007).

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

O termo biopolímeros contemplam materiais classificados em dois grupos: (a) polímeros produzidos por sistemas biológicos como microrganismos, plantas e animais e (b) polímeros que são sintetizados quimicamente, mas são derivados de materiais biológicos iniciais, como aminoácidos, açúcares, gorduras naturais ou óleos (U.S.CONGRESS, 1993). Biomateriais à base de quitosana são uma realidade na área da saúde, e sua aplicabilidade vem sendo pesquisada em diversas formas e campos.

### 3.6 QUITINA E QUITOSANA

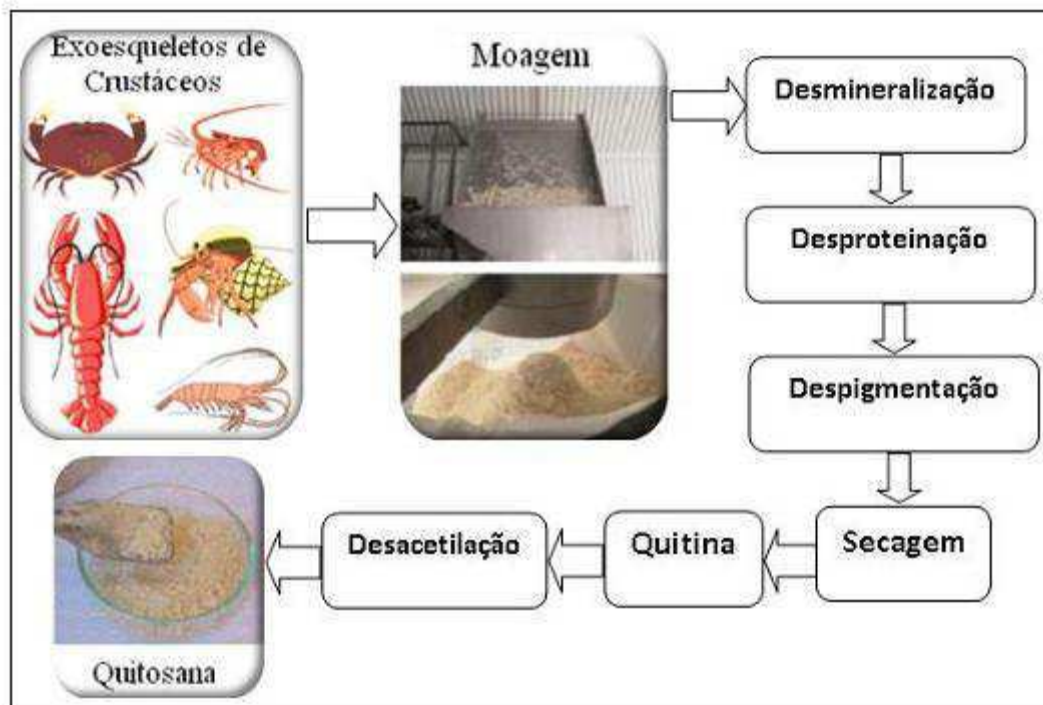
Descoberta no ano de 1859 por Rouget, a quitosana é um biopolímero hidrofílico obtido a partir da quitina, termo derivado da palavra grega *Khitón* - que significa carapaça, casca ou caixa de revestimento, e que designa um polissacarídeo abundante na natureza, perdendo apenas para a celulose em quantidade produzida anualmente (CRAVEIRO; CRAVEIRO, 1999; SENEL; MCCLURE, 2004).

Quitina e quitosana são polímeros atóxicos, biodegradáveis, biocompatíveis e produzidos por fontes naturais renováveis, cujas propriedades vêm sendo

exploradas em aplicações industriais e tecnológicas há quase setenta anos (ROBERTS, 1992).

Azevedo e colaboradores (2011), descrevem sobre o processo de separação da quitina e outros componentes do exoesqueleto dos crustáceos através do uso de soluções diluídas de HCl e NaOH para a desmineralização e desproteíntização respectivamente, sendo seguida da descoloração (despigmentação). Após esse processo a quitina é desacetilada (NaOH) para produzir a quitosana. A representação esquemática das etapas de obtenção da quitosana está representada na figura abaixo. A Figura 5 ilustra a obtenção da quitosana.

Figura 4 - Representação esquemática da obtenção da quitosana.

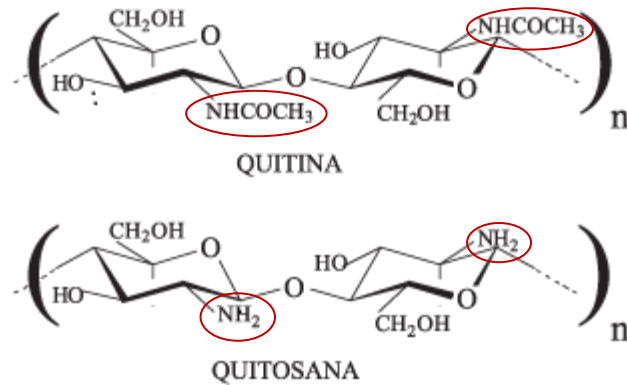


Fonte: MELO, 2010.

A desacetilação da quitina leva à obtenção de quitosana, seu mais importante derivado, cuja estrutura primária é idêntica à da quitina a não ser pelo fato que em quitosana predominam as unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose. De fato, a completa desacetilação da quitina raramente é realizada, pois são necessárias muitas reações consecutivas, que também favorecem a sua progressiva despolimerização. Assim, o termo quitosana abrange o conjunto de copolímeros que contém ao menos 50-60% de unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose, como

pode ser visualizada a fórmula química na Figura 5 da quitina e quitosana (ABRAM HIGUERA, 2004; ROBERTS, 1992).

**Figura 5** - Representação da fórmula química da quitina e da quitosana.



**Fonte:** Adaptado: BATTISTI; CAMPANA-FILHO, 2015.

A desacetilação da quitina realizada por processos químicos onde a quitina é suspensa em soluções aquosas concentradas de NaOH ou KOH (40 – 60%) por tempo variável (0,5 – 24h) e a temperaturas relativamente elevadas (50 – 130°C). As características da quitosana obtida são determinadas pela concentração da solução alcalina e razão quitina/solução alcalina, tamanho das partículas de quitina, temperatura, tempo e atmosfera de reação (CAMPANA FILHO et. al, 2007).

A quitosana, como biopolímero, vem se destacando por ser biodegradável e bioabsorvível, sendo seus produtos de degradação atóxicos, não imunogênicos e não carcinogênicos (MUZZARELLI et al., 1997).

Pesquisadores de diversas áreas, principalmente a médica e a farmacêutica, tem encontrado na quitosana um biomaterial com grande potencial. Substância com a capacidade de formar interações químicas com materiais hidrofóbico e aniônico (BIAGINI et al., 1992).

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

A adição de gelatina na composição de membranas de quitosana tem aumentado as características umectante e de adesão das mesmas (SILVA, 2013).

### 3.7 GELATINA

A gelatina é um biopolímero de origem animal, biocompatível, biodegradável, solúvel em pH fisiológico, formado por aminoácidos derivados do colágeno, que por sua vez é uma proteína encontrada na maioria dos seres vivos, apresentando composição diferente entre os répteis, peixes. Ela é responsável em manter a integridade física de várias partes do organismo como cartilagens, ossos, dentes, pele, entre outras (ALMEIDA, 2012)

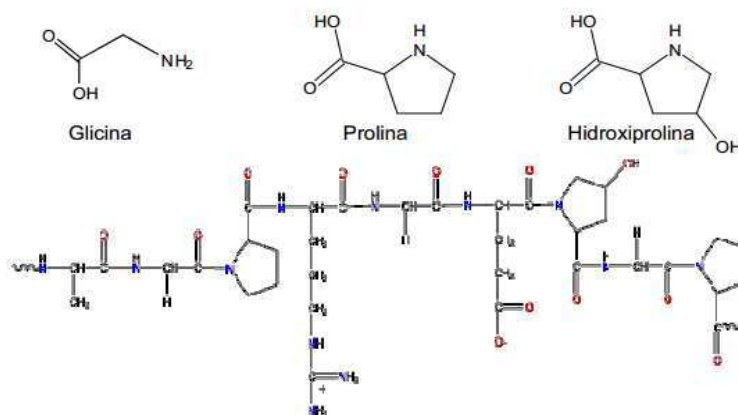
A gelatina é utilizada em indústrias de alimentos, farmacêuticas e cosméticas, principalmente devido a sua capacidade de formar géis termoreversíveis (SEGTMAN; ISAKSSON, 2004)

É uma proteína formada principalmente pelos aminoácidos glicina, prolina e hidroxiprolina obtida pela hidrólise (ácida ou alcalina) do colágeno sendo denominada de colágeno hidrolisado e diferente daquele, é solúvel. A Figura 6 ilustra os principais aminoácidos da gelatina (DJAGNY, 2001).

A interação da gelatina com quitosana é possível para formulação de membranas, pois tanto a gelatina como a quitosana são biopolímeros hidrofílicos com boa afinidade e compatibilidade (RIVERO; GARCÍA; PINOTTI, 2009).

A gelatina associada a quitosana é de grande importância para utilização em sistema de liberação controlada de insulina.

**Figura 6** - Estrutura dos principais aminoácidos da gelatina.



Fonte: DJAGNY, 2001

### 3.8 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

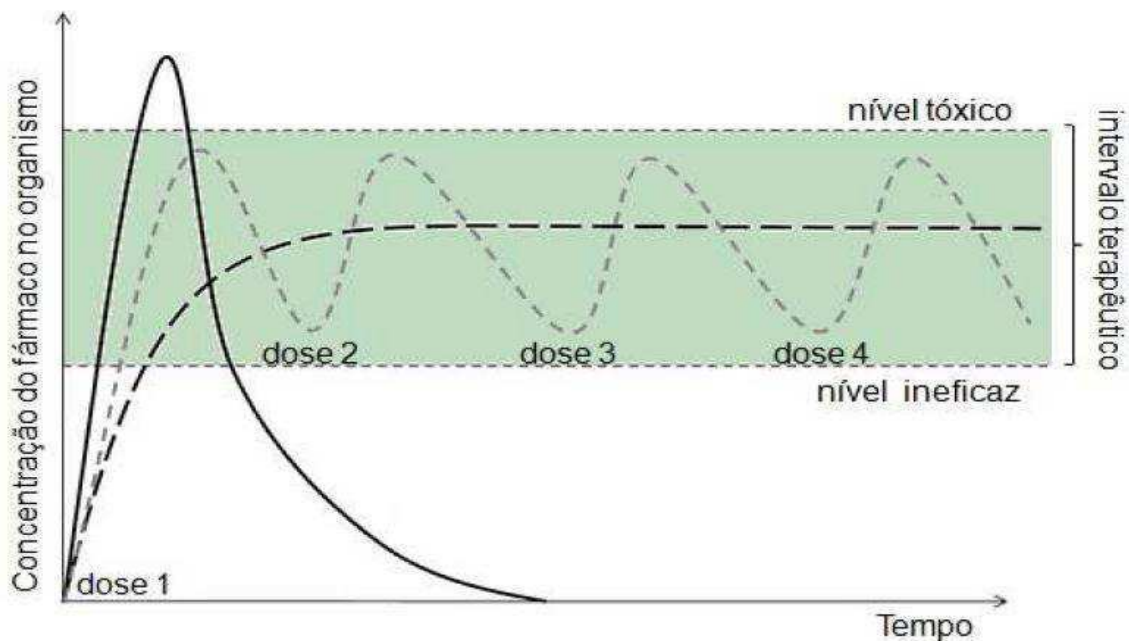
A finalidade de um sistema de administração de fármacos é fornecer o fármaco para o local adequado do corpo, mantendo-o dentro da concentração desejada. Compreende-se que um sistema de liberação controlada de fármacos, preparada adequadamente, constitui-se um importante avanço na direção da solução destes dois problemas (LEE; ROBINSON, 2004).

Os sistemas poliméricos de liberação controlada de fármacos têm sido pesquisados em detalhes nos últimos 30 anos. Apresenta a vantagem de manter o fármaco por mais tempo dentro da janela terapêutica (Figura 7) reduzindo a possibilidade de níveis tóxicos ou sub terapêuticos. Desta forma, minimiza os efeitos colaterais e diminui o número de doses requeridas além de promover a aproximação da secreção fisiológica de alguns hormônios (SOUZA, 2006).

Os fármacos possuem uma faixa de ação terapêutica, acima da qual ela é tóxica e abaixo da qual é ineficaz, as dosagens administradas determinam os níveis plasmáticos. Observe-se que a concentração do fármaco na corrente sanguínea na administração em dose única, apresenta um aumento na concentração, até atingir um pico máximo e então diminui: neste momento, é necessária uma nova dose, para que a concentração volte a se elevar. Se houver variação na administração, a concentração pode ficar abaixo do intervalo terapêutico, ou seja, abaixo do nível eficaz ou acima do nível tóxico. No sistema de liberação controlada de fármacos ocorre a manutenção da concentração do fármaco em níveis eficazes por um tempo prolongado, utilizando-se de uma única administração (ALLEN, 2007).

A quitosana, por ser um biomaterial seletivamente permeável, surgiu como bom candidato a meio de liberação de fármacos no meio gastrointestinal e na mucosa oral. Os estudos realizados têm apresentado resultados que corroboram o uso da quitosana nesta aplicação, visto que explicitam as qualidades dessa substância como agente de cobertura para encapsulamento possibilitando o uso em sistemas de liberação de fármacos, principalmente quando se necessita de liberação lenta e controlada (PANKAJ, 2011).

**Figura 7** - Perfil de liberação de fármacos convencional e controlada em função do tempo.

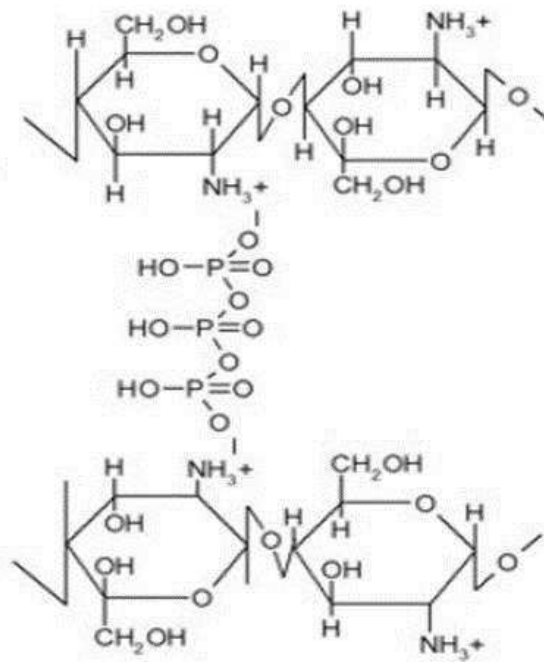


Fonte: Adaptado de LIMA, (2010).

### 3.9 TRIPOLIFOSFATO DE SÓDIO (STPP)

O tripolifosfato de sódio é um sal multivalente e atóxico que vem sendo estudado como agente reticulante alternativo ao glutaraldeído (considerado antigênico). O STPP tem o objetivo de melhorar as propriedades mecânicas e variar a taxa de degradação. Eles permitem a formação de ligações cruzadas com a cadeia polimérica principal, favorecendo a obtenção de rede além de bloquear os grupos amino com um agente bifuncional, aumenta assim a resistência das membranas e a degradação em condições fisiológicas (COSTA, 2008). Ele pode reticular a quitosana, formando um gel, pela interação iônica entre suas cargas negativas e as cargas positivas dos grupamentos amino da quitosana (CALVO et. al, 1997). Essa interação está ilustrada na Figura 8.

**Figura 8** - Interação entre o STPP e a quitosana.



Fonte: AZEVEDO et.al, 2011.





## **MATERIAIS E MÉTODOS**

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 LOCAL DA PESQUISA**

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

### **4.2 MATERIAIS**

#### **4.2.1 Biopolímero**

- Quitosana–75-85% desacetilada, fornecida pela SigmaAldrich®.
- Gelatina - fornecida pela SigmaAldrich®.

#### **4.2.2 Reagentes**

- Ácido Acético Glacial (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>) - Vetec®QuímicaFina Ltda com grau analítico. Lote 0801000.
- Hidróxido de Sódio (NaOH)- Vetec®Química Fina Ltda com grau analítico, massa molar 39,9971 g/mol. Lote 08071098.
- Insulina NPH –Insulina Humana comercial líquida - Novolin N, fabricada pelo laboratório Novo Nordisk Farmacêutica do Brasil Ltda.
- Tripolifosfato de Sódio - Sigma Aldrich®.

### **4.3. MÉTODOS**

#### **4.3.1 Preparo das membranas**

As membranas de quitosana foram preparadas pelo método de liofilização, através da dissolução do polímero em uma solução de ácido acético (1% v/v), para uma concentração final da solução polimérica 1% (m/v), sob agitação magnética com aquecimento (50°C) por um período de 24 horas.

Parte da solução foi neutralizada através do gotejamento de hidróxido de sódio a 1M (para esta solução, foram dissolvidos 40 gramas da base em 500 ml de água destilada e posteriormente adicionado o mesmo solvente até o volume final de 1000 ml) com aferição constante do pH (uso do pHmetro calibrado com as soluções padrão) até que ficasse entre de 6 -7; e a outra parte da solução de quitosana a 1% permaneceu sem neutralização.

#### **4.3.2 Incorporação da Insulina**

A solução de quitosana foi distribuída em placas de Petri (5,5 cm) e a insulina foi adicionada em cada placa, de modo que, ao final, para cada 10 ml de quitosana tinha-se 2ml (100 UI) de insulina. A insulina foi delicadamente misturada à quitosana com a utilização de um bastão vidro. Em seguida as placas foram colocadas no ultra freezer, a -65°C, para secagem e liofilização.

#### **4.3.3 Incorporação de Gelatina**

Optou-se por colocar a gelatina em pó nas proporções de 1%, 3% e 5% do percentual da quitosana 1% (com e sem neutralizador) sob agitação magnética com aquecimento (50°C) por um período de aproximadamente 15 minutos até a completa dissolução da mesma após vertida em placas de Petri para posterior incorporação da insulina.

#### **4.3.4 Incorporação do Tripolifosfato de Sódio (STPP) nas membranas de quitosana**

A solução de tripolifosfato de sódio 2% (m/v) foi preparada dissolvendo-se 20 gramas do sal em 500 ml de água destilada e, em seguida, aumentando o volume para 1000 ml com o mesmo solvente.

Todas as membranas produzidas foram reticuladas com STPP. Elas foram colocados na placa de petri contendo solução de tripolifosfato de sódio 2% (m/v), pH 8,5, por um período de 30 minutos (Figura 13). Em seguida, foram realizadas diversas lavagens com água destilada a fim de alcançar o pH de 6,0 a 6,2. As

medidas do pH foram realizadas em um pHmetro digital previamente calibrado com as soluções padrão. Uma vez ajustado o pH as placas de petri contendo as membranas tinham os espaços remanescentes preenchidos com água destilada e acondicionados no ultra-frezer com temperatura aproximada de  $-70^{\circ}\text{C}$  por 24h. Após este período, as placas foram colocadas no liofilizador por 72h (BORBA, 2015). Na Tabela 1 observam-se as identificações adotadas neste experimento para as diferentes variáveis das amostras confeccionadas.

**Tabela 1** - Descrição das amostras.

<b>Amostras</b>	<b>Descrição</b>
<b>QsN</b>	Quitosana sem neutralização
<b>QsNcG</b>	Quitosana sem neutralização com Insulina e Gelatina 3%
<b>QsNcGI 3%</b>	Quitosana sem neutralização com Insulina e Gelatina 3%
<b>QsNI</b>	Quitosana sem neutralização com Insulina
<b>QNsG</b>	Quitosana neutralizada sem Gelatina
<b>QNsGI</b>	Quitosana neutralizada sem Gelatina com Insulina
<b>QNcG 1%</b>	Quitosana neutralizada com Gelatina 1%
<b>QNcG 3%</b>	Quitosana neutralizada com Gelatina 3%
<b>QNcG 5%</b>	Quitosana neutralizada com Gelatina 5%
<b>QNcGI1%</b>	Quitosana neutralizada com Insulina e Gelatina 1%
<b>QNcGI 3%</b>	Quitosana neutralizada com Insulina e Gelatina 3%
<b>QNcGI 5%</b>	Quitosana neutralizada com Insulina e Gelatina 5%

Fonte: Própria

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO

Todas as membranas foram analisadas nos dois lados através dos seguintes ensaios: Microscopia Óptica – MO, Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV com Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X – EDS, Difração de raios-X (DRX), Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), todas as análises foram realizadas no Laboratório de Desenvolvimento e Avaliação de Biomateriais (CERTBIO).

#### **4.4.1 Microscopia Ótica - MO**

As superfícies das amostras foram analisadas através de um Microscópio Ótico 2D de reflexão e transmissão conectado ao monitor de vídeo marca HIROX modelo kh-8700, com magnificação de 350x.

#### **4.4.2 Difração de raios X (DRX)**

As análises de difração de raios X serão foram conduzidas a temperatura ambiente em aparelho XRD-7000 Shimadzu, utilizando radiação  $K\alpha$  do cobre (1,5418 Å), tensão de 40 kV e corrente 30 mA. As membranas de quitosana foram examinadas em um intervalo de  $2\theta$  entre 1,5 e 30,0 graus a uma velocidade de 1°/min.

#### **4.4.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

A técnica de FTIR em modo de absorbância será utilizada para caracterizar os materiais, quitosana, insulina, gelatina, STPP e membranas confeccionados.

As análises utilizando a técnica de espectroscopia na região de infravermelho com transformada de Fourier das membranas serão realizadas em temperatura ambiente e o equipamento utilizado será um Spectrum 400 da Perkin Elmer. A técnica FTIR será usada para identificar as bandas características dos grupos funcionais presentes nas matérias primas utilizadas nesta pesquisa, utilizando a faixa de varredura de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$  (FOOK, 2012).

#### **4.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) / Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDS)**

É uma técnica capaz de produzir imagens com alta magnificação (até 300.000 X) e resolução. A microscopia eletrônica analisa o material varrendo-o com um feixe de elétrons que interage com a superfície da amostra fornecendo, informações sobre

a morfologia e topográfica das superfícies de sólidos, sendo uma técnica útil no estudo da topografia de superfícies (FOOK, 2005).

As amostras foram analisadas em um microscópio eletrônico de varredura (MEV), Phenon TM Pro X, com a finalidade de observar a morfologia de todas as membranas obtidas e compará-las, quando submetidas a aumentos de 150, 1000 e 2000x.

As análises por espectroscopia por energia dispersiva de raios X foram realizadas no equipamento Phenon TM Pro X. Um detector instalado na câmara de vácuo do MEV mede a energia associada aos elétrons da amostra, como os elétrons de um determinado átomo possuem energias distintas, foi possível determinar quais elementos químicos estavam presentes na amostra.



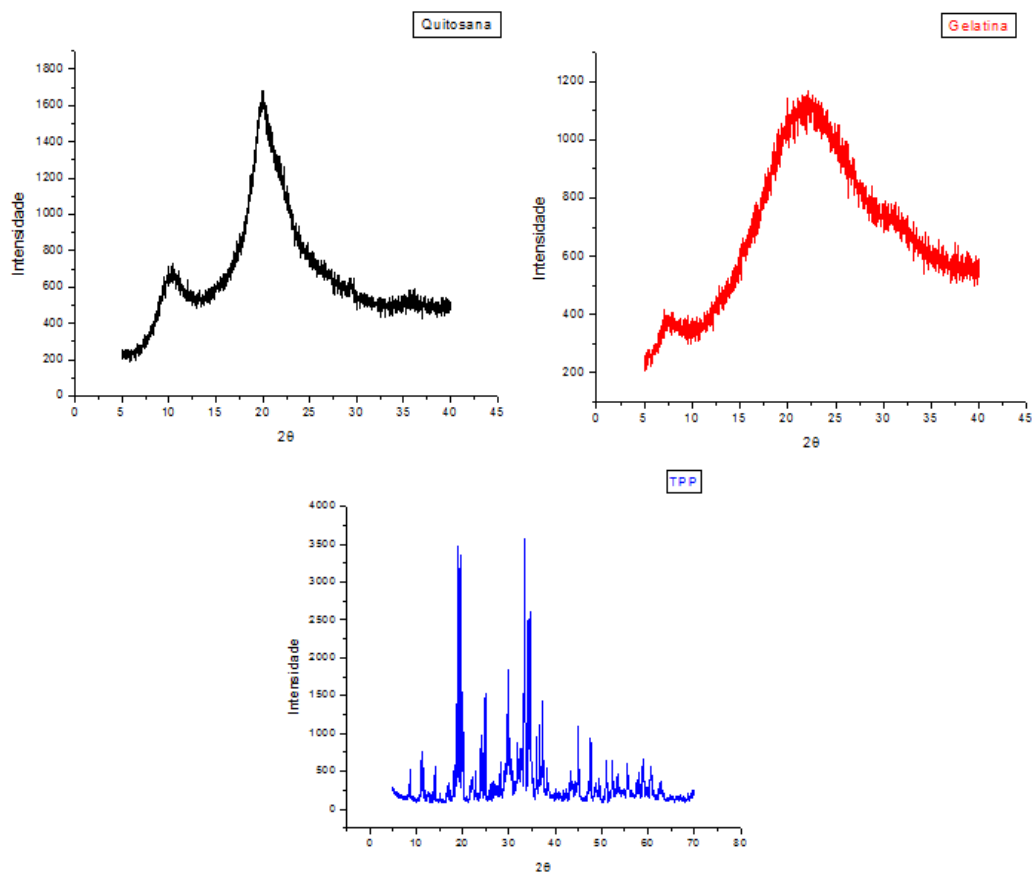
## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 DIFRAÇÃO DE RAIOS X

Todas as membranas de quitosana produzidas sem e com a gelatina e a insulina foram caracterizadas por difração de raios X com a finalidade de observar a influência da gelatina e da insulina na cristalinidade e conseqüentemente nas propriedades das membranas como observado na Figura 9.

**Figura 9** - Difração de raios x do pó de quitosana, da gelatina e do tripolifosfato.



**Fonte:** Própria

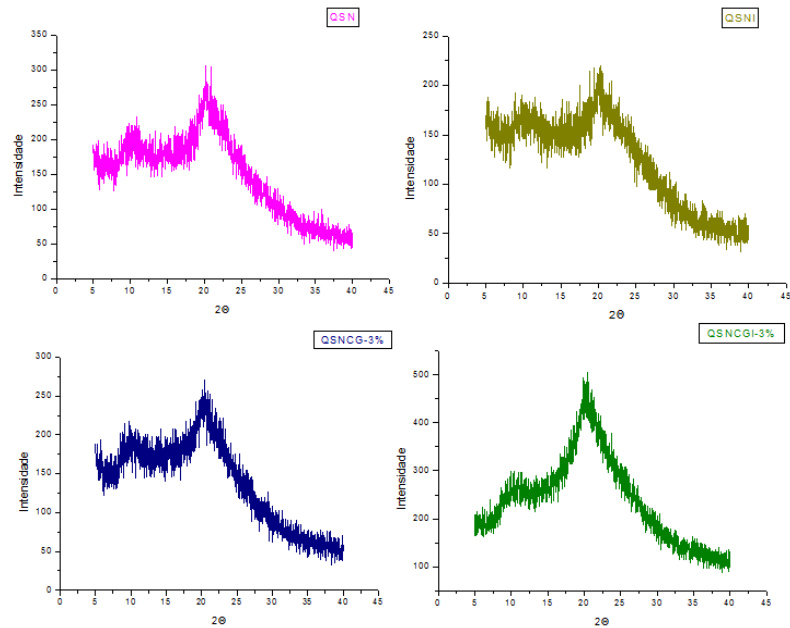
O difratograma da membrana de quitosana apresentou um comportamento típico de materiais semicristalinos, com base larga em torno de  $2\theta = 10^\circ$  e  $2\theta = 20^\circ$  que corroboram com Fidèles, (2010). Na gelatina também foram observados picos típicos característicos de material parcialmente cristalino, centrados em  $2\theta = 22^\circ$  e pico em  $2\theta = 8^\circ$  com menor intensidade.



No difratograma do STPP observa-se que o mesmo apresenta vários picos no intervalo  $2\theta = 10 - 70^\circ$ , caracterizando o material como cristalino.

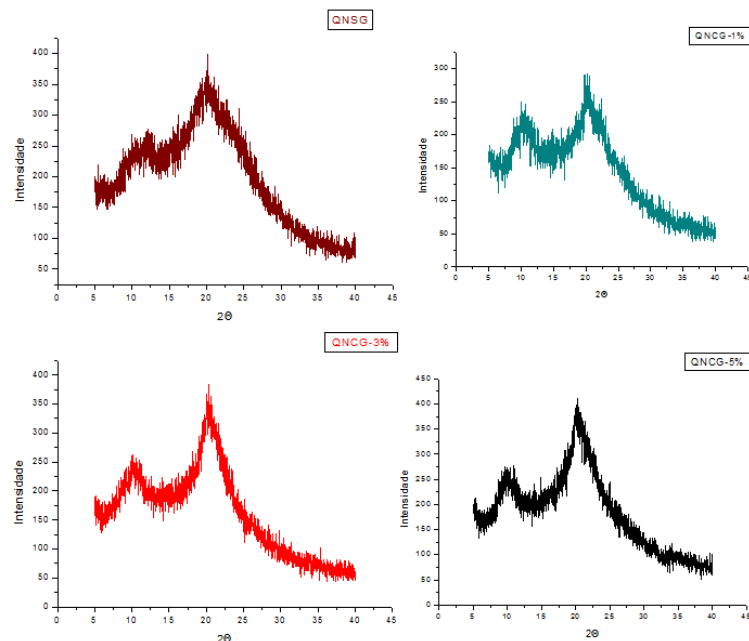
Na Figura 10 observam-se os difratograma dos arcabouços de quitosana sem neutralização, com insulina e gelatina.

**Figura 10** – Difração de raios X das membranas de quitosana com Tripolifosfato de sódio, insulina e gelatina.



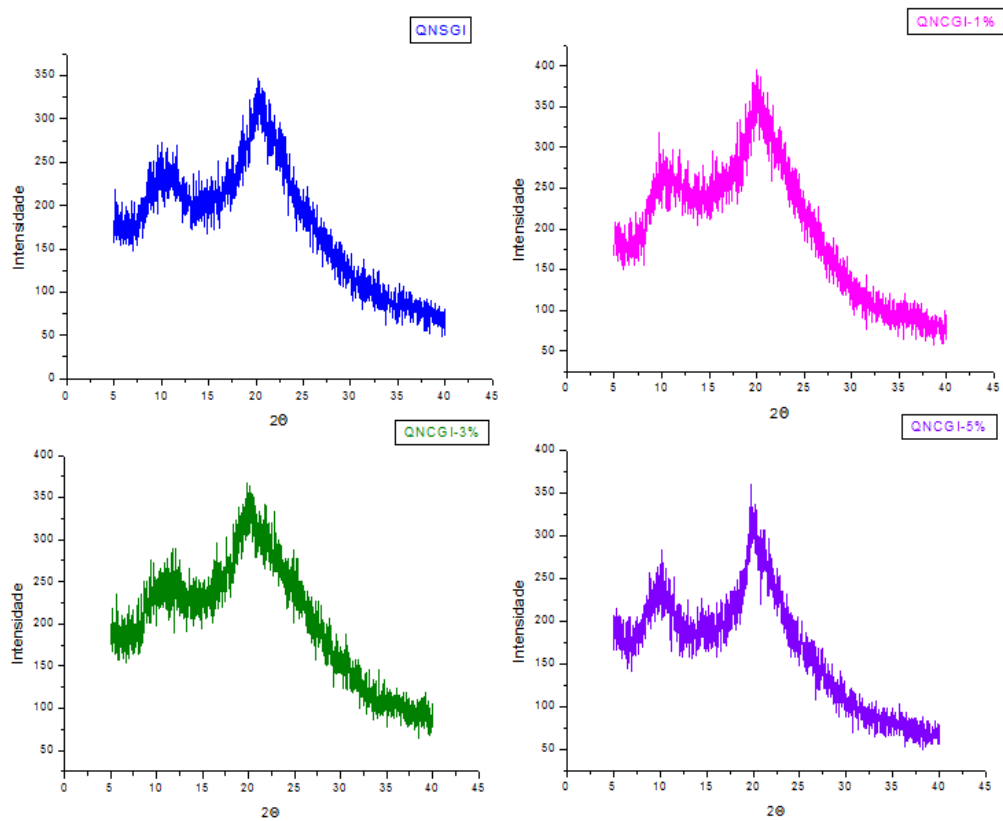
Fonte: Própria

**Figura 11** – Difração de raios X das membranas de quitosana com Tripolifosfato de sódio, insulina e gelatina



Fonte: Própria

**Figura 12** – Difração de raios X das membranas de quitosana com Tripolifosfato se sódio, insulina e gelatina.



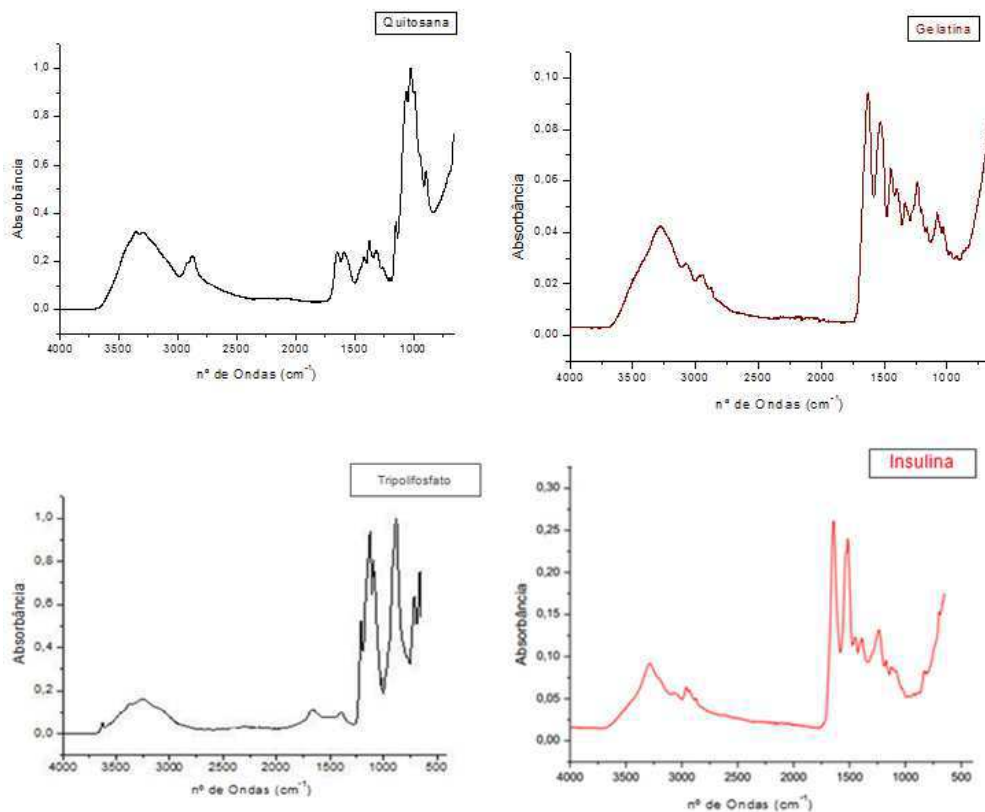
Fonte: Própria

Não foram observadas alterações significativas no perfil cristalino das membranas com gelatina e insulina.

## 5.2 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

A técnica de FTIR foi utilizada com o objetivo de identificar bandas características dos grupos funcionais obtidos das membranas de quitosana com e sem insulina e também com diferentes concentrações de gelatina. De acordo com a Figura 13, pode-se afirmar que a adição de insulina nas membranas de quitosana com gelatina provocou alteração no perfil das membranas quando comparada a de quitosana pura, indicando a presença de gelatina e de insulina nas mesmas.

**Figura 13** – Espectro do pó da gelatina e das membranas de quitosana sem e com gelatina e com insulina.



Fonte: Própria

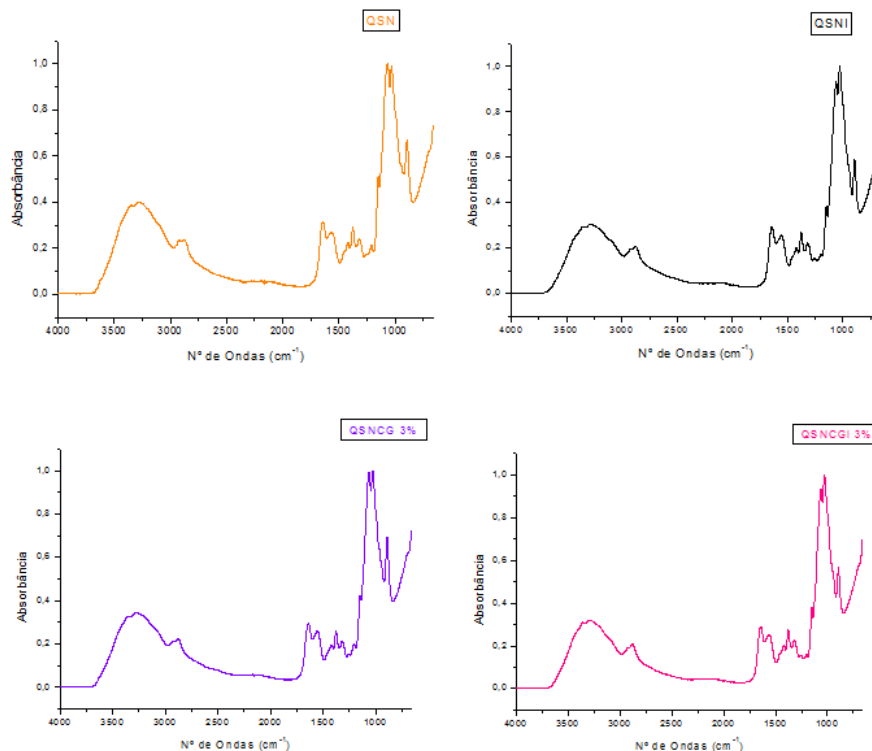
No espectro da quitosana, a banda em torno de  $3332\text{ cm}^{-1}$  é referente ao estiramento axial de OH, sobreposta à banda de estiramento N-H. A banda em  $2885\text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento assimétrico do grupo C-H. A banda em  $1646\text{ cm}^{-1}$  está associada à deformação axial C=O da amida primária. A banda em  $1581\text{ cm}^{-1}$  é referente a deformação vibracional do grupo amina protonado ( $\text{NH}_3^+$ ). A banda em  $1379\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída à deformação axial - CN de grupos amino. A banda intensa em  $1016\text{ cm}^{-1}$  está associada ao estiramento C-O-C dos anéis piranosídicos.

O espectro referente a gelatina apresentou bandas características em  $1656\text{ cm}^{-1}$ , típica de amida I, devido ao estiramento da carbonila; em  $1556\text{ cm}^{-1}$ , relacionado à amida II, devido às vibrações no plano da ligação N-H e ao estiramento C-N; em  $1229\text{ cm}^{-1}$ , correspondem as vibrações no plano da amida III, devido ao estiramento C-N e a deformação N-H; em  $1454\text{ cm}^{-1}$ , correspondente a estereoquímica dos anéis pirrolidínicos e próximo a  $3268\text{ cm}^{-1}$ , devido ao estiramento O-H e corrobora com Sionkowska et al., (2004).

O espectro de FTIR da insulina (Figura 13) ilustra duas intensas bandas de absorção referentes à amida I em  $1642\text{ cm}^{-1}$  e a amida II em  $1512\text{ cm}^{-1}$  e estão de acordo com Holanda (2011) e Sarmiento et al (2006) que encontraram resultados semelhantes em seu estudo sobre desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de polissacarídeos contendo insulina e filmes de quitosana com insulina, respectivamente.

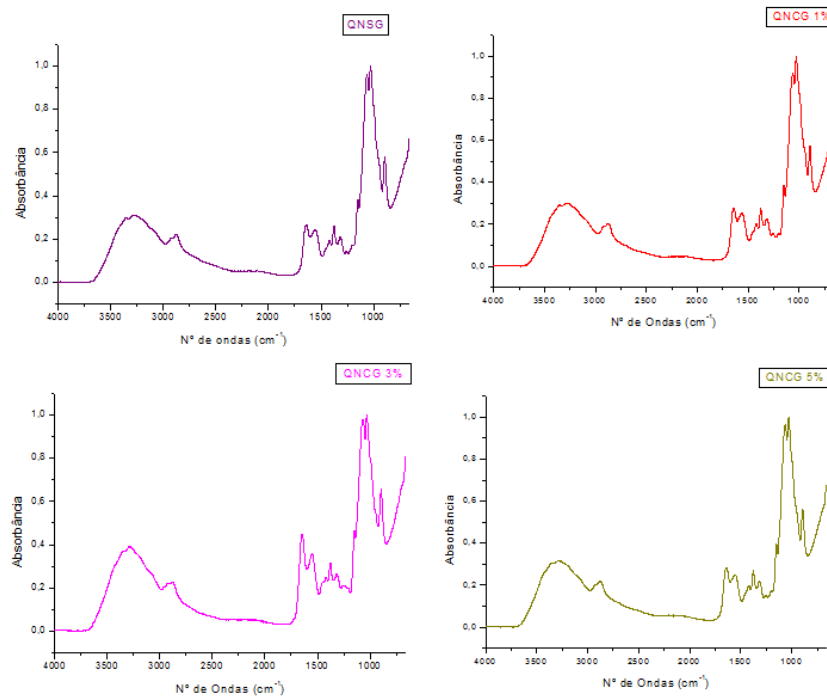
Observando-se a Figura 13, referente ao espectro de FTIR do Tripolifosfato de Sódio (TPP), as seguintes bandas características foram percebidas:  $1210\text{ cm}^{-1}$  (estiramento P=O),  $1137\text{ cm}^{-1}$  (vibrações de estiramento simétricas e antisimétricas no grupo  $\text{PO}_2$ ),  $1095\text{ cm}^{-1}$  (vibrações de estiramento simétricas e antisimétricas no grupo  $\text{PO}_3$ ),  $888\text{ cm}^{-1}$  (estiramento antisimétrico P-O-P). Esses resultados corroboram o encontrado por Holanda (2011) em seu estudo sobre a obtenção de membranas de quitosana com insulina para liberação de fármaco.

**Figura 14** - Espectro do pó da gelatina e das membranas de quitosana sem e com gelatina e com insulina.



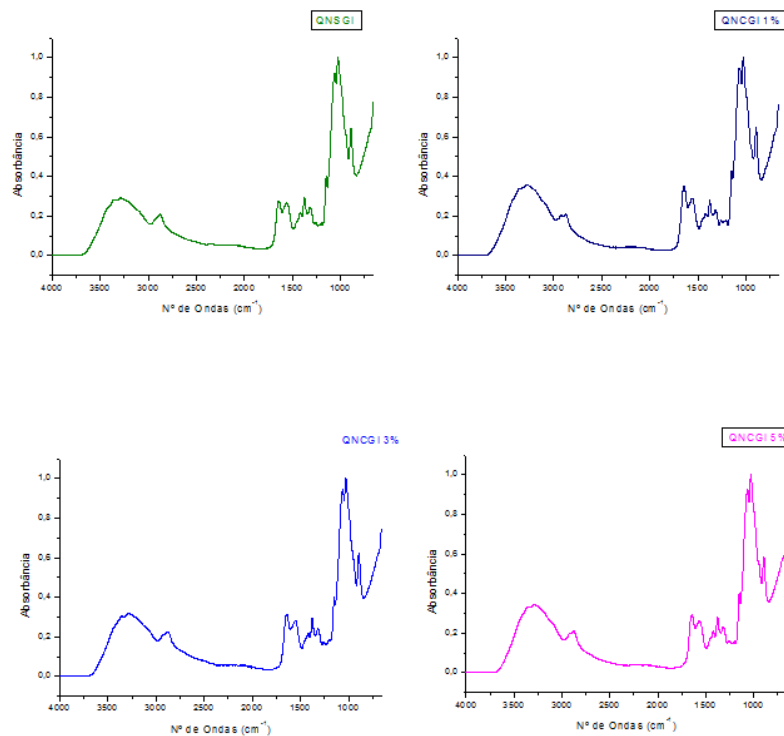
Fonte: Própria

**Figura 15** – Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier do pó da gelatina e das membranas de quitosana sem e com gelatina e com insulina.



Fonte: Própria

**Figura 16** – Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier do pó da gelatina e das membranas de quitosana sem e com gelatina e com insulina.



Fonte: Própria

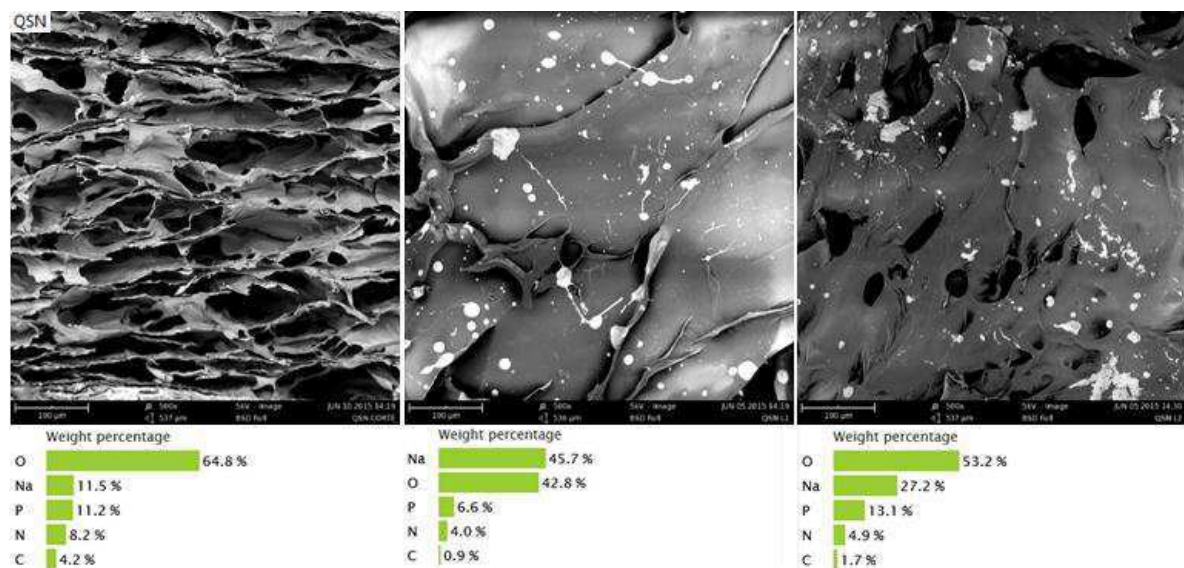
Pode-se verificar que a presença da gelatina nas concentrações estudadas nesta pesquisa e também a presença de insulina não provocou alterações nos grupos funcionais característicos das membranas de quitosana quando comparado aos resultados de FTIR obtidos para as membranas de quitosana puro.

### 5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA

Este ensaio foi realizado com a finalidade de observar a morfologia de todos das membranas obtidos nesta pesquisa e compará-los, além da obtenção de informações sobre os elementos químicos presentes nas amostras.

Nas Figuras de 17 a 28 podem ser observadas as micrografias das membranas de quitosana sem e com insulina e com diferentes proporções de gelatina, não reticulados e reticulados com tripolifosfato. São observados também os elementos químicos presentes nas regiões estudadas das membranas por meios do ensaio de EDS.

Figura 17– Micrografia da superfície de corte, superfície em contato com a placa de Petri (inferior) e da superfície em contato com o ar (superior) dos arcabouços de quitosana sem neutralização com hidróxido de sódio e reticulada com o tripolifosfato. Magnificação de 500x



Fonte: Própria

Na superfície de corte observam-se camadas paralelas orientadas longitudinalmente dando o aspecto lamelar, com presença de poros de tamanhos e

formas variados e interconectados com alguns de formatos esféricos no interior das amostras. A formação dos poros com tamanhos variados pode ser atribuída ao processo de congelamento da solução, pois a formação dos cristais de gelo pode ser influenciada pela temperatura de congelamento, concentração da solução polimérica e distância da parede do molde. Já na superfície que fica em contato com a placa de Petri, não são observados os poros igualmente as superfície de corte, mas é evidente a presença de sulcos, predominando as regiões de superfícies densas. Contudo, isso não implica que o material não seja poroso, pois a presença de menos poros nessa superfície pode ser devido a base da placa de Petri não permitir a saída de água no momento da liofilização.

Na superfície da amostra em contato com o ar já fica evidente a presença de mais poros quando comparado à superfície em contato com a placa e menos quando comparado a superfície de corte. Os poros nessa superfície já apresentam tamanhos e formas variados predominando a forma arredondada e, também, algumas regiões sem poros.

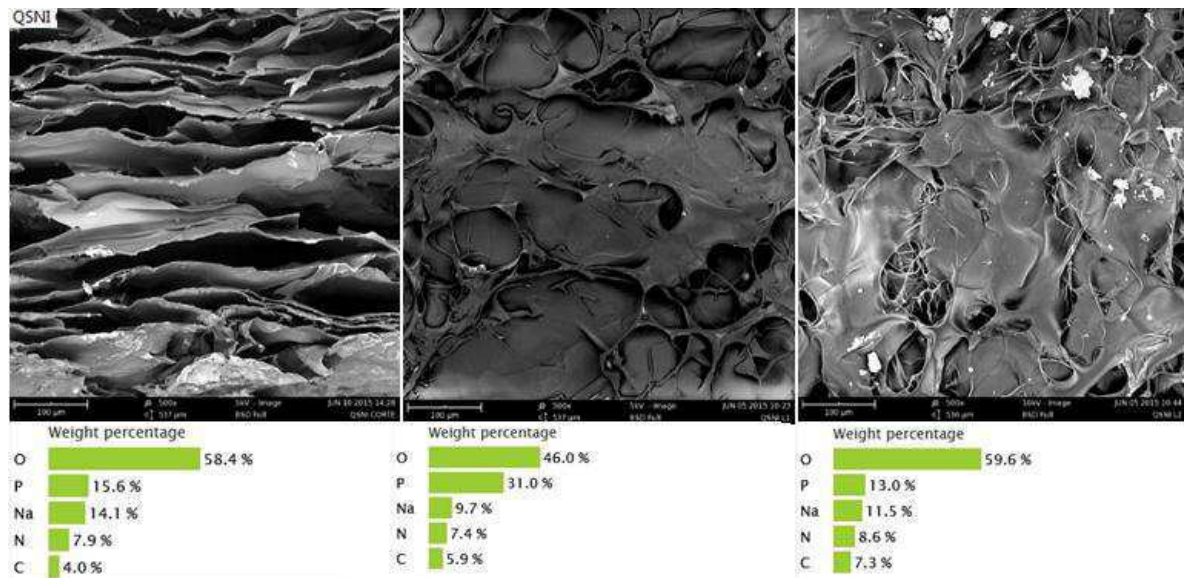
Estas observações estão de acordo com os trabalhos de Fook (2012), que obteve arcabouços de quitosana com e sem gelatina.

A porosidade evidenciada em todos os arcabouços é de grande importância para um sistema a de liberação de fármacos por permitirem a penetração de fluidos biológicos, facilitando a difusão dos fármacos para o meio (FÁVERE, 2009).

Pode-se observar também nessas superfícies a presença de partículas de tamanhos variados com aspecto de aglomerados de cor branca. Essas partículas, segundo os resultados de EDS, são resultantes do tripolifosfato de sódio, já que no EDS foi encontrado um considerável percentual do elemento sódio, principalmente nas superfícies onde foram encontradas maiores quantidades das partículas de com branca.

Foram encontrados, também, pelo EDS os elementos presentes na quitosana (O, C, N) e tripolifosfato de sódio (P, Na).

Figura 18 – Micrografia da superfície de corte, superfície em contato com a placa de Petri e da superfície em contato com o ar dos arcabouços de quitosana sem neutralização, com insulina e reticulada com o tripolifosfato. Magnificação de 500x.



Fonte: Própria

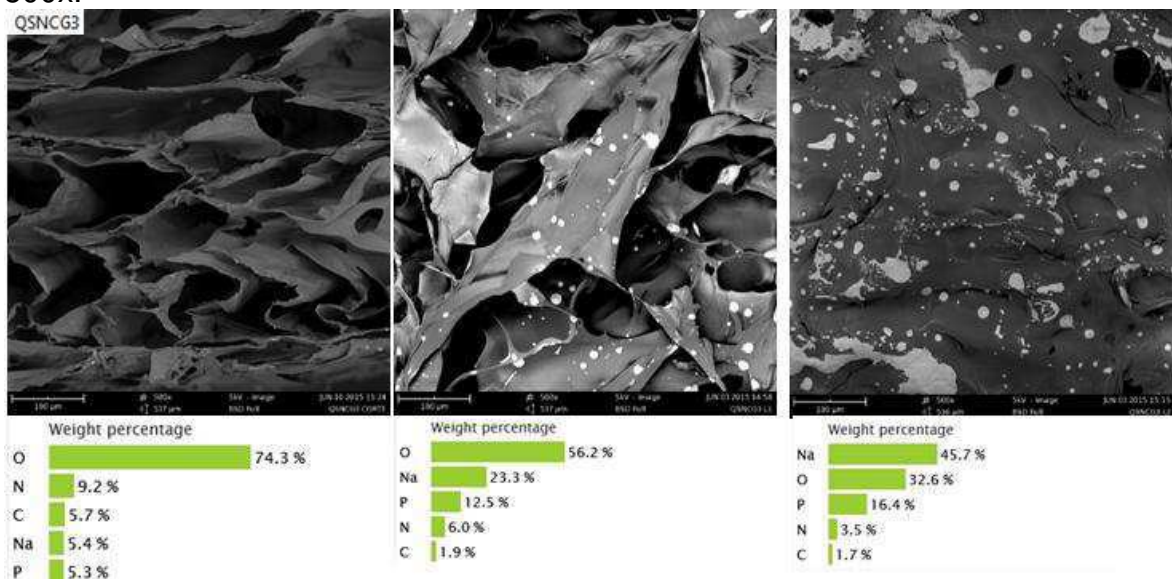
Na Figura 18 observa-se que as lamelas encontradas na superfície de corte são aparentemente mais espessas quando comparadas com as lamelas dos arcabouços sem insulina. Isso pode estar relacionado a presença da mesma que é encapsulada pela matriz polimérica de quitosana. Nas superfícies inferior e superior da amostra é evidente a presença de fibrilas em várias direções dando um aspecto de teia de aranha, além da presença de poros. Os elementos químicos encontrados foram os mesmos encontrados na Figura 17, sendo que nesta amostra encontram-se um percentual de fósforo bem maior. Acredita-se que esse fato possa estar relacionado a disputa do tripolifosfato de sódio com a insulina em relação aos pontos reativos da quitosana.

Na Figura 19 a micrografia na superfície de corte, observa-se que os poros têm formatos diferentes dos demonstrados nas Figuras 17 e 18. Este fato pode estar relacionado a presença da gelatina que pode influenciar no tempo de congelamento da solução de quitosana com gelatina e levar a uma organização diferente do gelo. Nas demais superfícies também são evidenciadas diferenças quando comparadas as superfícies inferior e superior das amostras sem gelatina. Também ocorre a presença de grandes quantidades de aglomerados de acetato de sódio ou do próprio tripolifosfato de sódio.



Segundo Fook (2012), esse comportamento é resultado do crescimento e solidificação dos cristais de gelo na direção do gradiente de temperatura, isto é, das extremidades para o centro da solução durante a etapa de congelamento. Um aspecto importante, porém pouco observado nessas micrografias foi a interconectividade entre os poros que não foi tão evidenciada quanto aos da superfície de corte dos arcabouços sem a gelatina.

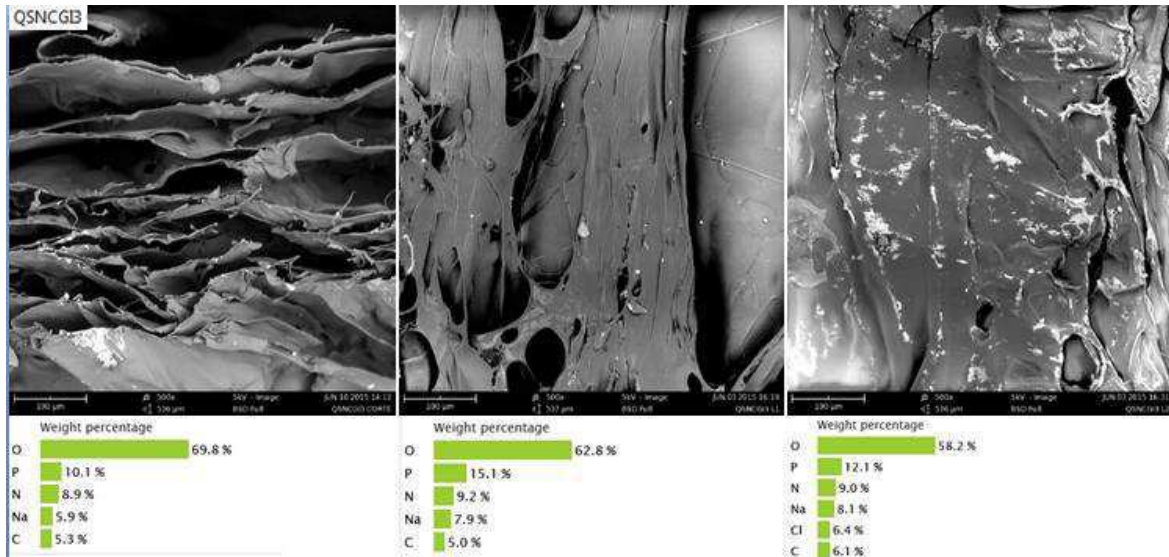
Figura 19 – Micrografia da superfície de corte, superfície em contato com a placa de Petri e da superfície em contato com o ar dos arcabouços de quitosana sem neutralização, com 3% de gelatina e reticulado com tripolifosfato. Magnificação de 500x.



Fonte: Própria

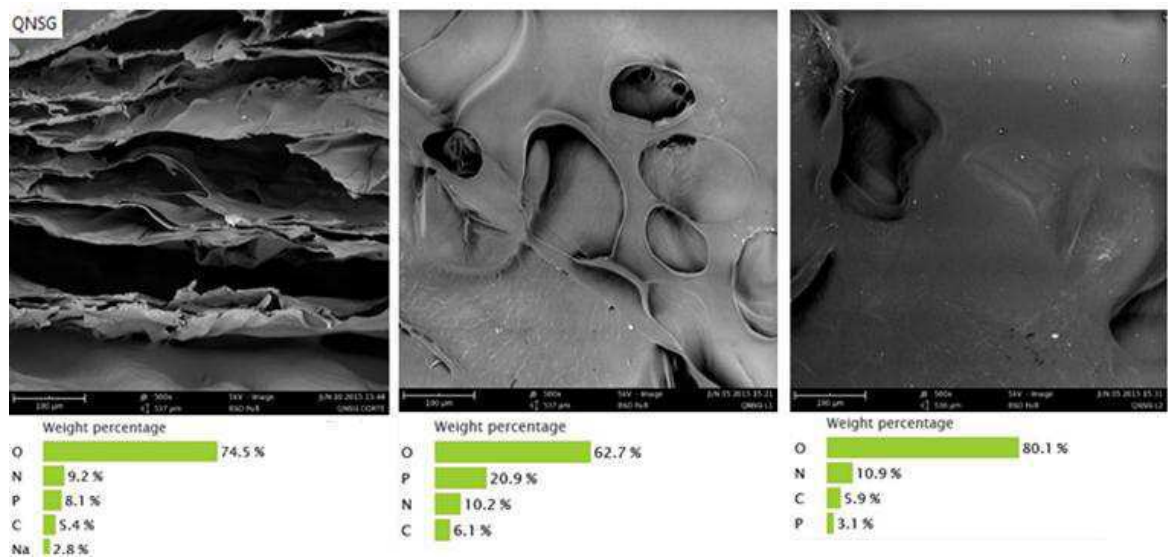
Observa-se na Figura 20 que a presença da insulina atribuiu ao arcabouço na sua superfície de corte o mesmo aspecto lamelar encontrado nos arcabouços sem gelatina e o que diferencia do arcabouço com gelatina. Isto ocorre porque a insulina atribui as lamelas uma maior espessura. Fato este encontrado na Figura 18.

**Figura 20** – Micrografia da superfície de corte, superfície em contato com a placa de Petri e da superfície em contato com o ar dos arca-bauços de quitosana sem neutralização, com 3% de gelatina, com insulina e reticulado com tripolifosfato de sódio. Magnificação de 500.



Fonte: Própria

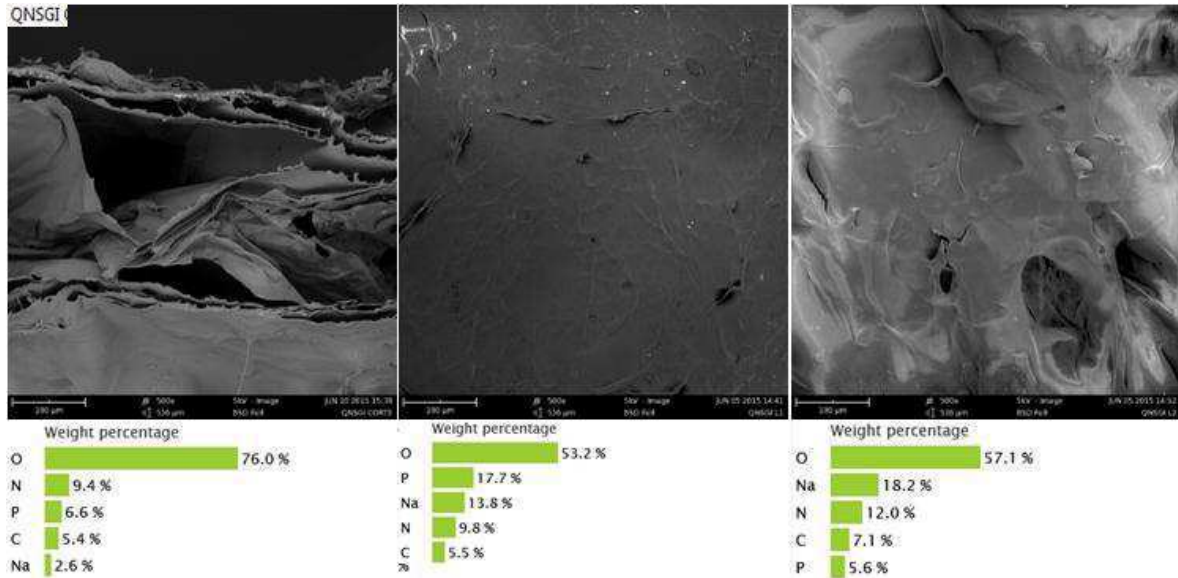
**Figura 21** – Microscopia Eletrônica da superfície de corte, superfície em contato com a placa de Petri e da superfície em contato com o ar dos arca-bauços de quitosana neutralizada com hidróxido de sódio e reticulados com tripolifosfato de sódio. Magnificação de 500x.



Fonte: Própria

Na Figura 21 a morfologia de superfície dos arca-bauços de quitosana neutralizados com hidróxido de sódio sem gelatina e reticulados com tripolifosfato são parecidas com as demais. No entanto não são observados muitos aglomerados como os vistos nas amostras sem neutralização.

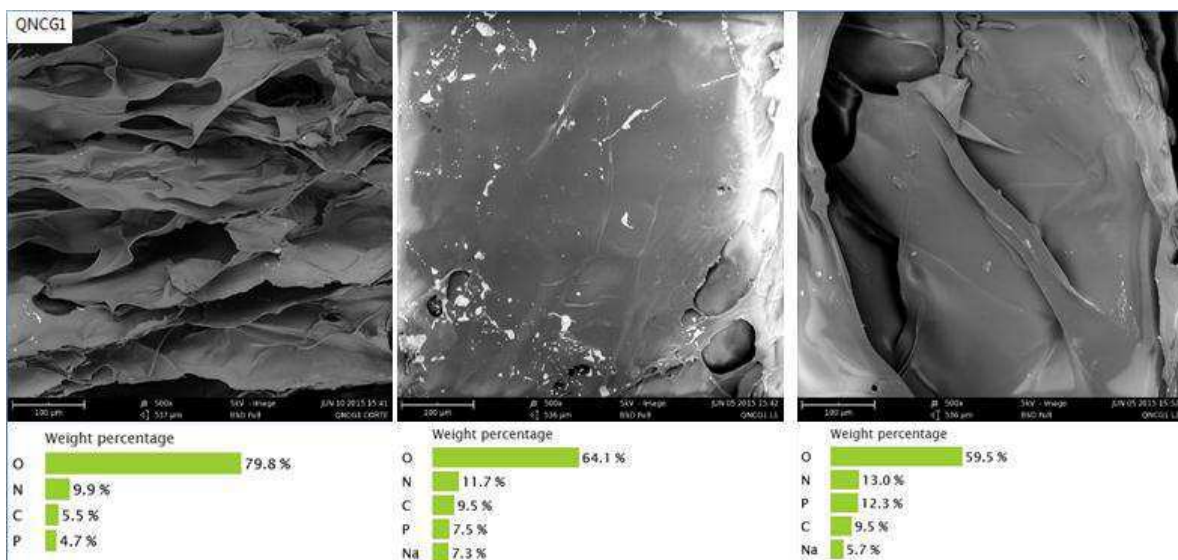
**Figura 22** – Micrografia da superfície de corte, superfície em contato com a placa de Petri e da superfície em contato com o ar dos arcabouços de quitosana neutralizada com hidróxido de sódio, com insulina e reticulado com o tripolifosfato. Magnificação de 500x.



Fonte: Própria

É visto na Figura 22 que os arcabouços que não tem gelatina o aspecto de lamelas na superfície de corte é mais evidente e que o espaço entre as lamelas são mais estreitos.

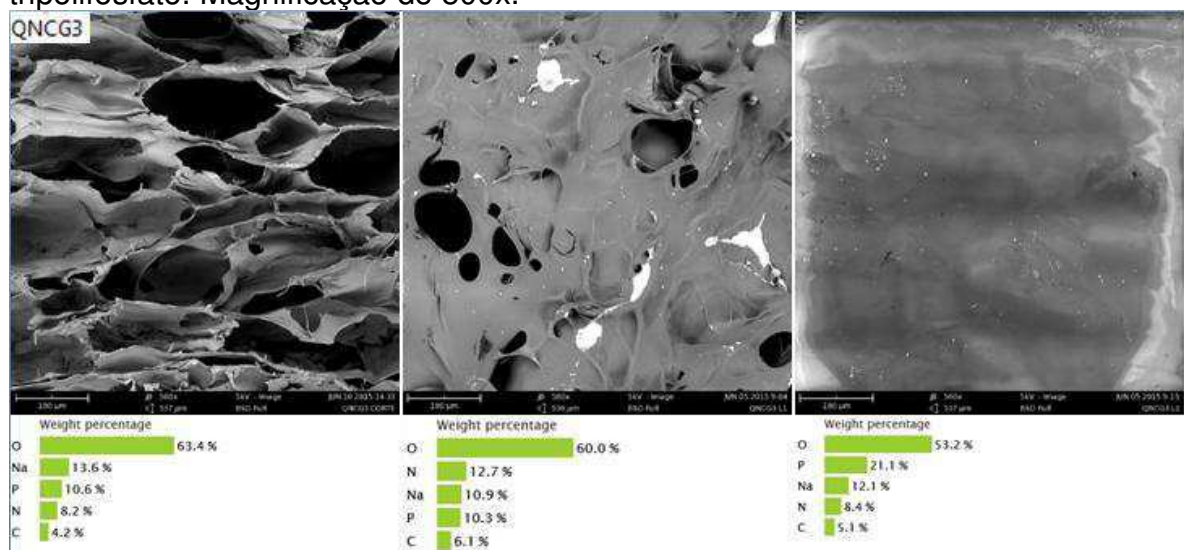
**Figura 23** – Micrografia da superfície de corte, superfície em contato com a placa de Petri e da superfície em contato com o ar dos arcabouços de quitosana neutralizados com hidróxido de sódio, com gelatina, com insulina e reticulado com tripolifosfato. Magnificação de 500x.



Fonte: Própria

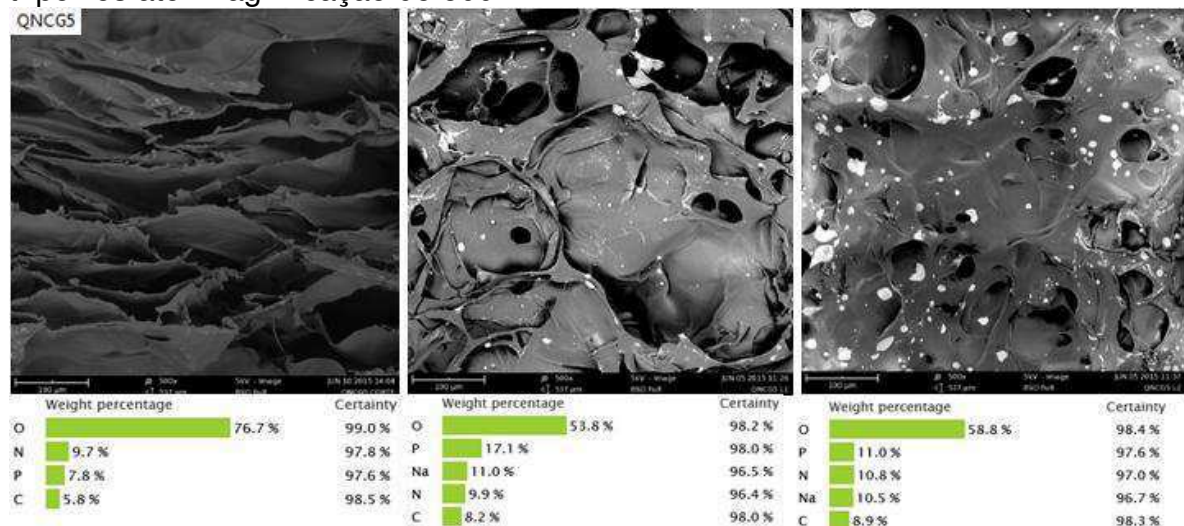
Os poros ilustrados na Figura 24 apresentam um aspecto mais arredondado do que os encontrados nas amostras sem gelatina e com insulina. Acredita-se que a gelatina influencia na formação dos poros. Outro fato importante é que as amostras com gelatina, mas que tem a insulina apresentam nas superfícies de corte as lamelas. Isso deve ocorrer pelo aumento da espessura das lamelas decorrente da presença da insulina.

**Figura 24** – Micrografia da superfície de corte, superfície em contato com a placa de Petri e da superfície em contato com o ar dos arcabouços de quitosana neutralizados com hidróxido de sódio, com 3% de gelatina e reticulado com tripolifosfato. Magnificação de 500x.



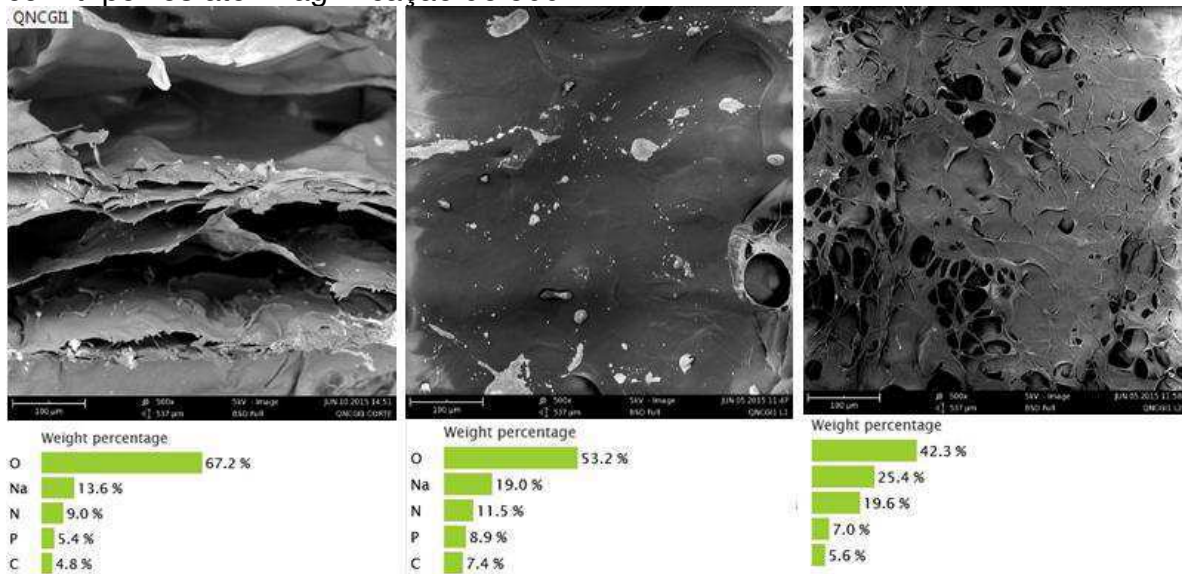
Fonte: Própria

**Figura 25** – Micrografia da superfície de corte, superfície em contato com a placa de Petri e da superfície em contato com o ar dos arcabouços de quitosana neutralizados com hidróxido de sódio, com 5% de gelatina e reticulado com tripolifosfato. Magnificação de 500x.



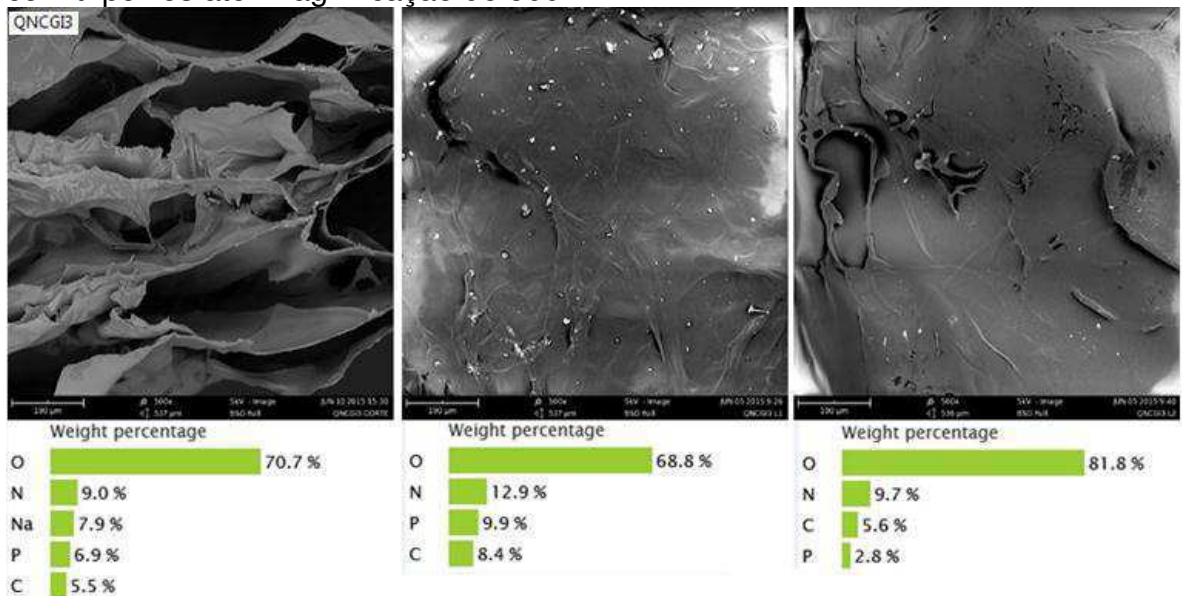
Fonte: Própria

**Figura 26** – Micrografia da superfície de corte, superfície em contato com a placa de Petri e da superfície em contato com o ar dos arcabouços de quitosana neutralizados com hidróxido de sódio, com 1% de gelatina, com insulina e reticulado com tripolifosfato. Magnificação de 500x.



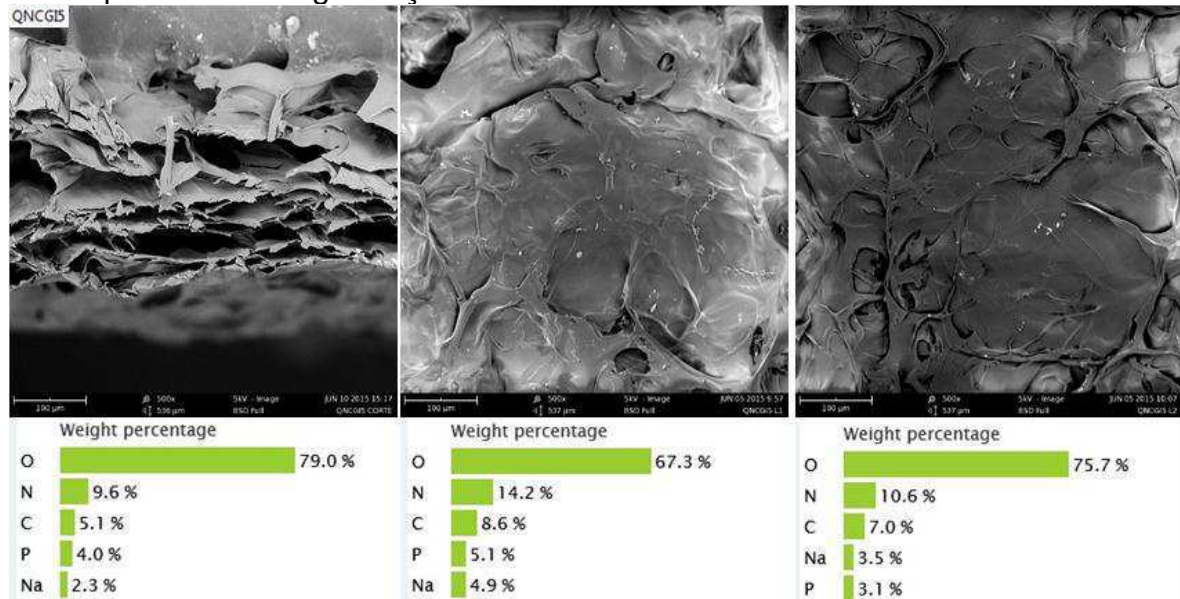
Fonte: Própria

**Figura 27** – Micrografia da superfície de corte, superfície em contato com a placa de Petri e da superfície em contato com o ar dos arcabouços de quitosana neutralizados com hidróxido de sódio, com 3% de gelatina, com insulina e reticulado com tripolifosfato. Magnificação de 500x.



Fonte: Própria

Figura 28 – Micrografia da superfície de corte, superfície em contato com a placa de Petri e da superfície em contato com o ar dos arcabouços de quitosana neutralizados com hidróxido de sódio, com 5% de gelatina, com insulina e reticulado com tripolifosfato. Magnificação de 500x.



Fonte: Própria

Foi observada nas superfícies de todas as amostras a presença de aglomerados de coloração esbranquiçada, acredita-se que seja partículas de Na do tripolifosfato como também do acetato de sódio formado nos arcabouços que foram neutralizados com hidróxido de sódio, já que no EDS destas partículas foram evidenciados os elementos fósforo (P) e sódio (Na).

A caracterização por EDS também evidenciou a presença dos elementos químicos presentes na quitosana (O, C, e N), como também na insulina. Ainda verificou-se que o percentual de cada elemento sofreu variação tanto nas diferentes amostras como também nos pontos estudados da mesma amostra.

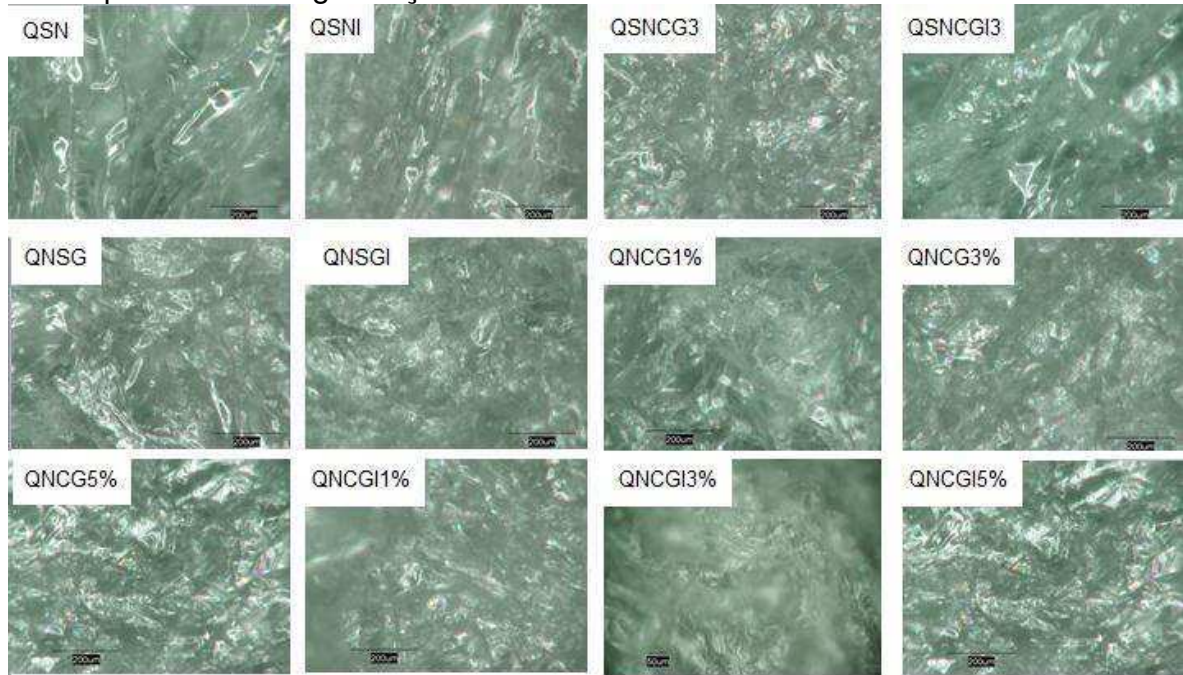
## 5.4 MICROSCOPIA ÓPTICA

Na Figura 29 são observadas as fotomicrografias obtidas pelo microscópio óptico dos arcabouços de quitosana sem e com insulina e com diferentes proporções de gelatina, não reticulados e reticulados com tripolifosfato.

Verificou-se que a técnica de microscopia óptica para os arcabouços estudados evidenciou a presença dos poros como encontrado na MEV, sendo que devido as diferentes profundidades das amostras provocadas pelos poros e pelas depressões

da mesma não foi possível ter uma imagem com foco em toda superfície. Outro fator que influenciou na qualidade das imagens foi à presença de regiões com maior brilho do que outras devido a reflexão de luz.

Figura 29 – Micrografia da superfície superior dos arcabouços de quitosana sem e com insulina e com diferentes proporções de gelatina, não reticulados e reticulados com tripolifosfato. Magnificação de 350x.



Fonte: Própria



**CONCLUSÃO**



## 6 CONCLUSÕES

Nos resultados de DRX foi possível observar que não ocorreu alteração significativa na cristalinidade das membranas, já que todos apresentaram características de polímeros semicristalinos com o mesmo perfil encontrado na quitosana.

A técnica de FTIR mostrou que a presença, tanto da insulina quanto da gelatina e do tripolifosfato de sódio não interferiu nos grupos funcionais de superfície da quitosana, mantendo desta forma as propriedades da mesma.

Com a microscopia eletrônica de varredura foi possível observar a presença lamelas nas superfícies de corte das amostras com poros interconectados com tamanhos e formas variadas e que a presença da gelatina influenciou nestas características, mas que, quando inserido a insulina voltaram a apresentar poros com as mesmas características das membranas sem gelatina, indicando que a insulina estava presente na estrutura.

Outra alteração encontrada que reforça a presença da insulina foi a espessura das lamelas e a presença de fibrilas nas amostras.

Baseado nos resultados pode-se concluir que a insulina foi encapsulada pela quitosana e que a presença da gelatina influenciou no tamanho e forma dos poros das membranas e que a neutralização com NaOH diminuiu a quantidade de aglomerados nas superfícies dos arcabouços reticulados com tripolifosfato de sódio.

## REFERÊNCIAS

- ABRAM, A. P.; HIGUERA, I. Quitina y quitosano: obtencion, caracterizacion y aplicaciones; Abram, A. P., ed.; Programa Cyted 2004, - PontificiaUniversidadCatolicadel Peru/Fondo Editorial: Lima, cap 1. 2004.
- ADAM, S. S.; KEY, N. S.; GREENBERG, C. S. "D-dimer antigen: current concepts and future prospects". *Blood*, v. 113, p. 2878–2887, 2009.
- AIDER, M. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: review. *LWT-Food Science and Technology*, 43, 837–842. 2010
- ALLEN JR. L.V.; POPOVICH,N.G.; ANSEL, H.C. Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos. Porto Alegre: Artmed, 2007, 775p.
- ALMEIDA, P. F. Análise da Qualidade de Gelatina obtida de tarsos de frango e aspectos envolvidos no processo produtivo. 135f. 2012. Dissertação (Mestre em Engenharia de Produção) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção, Universidade Nove de Julho, São Paulo, 2012.
- AYALA, G. G.; MALINCONICO, M.; LAURIENZO, P.; *Molecules*, 2008, 13, 2069 p.
- AZEVEDO V. V. C.; CHAVES S. A; BEZERRA D. C; FOOK M. V. L; COSTA, A. C. F. M.Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais Revista Eletrônica de Materiais e Processos / ISSN 1809-8797 / v.2.3 (2007) 27-34.
- AZEVEDO, J.R. et. al. Physical and chemical characterization insulin-loaded chitosan-TPP nanoparticles. *J Therm Anal Calorim*, 2011.
- BATTISTI, Marcos Valério; CAMPANA-FILHO, Sergio P.. Obtenção e caracterização de  $\alpha$ -quitina e quitosanas de cascas de *Macrobrachium rosenbergii*. *Quím. Nova*, São Paulo , v. 31, n. 8, 2008 . Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422008000800019&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000800019&lng=en&nrm=iso)>.access on 04 Apr. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000800019>.
- BIAGINI, G.; MUZZERELLI, R. A. A.; GIARDINO, R. E.; CASTALDINI, C. Biological Material for wound healing. In: BRINE, I.; CHARLES, J. *Advanced in chitin and chitosan*. Elsevier Science Publishers, London, p. 16-24, 1992.
- BLISS, M. *The Discovery of Insulin*. Paul Harris, Edinburgh. 1983.
- CALVO, P., REMUÑÁN-LÓPEZ, C., VILA-JATO, J. L. AND ALONSO, M. J. (1997), Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J. Appl. Polym. Sci.*, 63: 125–132
- CAMPANA FILHO et al. Extração, estrutura e propriedades de  $\alpha$  e  $\beta$ -quitina. *Química Nova*, v. 3, n. 3, p. 644-650, 2007

CNOP, M. WELSH, N. JONAS, J.C. Jorns, A. LENZEN, S. EIZIRIK, D. L. Mechanisms of Pancreatic -Cell Death in Type 1 and Type 2 Diabetes Many Differences, Few Similarities. *Diabetes* 54 (Suppl. 2): S97–S107, 2005

CRAVEIRO, A.A.; CRAVEIRO, A.C. e QUEIROZ, D.C. Quitosana – A fibra do futuro, Padetec, 124p, 1999.

CZECH M.P, CORVERA, S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *J Biol Chem* January 22; 274(4):1865-8, 1999

COSTA Jr, E.S. In: Desenvolvimento de matriz de Quitosana/PVA, quimicamente reticulada para aplicação potencial em engenharia de tecido epithelial. Teses (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Minas)- Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia da UFMG. Belo Horizonte, 2008

CORTEZ, C. M., *Fisiologia Aplicada à Psicologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008

Diabetes Prevention Program Research Group *N Engl J Med* 2002; 346:393-403 [February 7, 2002](#) DOI: 10.1056/NEJMoa012512

Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2014-2015/ Sociedade Brasileira de Diabetes ; [organização José Egidio Paulo de Oliveira, Sérgio Vencio]. – São Paulo: AC Farmacêutica, 2015.

DJAGNY, K. B.; WANG, Z.; XU, S. Gelatin: a valuable protein for food and pharmaceutical industries: review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Boca Raton, v41, pg 481-492, 2001

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

FOOK, M.V.L. In: Desenvolvimento de técnica de deposição de hidroxiapatita pelo método biomimético na superfície polietileno de ultra-alto peso molecular para aplicação como biomaterial. 96f. Tese (Doutorado em Química)-Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química. Araraquara, 2005

FOOK, A. C. B. M. Produção e caracterização de arcabouços compósitos HÁ/Biopolímero para engenharia de tecidos. 2012. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais). Centro de Ciência e Tecnologia. Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande. 2012

FORETZ, M., GUICHARD C, FERRE, P., FOUFELLE, F. Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, October 26; 96(22):12737-42, 1999.

HELMUS M. N.; TWEDEN K.; 1995. Materials selection. In Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering, Part A: Materials (eds) D L 64 Wise, D J Trantolo, D E Altobelli, M J Yaszemski, J D Gresser, E R Schwartz (New York: Marcel Dekker) pp 27-45.

HENCH, L. L. Biomaterials: a forecast for the future. Biomaterials, v. 19, p. 1419-1423, 1998.

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

<http://www.diabetes.org.br/>, 2015. Acesso em 12 de maio de 2015

<http://www.oup.co.uk/best.textbooks/medicine/humanphys/illustrations>, 2015. Acesso em 12 de maio de 2015

IYER H, KHEDKAR A. VERM M. Oral insulin – a review of current status. Diabetes, Obesity and Metabolism. 2010; 12: 179–185.

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

KOROLKOVAS, Dicionário Terapêutico Guanabara - Edição 2013/2014 - Andrejus Korolkovas.

LAWRENCE JR, J.C. Insulina e Fármacos Hipoglicemiantes orais. In: BRODY, T.M. et al. Farmacologia Humana. 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, cap.39, p.468-482.

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

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

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

MELO, F. M. A. D. Uso da Quitosana como surfactante policatiônico paramodificação de bentonita. 2010. 56f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande - PB.

MORAES A.S. de, Freitas ICM de, GIMENO S.G.A. e MONDINI L. Prevalência de diabetes mellitus e identificação de fatores associados em adultos residentes em

área urbana de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil 2006: Projeto OBEDIARP. Cad Saúde Pública. 2010.

MUZZARELLI, R. A. A.; *Carbohydr. Polym.* 2009, 76, 167.

NATHAN DM, et al. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care*. 2009

NEWS MEDICAL. Insulin Discovery, 2013. Disponível em: <http://www.news-medical.net/health/Insulin-Discovery.aspx> acesso em: 17.04.2015

OGG, S., PARADIS S., GOTTIEB, S., PATTERSON, G. I, LEE, L., TISSENBAUM, H. A., RUVKUN, G. The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature*, October 30;389(6654):994-9, 1997.

Organização Pan-americana da Saúde. Doenças crônico degenerativas e obesidade: estratégia mundial sobre alimentação saudável, atividade física e saúde . Disponível em: <[http:// opas.org.br/sistema/arquivos/d\\_cronic.pdf](http://opas.org.br/sistema/arquivos/d_cronic.pdf)>. Acesso em: 25 jan. 2013.

PANKAJ R K., ZELJKA V., IVAN P., NATAŠA Š. Mucoadhesive liposomal delivery systems: the choice of coating material. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2011, 37(4): 482–488.

PUIGSERVER, P, RHEE, J., DONOVAN, J., WALKEY, C. J, YOON, J.C., ORIENTE, F., KITAMURA, Y., ALTOMONTE, J., DONG, H., ACCILI, D., SPIEGELMAM, B.M. Insulin regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature*, May 29;423(6939):550-5, 2003

PESSIN, J.E., SALTIEL, A.R., Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest*, July;106(2):165-9, 2000.

RIVERO, S.; GARCÍA, M. A.; PINOTTI, A. Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. *Journal of Food Engineering*, v. 90, n. 4, p. 531-539, 2009.

ROBERTS, G. A. F. Chitin Chemistry. Mc Millan Press, London, 1992

ROMANAZZI, G., MLIKOTA GABLER, F., MARGOSAN, D., MACKEY, B. E., AND SMILANICK, J. L. Effect of chitosan dissolved in different acids on its ability to control postharvest gray mold of table grape. *Phytopathology* 99:1028-1036. 2009.

ROSA, M. P.; BARONI, G. V.; PORTAL, V. L. (2007), Potencial terapêutico para a prevenção e tratamento da nefropatia e neuropatia diabéticas: evidências do uso do cilostazol. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 51, 1528-1532.

SAKAKURA, Y., SHIMANO, H., SONE, H., TAKAHASHI, A., INOUE, N., TOYOSHIMA H., SUZUKI, S., YAMADA, N., INOUE, K. Sterol regulatory element-

binding proteins induce an entire pathway of cholesterol synthesis. *BiochemBiophys Res Commun*, August 10 ;286(1):176-83, 2001.

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

SANTOS, R. M. M. O futuro aponta para novas formas de administrar medicamentos, 2006. Disponível em: [http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id\\_materia=102](http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=102). Acesso em 24 abril 2015

SCHILLING, A. F.; LINHART, W.; FILKE, S.; GEBAUER, M.; SCHINKE, T.; RUEGER, J. M.; AMLING, M. Resorbability of bone substitute biomaterials by human osteoclasts. *Biomaterials*, v. 25, p. 3963-3972, 2004.

SEGTMAN, V., ISAKSSON T., Temperature, sample time dependent structural characteristics of gelatins gels studied by near infrared spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 2004, 18, 1.

SENEL, S.; McCLURE., S.J. Potential application of chitosan in veterinary medicine. *Advanced, Drug Delivery Reviews*, v.56, p.1467-1480, 2004.

SILVA, R.S.M. Desenvolvimento de membranas de Quitosana/Heparina para Tratamento do Tromboembolismo Venoso. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade Federal de Campina Grande.

SILVERTHORN, D. U. *Fisiologia Humana: Uma Abordagem Integrada*. 5ª edição – Editora Artmed, São Paulo, 2010

SILVA, C. A. da. A EDUCAÇÃO NO TRATAMENTO DAS DOENÇAS CRÔNICO-DEGENERATIVAS. *Revista Brasileira em Promoção da Saúde*. Fortaleza, v. 19, n. 004, p. 195-196, 2006.

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

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

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

UKPDS, Prospective Diabetes Study Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34) *Lancet*. 1998;352:854–865.

U.S. CONGRESS. Biopolymers: Making Materials Nature's Way-Background Paper, OTA-BP-E-102 (Washington,DC: U.S. Government Printing Office, September 1993).

VALENSI, P., SACHS, R-N., HARFOUCHE, B., LORMEAU, B., PARIES, J., COSSON, E., PAYCHA, F., LEUTENEGGER, M., & ATTALI, J-R. (2001). Predictive value of cardiac autonomic neuropathy in diabetic patients with or without silent myocardial ischemia. *Diabetes Care*, Vol.24, No.2, (February 2001), pp. 339–343, ISSN 1935-5548.

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

WILLIAMS, D. F. "Definitions in Biomaterials". *Journal of Biomechanics*, v. 22, n. 1, p. 79-151, 1989.

YANG, C.;XU,L.; ZHOU, Y; ZHANG,X.;WANG,M.;HAN,Y.;ZHAI,M; WEL, S.; LI,J. A green fabrication approach of gelatin/CM-chitosan hybrid hydrogel for wound healing. *Carbohydrate Polymers*, v.82, p. 1297-1305, 2010