



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

**Rosemary Sousa Cunha Lima**

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA  
DE FÁRMACOS: QUITOSANA / INSULINA**

**Campina Grande – Paraíba**

**Dezembro/2010**

Rosemary Sousa Cunha Lima

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE  
FÁRMACOS: QUITOSANA / INSULINA

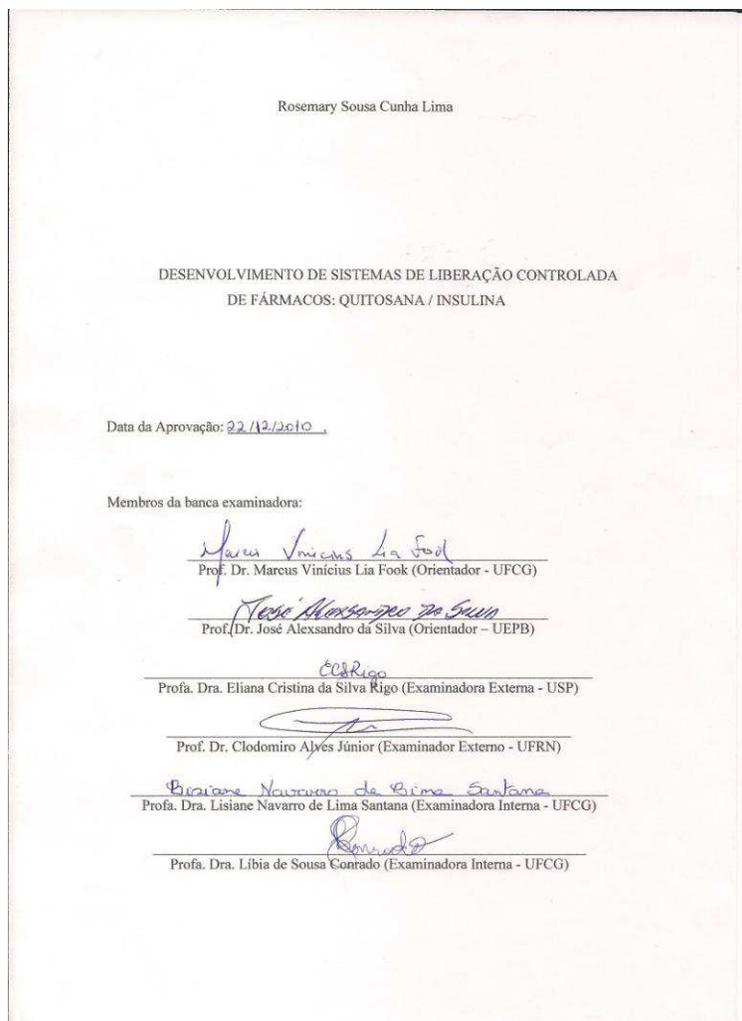
Trabalho de tese apresentado à banca examinadora do curso de Doutorado em Engenharia de Processos da Universidade Federal de Campina Grande, Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos, como exigência final para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Processos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook

2º ORIENTADOR: Prof. Dr. José Aleksandro da Silva

Campina Grande – Paraíba

Dezembro/2010



**(VERSO)**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG**

L732d Lima, Rosemary Sousa Cunha.

Desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos: quitosana/insulina / Rosemary Sousa Cunha Lima. — Campina Grande, 2010.

110 f. : il. col.

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

Referências.

Orientadores: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook, Prof. Dr. José Alessandro da Silva.

1. Polissacarídeos. 2. Diabetes *Mellitus*. 3. Biofilmes. 4. Sistemas Matriciais.

I. Título.

CDU-577.114.4(043)

## DEDICATÓRIA

Dedico aos meus filhos,  
Nicole e Aloysio, ao meu esposo Marcel  
e a minha mãe D. Guia.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu **Deus**, por mais uma etapa vencida.

Ao Prof.Dr. **Marcus Vinícius Lia Fook** por todo apoio, acolhimento, orientação, amizade e convivência em todas as etapas do trabalho;

Ao Prof. Dr **José Aleksandro da Silva** pela colaboração;

Aos Professores Dr<sup>a</sup> **Eliana Rigo** e **Clodomiro Alves**, examinadores externos pela disponibilidade em atender ao convite, em um período de tantos compromissos;

Às Professoras Dr<sup>a</sup> **Lisiane Navarro de Lima Santana** e Dra.**Líbia de Sousa Conrado** examinadoras internas, pela gentileza e valiosas contribuições;

À Professora **Iracilda Zeppone Carlos** e sua equipe, pela ajuda e orientação nos testes de citotoxicidade e pela utilização do Laboratório de Imunologia Clínica e Biologia Molecular do Departamento de Análises Clínicas da UNESP, Araraquara – SP.

Ao Professor **Flávio Honorato da Silva** pelo apoio e colaboração ao longo do trabalho;

Ao **Departamento de Farmácia** da UEPB pela liberação;

Ao **corpo docente** de Engenharia de Materiais e de Processos;

À coordenação do curso de Engenharia de Processos através do Prof. **Antônio Gilson**;

Aos colegas do Grupo de Biomateriais da UFCG, especialmente **Thiago, Rosseberg, João Ponciano, Carol, Adriana, Chirlaine, Andreas, Anna Sylvia, Greyce** e tantos outros que tiveram participação efetiva neste trabalho;

À colega **Lidiane Correia**, pela participação;

Aos colegas do Doutorado de Engenharia de Processos pelo companheirismo e ajuda nas disciplinas, especialmente **Rúbia, Chico, Moema, Vitória e Ivonete**;

Aos funcionários de Engenharia de Materiais e de Processos: **Violeta, Mila, André, Kátia, Sr. Fernandes, Geraldo, Márcia** e todos os demais;

Aos alunos da iniciação científica **Jéssica, Bruno e Diego** (farmácia); **Magna, Oscar** (Engenharia de Materiais); **Nathália** (Engenharia Química), **Adriana e Dayana** (Pibic Jr.) e outros que tiveram participação efetiva neste trabalho.

## AGRADECIMENTOS PESSOAIS

A Deus, Princípio, Meio e Fim;

A Nossa Senhora, pelas constantes interseções;

A minha mãe Guia, pelo incentivo, amizade, carinho e por tanto que tem feito por nós;

Ao meu pai Antônio de Carvalho (*in memorian*), por tantas lições ao longo da vida;

A minha sogra, D. Betinha, pela amizade;

Ao meu esposo Marcel, pela bela família que formamos;

Aos meus filhos Nicole e Aloysio pelo sentido, alegria e amor que trouxeram para minha vida;

Aos meus irmãos Marcos, Ana Lúcia, Alexandre, Magnólia e Ricardo pelos momentos de companheirismo e amizade desde a infância;

Aos cunhados Ilka, Marcus, Valéria, Harrison, Renata, Bertrand, René, Adriana e Arlene por complementarem nossa família;

Aos sobrinhos Christiano, Filipe, Pablo, André, Antônio Neto, Ana Maria, Ana Beatriz, Harrison Jr., Hugo, Haendel, Ana Rafaela, Larissa, Rebeca, Lis por aumentarem a alegria de minha vida;

A todos os que contribuíram na minha formação.

*“Tudo é do pai  
Toda honra e toda glória  
É d’Ele a vitória  
Alcançada em minha vida  
Tudo é do pai  
Se sou fraco e pecador  
Bem mais forte é o meu Senhor  
Que me cura por amor”.*

*Frederico Cruz*

## RESUMO

A utilização de biomateriais surgiu em função de pessoas que nascem com problemas em órgãos/tecidos ou os adquirem por traumas. Sua demanda foi enfatizada pelo aumento da expectativa de vida dos seres humanos; recentemente, a área de biomateriais encampou muitos estudos, a exemplo da pesquisa com liberação controlada de fármacos, biosensores e dispositivos biomédicos. Uma das doenças crônicas de grande abrangência na contemporaneidade é o Diabetes *mellitus* tipo 1, cujo tratamento consiste em administração subcutânea diária de insulina. O objetivo deste trabalho foi desenvolver biofilmes compostos de quitosana e insulina, na perspectiva de administrar o fármaco por uma via alternativa a injetável, em sistemas de liberação controlada, contribuindo para uma maior adesão ao tratamento. Os biofilmes foram desenvolvidos a partir da quitosana adquirida em dois fornecedores diferentes e a insulina utilizada foi a NPH em duas concentrações diferentes. A caracterização foi feita pelas técnicas de Molhabilidade, Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Difração de Raios X (DRX), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Termogravimetria (TG), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Biodegradação Enzimática, Avaliação da Viabilidade Celular dos Macrófagos e Determinação da Produção de Óxido Nítrico. Foram constatadas pequenas diferenças de hidrofiliabilidade das amostras, através das análises de molhabilidade. Através dos resultados de FTIR e DRX foi evidenciada a formação do biofilme quitosana/insulina. A morfologia do biofilme não foi modificada consideravelmente, independentemente da presença da insulina, das concentrações e do tipo de quitosana utilizada, sendo a morfologia característica de polímeros de natureza fibrosa, típica da quitosana. Os ensaios realizados por DRX demonstraram variação da cristalinidade nas preparações sendo constatada maior cristalinidade para a preparação de quitosana a 1%, Sigma Aldrich<sup>®</sup>, GD 75% (B2.1) e menor para a preparação de quitosana a 1,5% Sigma Aldrich<sup>®</sup>, GD 85% / 50UI de insulina, (B1.4). O DSC acusou três eventos térmicos mostrando que a presença insulina nas preparações de baixa massa molar se equivaleu aos efeitos constatados nas preparações de alta massa molar. A TG constatou maior perda de massa nas preparações de quitosana sem insulina. Os ensaios de biodegradação foram aplicados aos biofilmes de quitosana Sigma Aldrich<sup>®</sup> a 1%, resultando numa maior degradação para a composição a 1% / 50 UI de insulina (B1.3) e menor para a composição de quitosana a 1 % sem insulina (B1.1). Os ensaios de toxicidade demonstraram nas composições B, a viabilidade da utilização deste sistema como alternativa viável para o tratamento do Diabetes *mellitus*.

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

## ABSTRACT

The use of biomaterials was induced to help people borned with problems in organs / tissue or people that acquired them by traumas. This demand was increased by the human beings prolonged life expectance. Recently in the area of biomaterials, many studies have been published, such as researches on drug delivery systems, biosensors and biomedical devices. One of the high incidences of chronic diseases in contemporary society is Diabetes *mellitus* type 1, which treatment consists of daily subcutaneous administration of insulin. The aim of this study was to develop biofilms composed of chitosan and insulin, towards an alternative to the injectable drug administration, using drug delivery systems to increase adherence to the treatment. Biofilms were developed from chitosan from two different suppliers and NPH insulin was used in two different concentrations. The films were characterized by the techniques of Wettability, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), X-ray Diffraction (XRD), Differential Scanning Calorimetry (DSC), Thermogravimetry (TG), Scanning Electron Microscopy (SEM), Enzymatic Biodegradation, Assessment of Viability and Determination of Macrophage Nitric Oxide Production. We found small differences in hydrophilicity of the samples observing wettability analysis. The results of FTIR and XRD confirmed the formation of biofilms chitosan / insulin. The biofilms morphology didn't change substantially, regardless the presence of insulin concentrations and the type of chitosan used, presenting a nature fibrous polymer characteristic morphology, typical for chitosan. Tests conducted by XRD showed a variation of crystallinity in the samples. The highest crystallinity was found for the chitosan (1%), Sigma Aldrich®, 75% GD (B2.1) preparation and lowest for the chitosan (1.5%), Sigma Aldrich®, GD 85%, plus 50 IU of insulin, (B1.4) preparation. The DSC observed three thermal events showing that insulin presence in preparations of low molecular weight was equivalent to the effects of that in preparations of high molecular weight. The TG showed a higher weight loss for preparations of chitosan without insulin. The biodegradation tests were applied to chitosan from Sigma Aldrich® 1% biofilms, and showed the highest degradation for the composition of 1% / 50 IU of insulin (B1.3) and the lowest for the composition of chitosan 1% without insulin ( B1.1). The toxicity tests showed the feasibility to use this system as a viable alternative for the treatment of Diabetes *mellitus*.

Keywords: 1. Polysaccharides; 2. Biomaterials; 3. Diabetes *mellitus*; 4. Biofilms; 5. matrix systems

## SUMÁRIO

	Página
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	18
<b>2 OBJETIVOS</b>	20
<b>2.1 Objetivo Geral</b>	20
<b>2.2 Objetivos Específicos</b>	20
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	21
<b>3.1 Biomateriais</b>	21
<b>3.2 Liberação Controlada de Fármacos</b>	23
<i>3.2.1 Contexto histórico e classificação</i>	24
<i>3.2.2 Vantagens e Desvantagens</i>	25
<i>3.2.3 Taxa de Liberação e posologia.</i>	26
<i>3.2.4 Classificação da Liberação Controlada de Fármacos</i>	28
<i>3.2.5 Hidrogéis como sistema matricial para liberação controlada de fármacos</i>	31
<b>3.3 Polimerização e Biopolímeros: uso de polímeros na indústria farmacêutica.</b>	32
<b>3.4 Estrutura Polimérica dos Polissacarídeos.</b>	36
<b>3.5 Polímeros Naturais: Quitina e Quitosana</b>	40
<b>3.6 Quitosana</b>	42
<i>3.6.1 Origem</i>	43
<i>3.6.2 Estrutura e caracterização da quitosana</i>	43
<i>3.6.3 Propriedades físico-químicas</i>	44
<i>3.6.4 Propriedades Biológicas</i>	45
<i>3.6.5 A Quitosana como Biomaterial</i>	46
<i>3.6.6 Utilização da Quitosana na Engenharia de Tecidos</i>	46
<i>3.6.7 Utilização da quitosana na Liberação Controlada de Fármacos</i>	47
<i>3.6.8 Parâmetros que afetam as características de distribuição de fármacos em microesferas de quitosana</i>	47
<b>3.7 Insulina</b>	48
<i>3.7.1 Distribuição e degradação da insulina</i>	48
<i>3.7.2 Efeitos da Insulina</i>	49
<i>3.7.3 Produção de Insulina e Diabetes Mellitus</i>	51

3.7.4	<i>Composição da insulina</i>	54
3.7.5	<i>Preparações de insulina</i>	57
3.7.5.1	<i>Injeção de insulina, insulina regular ou insulina cristalina-zinco</i>	57
3.7.5.2	<i>Preparações de ação ampliada a partir da interação entre a insulina e a proteína básica, protamina</i>	57
3.7.5.3	<i>NPH ou isófana</i>	58
3.7.5.4	<i>Suspensão de insulina-protamina tamponada com acetato</i>	58
3.7.5.5	<i>Suspensão de insulina-zinco ampliada</i>	58
3.7.5.6	<i>Insulina semi-lenta</i>	58
3.7.5.7	<i>Suspensão de insulina-zinco</i>	58
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	59
<b>4.1</b>	<b>Materiais</b>	59
4.1.1	<i>Biopolímero</i>	59
4.1.2	<i>Reagentes</i>	59
4.1.2.1	<i>Ácido acético</i>	59
4.1.2.2	<i>Hidróxido de Sódio</i>	59
4.1.2.3	<i>Insulina</i>	59
<b>4.2</b>	<b>Animais</b>	60
<b>4.3</b>	<b>Métodos</b>	60
4.3.1	<i>Obtenção do biofilme de quitosana</i>	60
4.3.2	<i>Tipos de biofilmes produzidos</i>	61
4.3.3	<i>Método de incorporação da insulina no biofilme</i>	62
4.3.4	<i>Caracterização dos filmes de quitosana/insulina</i>	62
4.3.4.1	<i>Tensão Superficial (TS)</i>	62
4.3.4.2	<i>Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</i>	63
4.3.4.3	<i>Difração de raios X (DRX)</i>	63
4.3.4.4	<i>Análise Térmica</i>	64
4.3.4.4.1	<i>Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</i>	65
4.3.4.4.2	<i>Estudo Termogravimétrico (TG)</i>	65
4.3.4.5	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	65

<b>4.3.4.6 Ensaio de biodegradação enzimática</b>	66
<b>4.3.4.7 Avaliação da Viabilidade Celular dos Macrófagos</b>	67
4.3.4.7.1 <i>Obtenção das células do Exsudado Peritoneal</i>	67
4.3.4.7.2 <i>Avaliação da viabilidade celular de células peritoneais aderentes</i>	68
<b>4.3.4.8 Determinação da produção de óxido nítrico</b>	69
<b>4.3.4.9 Análise estatística</b>	70
<b>5 RESULTADOS</b>	71
<b>5.1 Tensão Superficial</b>	72
<b>5.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier</b>	74
5.2.1 <i>Biofilmes A1</i>	75
5.2.2 <i>Biofilmes B1</i>	77
5.2.3 <i>Biofilmes B2</i>	78
<b>5.3 Espectroscopia por dispersão de Raios X</b>	80
5.3.1 <i>Difratogramas</i>	80
5.3.2 <i>Cálculo do Índice de Cristalinidade</i>	82
<b>5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura</b>	85
<b>5.5 Análise Térmica</b>	87
5.5.1 <i>Calorimetria Exploratória Diferencial</i>	87
5.5.2 <i>Termogravimetria</i>	90
<b>5.6 Ensaios de Biodegradação.</b>	93
<b>5.7 Avaliação da Viabilidade Celular dos Macrófagos</b>	95
5.7.1 <i>Obtenção das células do Exsudado Peritoneal</i>	95
5.7.2 <i>Avaliação da Viabilidade Celular de Macrófagos</i>	96
5.7.3 <i>Determinação da produção de óxido nítrico</i>	98
<b>6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS</b>	101
<b>REFERÊNCIAS</b>	103

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
<b>Figura 1.</b> Esquema Cinético de Liberação Convencional	26
<b>Figura 2.</b> Esquema Cinético de Liberação Controlada	26
<b>Figura 3.</b> Perfil de liberação de fármacos convencional e controlada em função do tempo	27
<b>Figura 4.</b> Classificação da LCF e suas principais vias de Administração	29
<b>Figura 5.</b> Morfologia esquemática dos materiais amorfos: a) termoplástico amorfo; b) termoplástico semi-cristalino; c) elastômero; d) termorrígido	35
<b>Figura 6.</b> D-glicose (aldohexose) e D-frutose (ceto-hexose) respectivamente	37
<b>Figura 7.</b> Diferenciação da D-glicose em $\alpha$ -D-glicopiranosose e $\beta$ -D-glicopiranosose	38
<b>Figura 8.</b> Semelhança entre a estrutura química da $\beta$ -D-glicose, da $\beta$ -D-glicosamina e da N-acetil-D-glicosamina	39
<b>Figura 9.</b> Ligação glicosídica entre monômeros da quitina	39
<b>Figura 10.</b> Estrutura química da Quitina e da Quitosana	41
<b>Figura 11.</b> Ação da insulina em transportadores de glicose	51
<b>Figura 12.</b> Sequência de aminoácidos da Pró-insulina humana	53
<b>Figura 13.</b> Esquema estrutural da pró-insulina humana	54
<b>Figura 14.</b> Aminoácidos mais frequentes nas proteínas, estrutura geral e estrutura química	55
<b>Figura 15.</b> Soluções poliméricas feitas com (a) quitosana Polymar (GD=86%) e (b) Sigma Aldrich <sup>®</sup> (GD=75% e 85%)	71
<b>Figura 16.</b> Biofilme confeccionado com quitosana Sigma Aldrich <sup>®</sup> a 1% e 100UI de Insulina	72
<b>Figura 17.</b> Valores de ângulo de contato obtidos a partir da medida do meio ângulo, de uma gota de água destilada gotejada, nas diferentes preparações	73
<b>Figura 18.</b> Espectro de Infravermelho das preparações quitosana Polymar (A1)	76

	14
<b>Figura 19.</b> Espectro de Infravermelho das preparações Sigma Aldrich <sup>®</sup> , GD 85%	78
<b>Figura 20.</b> Espectro de Infravermelho das preparações Sigma Aldrich <sup>®</sup> B2	79
<b>Figura 21.</b> Difratoformas dos biofilmes Polymar	80
<b>Figura 22.</b> Difratoforma dos biofilmes B1	81
<b>Figura 23.</b> Difratoformas dos biofilmes B2	82
<b>Figura 24.</b> Corte transversal de um biofilme de quitosana de baixo peso molecular	85
<b>Figura 25.</b> Corte transversal de um biofilme de quitosana de alto peso molecular a 1,5% com 50 UI de insulina	85
<b>Figura 26.</b> Corte transversal de um biofilme de quitosana Polymar a 1,5%, com 2.000 vezes.	86
<b>Figura 27.</b> Corte transversal de um biofilme de quitosana Sigma Aldrich <sup>®</sup> a 1%, com 2.000 vezes	87
<b>Figura 28.</b> Curvas calorimétricas referentes aos biofilmes de quitosana Sigma Aldrich <sup>®</sup> a 1%, GD 85%, baixa massa molar, sem insulina (B1.1), com 50UI de insulina (B1.3) e 100UI de insulina (B1.5).	88
<b>Figura 29.</b> Curvas calorimétricas referentes aos biofilmes de quitosana Sigma Aldrich <sup>®</sup> a 1%, GD 75%, alta massa molar, sem insulina (B2.1), com 50UI de insulina (B2.3) e 100UI de insulina (B2.5).	89
<b>Figura 30.</b> Curvas termogravimétricas referentes aos biofilmes de quitosana Sigma Aldrich <sup>®</sup> a 1%, GD 85%, baixa massa molar, sem insulina (B1.1), com 50UI de insulina (B1.3) e 100UI de insulina (B1.5)	91
<b>Figura 31.</b> Curvas termogravimétricas referentes aos biofilmes de quitosana Sigma Aldrich <sup>®</sup> a 1%, GD 75%, alta massa molar, sem insulina (B2.1), com 50UI de insulina (B2.3) e 100UI de insulina (B2.5)	92
<b>Figura 32.</b> Perda de massa expressa em percentual dos biofilmes submetidos à ação da lisozima (B1.1, B1.3 e B1.5) e ao Tampão PBS (B1.1T, B1.3T e B1.5T)	94
<b>Figura 33.</b> Células obtidas do exsudato peritoneal de Camundongos Swiss após 3 dias de estimulação com inoculação peritoneal de 3 mL de tioglicolato de sódio	96
<b>Figura 34.</b> Viabilidade de macrófagos de camundongos Swiss na presença dos biofilmes B1.1, B1.5, B2.1e B2.5	97
<b>Figura 35.</b> Produção de óxido nítrico por macrófagos de camundongos Swiss na presença dos biofilmes B1.1, B1.5, B2.1e B2.5	98

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1:</b> Categorias dos Sistemas de Liberação Modificada	24
<b>Tabela 2.</b> Vantagens e desvantagens do Sistema de Liberação Controlada de Fármacos	25
<b>Tabela 3.</b> Resumo das ações da insulina no metabolismo animal	50
<b>Tabela 4.</b> Distribuição dos aminoácidos da insulina Humana e classificação de acordo com as propriedades de suas cadeias	56
<b>Tabela 5.</b> Biofilmes produzidos e suas composições	61
<b>Tabela 6.</b> Principais valores de absorvância detectados nos biofilmes de quitosana e quitosana/insulina.	75
<b>Tabela 7.</b> Índice de Cristalinidade ( $I_{CR}$ ) das amostras calculados a partir da Intensidade refratada relativa à região cristalina ( $I_c$ ) e Intensidade refratada relativa à Região Amorfa ( $I_A$ )	83
<b>Tabela 8:</b> Dados calorimétricos das preparações Sigma Aldrich de baixa e alta massa molar (B1 e B2) respectivamente, a razão de aquecimento 10°C/min.	90
<b>Tabela 9.</b> Dados termogravimétricos dinâmicos das preparações B1.1, B1.3 e B1.5.	92
<b>Tabela 10.</b> Perda de massa percentual de biofilmes de quitosana e quitosana/insulina submetidos a ensaios de biodegradação e respectivos desvios padrão	94
<b>Tabela 11.</b> Análise de Variância - ANOVA Teste de Tukey para os biofilmes testados confrontados com o padrão positivo e negativo.	99

## LISTA DE SIGLAS

ASTM	- <i>American Society for Testing and Materials</i>
CAr	- Campus de Araraquara
CEMIB	- Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
CEP	- Comitê de Ética em Pesquisa
CLAE-UV	- Cromatografia líquida com detector espectrofotométrico na região do ultravioleta
CME	- Concentração mínima eficaz
CMT	- Concentração mínima tóxica
CN	- Controle negativo
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
DRX	- Difração de Raios X
DSC	- Calorimetria exploratória diferencial
DTG	- Derivada termogravimétrica
FCF	- Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FTIR	- Espectroscopia na região do Infravermelho com transformada de Fourier
GA	- Grau de acetilação
GD	- Grau de desacetilação
GP	- Grau de polimerização
GRAS	- <i>Generally Regard As Safed</i>
Ia	- Intensidade relativa à região amorfa
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Ic	- Intensidade relativa à região cristalina
Icr	- Índice de cristalinidade
iNOS	- enzima NO sintetase induzida
LCF	- Liberação controlada de fármacos
LPS	- Lipopolissacarídeos
MEV	- Microscopia Eletrônica de Varredura

MO	- Microscópio Ótico
MTT	- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
NPH	- <i>Neutral Protamin Hagerdorn</i>
NO	- <i>Óxido Nítrico</i>
OMS	- <i>Organização mundial da saúde</i>
PBS	- <i>Phosphate buffered saline</i>
pH	- Potencial Hidrogeniônico
PNAD	- Pesquisa Nacional por Amostra em Domicílio
ppm	- Partes por milhão
SBCAL	- Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SBF	- <i>Solution Body Fluid</i>
TGA	- Análise termogravimétrica
TS	- Tensão Superficial
UFMG	- Universidade Federal de Campina Grande
UI	- Unidade internacional
UNESP	- Universidade Estadual Paulista Prof. Júlio de Mesquita Filho
UNICAMP	- Universidade Estadual de Campinas
US	- <i>United States</i>

## 1 INTRODUÇÃO

A manutenção e reparação dos órgãos são fenômenos naturais em indivíduos saudáveis e jovens e o desenvolvimento de alguns destes indivíduos acontece, mesmo com dietas inadequadas, permanecendo saudáveis por algum tempo, quer sejam sedentários ou submetidos a rotinas extremas de exercícios. Seria bom se essa situação prevalecesse sob a humanidade, mas infelizmente isso não acontece. Algumas pessoas nascem com tecidos defeituosos ou órgãos que não funcionam bem; a maioria adquire problemas em consequência de traumas ou doenças; com a idade, perde-se progressivamente a habilidade para enfrentar os desafios físicos e curar as doenças (HASELTINE, 2002).

O aumento da expectativa de vida dos seres humanos tem trazido novos desafios às ciências em todas as áreas. Um destes desafios é a capacidade de convivência com a limitação, que ocorre em função da falência ou perda de órgãos e tecidos nos traz. Em documentos oficiais, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) destaca o considerável aumento da população idosa. Em 2007, a Pesquisa Nacional por Amostra em Domicílio – PNAD apontava a existência no Brasil de quase 20 milhões de idosos, correspondendo a 10,5% do total da população (BRASIL, 2008). Segundo dados estatísticos apresentados na Europa em 2010, a população com idade superior a 60 anos é maior que a com menos de 20 anos. O número de indivíduos com mais de 50 anos, entre 1990 e 2020, deverá duplicar (RATNER; BRYANT, 2004).

O aumento da demanda de biomateriais, ocorrido nas últimas décadas, vem de encontro à necessidade originada pelo aumento da expectativa de vida e pelo atendimento de pacientes, após tratamentos médicos, devido a doenças sistêmicas ou tratamentos farmacológicos (RATNER et al. 1996). A utilização de biomateriais em pacientes acometidos por doenças crônicas pode ser de grande valia para pacientes e profissionais, facilitando o tratamento e consequentemente melhorando sua adesão, como é o caso do Diabetes *mellitus*.

O Diabetes *mellitus*, é uma doença crônica que ocorre quando o pâncreas não produz insulina suficiente (tipo 1), ou quando o corpo não pode usar efetivamente a insulina que ele produz (tipo 2), a qual atinge 246 milhões de pessoas no mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), até 2020, o número de pessoas que vivem com diabetes deve chegar a 380 milhões, com alta incidência entre crianças. O Diabetes tipo 1,

no qual o paciente efetivamente depende da administração de insulina, cresce cerca de 3% ao ano entre crianças/adolescentes e cerca de 5% ao ano, entre crianças em idade pré-escolar. A incidência é maior em crianças do sudoeste da Ásia e da Europa. O Brasil ocupa a sétima posição no ranking de países com maior número de diabéticos, com 6,9 milhões de casos registrados. Em 2025, estima-se que o país passe a ocupar a quarta posição, com 17,6 milhões de pessoas com diabetes (BRASIL, 2008; RIBEIRO; FREUDENRICH, 2001).

O carreamento de fármacos por sistemas poliméricos, como é o caso da quitosana, é considerado uma promissora e valiosa técnica para otimizar a liberação controlada de fármacos, pois um sistema carreador deste tipo permite boa estabilidade, absorção e excelente transferência tissular quantitativa, bem como, a esperada atividade farmacodinâmica (LACAVA, 2006).

É necessário registrar que, o tratamento do Diabetes tipo 1 traz muitos incômodos, pois consiste na administração múltipla diária de insulina por via subcutânea. Diante do exposto, o desenvolvimento deste trabalho vem de encontro a essa demanda e abre uma perspectiva de minimização deste problema, uma vez que objetiva o desenvolvimento de um sistema que possa utilizar uma via de administração diferente da subcutânea, associando a aplicação deste biopolímero para a obtenção de um sistema de liberação controlada de fármaco, com potencial de real inovação tecnológica.

Por outro lado, é importante ressaltar que este trabalho enquadra-se dentro do conceito da biofarmacotécnica, área de atuação docente da autora deste trabalho, que, segundo autores, pode ser compreendida como a técnica de incluir ou veicular o fármaco em uma formulação estável, dando origem a uma forma farmacêutica adequada à via de administração proposta e ao objetivo terapêutico do medicamento (STORPIRTIS; GAI, 2009).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Desenvolver um processo para obter um biomaterial constituído por uma matriz polimérica – quitosana, em forma de biofilme, e um fármaco - insulina, para potencial aplicação como sistema de liberação controlada de fármacos.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Obter biofilmes de quitosana incorporados com insulina.
- Estudar a morfologia do biofilme de quitosana incorporado com insulina.
- Avaliar a molhabilidade dos biofilmes de quitosana e dos desenvolvidos com quitosana/insulina.
- Verificar a estabilidade do biofilme em condições de temperatura e de composição de fluidos biológicos.
- Estabelecer perspectivas de liberação controlada da insulina, a partir do biofilme desenvolvido.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Biomateriais

Os biomateriais começaram a ser utilizados pela necessidade de repor, mesmo que em alguns casos, apenas esteticamente, seguimentos biológicos de variada complexidade. Desde então, tem-se observado uma evolução deste campo, que vai da remoção dos tecidos no passado, a substituição dos mesmos atualmente, até a regeneração dos tecidos que se constitui uma meta a ser alcançada em um futuro promissor (HENCH, 1998). A partir das idéias iniciais sobre biomateriais, muitos outros estudos foram sendo encampados a exemplo da pesquisa com liberação controlada de fármacos, biosensores e dispositivos biomédicos (RATNER, 1996).

Por conseguinte, a definição inicial que considerava os biomateriais como aqueles materiais capazes de tratar, aumentar ou substituir, qualquer tecido, órgão ou função do corpo está em constante evolução, agrupando as funções e conceitos que os novos campos propõem. No entanto, algumas características já foram delimitadas por diversos pesquisadores a exemplo da interdisciplinaridade, da afinidade que os cientistas da área devem demonstrar com as ciências dos materiais, do desenvolvimento dos dispositivos de biomateriais (envolvendo desde a identificação da necessidade, desenvolvimento, manufatura, implantação e remoção do dispositivo no paciente), da magnitude da necessidade e do campo comercial (que envolve questões comerciais e éticas pertinentes). Nesta linha de raciocínio, Ratner (1996) enfatiza que não é fácil encontrar a interligação entre esses componentes no campo chamado “ciências de biomateriais” e afirma que o traço comum é a interação entre sistemas biológicos e materiais sintéticos ou naturais.

Desta forma, considera-se pertinente a afirmação de que o arsenal de biomateriais, no caso de materiais poliméricos, inclui desde biopolímeros usados na liberação controlada de fármacos (LCF) às chapas biopoliméricas usadas para reparar ossos em dispositivos ortopédicos específicos, descritos em estudos de casos. Assim, neste tipo de estudo, é necessário integrar o conteúdo das ciências básicas da engenharia e a experiência médica (DEE, PULEO; BIZIOS, 2002).

Os requisitos que um biomaterial deve cumprir são: ser biocompatível, atóxico, não cancerígeno e quimicamente estável (exceto nos casos em que se objective alcançar a biodegradabilidade); apresentar resistência mecânica adequada; apresentar peso, densidade e resistência à fadiga adequados; ter um desenho de engenharia adequado ao uso; ser

economicamente viável, reproduzível, fácil de fabricar e processar em grande escala (MORATO; NARVAEZ; TORIBIO, 2004). De acordo com a aplicação, a inércia química do biomaterial pode ser desejada, mas na maioria dos casos esta qualidade pode não ser um fator determinante na utilização deste tipo de material.

A escolha dos biomateriais influencia muito o planejamento e o sucesso da utilização de técnicas de liberação controlada de fármacos, em implantes e órgãos artificiais. Pesquisadores estão usando estratégias da engenharia para desenvolver polímeros inspirados para aplicação terapêutica e diagnóstica. O critério de planejamento para esses materiais está baseado em grandes limitações funcionais para regular atividades biológicas, de maneira controlada e biocompatível. Assim, novos polímeros estão em desenvolvimento para serem utilizados na adesão tecidual, recriando condições do corpo na superfície do polímero, evitando problemas pós-operatórios. Outra área de interesse é o uso de biomateriais para o planejamento de matrizes artificiais extracelulares que servem como suporte para aplicação na engenharia de tecidos. Estes suportes são projetados em formas tridimensionais complexas e permitem controlar certos sinais micro-ambientais como interações extracelulares e estímulos biomecânicos em nano, micro e macro-escala (BIOMATERIALS..., 2008; KOHN; WELSH; KNIGHT, 2007).

O termo biopolímeros é utilizado para descrever uma variedade de materiais classificados geralmente em duas categorias: (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).

A quitosana é um biopolímero natural, abundante e atóxico e sua utilização tem sido proposta para usos diversos, seja na área de engenharia, biotecnologia, ciências farmacêuticas ou medicina. É obtida a partir da adequação da estrutura química de um polímero natural encontrado em diversas fontes: processo de desacetilação da quitina, que por sua vez é extraída das carapaças de alguns artrópodes, principalmente os crustáceos, através da reação de desacetilação. As suas indicações incluem meio complexante de íons metálicos, como elemento básico para a confecção de matrizes de liberação controlada de fármacos, entre outras. Há algum tempo, filmes finos de quitosana tem sido submetidos a avaliações práticas, sobretudo em decorrência de suas características físico-químicas, que resultam em propriedades como fácil formação de géis, capacidade filmogênica e boas propriedades mecânicas (ASSIS; SILVA, 2003).

A utilização de quitosana em desenvolvimento de sistemas de liberação transdérmica e a eficiência deste polímero em promover a penetração transepitelial, já foram demonstradas com vários agentes terapêuticos, como a insulina, a morfina, a heparina e a hidrocortisona (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006). A liberação pulsátil baseada num sistema em gel foi desenvolvida e mostrou-se viável na distribuição modulada de insulina em resposta a mudança na concentração fisiológica da glicose (KASHYAP et al., 2007). No entanto, até o momento, desconhecem-se pesquisas que apresentem resultados com perspectivas concretas de se obter um material que possa promover a liberação da insulina em biofilmes de quitosana. Sendo assim, a efetivação deste estudo possibilitará o desenvolvimento de um biofilme que viabilizará uma opção ao tratamento do Diabetes *mellitus* com aplicação da insulina de maneira menos traumática aos pacientes.

O surgimento da engenharia de tecidos como disciplina acadêmica e da indústria global abriu oportunidades sem precedentes para o desenvolvimento de terapias avançadas para o tratamento de doenças congênitas ou adquiridas. A engenharia de tecidos fornece novas combinações de células, biomateriais, medicamentos, produtos de genes, ou genes que podem ser projetados, especificados, fabricados e fornecidos de forma simultânea ou sequencialmente, como agentes terapêuticos (BOYCE, 2002).

### **3.2 Liberação Controlada de Fármacos**

Na terapia medicamentosa convencional, o fármaco é administrado através de uma forma farmacêutica e produz um nível tecidual (geralmente sanguíneo) do fármaco, que não se mantém dentro da faixa terapêutica, por um período prolongado de tempo (LEE; ROBINSON, 2004). Desta forma, o êxito do tratamento vai depender de vários fatores como dosagens precisas e frequentes, em horários específicos pré-determinados e adesão do paciente à terapêutica, de modo que a não obediência ao esquema terapêutico pode resultar em utilização do fármaco em faixa não efetiva ou em níveis tóxicos.

O objetivo de qualquer sistema de administração de fármacos é liberá-lo ao organismo, dentro de uma distribuição espacial e temporal, ou seja, é fornecer o fármaco para o local apropriado do corpo, mantendo-o dentro da concentração desejada. Sendo assim, entende-se que um sistema de liberação controlada de fármacos, projetado de forma apropriada, constitui-se num importante avanço na direção da solução destes dois problemas (LEE; ROBINSON, 2004).

### 3.2.1 Contexto histórico e classificação

O conceito de um sistema de liberação controlada de fármacos teve início na Inglaterra na década de 1930. Em 1937, Deansley e Parkes apresentaram as suas conclusões na *Royal Society of Medicine*, em Londres. Em um experimento, eles descobriram que a implantação de estrogênio em aves do sexo masculino, resultou no aparecimento de características femininas nestas mesmas aves, em três meses. Em 1938, no *Guy's Hospital*, em Londres, Bispo apresentou pesquisa em seres humanos em que a implantação subcutânea de comprimidos de estrogênio limitou o número de sintomas apresentados pelas mulheres com menopausa prematura (SHALABY; SHALABY, 2005).

O desenvolvimento de formulações farmacêuticas para uso humano, baseado em sistemas de liberação de fármacos com taxas controladas, iniciou-se em 1970 e minibombas osmóticas são extensivamente utilizadas desde 1978, resultando em torno de 6000 publicações na literatura farmacológica, fisiológica e endocrinológica (URQHART, 2000).

A Liberação Controlada é uma das categorias de Liberação Modificada de Fármaco e como tal está descrita na Tabela 1.

**Tabela 1.** Categorias dos Sistemas de Liberação Modificada

<i>Categoria</i>	<i>Característica</i>
<b>Liberação Retardada</b>	Utiliza forma farmacêutica única com dosagens repetitivas e intermitentes de um fármaco.
<b>Liberação Sustentada</b>	Inclui qualquer sistema de administração de fármacos, que promova sua liberação lenta, por um período de tempo prolongado.
<b>Liberação Controlada</b>	Mantém o fármaco na concentração efetiva e direcionado para sítios específicos ou para receptores.

**Fonte:** Baseada em LEE; ROBINSON, (2004)

Um sistema ideal de distribuição de fármacos deve ser biocompatível, facilmente liberado, permitir um controle da taxa de distribuição de fármacos e não deve alterar a atividade do fármaco na distribuição. Os materiais naturais, incluindo polímeros como a quitosana têm sido aplicados topicamente nos sistemas de liberação de fármacos apresentando vantagens com relação aos materiais sintéticos, porque a degradação é controlada pelas células de acordo com mecanismos fisiológicos (FELDMAN et al., 2003).

O uso de biopolímeros para liberação controlada de fármacos pode minimizar reações teciduais, promover benefícios terapêuticos e, ao mesmo tempo, minimizar efeitos tóxicos (SINKO, 2008; HERDMAN, 1993).

### 3.2.2 Vantagens e Desvantagens

Considera-se que a tecnologia da liberação controlada de fármacos apresenta sua contribuição enquanto ciência multidisciplinar; entretanto, como qualquer outra forma farmacêutica, estes sistemas têm várias vantagens e desvantagens, que estão resumidas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Vantagens e desvantagens do Sistema de Liberação Controlada de Fármacos

VANTAGENS	DESVANTAGENS
Os níveis plasmáticos do fármaco podem ser mantidos por um longo período de tempo, pela liberação progressiva e controlada do fármaco, proporcionando maior eficácia terapêutica.	Problemas de biocompatibilidade do implante ou dos solventes orgânicos residuais usados na síntese.
Diminuição da frequência da administração do medicamento e maior tempo de permanência na circulação.	Produção de produtos potencialmente nocivos se for empregado um sistema de polímero biodegradável (ou absorvível). Este não é o caso da quitosana.
A liberação sustentada pode conduzir a uma baixa dosagem do fármaco que é importante quando se lida com medicamentos que tem efeitos colaterais significativos ou toxicidade.	Implante cirúrgico e/ou remoção do sistema
A colaboração do paciente pode ser melhorada com administração segura e conveniente.	Acionamento de <i>overdose</i> involuntária (em sistemas defeituosos ou em caso de acidentes), nos casos de necessidade de implantar dispositivos.
Fármacos com alto metabolismo de primeira passagem pelo fígado ou desativação pelo trato gastrointestinal podem ser efetivamente utilizado.	Incapacidade de ajustar a taxa de liberação do medicamento, se os efeitos se tornarem indesejáveis após o implante.
Direcionamento a alvos específicos possibilidade de se incorporar substâncias hidrofílicas e lipofílicas, em determinados sistemas.	Variabilidade da absorção a partir do tecido subcutâneo devido a diferenças no suprimento sanguíneo local e da quantidade de gordura local.
	Taxa de penetração lenta, falta de flexibilidade na dosagem e/ou precisão, bem como uma restrição à relativamente baixa dosagem.

**Fonte:** Adaptado de SHALABY; SHALABY (2005); AZEVEDO (2008); KAPARISSIDES et al. (2006)

### 3.2.3 Taxa de Liberação e posologia.

Nas formas farmacêuticas convencionais tais como comprimidos, cápsulas, soluções, suspensões, entre outras, a liberação do fármaco ocorre de maneira mais rápida, facilitando a absorção.

A Figura 1 ilustra o esquema cinético referente a este tipo de liberação, onde  $K_r$ ,  $K_a$  e  $K_e$  são constantes de relação de primeira ordem para liberação, absorção e eliminação total do fármaco, respectivamente.



**Figura 1.** Esquema Cinético de Liberação Convencional

**Fonte:** Baseada em LEE; ROBINSON, (2004)

Na forma farmacêutica convencional  $kr$  é muito maior do que  $ka$ , ou seja, a absorção do fármaco através de uma membrana biológica é uma etapa limitadora da taxa de distribuição do fármaco para sua área-alvo.

Na liberação não-imediata o esquema cinético acima é simplificado, conforme está ilustrado na Figura 2.

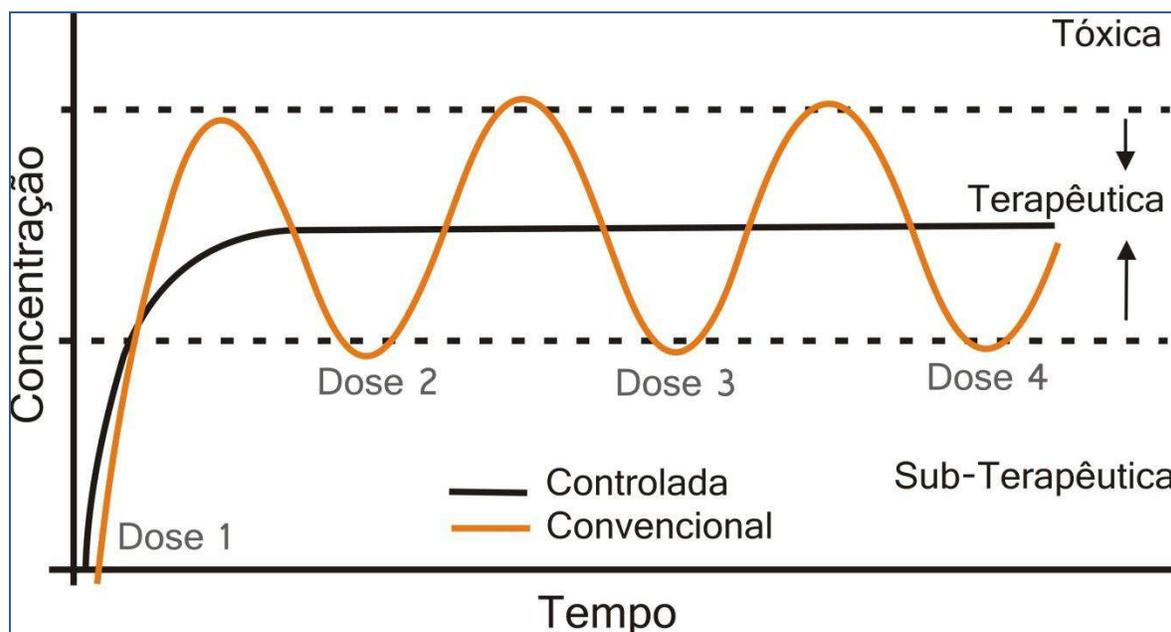


**Figura 2.** Esquema Cinético de Liberação Controlada

**Fonte:** Baseada em LEE; ROBINSON, (2004)

Neste caso, a fase de absorção torna-se insignificante em relação à fase de liberação da droga, ou seja  $kr$  é muito menor do que  $ka$ , ou seja, a liberação da droga a partir da forma farmacêutica é uma etapa limitadora da taxa. Desta maneira, o desenvolvimento de um sistema de liberação matricial, como é o caso do biofilme de quitosana, primariamente, deve tentar alterar a taxa de liberação, alterando o valor de  $kr$ .

Sendo assim, o objetivo inicial ideal de um sistema de liberação controlada é manter um nível constante do fármaco no sangue ou tecido-alvo, nos casos terapêuticos em que isto seja necessário ou desejável. A Figura 3 estabelece uma comparação entre o sistema convencional e o de liberação controlada.



**Figura 3:** Perfil de liberação de fármacos convencional e controlada em função do tempo  
**Fonte:** VITALINE (2010)

Considerando que cada fármaco possui 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 convencional, apresenta um aumento na concentração, até atingir um pico máximo ( $C_{max}$ ) e então declina: neste momento, uma nova dose é necessária, para que a concentração volte a subir. Quando a administração de doses não é rigorosamente seguida, a concentração pode ficar abaixo do valor terapêutico ideal, ou seja, abaixo da concentração mínima eficaz (CME) ou acima do valor terapêutico ideal, atingindo a Concentração Mínima Tóxica (CMT). Dessa maneira, 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 JR., POPOVICH, ANSEL, 2007).

### 3.2.4 Classificação da Liberação Controlada de Fármacos

Em geral, a Liberação Controlada de Fármaco (LCF) utiliza como métodos de liberação a **difusão, a dissolução e a osmose**, nos quais quase sempre é possível utilizar o sistema de reservatório e o sistema matricial. A Figura 4 apresenta os principais itens de classificação da Liberação Controlada de Fármacos. No entanto, os comentários seguintes estão especialmente direcionados ao sistema matricial, no qual se pode incluir o objeto de estudo deste trabalho, ou seja, o biofilme quitosana/insulina.

No primeiro caso, a liberação da droga é determinada pela sua difusão através de um polímero insolúvel em água utilizando dois sistemas: em um deles, o fármaco é envolvido por uma membrana polimérica e no outro se utiliza uma matriz na qual o fármaco é dissolvido ou disperso uniformemente. Na prática, os sistemas de difusão também dependem da dissolução, para que ocorra a liberação.

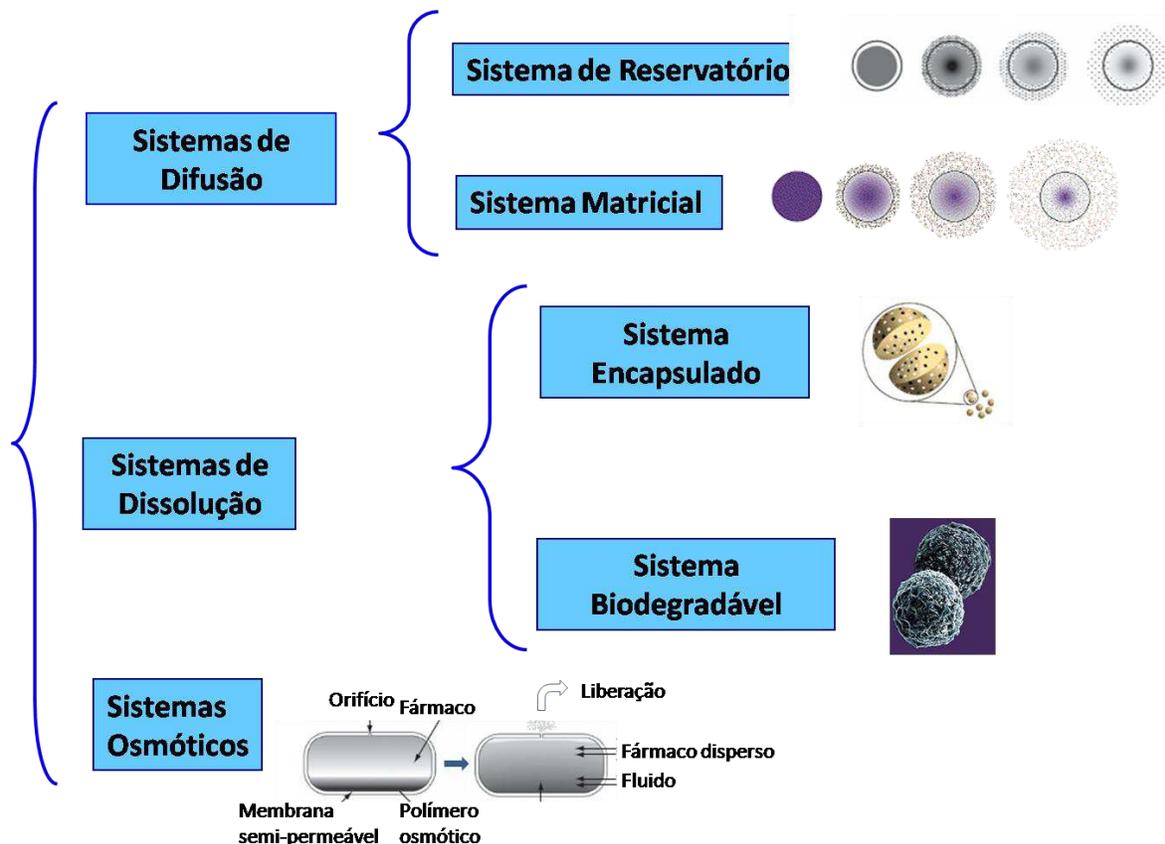
A liberação de um fármaco, a partir de um dispositivo de reservatório, é regida pela primeira lei de difusão de Fick, ou seja

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

Onde J é o fluxo da droga através da membrana, na direção da concentração decrescente (quantidade/área-tempo);

D é o coeficiente de difusão da droga na membrana (área/tempo);

e  $dC_m/dx$  é a variação da concentração da droga com a distância  $x$  (LEE; ROBINSON, 2004).



**Figura 4.** Classificação da LCF e suas principais vias de Administração  
 Fonte: Própria

Em contrapartida, no sistema de matriz o fármaco é distribuído uniformemente em toda matriz polimérica, cuja liberação controlada ocorre através de uma série de interconexões tortuosas de canais que permitem, ou não, a liberação de macromoléculas, por longos períodos de tempo. Após a exposição ao meio biológico, a matriz intumescer, causando um aumento da distância entre as cadeias poliméricas facilitando, portanto, a liberação do fármaco a partir da matriz para o meio biológico, por escoamento ou a partir da degradação das cadeias do polímero, devido a ação dos fluidos biológicos (SHALABY; SHALABY, 2005).

Os sistemas de dissolução podem ser formados partindo do princípio de que um fármaco com dissolução lenta produzirá um nível sanguíneo sustentado e a preparação de produtos de liberação controlada é possível, controlando-se a taxa de dissolução dos fármacos que sejam altamente solúveis em água. A opção é preparar um sal ou derivado apropriado, revestindo-o com um material lentamente solúvel e incorporá-lo em um

comprimido com um carreador lentamente solúvel. A área de superfície disponível para dissolução tem que permanecer constante para alcançar uma taxa de liberação constante, situação que, na prática, é difícil de obter (LEE; ROBINSON, 2004).

A equação de Noyes-Whitney define a dissolução de uma partícula esférica e apresenta a velocidade de transferência de massa de moléculas ou íons de soluto por uma camada de difusão estática ( $dm/dt$ ), como diretamente proporcional à área disponível para a migração molecular ou iônica ( $A$ ) e a diferença de concentração ( $\Delta C$ ), pela camada limítrofe, bem como é inversamente proporcional à espessura da camada ( $h$ ). Essa relação pode ser visualizada na Equação 2.

$$dm/dt = k_1 A \Delta C / h \quad (2)$$

onde  $k_1$  = coeficiente de difusão ( $m^2s^{-1}$ ) (AULTON, 2005).

De uma forma geral, os sistemas que usam dissolução são dois tipos: a formulação encapsulada, na qual a liberação da droga é determinada pela espessura do polímero e a formulação matricial, na qual a liberação da droga é determinada pela taxa de dissolução do polímero (LEE; ROBINSON, 2004). Neste último caso, a matriz polimérica pode ser biodegradável oferecendo a vantagem de ser absorvida pelo organismo, eliminando, portanto, a necessidade de remoção cirúrgica do sistema e permitindo a difusão do fármaco para os tecidos circundantes. No entanto, é preciso ponderar esta vantagem com a possibilidade do potencial tóxico dos produtos da degradação do polímero (SHALABY; SHALABY, 2005).

Nos Sistemas Osmóticos, a pressão osmótica pode ser empregada como força de impulsão para gerar uma liberação constante de droga, desde que uma pressão osmótica constante seja mantida e outras variáveis sejam controladas. Para uma melhor compreensão deste sistema, considere-se um comprimido revestido por uma membrana semipermeável, contendo um pequeno orifício. Quando exposta à água ou a algum líquido do corpo, a membrana permitirá difusão livre de água, mas não do fármaco, resultando em sua entrada devido à diferença de pressão osmótica e a taxa de fluxo de volume de água. Portanto, a permeabilidade, a área e a espessura da membrana determinam a taxa de fluxo de volume da água para o interior do comprimido, resultando no bombeamento do fármaco para fora, através do orifício, em um ritmo controlado (LEE; ROBINSON, 2004).

### *3.2.5 Hidrogéis como sistema matricial para liberação controlada de fármacos*

Hidrogéis são géis poliméricos especiais capazes de formar uma rede polimérica tridimensional e de absorver e reter diferentes quantidades de água e de fluidos biológicos. Podem ser sintetizados via monômeros bifuncionais e com agentes reticulantes multifuncionais. A princípio, qualquer polímero pode ser usado para se sintetizar uma rede polimérica, isto inclui polímeros biológicos como polissacarídeos (inclusive a quitosana) e proteínas (inclusive a insulina). Polímeros lineares solúveis em água podem ser usados para produzir um gel. A ligação cruzada pode ocorrer por meio de reação química, radiação ionizante (gerando radicais livres que podem-se recombinar formando junções entre as cadeias de polímeros) ou através de interações físicas como emaranhados e cristalitos. A hidrofilicidade vem da inclusão na rede de grupos como hidroxila, sulfonato, carboxilato e outros grupos que interagem suficientemente bem com a água. Um hidrogel pode ser convertido também de um tipo a outro através de reações químicas em seus grupos funcionais. Desse modo, pode-se obter uma infinidade de hidrogéis para todas as mais variadas características (BISPO, 2009).

Estes géis poliméricos intumescidos são reticulados para formar uma matriz porosa, tanto por métodos físicos como químicos; eles são macios, úmidos e mimetizam muitos tecidos naturais, que os habilitam na substituição de delicados tecidos vivos (COSTA JÚNIOR, 2008; SINKO, 2008; BATICH; LEAMY, 2003).

Polímeros naturais como quitosana, alginato e algarose favorecem a produção de sistemas de hidrogéis porque eles são macromoléculas solúveis em água que produzem géis físicos. Outros polímeros naturais como colágeno, gelatina e fibrina formam géis reticulados induzidos por agentes reticulantes, como transglutaminases. Dependendo da aplicação, hidrogéis naturais oferecem várias vantagens em relação a agentes sintéticos, incluindo aumento da hidrofilicidade e aumento da porosidade, (GINTY et al., 2006).

As propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas podem ser moduladas. Por exemplo, hidrogéis podem responder a estímulos do ambiente como temperatura, pH, luz e moléculas específicas. Estas propriedades interessantes tem tornado os hidrogéis comum

para várias aplicações variando de aplicações farmacêuticas, biomédicas e outras aplicações industriais (SINKO, 2008; JEONG; HUH; PARK, 2006).

Dentre as muitas aplicações de hidrogéis, a Liberação Controlada de Fármacos é uma das áreas nas quais eles têm desempenhado um papel vital. A matriz hidratada resulta em boa compatibilidade tanto com proteínas, como com células vivas e fluidos biológicos. Desde o primeiro relato de uso biomédico de hidrogéis em 1960, vários outros hidrogéis tem sido desenvolvidos para aplicações biomédicas e farmacêuticas particularmente para a distribuição de fármacos e substâncias bioativas (JEONG; HUH; PARK, 2006).

Assim, constata-se que a utilização dos hidrogéis na preparação de formas farmacêuticas permitem a liberação do fármaco após expansão, em contato com o meio de dissolução ou em resposta à estímulos fisiológicos como temperatura, pH, enzimas, biomoléculas (glicose, ureia, insulina), força iônica e oxidação (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010). George e Abraham (2006) afirmaram que a quitosana apresenta propriedades como biocompatibilidade, biodegradabilidade, sensibilidade ao pH e mucoadesividade que favorecem sua utilização por farmacologistas como matriz na liberação controlada de fármacos, inclusive por via oral.

### **3.3 Polimerização e Biopolímeros: uso de polímeros na indústria farmacêutica.**

Uma vez estabelecidas condições de reação, a união de monômeros por ligações covalentes origina polímeros. A condição primária para que determinada molécula possa polimerizar é conhecida como funcionalidade, a qual deve ser igual ou superior a dois (pontos reativos  $\geq 2$ ). Esta funcionalidade apresenta-se de três maneiras: presença de pelo menos dois grupos funcionais, presença de insaturação e moléculas cíclicas (3/4 átomos). O processo de transformação de moléculas monoméricas em moléculas poliméricas é conhecido como polimerização. Quanto à cinética de polimerização as reações podem ser em cadeia e em etapas (FOOK, 2005; BATICH; LEAMY, 2003).

Denominam-se homopolímeros aos polímeros formados a partir de um único monômero, em contraposição aos copolímeros ou heteropolímeros que são formados a partir de mais de um monômero. Os copolímeros podem ser alternados, aleatórios, ou em blocos (SINK, 2008). No caso dos copolímeros alternados, dois tipos de polímeros se

alternam sistematicamente. Para os copolímeros aleatórios os meros seguem uma seqüência aleatória dentro da cadeia. Já os copolímeros em bloco apresentam seqüências longas de um mesmo mero, alternando com seqüências de outro mero (SINKO, 2008). Sendo assim, pode-se dizer que a quitosana é um copolímero aleatório, cujas unidades monoméricas são a glicosamina e acetilglicosamina.

A maioria das técnicas de polimerização produz polímeros com cadeias de massas molares variadas. Desta maneira, a massa molar de um polímero é de grande interesse por afetar propriedades mecânicas solubilidade e ponto de fusão do polímero. A massa molar de um polímero pode ser diferenciado como massa molar numérica média ( $M_n$ ) e massa molar ponderada ( $M_w$ ). A massa molar numérica avalia a massa molar sobre o número total de moléculas (média aritmética), enquanto que a massa molar ponderada considera as proporções mássicas (FOOK, 2005; BATICH; LEAMY, 2003; CALLISTER JR., 2001).

As Equações 3 e 4 apresentam as fórmulas das massas molares:

$$M_n = \sum N_i M_i / \sum N_i \quad (3)$$

$$M_w = \sum N_i M_i^2 / \sum N_i M_i \quad (4)$$

onde  $N_i$  é o número de cadeias poliméricas com massa molar  $M_i$ .

O mecanismo de polimerização é uma classificação usual porque indica a presença de agentes contaminantes de baixa massa molar, como oligômeros ou monômeros que não reagiram. Os polímeros de baixa massa molar apresentam maior mobilidade e solubilidade e mais facilidade de provocar efeitos fisiológicos (BATICH; LEAMY, 2003). O Grau de Polimerização "n" é uma alternativa para avaliar o tamanho da cadeia polimérica, que representa o número médio de unidades monoméricas da cadeia (SINKO, 2008; CHANDA; ROY, 2006; CALLISTER JR., 2001).

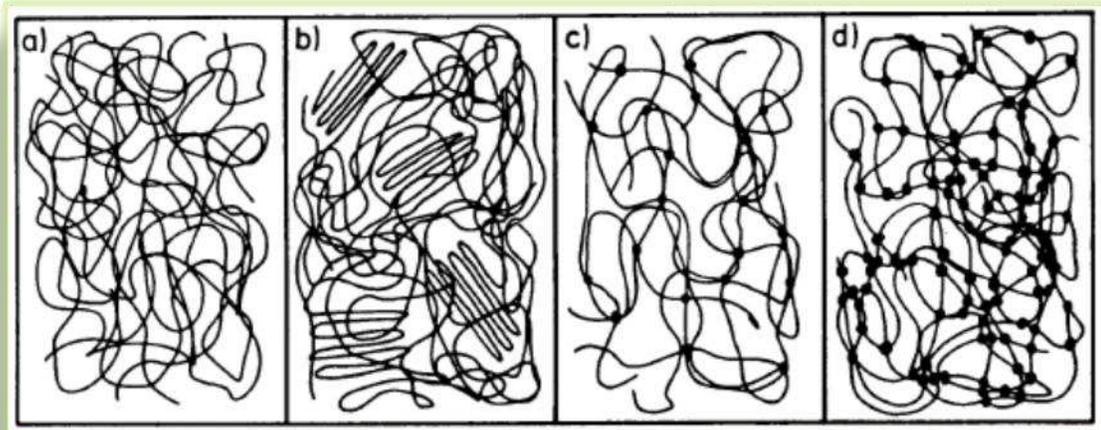
No caso específico do polímero quitosana, cadeias com baixas massas molares e oligômeros podem ser conseguidas pela hidrólise das cadeias poliméricas e, para algumas aplicações específicas, estas pequenas moléculas têm sido utilizadas com mais facilidade. A despolimerização da quitosana pode ser conseguida quimicamente, enzimaticamente ou fisicamente. A despolimerização química pode ser feita por hidrólise ácida usando HCl ou

por reação oxidativa utilizando  $\text{HNO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Entre as enzimas, que são capazes de despolimerizar a quitosana enzimaticamente, está a lisozima. A despolimerização física pode ser feita por radiação gama. O grau de polimerização (GP) é uma importante característica a ser fornecida pelos fabricantes do mercado atual (ARANAZ et al., 2009).

As cadeias poliméricas podem ser arranjadas de três maneiras: linear, ramificada e reticulada. Como todos os materiais as propriedades dos polímeros podem ser previstas e explicadas pelo entendimento da estrutura polimérica em escala atômica, microscópica e macroscópica podendo ainda ser classificados superficialmente em termoplásticos e termorrígidos. A cadeia polimérica da quitosana é do tipo ramificada e para determinadas aplicações ela tem sido reticulada por agentes reticulantes, como ácido sulfúrico, glutaraldeído, tripolifosfato, entre outros ( FIDÉLES, 2010; LAUS et. al., 2006; PIAI et al., 2006; TORRES et al., 2006).

Polímeros termoplásticos são constituídos de cadeias poliméricas individuais que são mantidas juntas por ligações relativamente fracas, como ligações dipolo-dipolo e forças de Van der Waals. Os termoplásticos amolecem quando são aquecidos e endurecem quando resfriados, processos totalmente reversíveis e que podem ser repetidos. A maioria dos polissacarídeos e proteínas é considerada termoplástica e pode ser processado por técnicas usuais, ser dissolvidos em solventes, formar filmes e outros dispositivos. Os termoplásticos são lineares ou ramificados. Já os polímeros termorrígidos são os que contêm reticulações entre as cadeias poliméricas e não estão sendo abordados neste trabalho (BATICH; LEAMY, 2003; CALLISTER JR.,2001).

Comparativamente, os polímeros não cristalizam na mesma intensidade que os metais, porque as cadeias poliméricas são grandes e de tamanhos variados. Os grupos terminais atuam como imperfeições cristalinas. Geralmente, os polímeros são classificados como semicristalinos, uma mistura de regiões cristalinas e amorfas (FOOK, 2005). No estado sólido os polímeros possuem variados graus de cristalinidade. Nenhum polímero apresenta cem por cento de cristalinidade, mas alguns são puramente amorfos (BATICH; LEAMY, 2003). As cadeias poliméricas podem apresentar regiões cristalinas e regiões amorfas interconectadas, conforme está sendo apresentado na Figura 5.



**Figura 5.** Morfologia esquemática dos materiais amorfos: a) termoplástico amorfo; b) termoplástico semi-cristalino; c) elastômero; d) termorrígido

**Fonte:** Padilha (2000)

A cada uma destas regiões está associada uma temperatura de transição do estado sólido para o estado líquido. No caso da região amorfa, a mobilidade está restrita a vibrações de curta intensidade e é denominada temperatura de transição vítrea ou de segunda ordem ( $T_g$ ). A temperatura associada à fusão da fase cristalina é denominada temperatura de fusão cristalina ( $T_m$ ). Estes casos compreendem os polímeros de cadeia linear e ramificada. No caso de polímeros de cadeia reticulada não ocorre a presença de estruturas cristalinas (FOOK, 2005).

A quitosana tem sido descrita como semi-cristalina ou cristalina mostrando polimorfismo, dependendo do estado físico. A cristalinidade da quitosana também pode variar consideravelmente dependendo do tratamento do polímero durante a extração e da origem, sendo a cristalinidade da quitosana extraída da carapaça de caranguejo maior do que a extraída da carapaça de lagosta, que por sua vez é maior do que a de camarão (ARANAZ, 2009; RINAUDO, 2006). O primeiro requisito para a cristalinidade é a repetição ordenada da estrutura da cadeia. Por isso, polímeros estereoregulares são frequentemente cristalinos, enquanto que seus homólogos são amorfos (BATICH; LEAMY, 2003).

Os polímeros incluem-se dentre os materiais mais utilizados na indústria farmacêutica, dada a sua versatilidade quanto a aplicações e funcionalidades, especialmente na liberação controlada de fármacos (DEE, PULEO; BIZIOS 2002). Diante da importância dos polímeros na produção de medicamentos e cosméticos, faz-se necessário que os

farmacêuticos conheçam mais sobre estes componentes e, que os engenheiros de materiais reconheçam as necessidades específicas do setor (VILLANOVA; ORÉFICE, CUNHA, 2010).

Vários fatores que correlacionam às propriedades do princípio ativo, dos polímeros e dos demais componentes da formulação são determinantes na escolha deste polímero, que vão desde o tipo de formulação até o mecanismo de liberação pretendido (por exemplo, forma de dosagem parenteral ou entérica). Diante disto, os fabricantes procuram proporcionar polímeros com propriedades que possibilitem a sua aplicabilidade em determinadas formulações. Os sistemas de liberação poliméricos são ferramentas de grande importância na indústria farmacêutica utilizados principalmente para se conseguir um controle espacial ou temporal (OLIVEIRA; LIMA, 2006).

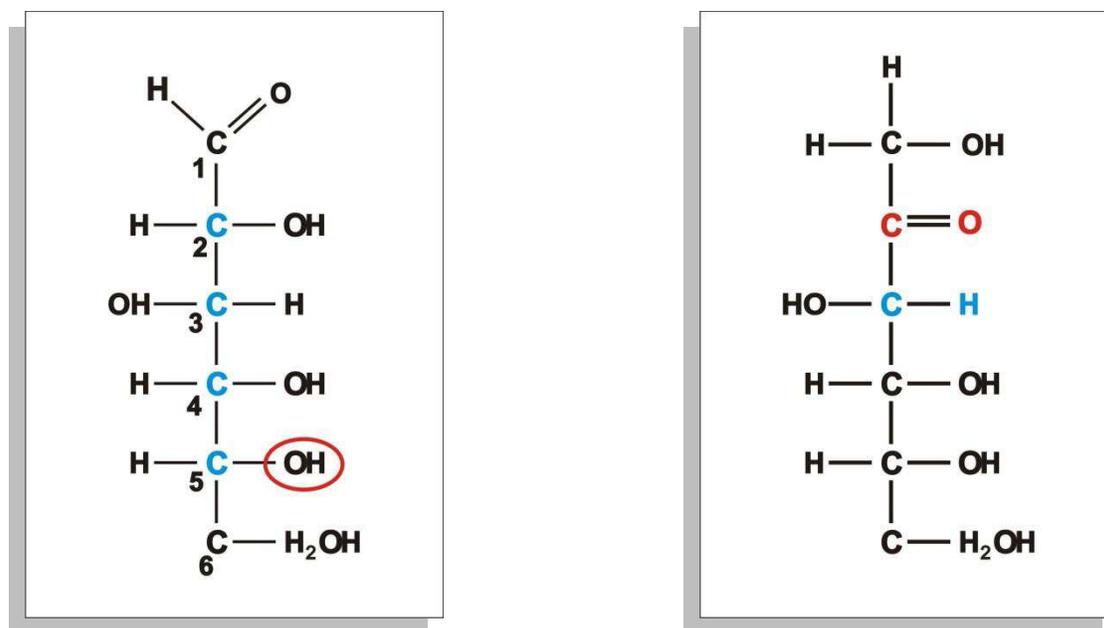
A quitosana tem sido utilizada pela indústria farmacêutica como excipiente, quer seja para a compressão direta de comprimidos, como desintegrante de comprimidos para a produção de sistemas de liberação controlada de fármacos ou pra promover a dissolução de fármacos. É evidente que, quando a quitosana é comparada com excipientes tradicionais, para determinados usos, ela tem demonstrado propriedades superiores e maior flexibilidade. Além do mais, quitosana tem sido usada para a produção de micro-esferas e de micro-cápsulas em pesquisas na liberação controlada de fármacos de hormônios. Também tem sido utilizada para distribuição oral e nasal de fármacos polares incluindo peptídeos e proteínas e distribuição de vacinas. Estas propriedades, juntamente com a isenção da toxicidade, fazem da quitosana um promissor excipiente para indústria farmacêutica atual e do futuro (ILLUM, 2008).

### **3.4 Estrutura Polimérica dos Polissacarídeos**

Segundo sua origem, os polímeros são classificados como naturais e sintéticos. Dentre os naturais, estão os polímeros a base de proteínas (colágeno, albumina e gelatina) e os polissacarídeos (quitosana, agarose, alginato, carragenina, ácido hialurônico, dextran e ciclodextrinas). Os polímeros sintéticos podem ser sub-classificados em biodegradáveis (poliéster, polianidrido, poliamidas, polímeros fosforosos e outros) e não biodegradáveis (silicones, acrílicos e outros). Alguns autores têm enfatizado a utilização da quitosana na

liberação controlada de fármacos, embora com enfoque diferenciado ao dado nesta abordagem (SINKO, 2008; OLIVEIRA; LIMA, 2006; TORRES et al., 2005; AGNIHOTRI MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004; SINHA et al., 2004). Os polissacarídeos e as proteínas tem sido utilizados extensivamente na liberação controlada de fármacos (OTTENBRITE; FADEEVA, 1994).

Para uma compreensão adequada da nomenclatura empregada na estrutura polimérica dos polissacarídeos, especialmente da quitina e da quitosana, considera-se pertinente um resgate de princípios fundamentais da bioquímica, associada ao assunto. Os monômeros que compõem a estrutura dos polissacarídeos são denominados monossacarídeos e que se caracterizam por serem aldeídos ( $\text{H}-\text{C}=\text{O}$ ) ou cetonas ( $-\text{C}=\text{O}$ ) derivados de polihidroxiálcoois de cadeia linear contendo pelo menos três átomos de carbono. Caso o grupo carbonila seja um aldeído, o composto é chamado de aldose e caso o grupo carbonila seja uma cetona, o composto é chamado cetose (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2006). A D-Glicose é o exemplo mais conhecido das aldohexoses e a D-frutose é o principal exemplo das ceto-hexoses e suas respectivas estruturas químicas estão descritas na Figura 6.

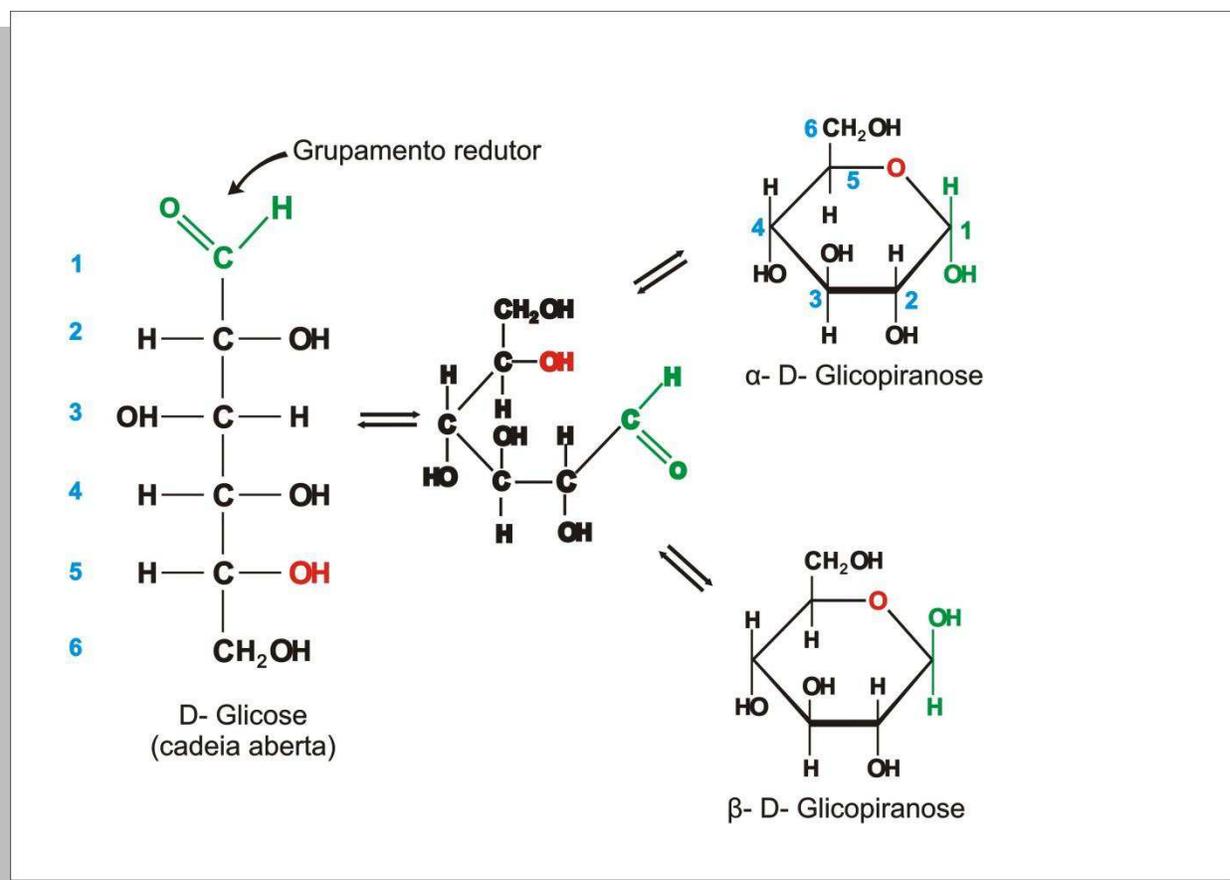


**Figura 6.** D-glicose (aldohexose) e D-frutose (ceto-hexose) respectivamente  
**Fonte:** Adaptado de Ferreira, Rocha e Silva (2009)

De acordo com a convenção de Fischer, um composto é classificado como D, quando o centro assimétrico (quiral) mais afastado do grupo carbonila possui a mesma

configuração absoluta do D-gliceraldeído, ou seja, o  $\text{-OH}$  no  $\text{C}_5$  da D-glicose está à direita na projeção de Fischer.

Na realidade, os monossacarídeos que possuam cinco ou mais átomos de carbono na cadeia, em geral ocorrem em soluções aquosas como estruturas cíclicas, nas quais o grupo carbonila forma uma ligação covalente com o oxigênio de um grupo hidroxila ao longo da mesma cadeia. Sendo assim o composto dá origem a compostos anômeros, ou seja, a um par de estereoisômeros que se diferem em configuração do carbono anomérico em  $\alpha$  e  $\beta$  (FIGURA 7). O átomo de carbono carbonila (grupo aldeídico) ou hemiacetal (grupo cetônico) que reage com o grupo álcool é denominado carbono anomérico (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2006).

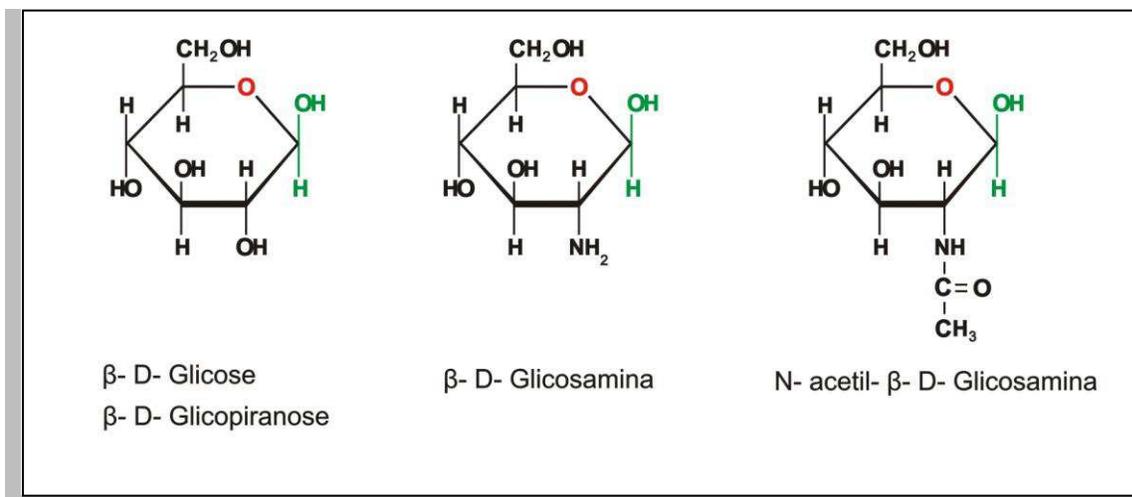


**Figura 7.** Diferenciação da D-glicose em  $\alpha$ -D-glicopiranosose e  $\beta$ -D-glicopiranosose

**Fonte:** Adaptado de Ferreira, Rocha e Silva (2009)

Para a formação do radical glicosamina a hidroxila em  $\text{C}_2$  do açúcar original é substituída por um grupo amino, que pode condensar-se, ou não, com o ácido acético formando a N-acetilglicosamina. Desta maneira, fica explicada a estrutura monomérica da

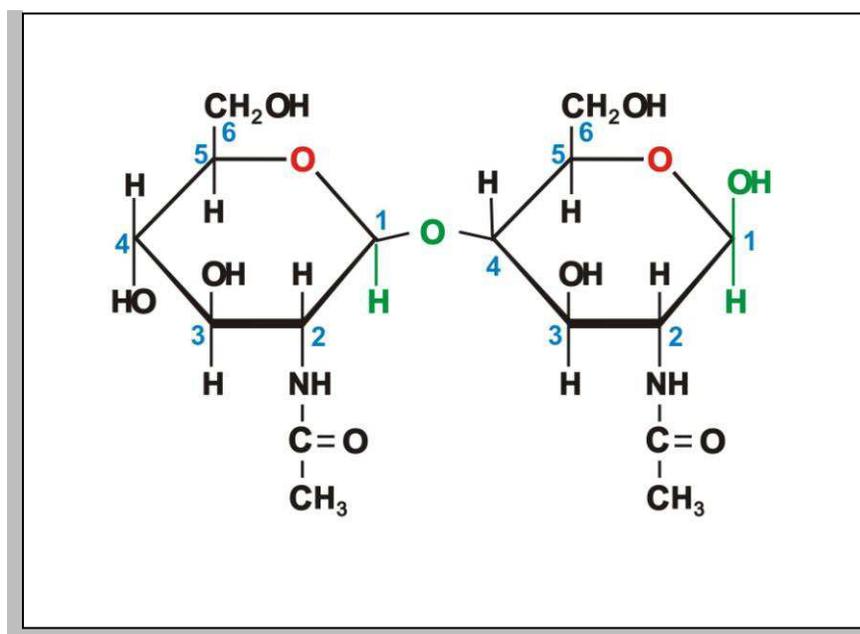
quitina e da quitosana. A Figura 8 apresenta os monômeros  $\beta$ -D-glicose, da  $\beta$ -D-glicosamina e do N-acetil-D-glicosamina.



**Figura 8.** Semelhança entre a estrutura química da  $\beta$ -D-glicose, da  $\beta$ -D-glicosamina e da N-acetil-D-glicosamina

**Fonte:** Adaptado de Ferreira, Rocha e Silva (2009)

Denomina-se ligação glicosídica a ligação covalente que une dois monossacarídeos a partir de um grupo hidroxila de um deles com o átomo de carbono anomérico do outro (FIGURA 9).



**Figura 9.** Ligação glicosídica entre monômeros da quitina

**Fonte:** Adaptado de Ferreira, Rocha e Silva (2009)

Na nomenclatura dos polissacarídeos, algumas vezes é utilizada a letra “O” precedendo o nome do primeiro monossacarídeo, como lembrete que a união açúcar-açúcar é feita através do átomo de Oxigênio, como por exemplo no caso do O-  $\alpha$ -D-glicopiranosose (1  $\rightarrow$  4)  $\beta$ -D-glicopiranosose. O símbolo (1  $\rightarrow$  4) indica que a ligação glicosídica ocorreu entre o C<sub>1</sub> do primeiro monossacarídeo e o C<sub>4</sub> do segundo monossacarídeo. As ligações glicosídicas são facilmente hidrolisadas por ácido, mas resistem à clivagem por base.

No tópico a seguir, será feito um aprofundamento sobre os polímeros quitosana e seu precursor a quitina, para uma melhor compreensão do objeto de estudo do experimento que fundamenta este trabalho.

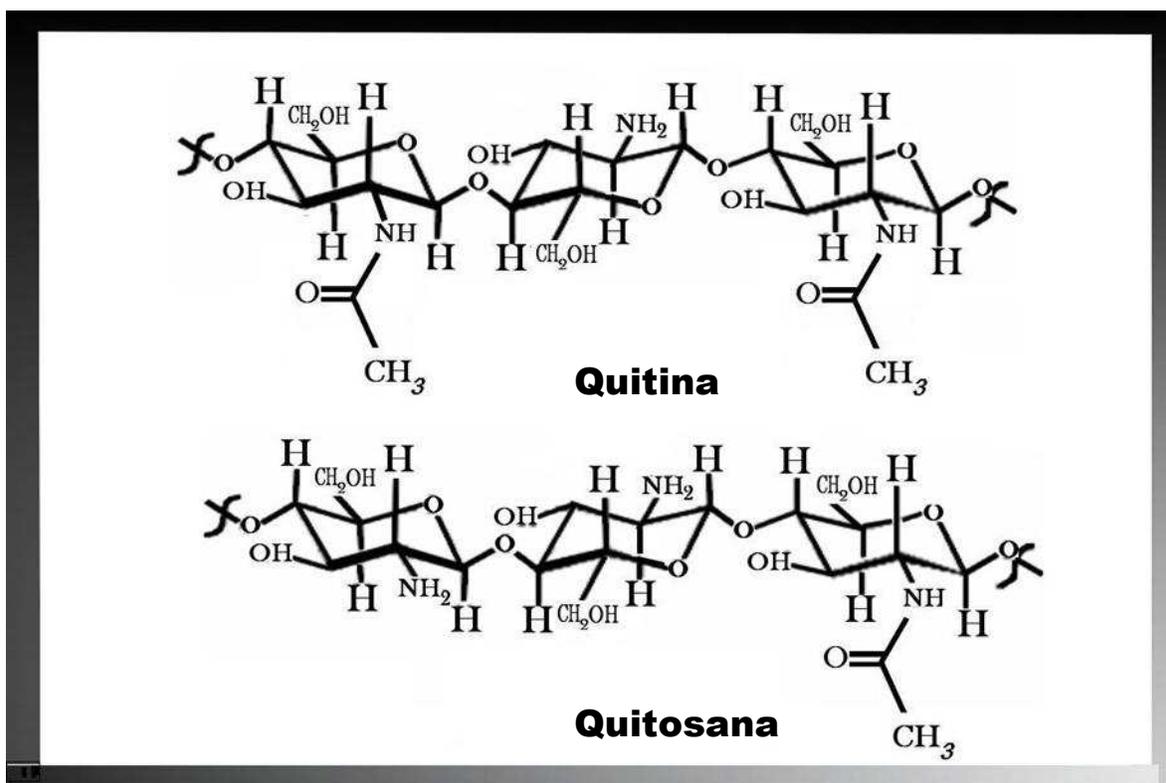
### **3.5 Polímeros Naturais: Quitina e Quitosana**

O grande interesse de cientistas e tecnólogos pela quitina e a quitosana como materiais poliméricos, com aplicações na área biomédica, advém do fato de que estes polissacarídeos têm características tecnológicas e econômicas relevantes além de apresentarem propriedades biológicas adequadas: são atóxicos, biocompatíveis, biodegradáveis e produzidos por fontes naturais renováveis (DALLAN, 2005; FRAGA et al. 2006; SANTOS et al., 2003; CUI et al., 2008). São derivados de resíduos da indústria da pesca, produzidos a partir do processamento da carapaça dos crustáceos e apresentam um grande valor comercial devido à sua alta porcentagem de nitrogênio (6,89%), quando comparada à celulose substituída sinteticamente (1,25%), tornando-os agentes quelantes (DALLAN, 2005; CRINI; BADOT, 2007). Estima-se que, cerca de 10 bilhões de toneladas de quitina e seus derivados, são produzidos a partir de organismos vivos a cada ano (WONG, 2009).

A quitina e a quitosana podem ser empregadas como biomateriais sob a forma de biofilmes de recobrimento (membranas), soluções coloidais ou esponjas, no tratamento de ferimentos ou queimaduras; na área farmacêutica são bastante utilizados como carreadores de fármacos e na indústria de cosméticos; apresentam várias utilizações na agricultura e na indústria de alimentos. A quitina e/ou seus derivados estão disponíveis comercialmente principalmente para administração por via oral, no auxílio a processos de emagrecimento, o

que reforça seu caráter de baixa toxicidade (DALLAN, 2005; SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

A quitina e a quitosana são heteropolímeros ou copolímeros formados a partir dos monômeros (1,4)-2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose e  $\beta$ -(1,4)-2-acetoamino-2-desoxi-D-glicopirranose que se ligam entre si por ligações glicosídicas. A quitosana é obtida pela desacetilação da quitina, mais especificamente do carbono 2 do segundo monômero. Desta forma, quanto à estrutura química, a principal diferença entre a quitina e a quitosana diz respeito à presença do radical acetato, ligado ao radical amino, no carbono 2 que compõe o anel principal da estrutura (CAMPANA FILHO et al., 2007; KUMAR, 2000). Na Figura 10, esta diferenciação pode ser visualizada.



**Figura 10.** Estrutura química da Quitina e da Quitosana

**Fonte:** adaptado de CLEASEN, WILHELMS; KULICKE (2006)

Ambos os polímeros exibem propriedades físico-químicas, biológicas e mecânicas bem interessantes, com grande potencial de aplicações. Várias destas propriedades são relatadas pelo Grau de N-acetilação - GA, que é o mais importante parâmetro de comportamento dos polímeros. Este parâmetro é utilizado para caracterizar o conteúdo

médio de unidades N-acetil-D-glicosamina de quitina e quitosana. A determinação do GA dos dois polímeros é o mais importante parâmetro que influencia suas propriedades e comportamento, facilitando o estudo de estruturas químicas, propriedades e relações estruturas-propriedade. Se o GA é conhecido, muitas propriedades podem ser previstas (KASAAI, 2008; SILVA ; SANTOS; FERREIRA, 2006). Em contraposição, a fração ou percentagem de unidades de glicosamina (monômeros desacetilados) em uma molécula polimérica de quitosana ou quitina é denominada Grau de Desacetilação – GD (ASTM, 2007). O GD varia com a fonte de quitina e com o método de processamento (WONG, 2009).

Alguns estudos consideraram a evolução das bandas a  $1655\text{ cm}^{-1}$  (amida I) e a  $1590\text{ cm}^{-1}$  (deformação N-H de amidas) em espectroscopia no Infravermelho, como indicadoras do grau de desacetilação (GD). Deste modo, o aumento do grau de desacetilação foi indicado pelo decréscimo da banda  $1655\text{ cm}^{-1}$  na mesma proporção do crescimento da banda de  $1590\text{ cm}^{-1}$  (JOSUÉ et al., 2000; CANELA; GARCIA, 2001; PRASHANTH; KITTUR; THARANATHAN, 2002).

A Quitina é o segundo polímero mais abundante da natureza, depois da celulose, sendo o constituinte principal das carapaças dos artrópodes, dentre os quais se destacam os crustáceos (caranguejos, camarões, lagostas e siris) e encontrado em menor quantidade em outras espécies animais. É, também, o constituinte principal das paredes celulares nos fungos (QUITINA, 2008; FRAGA et al. 2006; TAKAHASHI; IMAI; SUZUKI, 2007; KASAAI, 2008; CRINI; BADOT, 2007; RINAUDO, 2006; STEVENS, 1999).

### **3.6 Quitosana**

A quitosana é um polissacarídeo insolúvel em água, ácidos concentrados, álcalis, álcool e acetona. Sob agitação e aquecimento constante, durante um longo período, alguns ácidos inorgânicos e diluídos (ex. ácido acético, nítrico, perclórico ou fosfórico), podem ser utilizados no preparo de soluções de quitosana (DALLAN, 2005; HEJAZI; AMIJI, 2003). A solubilidade da quitosana é melhorada em condições ácidas ( $\text{pH} < 6$ ), pois, nestas condições, a maioria dos grupamentos amino estão protonados (MAO et al., 2005). Alguns trabalhos tem sido publicados que sugerem a modificação de sua estrutura, tornando a

quitosana solúvel, mesmo em pH 10 (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006). Maeda et al. (2003) relatam que a quitosana com baixo peso molecular (menor que 2000Da) é solúvel em água.

### 3.6.1 Origem

É um derivado da quitina obtida de sua desacetilação parcial ( $\geq 50\%$ , dependendo do polímero) no estado sólido em condições alcalinas ou por hidrólise enzimática na presença da quitina desacetilase. O processo de desacetilação consiste na remoção da maioria dos radicais acetilas da estrutura e substituição dos mesmos por um átomo de hidrogênio, resultando em um radical amino. Então, os polímeros desacetilados, com grau de desacetilação acima de 50%, podem ser considerados quitosana. As quitosanas obtidas pela reação de estado sólido tem uma distribuição heterogênea de grupos acetil ao longo de suas cadeias, provavelmente devido à morfologia semicristalina da quitina. Tem sido demonstrado que a  $\beta$ -quitina tem uma reatividade muito maior na desacetilação que a  $\alpha$ -quitina (RINAUDO, 2006; DALLAN, 2005).

O termo quitosana abrange o conjunto de copolímeros que contém ao menos 50-60% de unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose e o restante das unidades monoméricas composta de 2-acetoamido-2-desoxi-D-glicopiranosose (CAMPANA-FILHO et al., 2007; GINTY et al., 2006). A quitosana é citada entre os mais importantes polímeros absorvíveis/biodegradáveis e carrega em sua estrutura grupos amino livre sendo o seu equilíbrio químico mantido com seus grupos originais acetoamido (SHALABI; BURG, 2005).

### 3.6.2 Estrutura e caracterização da quitosana

No estado sólido, a quitosana é um polímero semicristalino. Sua morfologia está sendo investigada e alguns polimorfos estão mencionados na literatura. A quitosana é classificada como oligômero quando possui cerca de doze monômeros e como polímero quando possui mais de doze monômeros (WONG, 2009).

Cristais únicos de quitosana são obtidos usando a desacetilação completa da quitina de baixo peso molecular. O diagrama de difração de elétrons pode ser indexado em uma célula ortorrômbica única ( $P2_12_12_1$ ) com  $a=0,807\text{nm}$ ,  $b=0,844\text{nm}$ ,  $c=1,034\text{nm}$ ; a célula unitária contém duas cadeias paralelas de quitosana, mas nenhuma molécula de água. A influência das condições experimentais na cristalinidade tem sido descrita (COSTA JÚNIOR, 2008; RINAUDO, 2006; OGAWA, 1991).

### 3.6.3 Propriedades físico-químicas

A quitosana é considerada um polissacarídeo com alto conteúdo de nitrogênio. Sua estrutura D-glicosamina é rígida e hidrofílica. Apresenta capacidade de formar bandas de hidrogênio intermoleculares e alta viscosidade. É insolúvel em água e solventes orgânicos; é solúvel em solução ácida. Apresenta muitos grupos reativos para ativação química e reticulação e é capaz de formar sais com ácidos orgânicos e inorgânicos. Apresenta propriedades quelantes e condutividade iônica (ARANAZ et al, 2009; CRINI; BADOT, 2007).

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

A quitosana é um biopolímero catiônico com alta densidade de carga (uma carga positiva por resíduo glicosamina). Como agente de floculação interage com moléculas de carga negativas e tem propriedade de adsorção. Apresenta habilidade formadora de filme; pode ser usado como material para isolamento de biomoléculas (CRINI; BADOT, 2007).

Quanto à massa molar pode ser classificada como de baixa massa molar com menos do que 150 KDa, de média massa molar de 150 a menos de 700 e de alta massa molar de 700 a 1000 KDa (WONG, 2009). Outros autores consideram que o termo quitosana refere-se a um grande número de polímeros com diferentes graus de desacetilação (40-98%) e massas molares (50.000-2.000.000 Da) e que estas são as características mais importantes

na determinação de suas propriedades físico-químicas e de suas propriedades biológicas (HEJAZI; AMIJI, 2003).

#### 3.6.4 Propriedades Biológicas

A atividade antimicrobiana está relacionada à presença de grupos amínicos que, uma vez em contato com os fluidos fisiológicos, provavelmente são protonados e se ligam a grupos aniônicos dos microrganismos, resultando na aglutinação das células microbianas e inibição do crescimento (CLEASEN; WHILHELMS; KULICKE, 2006).

Outros estudos revelam que o mecanismo da atividade antimicrobiana da quitosana está intimamente relacionado às propriedades físico-químicas do polímero e às características da membrana do microrganismo. Já foi comprovado que a atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas aumenta, quanto maior for a massa molar do polímero, enquanto que, para bactérias gram-negativas, quanto menor for a massa molar da quitosana, maior a atividade antimicrobiana. Deste modo, os efeitos da quitosana parecem ser distintos nos dois tipos de bactérias:

- bactérias gram-positivas: a quitosana de alta massa molar forma películas ao redor da célula que acabam por inibir a absorção de nutrientes;
- bactérias gram-negativas: a quitosana de baixa massa molar penetra mais facilmente nas células, causando distúrbios no metabolismo desses microrganismos (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

Segundo Silva (2005), o uso indiscriminado de antimicrobianos associados ao fenômeno de resistência apresentado pelos microrganismos tem motivado a pesquisa para novos agentes antimicrobianos, dentre eles a quitosana. Desta forma, em seu trabalho intitulado “Estudo da ação inibitória da quitosana sobre os enteropatógenos *Salmonella entérica*, *Shigella sonnei* e *Escherichia coli*” fez um importante levantamento a cerca dos trabalhos publicados até então apontando possíveis mecanismos de ação da quitosana sobre microrganismos, influência das características físicas das soluções, como grau de desacetilação, massa molar, concentração utilizada, tempo de exposição, viscosidade e pH.

Além da atividade antimicrobiana, são atribuídas a quitosana efeito coagulante e analgésico, estimulante da cicatrização, ação anti-inflamatória, efeito hipocolesterolêmico e hipoglicêmico e auxiliar na redução de peso.

### *3.6.5 A quitosana como biomaterial*

A quitosana tem apresentado propriedades cicatrizantes e antimicrobianas provavelmente devido as características de seus produtos de degradação enzimática, os oligômeros de N-acetil-D-glicosamina, que são totalmente absorvíveis pelo organismo, além de ter excelente capacidade de formação de biofilmes (DALLAN, 2005; FRAGA et al., 2006).

A atividade da quitosana sobre as biomoléculas é facilitada pela diferença de cargas elétricas que ocorre na superfície das duas estruturas. Enquanto que proteínas, polissacarídeos aniônicos, ácidos nucléicos e ácidos graxos, dentre outros, apresentam cargas negativas em suas superfícies, a quitosana é um polímero que se comporta como um polieletrólito, ou seja, apresenta uma alta densidade de carga - uma carga positiva por unidade de glicosamina (DALLAN, 2005). Sua biodegradabilidade é atribuída ao fato de ser metabolizada por enzimas humanas, principalmente a lisozima (FRAGA et al., 2006).

Algumas aplicações da quitosana como biomaterial são: manufatura de lentes de contato, membranas artificiais, tratamento de lesões de pele, cicatrizante, agente hemostático, bactericida e fungicida.

### *3.6.6 Utilização da quitosana na Engenharia de Tecidos*

Brown e Hoffman (2002) destacam a aplicação da quitosana em engenharia de tecidos devido a sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, disponibilidade de grupos reativos e similaridade com glicosaminoglicanos. A quitosana pode ser utilizada para a fabricação de suportes porosos, hidrogéis, fibras e microesferas para uma variedade de tecidos, incluindo ossos, fígado, tecidos nervosos, enxertos vasculares, cartilagem e pele. Também pode ser utilizada na distribuição de proteínas como fatores de crescimento, de

maneira controlada e estável, que pode ser benéfico na promoção do crescimento dos tecidos e angiogênese.

### 3.6.7 Utilização da quitosana na Liberação Controlada de Fármacos

A quitosana é um material potencialmente compatível com meios biológicos e quimicamente versátil devido a distribuição de grupos  $-NH_2$  e a variação de pesos moleculares. Estas duas propriedades têm sido utilizadas por cientistas da engenharia de tecidos e de distribuição controlada de fármacos. A biodegradação da quitosana é feita em vertebrados principalmente pela lisozima e por enzimas bacterianas do cólon. Entretanto, oito tipos de quitinases foram isoladas em humanos, três das quais apresentam atividade enzimática. Em geral, o aumento do Grau de Desacetilação diminui a taxa de biodegradação (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009; KEAN; THANOU, 2010). Sendo um polímero, a quitosana pode ser submetida a quitosanólise, produzindo quitosanas de baixa massa molar, oligômeros e monômeros (ABD-ELMOHDY et al., 2010). Além dos estudos de biodegradação, estudos de biodistribuição e de toxicidade celular, ambos *in vivo* e *in vitro* tem sido publicados (KEAN; THANOU, 2010). Desta maneira, a quitosana é apontada como um GRAS (*Generally Regard As Safed*), ou seja, uma substância cujo uso é geralmente considerado seguro (BANGYEKAN et al., 2006; KEAN; THANOU, 2010).

### 3.6.8 Parâmetros que afetam as características de distribuição de fármacos em microesferas de quitosana

As membranas preparadas com quitosana têm apresentado grande permeabilidade tanto para fármacos ácidos, como para fármacos básicos. Estudos de liberação controlada de fármacos com microesferas de quitosana têm mostrado, geralmente, que a liberação do fármaco diminui com o aumento do peso molecular da quitosana. Alguns trabalhos comprovaram que a taxa de distribuição de fármacos foi reduzida com o aumento da concentração da quitosana. Outros parâmetros que valem a pena serem investigados são: o estado físico da droga nas microesferas, efeito da densidade de reticulação e o efeito de aditivos (SINHA et al., 2004).

### 3.7 Insulina

A descoberta da insulina (1921 – Toronto) foi um dos mais importantes avanços da medicina, embora ocorressem muitos efeitos colaterais, inicialmente, devido às impurezas. A utilização de uma tecnologia apropriada na década de 60 proporcionou uma produção de insulinas mais puras, diminuindo efeitos colaterais, principalmente alergias, cujos efeitos foram atenuados com o surgimento da tecnologia do DNA recombinante (1978) que introduziu o gen da insulina no genoma de uma bactéria e conseguiu fazer com que ela produzisse insulina idêntica a humana (PORTAL FATOR BRASIL, 2008).

A insulina tem sua dose expressa em “unidades internacionais”(UI) e sua extração pode ser feita a partir do pâncreas suíno ou bovino. Entre espécies, ocorre uma conservação na seqüência dos aminoácidos que formam a insulina, de modo que a diferença entre a insulina humana e a bovina se resume a três aminoácidos e da insulina suína só em um aminoácido. Isso explica insulina suína ser menos antigênica em seres humanos do que a insulina bovina (LAWRENCE JR, 1997). No entanto, hoje em dia, a maior parte da insulina utilizada é de origem humana, fabricada a partir da técnica do DNA recombinante, utilizando uma cepa não-patogênica da *Escherichia coli*. Um plasmídeo do DNA recombinante que codifica a insulina humana é introduzido na bactéria que é cultivada por fermentação, produzindo as cadeias A e B da insulina humana. Após purificação individual, as duas cadeias são reunidas, constituindo uma cadeia de insulina que é química, física e imunologicamente equivalente à derivada do pâncreas humano (ALLEN JR., POPOVICH; ANSEL, 2007; RANG; DALE; RITTER, 2001).

#### 3.7.1 Distribuição e degradação da insulina

A meia-vida da insulina circulante em seres humanos é de aproximadamente 8 minutos e sua degradação ocorre em diversos tecidos, principalmente no fígado. Os efeitos da insulina sobre a glicose e o metabolismo lipídico ocorrem minutos após a exposição de células sensíveis à 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 JR, 1997).

A insulina circula no sangue na forma de monômero livre, num volume aproximadamente igual ao volume do líquido extracelular, com concentração de cerca de 2 a 4 mg/mL (50 a 100 $\mu$ U/mL) no sangue porta e de 0,5 ng/mL (12 $\mu$ U/mL) na circulação periférica, em condições basais (jejum alimentar). Após uma refeição ocorre rápida elevação da concentração de insulina no sangue porta, seguida da elevação paralela, mas menos intensa na circulação periférica, padrão que tende a ser imitado pela insulino terapia (KAHN; SCHECHTER, 1991).

A administração oral da insulina não é viável, pois a maior parte do hormônio é destruída pelas proteases, nas vias intestinais, antes da absorção. Desta forma, a via de administração mais utilizada é a subcutânea, cujo início de ação ocorre a partir de 1 hora após a administração e dura cerca de 6 horas. A administração do medicamento por esta via é lenta, em comparação com a via de administração endovenosa, o que é conveniente para evitar múltiplas injeções para a manutenção de um controle adequado da glicemia. A absorção local lenta está relacionada às dimensões relativamente amplas da molécula (LAWRENCE JR, 1997).

### *3.7.2 Efeitos da Insulina*

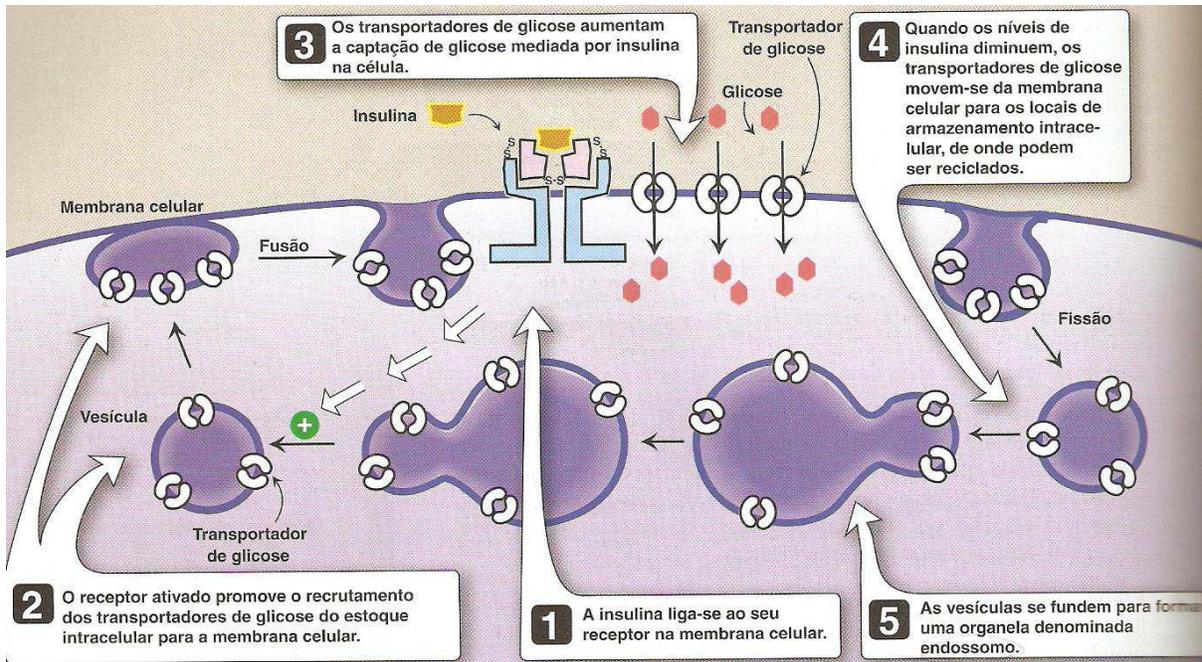
A insulina é o principal hormônio que controla o metabolismo intermediário, exercendo ações sobre o fígado, o músculo e a gordura. Sua ação principal consiste em conservar os combustíveis energéticos ao facilitar a captação, a utilização e o armazenamento da glicose, dos aminoácidos e dos lipídios após uma refeição, reduzindo rapidamente o nível de glicemia. Por outro lado, a redução dos níveis plasmáticos de insulina, reduz a captação celular de glicose e mobiliza as fontes endógenas de combustíveis (RANG; DALE; RITTER, 2001; RAMALHO, 1998). Desta forma, há autores que a consideram como hormônio anabólico mais conhecido e essencial para a manutenção da homeostase da glicose, do crescimento e da diferenciação celular (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002). As principais ações da insulina no metabolismo de substâncias em diversos tecidos estão resumidas na Tabela 3.

**Tabela 3.** Resumo das ações da insulina no metabolismo animal

Metabolismo	Céulas hepáticas	Células adiposas	Músculo
Carboidratos	↓ gliconeogênese ↓ glicogenólise ↑ glicólise ↑ glicogênese	↑ captação de glicose ↑ síntese de glicerol	↑ captação de glicose ↑ glicólise ↑ glicogênese
Lipídios	↑ lipogênese ↓ lipólise	↑ síntese de triglicerídios ↑ síntese de ácidos graxos ↓ lipólise	-
Proteínas	↓ degradação das proteínas	-	↑ captação de aminoácidos ↑ síntese de proteínas

Fonte: Adaptado de RANG, DALE e RITTER (2001)

O organismo animal mantém o controle da glicemia dentro da necessidade de manter suprimentos adequados de glicose (seu principal combustível) como fonte obrigatória de energia metabólica para os órgãos, principalmente para o cérebro, na vigência de uma ingestão alimentar intermitente e demandas metabólicas variáveis. Quando a ingestão de alimentos fornece mais energia do que é imediatamente necessário, ocorre o armazenamento do excesso de calorías sob a forma de glicogênio ou gorduras. No período de abstinência de alimento, essas reservas de energia são metabolizadas de forma ordenada (RANG; DALE; RITTER, 2001). Se os níveis de glicose no sangue forem demasiado baixos (hipoglicemia), o funcionamento do cérebro é alterado surgindo sintomas como a falta de concentração, tonturas e desmaios, ou, em situações extremas, convulsões, coma e morte (DUGGI, 2009). A Figura 11 ilustra a ação da insulina em transportadores de glicose nas células.



**Figura 11.** Ação da insulina em transportadores de glicose  
**Fonte:** CHAMPE; HARVEY e FERRIER (2006)

Os processos de absorção e liberação de glicose são regulados por hormônios. A insulina é a mais importante desses hormônios, uma vez que é a única capaz de baixar os níveis de açúcar no sangue. A concentração da insulina na veia porta é sempre maior que no sangue periférico, pois 60% da glicose ingerida ficam retidas no fígado. Ao nível hepático, a insulina atua como supressora de enzimas gliconeogênicas, inibe a glicogenólise e a lipase que degrada triglicerídeos em ácidos graxos e glicerol. Desta forma, a insulina é considerada como principal hormônio regulador do nível glicêmico, diferindo o padrão global de controle da glicemia no estado basal e no estado alimentado (RAMALHO, 1998).

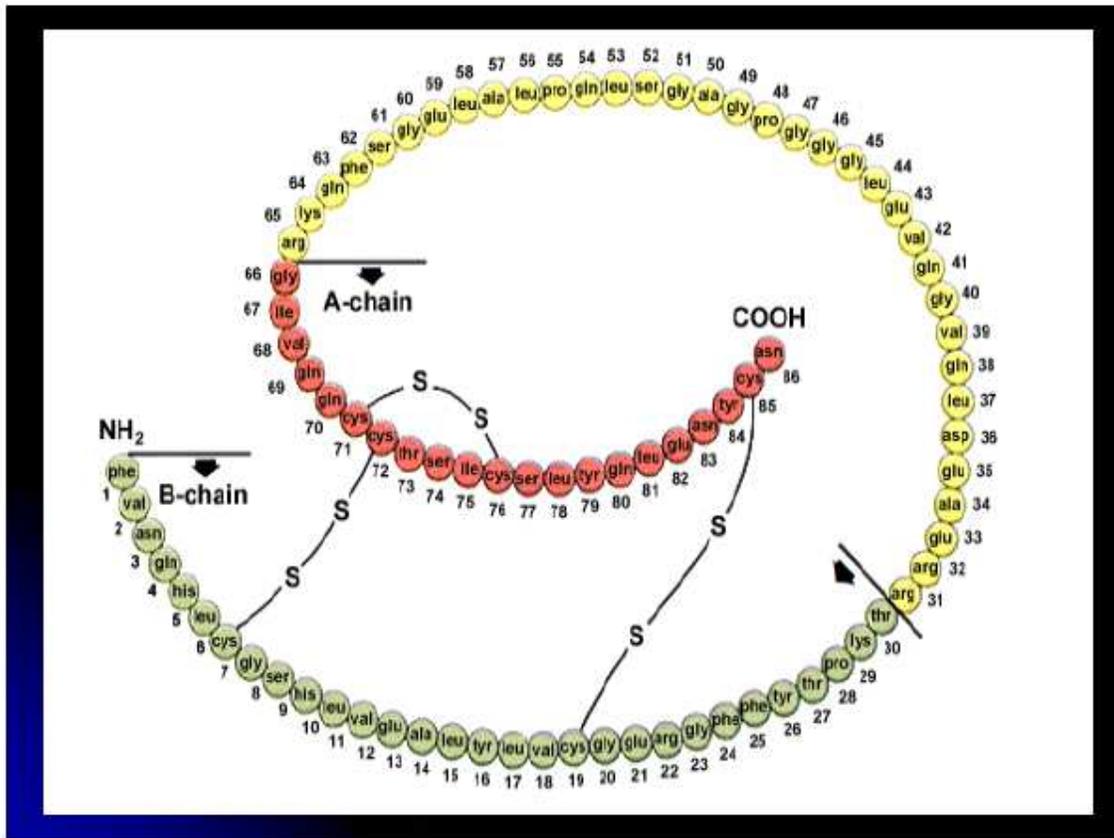
### 3.7.3 Produção de Insulina e Diabetes Mellitus

O Diabetes *mellitus* é um distúrbio metabólico crônico caracterizado por hiperglicemia (glicose plasmática de jejum > 7mmol/L ou glicose plasmática >10 mmol/L duas horas após uma refeição), devido à deficiência e/ou resistência à insulina. Existem duas formas principais de Diabetes *mellitus*: (a) diabetes tipo 1 (também conhecida como Diabetes *mellitus* insulino-dependente ou diabetes de início juvenil e (b) diabetes tipo 2,

Diabetes *mellitus* não insulino-dependente ou diabetes de início na maturidade (RANG; DALE; RITTER, 2001).

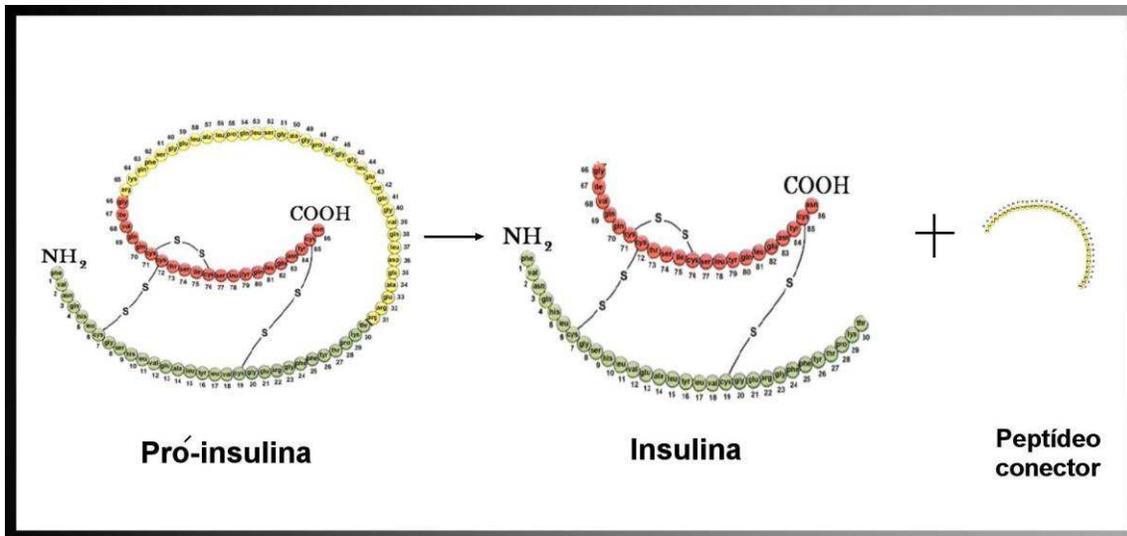
No organismo animal, a insulina é sintetizada pelas células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas, a partir da pró-insulina, seu precursor de cadeia simples. Muitos fatores estimulam a secreção de insulina, sendo o aumento dos níveis de glicose sanguínea o fator principal (KAHN; SCHECHTER, 1991). Outros estímulos para a liberação de insulina incluem aminoácidos, principalmente a arginina e a leucina, ácidos graxos, estímulo ao sistema nervoso parassimpático, o glucagon e vários hormônios do trato gastrointestinal (RANG; DALE; RITTER, 2001).

A insulina foi a primeira proteína, cuja seqüência de aminoácidos foi determinada por Brown e colaboradores, em 1951 (RANG; DALE; RITTER, 2001). A conversão da pró-insulina humana em insulina envolve remoção de quatro aminoácidos básicos e do conector remanescente ou peptídeo C, por proteólise. São originadas assim, duas cadeias peptídicas (A e B) da molécula de insulina, que contém uma ligação dissulfeto dentro da subunidade e duas ligações dissulfeto entre as subunidades. Em geral, a cadeia A é constituída de 21 resíduos de aminoácidos e a cadeia B de 30, com massa molar aproximado de 5.800 Da (KAHN; SCHECHTER, 1991). Na Figura 12 pode-se visualizar a seqüência de aminoácidos da estrutura da pró-insulina.



**Figura 12.** Sequência de aminoácidos da Pró-insulina humana  
**Fonte:** Escola Médica Virtual (2008)

A estrutura cristalina revela que as duas cadeias da insulina formam uma estrutura altamente organizada com diversas regiões  $\alpha$ -helicoidais em ambas as cadeias A e B. O radical carboxil-terminal da cadeia B e os resíduos amino e carboxil-terminais da cadeia A formam a superfície da molécula que interage com o receptor. As duas cadeias da insulina se estiverem isoladas são inativas (KAHN; SCHECHTER,1991). A Figura 13 ilustra a transformação da pró-insulina em insulina.



**Figura 13.** Esquema estrutural da pró-insulina humana

**Fonte:** Adaptado de Escola Médica Virtual (2008)

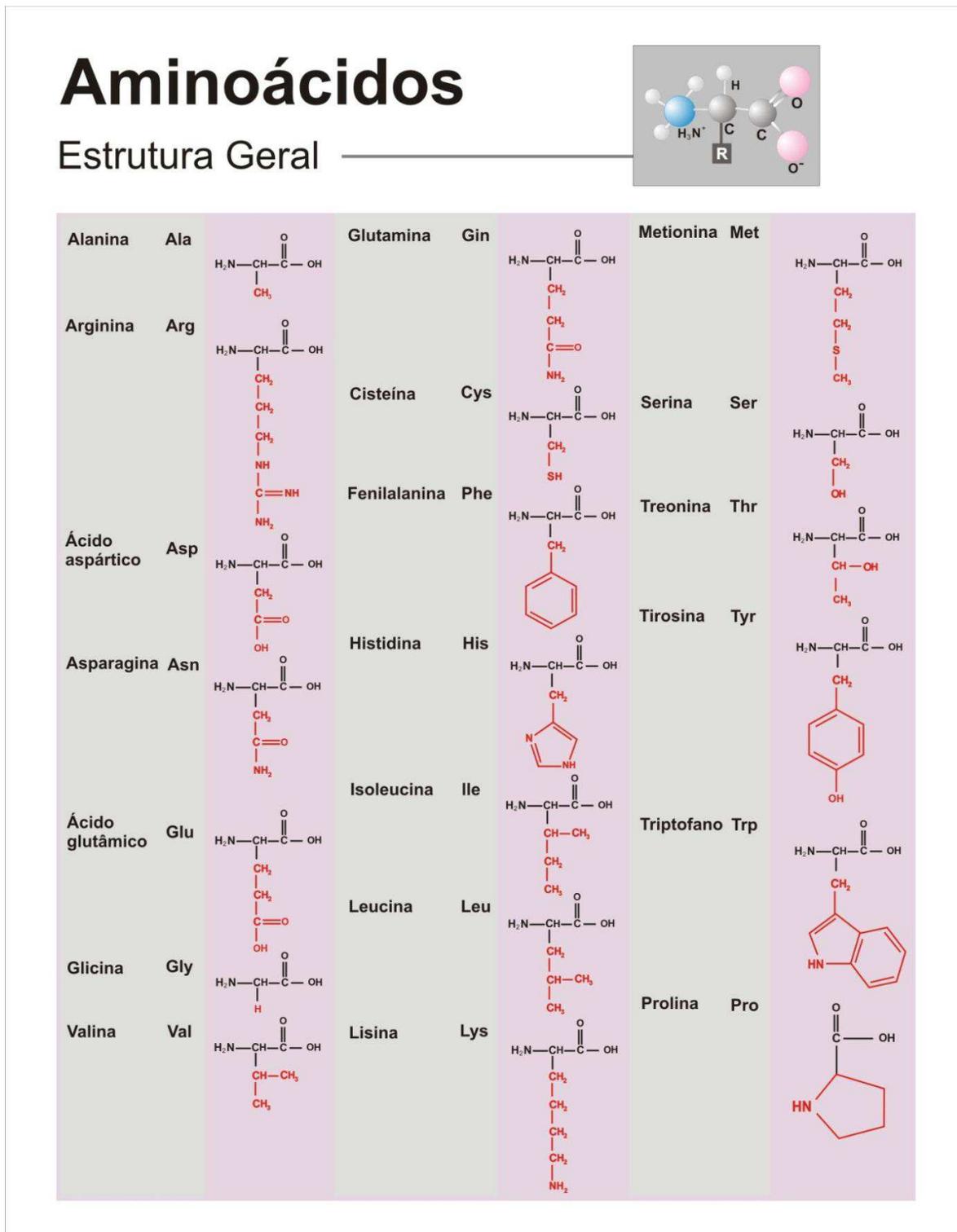
A conversão da pró-insulina endógena em insulina ocorre nas granulações secretoras, onde a maior parte da insulina sofre cristalização com o  $Zn^{++}$ . As granulações armazenam quantidades aproximadamente equimolares de insulina e de peptídeo C, além de uma quantidade muito menor de pró-insulina. Quando a célula beta recebe o estímulo adequado, os conteúdos das granulações são liberados por exocitose (LAWRENCE JR, 1997).

#### 3.7.4 Composição da insulina

Neste trabalho, já foi mencionado que a insulina é uma proteína. Stevens (1999) afirma que proteínas são polímeros cujas unidades monoméricas são constituídas de grupos amidas e ácidos carboxílicos, localizados no carbono  $\alpha$ . Elas são muito mais complexas do que os polissacarídeos por causa do grande número de  $\alpha$ -aminoácidos existentes naturalmente, cujas formas podem aparecer como um número ilimitado de arranjos seqüenciados.

Já foram descritos mais de trezentos aminoácidos a partir de fontes naturais, mas a codificação genética dos mamíferos consta de cerca de vinte aminoácidos. A maioria dos aminoácidos é constituída de um grupo carboxila, um grupo amino e uma cadeia lateral distinta (grupo R) ligado a um átomo de carbono (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2006).

Esta estrutura geral, a relação dos aminoácidos mais comuns e a respectiva sigla de três letras representativa de cada um, estão descritos na Figura 14.



**Figura 14.** Aminoácidos mais frequentes nas proteínas, estrutura geral e estrutura química

Fonte: Adaptado de ALLSTARHEALTH (2010)

Em condições fisiológicas (pH aproximadamente igual a 7,4), o grupo carboxila encontra-se dissociado, formando o íon carboxilato carregado negativamente ( $-\text{COO}^-$ ) e o grupo amino encontra-se protonado ( $-\text{NH}_3^+$ ). Nas proteínas, as ligações peptídicas são formadas pela combinação desses grupos, de modo que quase não se tem esse tipo de íon disponível para reações químicas, a não ser pela possibilidade de formação de pontes de hidrogênio. Deste modo, a natureza das cadeias laterais determinará o papel de um aminoácido em uma reação química. Assim é importante a classificação dos aminoácidos de acordo com as propriedades de suas cadeias laterais, ou seja, se elas são apolares (apresentam uma distribuição equivalente de elétrons) ou polares, (apresentam uma distribuição desigual de elétrons,) nos quais se incluem ácidos e bases. Pode-se dizer também que os aminoácidos básicos contêm mais do que um grupo amino; os ácidos mais do que um grupo carboxil e os neutros contêm ambos em quantidades equivalentes (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2006; STEVENS, 1999).

Analisando a estrutura da insulina humana apresentada anteriormente nas Figuras 12 e 13, relacionou-se a distribuição dos aminoácidos presentes nas cadeias A e B, classificados de acordo com as propriedades de suas cadeias. Os dados estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Distribuição dos aminoácidos da insulina humana e classificação de acordo com as propriedades de suas cadeias

Nome	Sigla	Tipo	Quantidade na Cadeia A	Quantidade na Cadeia B	Quantidade Total
Glicina	Gly	Não Polar	01	03	04
Isoleucina	Ile	Não Polar	02	00	02
Valina	Val	Não Polar	01	03	04
Leucina	Leu	Não Polar	02	04	06
Fenilalanina	Phe	Não Polar	00	03	03
Alanina	Ala	Não Polar	00	01	01
Prolina	Pro	Não Polar	00	01	01
Glutamina	Gln	Polar	02	01	03
Cisteína	Cys	Polar	04	02	06
Treonina	Thr	Polar	01	02	03

**Tabela 4.** Distribuição dos aminoácidos da insulina humana e classificação de acordo com as propriedades de suas cadeias (continuação)

Nome	Sigla	Tipo	Quantidade na Cadeia A	Quantidade na Cadeia B	Quantidade Total
Serina	Ser	Polar	02	01	03
Tirosina	Tyr	Polar	02	02	04
Asparagina	Asn	Polar	02	01	03
Ácido Glutâmico	Glu	Ácido	02	02	04
Histidina	His	Básico	00	02	02
Arginina	Arg	Básico	00	01	01
Lisina	Lys	Básico	00	01	01
Total			21	30	51

### 3.7.5 Preparações de insulina

As preparações abaixo descritas estão citadas em Lawrence Jr. (1997) e julgou-se como pertinente sua apresentação, como uma contribuição ao conhecimento das diversas formas de insulina existentes no mercado, mesmo que só a insulina NPH (*Neutral Protamin Hagerdorn*) tenha sido utilizada na pesquisa que fundamentou este trabalho.

**3.7.5.1 Injeção de insulina, insulina regular ou insulina cristalina-zinco:** É a única solução adequada para uso endovenoso e apresenta aspecto claro. O mais comum é associá-la com uma insulina de ação ampliada para favorecer uma elevação rápida das concentrações de insulina.

**3.7.5.2 Preparações de ação ampliada a partir da interação entre a insulina e a proteína básica, protamina:** Quando a insulina é misturada à protamina, ocorre precipitação de um complexo protamina-insulina que resulta num prolongamento da duração da ação da insulina, pois se cria um depósito a partir do qual a droga é lentamente liberada, a partir da sua dissolução no líquido intersticial e não por aumento na meia-vida da droga circulante. Os preparados que contém protamina utilizam tampões de fosfato.

**3.7.5.3 NPH ou isófana:** Contem baixas concentrações de protamina não combinada (P), pH neutro (N) e foi desenvolvido pelo cientista dinamarquês Hagerdorn (H). O termo isófano denota que o preparado contém quantidades estequiométricas de insulina protamina. Essa preparação foi formulada para evitar um problema de excesso de protamina, que causa dissolução excessivamente lenta da insulina.

**3.7.5.4 Suspensão de insulina-protamina tamponada com acetato:** Nestes casos, um excesso de zinco é acrescentado e ocorre precipitação sob a forma de grandes cristais homogêneos ou de pequenas partículas. Os preparados feitos dessa maneira apresentam a vantagem de serem misturados em qualquer proporção sem prejuízo de sua atividade ou estabilidade e de evitar reações alérgicas atribuídas à protamina.

**3.7.5.5 Suspensão de insulina-zinco ampliada:** É formada por cristais grandes que se dissolvem muito lentamente no local da injeção, de modo que a instalação e a duração da ação são semelhantes às das suspensões de insulina-zinco protamina.

**3.7.5.6 Insulina semi-lenta:** Suspensão de partículas pequenas, cujos cristais dissolvem-se muito rapidamente e a instalação e a duração da ação é semelhante às da suspensão de insulina.

**3.7.5.7 Suspensão de insulina-zinco:** É uma mistura que contém 30% de insulina semi-lenta e 70% de insulina ultra-lenta. A instalação e a duração da ação são semelhantes à da insulina NPH.

## 4 METODOLOGIA

A apresentação da metodologia utilizada neste trabalho procurou seguir critérios científicos tradicionais e será descrita nos tópicos materiais e métodos.

### 4.1 Materiais

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

#### 4.1.1 Biopolímero

O biofilme de quitosana foi obtido a partir de quitosana comercial adquirido de dois fornecedores: a Polymar<sup>®</sup> Indústria Comércio Importação e Exportação Ltda., situada na cidade de Fortaleza – CE, Brasil, sendo denominado neste trabalho, Fornecedor A e a Sigma Aldrich<sup>®</sup>, empresa multinacional de origem europeia, denominado Fornecedor B. Ambas são produzidas a partir da quitina extraída da casca de camarão, mas de espécies provavelmente diferentes. O custo da quitosana regional é muito menor que a da quitosana importada.

#### 4.1.2 Reagentes

Os reagentes serão citados juntamente com o nome do fabricante e o número do lote.

**4.1.2.1 Ácido acético:** VETEC<sup>®</sup> com grau analítico, Lote 0801000.

**4.1.2.2 Hidróxido de Sódio:** VETEC<sup>®</sup> com grau analítico, Lote 0708471.

**4.1.2.3 Insulina:** Insulina humana comercial Humulin<sup>®</sup> N (NPH), fabricada pelo laboratório Eli Lilly<sup>®</sup>, Lote A471147. A escolha do tipo de insulina se deu em razão do acesso ao produto fornecido em unidades de saúde públicas da região.

## 4.2. Animais

Camundongos machos Balb/c, pesando entre 18-25g, procedentes do CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica), UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas), São Paulo, foram utilizados em todos os experimentos. Estes animais foram mantidos em gaiolas em grupos de 5, com condições estáveis de ambiente ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $56 \pm 2\%$  de umidade relativa do ar) e ciclos de claro/escuro de 12 horas. Os animais receberam água e ração (Purina<sup>®</sup>) esterilizadas, *ad libitum*. Os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>. Todos os procedimentos que utilizaram células vivas dos animais foram realizados em triplicata. Todos os procedimentos com animais foram conduzidos conforme normas do SBCAL (Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório) e que obtiveram parecer do Comitê de Ética local (parecer nº08/2009 CEP/FCF/CAr).

## 4.3 Métodos

A obtenção do biofilme de quitosana foi baseado em Dallan (2005) e em Cui et al. (2008), utilizando-se a técnica conhecida como método sol-gel. Esta técnica pode ser dividida em três etapas, ou seja, dissolução da quitosana em uma solução ácida diluída e adição de outros componentes, transferência desta solução para moldes planos e secagem e formação da membrana propriamente dita.

### 4.3.1 Obtenção do biofilme de quitosana

O biofilme foi obtido a partir da obtenção de uma solução de quitosana em ácido acético a 1%, que foi filtrada em vácuo e vertida em placas de Petri de 12cm. A solução foi submetida a secagem em estufa a 50°C, com circulação de ar, por um período de 12 a 24 hs (método da evaporação do solvente). Sobre os biofilmes secos aderidos à placa foram adicionados 50mL de solução de hidróxido de sódio a 1M, a fim de assegurar a completa neutralização do ácido. Em seguida, as placas de Petri com os biofilmes foram imersos em água destilada (500mL para cada placa de 120mm) por 1h e aferido o pH da água. Depois, a água de lavagem foi descartada e substituída por uma nova água destilada, que teve o pH

aferido até atingir pH=7. Os biofilmes foram secos a temperatura ambiente em moldes de vidro e, a seguir, submetidos aos processos de caracterização.

#### 4.3.2 Tipos de biofilmes produzidos

Os biofilmes foram produzidos de acordo com as formulações apresentadas na Tabela 5.

**Tabela 5.** Biofilmes produzidos e suas composições

Quitosana (fornecedor)	GD*	Sigla	Composição
Polymar®	86,5% **	A1.1	Biofilme de quitosana 1% (m/v)
		A1.2	Biofilme de quitosana 1,5% (m/v)
		A1.3	Biofilme de quitosana 1% (m/v) + de 50UI de Insulina
		A1.4	Biofilme de quitosana 1,5% (m/v) + de 50UI de Insulina
		A1.5	Biofilme de quitosana 1% (m/v) + de 100UI de Insulina
		A1.6	Biofilme de quitosana 1,5% (m/v) + de 100UI de Insulina
Sigma Aldrich®	~ 85% Baixa Massa Molar	B1.1	Biofilme de quitosana 1% (m/v)
		B1.2	Biofilme de quitosana 1,5% (m/v)
		B1.3	Biofilme de quitosana 1% (m/v) + de 50UI de Insulina
		B1.4	Biofilme de quitosana 1,5% (m/v) + de 50UI de Insulina
		B1.5	Biofilme de quitosana 1% (m/v) + de 100UI de Insulina
		B1.6	Biofilme de quitosana 1,5% (m/v) + de 100UI de Insulina
Sigma Aldrich®	~ 75% Alta Massa Molar	B2.1	Biofilme de quitosana 1% (m/v)
		B2.2	Biofilme de quitosana 1,5% (m/v)
		B2.3	Biofilme de quitosana 1% (m/v) + de 50UI de Insulina
		B2.4	Biofilme de quitosana 1,5% (m/v) + de 50UI de Insulina
		B2.5	Biofilme de quitosana 1% (m/v) + de 100UI de Insulina
		B2.6	Biofilme de quitosana 1,5% (m/v) + de 100UI de Insulina

\*GD – Grau de Desacetilação.

\*\*Massa molar não determinada

#### *4.3.3 Método de incorporação da insulina no biofilme*

A incorporação da insulina para as demais placas foi realizada usando-se a mesma técnica de evaporação do solvente em placas, descrita para obtenção do biofilme de quitosana. Após a filtração da solução da quitosana adicionou-se a insulina, numa proporção de 1UI mL<sup>-1</sup> mantendo-se a agitação magnética por 5 minutos. A seguir a solução foi vertida nas placas Petri, e permaneceu em estufa com circulação de ar, a 50°C, para secagem. As demais etapas se sucederam na mesma ordem descrita na elaboração dos biofilmes de quitosana.

#### *4.3.4 Caracterização dos filmes de quitosana/insulina*

O material obtido foi caracterizado pelas técnicas de Molhabilidade, Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Difração de Raios X, Análise Térmica, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Biodegradação Enzimática, Avaliação da Viabilidade Celular dos Macrófagos e Determinação da Produção de Óxido Nítrico.

##### ***4.3.4.1 Molhabilidade***

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

Para avaliar a molhabilidade foi necessário obter o ângulo de contato da insulina com o filme de quitosana com e sem insulina, denominado Método de medida de meio-ângulo. Ele proporcionou a leitura direta do ângulo de contato, por meio do ajuste de uma linha tangente à gota do líquido, obtendo o ângulo de contato  $\theta/2$ , que projetado numa escala se obtém o valor do ângulo de contato,  $\theta$ . Na realização desta análise foi utilizado um goniômetro desenvolvido por técnicos da Unidade Acadêmica de Engenharia Mecânica da UFCG (Universidade Federal de Campina Grande) e encontra-se instalado no

Laboratório de Caracterização de Materiais da Unidade Acadêmica de Ciências e Engenharia de Materiais, da mesma universidade.

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

A espectroscopia do infravermelho é uma técnica de grande valor para a análise orgânica qualitativa e compreende a faixa do espectro eletromagnético que vai do limite superior da faixa do micro-ondas até o começo da região visível, com comprimentos de onda entre  $14000\text{ cm}^{-1}$  e  $20\text{ cm}^{-1}$ . A banda espectral mais utilizada corresponde ao infravermelho médio que cobre as frequências entre  $200\text{ cm}^{-1}$  e  $4000\text{ cm}^{-1}$ . Esta técnica considera que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibração específicas, as quais correspondem a níveis vibracionais da molécula (FOOK, 2005; LOPES; FASCIO, 2004).

Esta análise foi realizada utilizando um espectrômetro Spectrum 400 *Perkin Elmer*<sup>®</sup> FT-IR/FT-NIR *Spectrometer*, com varredura de  $4000$  a  $650\text{ cm}^{-1}$ , instalado no Laboratório de Caracterização de Materiais, da Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais, da UFCG. Considerando que a frequência de vibração de um par de elétrons é aproximadamente igual à frequência da radiação infravermelha e que, quando radiação infravermelha incide em uma substância, a radiação de mesma frequência que as frequências vibracionais das ligações é absorvida, é possível deduzir as frequências de vibração de uma molécula, observando as frequências que são seletivamente removidas do espectro infravermelho. Sendo assim, o espectro de absorção de infravermelho foi utilizado para ajudar a deduzir a estrutura molecular da quitosana e do complexo quitosana/insulina.

Os dados obtidos com a espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier foram também utilizados para avaliar o grau de desacetilação das quitosanas utilizadas. Para isto foi calculada a relação entre a intensidade de absorbância do grupamento amino e do grupamento acetato ou  $A_{3500}/A_{1670}$  e confrontado com os valores de GD apresentados pelos fornecedores.

#### 4.3.4.3 Difração de raios X (DRX)

Neste trabalho as amostras foram submetidas à análise por difração de raios X (DRX), através de um difratômetro de raios X Shimadzu® (modelo XRD 6000) com varredura angular  $5^\circ < 2\theta < 35^\circ$ , na montagem de Bragg-Brentano, sistema  $\theta$ - $2\theta$ , utilizando-se radiação de Cu ( $K\alpha_1$ ) com varredura no passo de 0,02 ( $2\theta$ ), com intervalo de 0,6 segundo para cada amostra. As análises foram realizadas no laboratório de Caracterização de Materiais, da Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais, da UFCG.

A medida de cristalinidade das membranas foi estimada pela medida das intensidades das regiões cristalina e amorfa tendo como base os estudos de Signini e Campana Filho (2001), Dallan (2005) e Zhang et al. (2010).

Desta forma, o cálculo do Índice de cristalinidade foi realizado utilizando-se a Equação 1.

$$I_{CR} = \frac{I_C - I_A}{I_C} \times 100 \quad (5)$$

Sendo  $I_C$  e  $I_A$  as intensidades dos sinais das regiões cristalinas e amorfas, respectivamente.

#### 4.3.4.4 Análise Térmica

Os métodos térmicos, como Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), termogravimetria (TGA) e sua derivada (DTG) têm surgido como poderosas técnicas termoanalíticas para monitorar características químicas e mudanças físicas em biopolímeros.

Para a realização deste trabalho utilizaram-se as técnicas termoanalíticas Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TGA). Os dados termoanalíticos foram analisados por meio do *software* TASYs® da Shimadzu® e realizadas no Departamento de Análises Térmicas, do Departamento de Farmácia, da Universidade Federal da Paraíba.

#### **4.3.4.4.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)**

As curvas DSC dos biofilmes foram obtidas usando o calorímetro, modelo DSC-50, da Shimadzu<sup>®</sup>. A razão de aquecimento utilizada foi de 10°C/min, com temperatura inicial ambiente e temperatura final de 400°C, em atmosfera de nitrogênio, com fluxo de 50 mL min<sup>-1</sup>. As amostras foram acondicionadas em cadinho de alumínio, fechados hermeticamente, com uma massa de 2,00 mg ( $\pm 0,05$ ). A calibração do DSC foi realizada usando o ponto de fusão e a entalpia dos padrões índio e zinco.

#### **4.3.4.4.2 Estudo Termogravimétrico (TG)**

As curvas de TG do fármaco e das misturas binárias foram obtidas por meio de termobalança Shimadzu<sup>®</sup>, modelo TGA 50H, em atmosfera de nitrogênio em fluxo de 50 mL.min<sup>-1</sup>, sendo a massa das amostras em torno de 5,0 mg ( $\pm 0,5$ ), acondicionadas em cadinho de alumina, na razão de aquecimento de 10°C.min<sup>-1</sup> até 900°C.

#### **4.3.4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A microscopia eletrônica analisa o material através da irradiação por um fino feixe de elétrons que interage com a superfície da amostra e origina uma série de radiações, tais como: elétrons secundários, elétrons retroespalhados, raios X característicos, elétrons Auger, fótons, etc. Estas radiações quando captadas corretamente irão fornecer características sobre a amostra (topografia da superfície, composição, cristalografia, etc). A microscopia eletrônica de varredura utiliza mais especificamente os elétrons secundários e os retroespalhados para a formação da imagem, sendo que os elétrons secundários fornecem as imagens relativas à topografia da superfície e são responsáveis pela obtenção das imagens de alta resolução, enquanto que os retroespalhados fornecem imagem característica da variação de composição (FOOK, 2005).

A caracterização por MEV foi realizada no equipamento fabricada pela Hitachi<sup>®</sup>, modelo TM 1000, acoplado com sistema para micro-análise química por Espectroscopia de

Energia Dispersiva – EDS, instalado no Laboratório de Caracterização de Materiais, da Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais, da UFCG.

#### **4.3.4.6 Ensaio de biodegradação enzimática**

Para este ensaio empregou-se como base as normas ASTM F1635-04 *Standard Test Method for in vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants* (2009) e a ASTM F2103-01 *Standard Guide for Characterization and Testing of Chitosan Salts as Starting Materials Intended for Use in Biomedical and Tissue-Engineered Medical Products Applications* (2007). As membranas secas foram cortadas na dimensão de 2,0 cm<sup>2</sup>, pesadas em balança analítica e encaminhadas para esterilização em óxido de etileno, procedimento realizado na empresa Medical do Brasil, instalada no município de Paulista, Pernambuco. As membranas esterilizadas foram então, isoladamente, colocadas em placas de Petri. As amostras foram divididas em dois grupos para avaliação da biodegradação. O primeiro grupo contendo uma solução de lisozima/*Phosphate buffered saline* - PBS com concentração de 1µg/mL e, o segundo apenas com a solução de PBS, para controle. A escolha da concentração da solução de lisozima seguiu os critérios estabelecidos por Freier et al. (2005) e corresponde a concentração aproximada da lisozima no soro humano.

A lisozima e o tampão PBS foram adquiridos do fornecedor Sigma Aldrich®. Devido ao grande número de biofilmes produzidos, escolheu-se para este ensaio os biofilmes B1.1, B1.3 e B1.5 em triplicata, tanto para a solução de lisozima como para o tampão PBS, em dois lotes, resultando em 36 amostras. Os critérios para escolha do tipo de biofilme a ser utilizado neste ensaio foram os resultados de tensão superficial e de difração de raios X, que mostraram ser este tipo de biofilme que apresentou maior hidrofobicidade e maior caráter amorfo. Os biofilmes foram incubados em estufa microbiológica, à temperatura de 37°C, sendo retirados da estufa em intervalos de 7 e 14 dias, sendo que cada intervalo de tempo mencionado foi considerado um lote em estudo, seguindo um procedimento de lavagem em água destilada, secagem por 48 horas em estufa a 50°C e pesagem em balança analítica. As diferenças percentuais das massas das amostras antes e

após o ensaio forneceram os resultados referentes à degradação enzimática das membranas, observados a partir da média de ensaios repetidos em três amostras.

#### ***4.3.4.7 Avaliação da Viabilidade Celular dos Macrófagos***

Com o objetivo de atender a norma ISO 10993 que recomenda ensaios *in vitro* de citotoxicidade como testes iniciais para materiais que ficarão em contato com a pele, escolheu-se o teste de avaliação da viabilidade celular dos macrófagos por MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio]. De uma forma geral, neste teste realizam-se ensaios quantitativos para avaliar a interrupção da atividade mitocondrial pela quantificação da formação de cristais de formazana, a partir da redução do tetrazólio MTT. Ou seja, avalia-se a viabilidade celular partindo do princípio que as células viáveis, uma vez em contato com o MTT, metabolizam o tetrazólio de metiltiazol na mitocôndria, utilizando enzimas ativas, havendo um acúmulo de cristais de tetrazólio ou formazana, que pode ser detectado pela leitura da absorvância em 540nm, com filtro de referência em 620nm, conforme recomendado por Mosmann (1983), utilizando-se a técnica de espectroscopia de absorção na região do visível. Sendo assim, quanto maior a leitura no espectrofotômetro maior o percentual de células viáveis, em relação as não viáveis.

Para a concretização desta etapa, fez-se necessário a obtenção das células do exsudato peritoneal que foi realizada a partir do procedimento descrito a seguir.

##### ***4.3.4.7.1 Obtenção das células do Exsudato Peritonial***

Os animais (Camundongos Swiss) foram previamente estimulados pela inoculação intraperitoneal de 3,0 mL de tioglicolato de sódio (Difco<sup>®</sup> Lab. LTDA) a 3,0%, três dias antes da coleta de células. Após esse período, os animais foram eutanasiados por inalação em câmara de CO<sub>2</sub>. Estes animais tiveram a pele da região abdominal retirada assepticamente, em câmara de fluxo laminar, Classe 100 (Veco<sup>®</sup>) e o peritônio exposto. Na porção mediana superior do abdômen foi injetado 5,0 mL de solução salina tamponada com fosfatos (PBS) estéril em pH 7,2 e a 4°C, com auxílio de seringa e agulhas também estéreis.

Uma leve massagem manual foi realizada e as células do exsudato peritoneal foram coletadas com a mesma seringa e dispensadas em tubo cônico estéril (Corning<sup>®</sup>, Inc., EUA) para preparo da suspensão celular. As células do exsudato peritoneal foram lavadas três vezes, com 5 mL de PBS (pH 7,2) e centrifugadas a 400 x g por 5 minutos em centrífuga (Fanem<sup>®</sup>, Ind. Bras.), à temperatura ambiente. As células sedimentadas foram ressuspensas em 1,0 mL de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma<sup>®</sup>) contendo 2 $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma<sup>®</sup>) a  $2 \times 10^{-5}$ M, penicilina 100 U/mL (Sigma<sup>®</sup>), estreptomicina 100 U/mL (Sigma<sup>®</sup>), L-glutamina 2mM (Sigma<sup>®</sup>) e 5% de soro fetal bovino (Cutilab<sup>®</sup>), sendo o meio assim composto designado de RPMI-1640 completo (RPMI-1640-C). O número de células foi determinado pela contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer (Boeco<sup>®</sup>, Germany) em uma diluição 1:100 do Líquido de Lázarus. As células foram ajustadas à concentração de  $5 \cdot 10^6$  células em meio RPMI-1640-C.

#### 4.3.4.7.2 Avaliação da viabilidade celular de células peritoneais aderentes

Para o ensaio de viabilidade celular foi utilizado o método baseado na capacidade das células viáveis de clivar o anel tetrazólico presente no sal de MTT, pela ação de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria ativa, formando cristais de formazana (MOSMANN, 1983).

A uma placa estéril de 96 cavidades de fundo plano (Corning<sup>®</sup>, Inc.) foram distribuídos 100  $\mu$ L por cavidade das suspensões de célula do exsudato peritoneal de camundongos, obtidas conforme descrito anteriormente, ajustadas à concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL em meio de cultura RPMI-1640-C divididos em dois volumes iguais de 50  $\mu$ L, sendo que entre eles, foi adicionado um disco, confeccionado a partir de biofilmes de quitosana ou quitosana/insulina, em quatro composições que estão descritas abaixo:

Biofilmes B1.1 - Quitosana de baixa massa molar;

Biofilmes B1.5 - Quitosana de baixa massa molar + insulina;

Biofilmes B2.1 - Quitosana de baixa massa molar;

Biofilmes B2.5 - Quitosana de baixa massa molar + insulina.

Em outras cavidades da referida placa, com as mesmas condições anteriores, foram adicionadas 100  $\mu$ L de LPS (lipopolissacarídeo bacteriano derivado de *E. coli*, adquirido da

Sigma<sup>®</sup>) a uma concentração de 10 µg/mL, ou apenas meio de cultura (controle negativo), em triplicata. As placas foram incubadas por 24 hs, a 37°C, em estufa contendo tensão constante de 5% de CO<sub>2</sub> (Forma Scientific<sup>®</sup>, EUA). Após esse período, sobre a cultura celular foram adicionados 100 µL de uma solução de MTT (Across Organics<sup>®</sup>) a 0,5 mg/mL em RPMI-1640. A placa foi então incubada por mais 3 horas, nas mesmas condições anteriores. Após esta incubação, os sobrenadantes foram descartados, sendo retirados inclusive os biofilmes de quitosana e quitosana/insulina em diferentes preparações e as células aderentes tratadas com 100 µL de isopropanol (Mallinckrodt<sup>®</sup>) para solubilizar os cristais de formazana formados. A leitura da densidade ótica foi determinada em espectrofotômetro (*Multiskan Ascent<sup>®</sup>*, *Labsystems Research Tech<sup>®</sup>*. Div., Helsinki, Finland) em UV/visível a 540 nm com filtro de referência de 620 nm (MOSMANN, 1983). A viabilidade celular foi calculada em porcentagem, considerando-se o controle negativo como 100% de viabilidade.

Este ensaio foi realizado no Laboratório de Imunologia Clínica e Biologia Molecular, do Departamento de Análises Clínicas da UNESP, Araraquara - SP.

#### ***4.3.4.8 Determinação da produção de óxido nítrico***

O reconhecimento de materiais estranhos ao organismo, durante o patrulhamento de infecções e de tolerância, é função dos macrófagos sendo feito, principalmente, através da produção de óxido nítrico pós-estímulo. Esta molécula é um potente anti-microbiano das células de defesa inata ou inespecífica. Um biomaterial não deve inviabilizar sua produção, para que não haja o desenvolvimento de infecções durante o seu uso. No caso de enxertos, isto é particularmente importante, para que não ocorra indução de rejeição, por ocorrência de uma resposta natural exarcebada (COSTA JR, 2008).

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

As células obtidas do exsudato peritoneal foram ajustadas à concentração de 5x10<sup>6</sup> células/ML, em meio RPMI-1640-C e distribuídas em placas de cultura de tecidos, de 96

cavidades. A cada cavidade foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  dessa suspensão celular e as placas foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$ , por 60 min, em estufa contendo tensão constante de 5% de  $\text{CO}_2$  (Thermo Electron Hepa Class 100). Aos macrófagos que ficaram aderidos à placa foi adicionado volume igual ao inicial de RPMI-1640-C, divididos em dois volumes iguais de 50 $\mu\text{L}$ , sendo que entre eles, foi adicionado um disco, confeccionado a partir de biofilmes de quitosana ou quitosana/insulina, em quatro composições que estão descritas no item 5.3.4.7.2, deste trabalho ou ainda 100  $\mu\text{L}$  de LPS (lipopolissacarídeos) a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , como controle positivo, ou somente de RPMI-1640-C, como controle negativo. Estas placas foram novamente incubadas a  $37^\circ\text{C}$ , em estufa com tensão constante de 5% de  $\text{CO}_2$  (Thermo Electron Hepa Class 100), por 24 horas. Então, alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  dos sobrenadantes das culturas de macrófagos foram transferidas para uma placa de cultura de células, não estéril, contendo 96 cavidades de fundo plano e acrescidas de igual volume de reagente de Griess. Após 10 minutos de incubação, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a absorvância foi determinada com filtro de 540 nm em espectrofotômetro. As concentrações de NO liberadas nos sobrenadantes das culturas celulares foram calculadas, a partir de uma curva padrão, previamente estabelecida, e os valores foram expressos em  $\mu\text{mols}$  de nitrito.

#### ***4.3.4.9 Análise estatística***

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

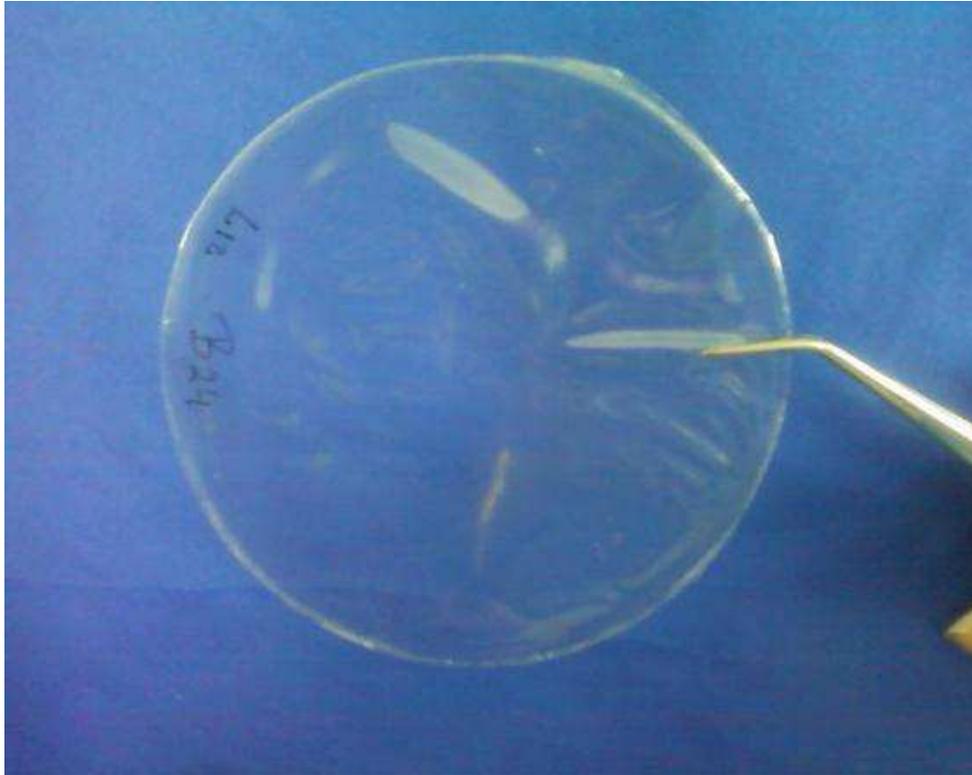
## 5 RESULTADOS

Os biofilmes obtidos pelo método anteriormente descrito (item 4.3) apresentaram espessura que variaram de 0,055 a 0,075mm. Macroscopicamente ficou constatado que as soluções poliméricas feitas a partir dos fornecedores diferentes com graus de desacetilação diferentes apresentaram colorações diferentes. Foi possível observar que as soluções feitas a partir da quitosana do fornecedor Sigma Aldrich<sup>®</sup>, eram mais claras que as soluções feitas com a quitosana do fornecedor Polymar<sup>®</sup>. A Figura 15 evidencia esta constatação.



**Figura 15.** Soluções poliméricas feitas com (a) quitosana Polymar<sup>®</sup> (GD=86% ) e (b) Sigma Aldrich<sup>®</sup> (GD=75% e 85%), respectivamente.

Da mesma forma que as soluções acima, os biofilmes confeccionados com as soluções resultaram em biofilmes que apresentaram diferenças macroscópicas. A Figura 16 ilustra um dos biofilmes produzidos.



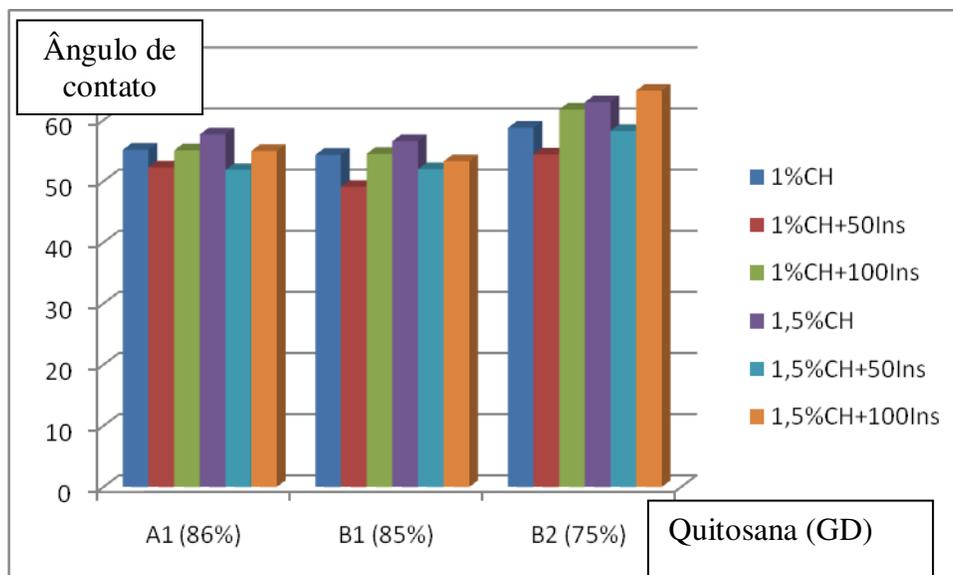
**Figura 16.** Biofilme confeccionado com quitosana Sigma Aldrich® a 1% e 100UI de Insulina

Da mesma forma que as soluções poliméricas, os biofilmes confeccionados a partir do fornecedor A, possuíam coloração ligeiramente mais escura do que os biofilmes confeccionados a partir da quitosana produzida pelo fornecedor B. Com relação à presença da insulina, não foram observadas diferenças consideráveis na morfologia macroscópica do biofilme. O aumento da concentração da quitosana resultou em biofilmes aparentemente mais resistentes, mas não foi feito nenhum ensaio de resistência mecânica, por não ser este o objetivo deste trabalho.

Os biofilmes foram caracterizados e/ou avaliados pelas técnicas descritas na metodologia, sendo obtidos os resultados apresentados a seguir.

### **5.1 Molhabilidade**

A Figura 17 ilustra o resultado do teste de molhabilidade relacionando ângulo de contato com os graus de desacetilação das quitosanas A1, B1 e B2.



**Figura 17.** Valores de ângulo de contato obtidos a partir da medida do meio ângulo, de uma gota de água destilada gotejada, nas diferentes preparações.

A presença da insulina não interferiu consideravelmente no perfil hidrofílico do material, considerando os critérios adotados por Fook (2005) e por Luz, Ribeiro e Pandolfelli (2008), pois todas as preparações apresentaram ângulo de contato menor que  $90^\circ$ , independentemente da composição da mesma (FIGURA 17). No entanto, foi possível constatar uma tendência geral de diminuição do ângulo de contato nas preparações que possuem 50UI de insulina, em relação às preparações que não contêm insulina, indicando maior caráter hidrofílico deste material. Em contrapartida, as preparações que possuem 100UI de insulina apresentaram ângulos de contato maiores do que as preparações que possuem 50UI de insulina, mas, na maioria das vezes, menores do que as preparações que não contêm insulina. Esta tendência repete-se em todas as preparações estudadas, independentemente do tipo de quitosana ou da concentração em que esta foi empregada. Comparando-se as preparações que contêm apenas quitosana, observa-se uma tendência de aumento do ângulo de contato, na medida em que ocorreu um aumento da concentração da quitosana, que ocorre para todas as preparações. Este resultado corrobora com Bispo (2009) e Costa Jr. (2008), os quais afirmam que o aumento da concentração da quitosana aumentou o ângulo de contato devido à maior hidrofobicidade da superfície. Isto ocorre, provavelmente devido à incapacidade que os grupos polares da quitosana apresentam de se orientar na superfície, exibindo uma forte ligação de hidrogênio intermolecular e intramolecular, abaixo da superfície do filme.

Considerando que o Grau de Desacetilação é a fração ou percentagem de monômeros desacetilados em uma molécula polimérica de quitosana (ASTM 2103-1,2007) e que o radical amino ( $\text{NH}_2$ ) é mais polar que o radical acetato ( $\text{COOH}^-$ ), as preparações mais desacetiladas apresentam menor ângulo de contato que a menos desacetilada (maior quantidade de radicais polares, maior hidrofiliçidade, menor ângulo de contato e menor tensão superficial). Deste modo, as preparações de quitosana a 1%, ou seja, A1.1, B1.1, B2.1 apresentaram ângulos de contato com valores crescentes, considerando-se os respectivos graus de desacetilação. Isto pode ser constatado através da análise da primeira barra de todas as colunas mostradas na Figura 17.

Sendo assim, o perfil hidrofílico do material seguiu uma tendência para a maioria das preparações em ordem crescente: o perfil hidrofílico dos biofilmes com 50UI de insulina foi maior do que o perfil hidrofílico dos biofilmes com 100UI de insulina que por sua vez foi maior do que o perfil hidrofílico dos biofilmes sem insulina, independentemente da concentração de quitosana. Considerando todo o conjunto de preparações, a composição que apresentou maior perfil hidrofílico foi a B1.3 (fornecedor Sigma Aldrich<sup>®</sup>, 1% de quitosana/ 50UI insulina) e a que apresentou menor perfil hidrofílico foi a B2.6 (fornecedor Sigma Aldrich<sup>®</sup>, 1,5% de quitosana /100UI de insulina).

Considerando os dois fornecedores de quitosana, numa comparação entre as duas preparações que possuem graus de desacetilação semelhantes, não foram constatadas diferenças relevantes no perfil hidrofílico dos dois materiais.

## **5.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier**

Os principais valores de faixa de absorvância de FTIR característicos da estrutura da quitosana e insulina, bem como os respectivos valores mensurados neste trabalho, estão resumidos na Tabela 6.

**Tabela 6.** Principais valores de absorvância detectados nos biofilmes de quitosana e quitosana/insulina

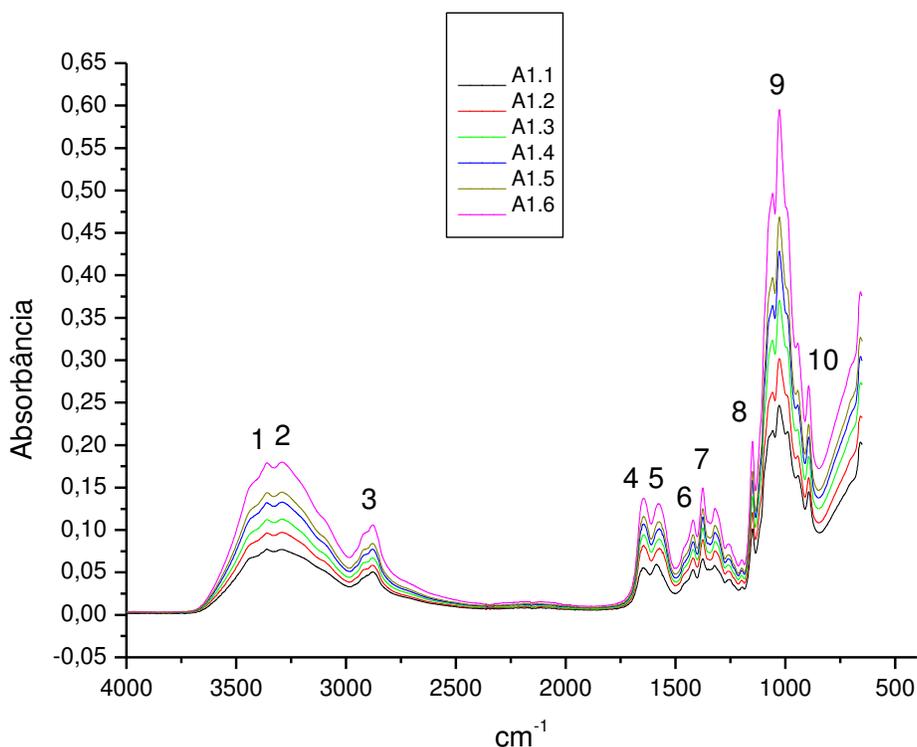
	Sinal	Faixa de absorvância	Absorções identificadas (cm <sup>-1</sup> )
1	- estiramento simétrico e assimétrico do NH <sub>2</sub>	3500-3300	3550, 3525, 3500, 3294, 3277, 3224, 3305
2	- estiramento O-H	3500-3200	3550, 3525, 3500, 3305, 3294, 3277, 3224
3	- estiramento simétrico e assimétrico metila e metileno	2900- 2800	2888, 2877, 2876, 2877
4	- Estiramento C=O de Amidas	1670-1640	1658, 1650, 1647, 1642, 1624
5	- Deformação NH <sub>2</sub>	1640-1560	1650, 1642, 1646, 1624
6	- Estiramento simétrico de sais de Ácido Carboxílico	1400	1380, 1369
7	- Deformação simétrica C-H	1380-1370	1380, 1369
8	Vibrações C-O-C	1159	1161, 1153, 1149, 1110, 1064
9	Estiramento C-O de álcoois e fenóis	1250-1000	1031, 1029, 1027, 1024, 1020, 1012
10	Deformações C-H	1000-650	992

**Fonte:** Adaptado de Cui et al. (2008), Kasaai (2008), Kasyap et al. (2007), Fraga et al.(2006), Prashanth, Kittur, Tharanathan (2002), Tonhi e Plepis (2002)

As absorções atribuídas aos grupamentos funcionais característicos de quitina e quitosana foram constatadas nos biofilmes produzidos e os valores expressos na última coluna da Tabela 6 correspondem aos valores reais mensurados, durante as análises do FTIR. Pequenos deslocamentos na constatação da absorvância dos picos, em relação às faixas de absorvância atribuídas aos sinais referidas pela literatura, não invalidam a interpretação e serão comentados nos tópicos a seguir.

### 5.2.1 Biofilmes A1

A Figura 18 apresenta os espectros da região do infravermelho dos biofilmes de quitosana A1, ou seja, obtidos a partir da quitosana adquirida do fornecedor A (Polymar<sup>®</sup>) com Grau de Desacetilação – GD = 86,5%, com concentrações de 1% e 1,5% de quitosana, com e sem insulina, conforme apresentado no item 4.3.2, deste trabalho.



**Figura 18.** Espectro de Infravermelho das preparações com quitosana Polymar<sup>®</sup> (A1)  
 \*a numeração acima do espectro refere-se aos grupos funcionais da Tabela 6

A estrutura química da quitosana (Figura 10) caracteriza-se por grupos amino livres, sendo o seu equilíbrio químico mantido com seus grupamentos acetamida originais. Na Figura 18, as absorções médias e largas verificadas entre  $3500\text{ cm}^{-1}$  e  $3300\text{ cm}^{-1}$  podem ser atribuídas a estiramentos N-H assimétricos e simétricos respectivamente de amins primárias em líquidos puros. Quase sobreposta, há uma contribuição de estiramento -OH presente na estrutura da quitosana na faixa de  $3500\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ . Aproximadamente em  $2800\text{ cm}^{-1}$ , observa-se um pico que pode ser atribuído aos estiramentos C-H simétrico e assimétrico dos grupos metila presentes nos radicais da quitosana, que não foram desacetilados e os radicais metileno existentes na estrutura da quitosana, mais especificamente relacionados ao Carbono 6. Na região de  $1670\text{ cm}^{-1}$  e  $1640\text{ cm}^{-1}$  pode ser observada uma absorção atribuída ao estiramento C=O de amidas. Próximo a esta faixa, ocorre absorção média/forte e larga atribuída a estiramento nas amins primárias. Aproximadamente em  $1400\text{ cm}^{-1}$ , pode ser detectado um sinal referente a absorção de estiramento simétrico de sais de ácido carboxílico. Na faixa de  $1380\text{ cm}^{-1}$  a  $1370\text{ cm}^{-1}$  ocorre

uma absorção que pode ser atribuída a deformação simétrica de C-H. As vibrações C-O-C podem ser detectadas em  $1159\text{cm}^{-1}$ . Entre  $1250\text{cm}^{-1}$  e  $1000\text{cm}^{-1}$  pode ocorrer uma absorção atribuída ao estiramento C-O de alcoóis e fenóis. A absorção ocorrida na faixa de  $1000\text{cm}^{-1}$  a  $650\text{cm}^{-1}$  está relacionada à presença de -C-H.

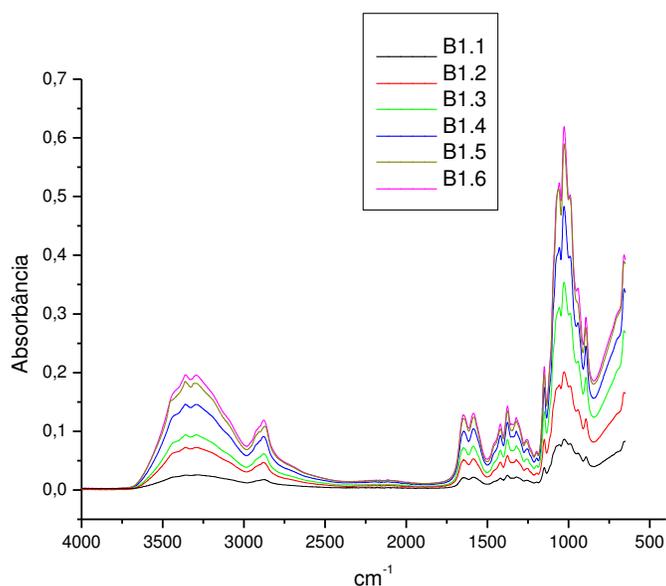
A presença de absorções em  $1154\text{cm}^{-1}$  e  $896\text{cm}^{-1}$  são consideradas como indicativas da presença da estrutura sacarídea característica da quitosana (COSTA JR; MANSUR, 2008). As bandas  $3500\text{cm}^{-1}$ ,  $1300\text{cm}^{-1}$  e  $1200\text{cm}^{-1}$  correspondem aos estiramentos OH-fenol e C-N-amina primária que caracterizam os grupos funcionais da quitosana. A banda localizada próximo a  $1500\text{cm}^{-1}$  caracteriza o estiramento C-O que caracteriza a ligação N-glicosídica responsável pela estruturação do polímero (FRAGA et al., 2006). Darder, Colilla e Hitzky (2003) atribuem bandas vibracionais em  $1075\text{cm}^{-1}$  característica do anel de piranose.

As diferenças entre os espectros dizem respeito a aspectos quantitativos e não qualitativos, ou seja, a intensidade das bandas de absorção, o que é justificado pela maior quantidade de grupos químicos na preparação de maior concentração. Qualitativamente o espectro assemelha-se ao apresentado por Beppu, Arruda e Santana (1999).

Nas preparações contendo insulina e quitosana ocorre uma sobreposição de picos, em decorrência da presença dos aminoácidos que compõe a estrutura da insulina, nos quais estão presentes o grupamento amina e o grupamento carboxilo, além de outros existentes também na estrutura da quitosana. Sendo assim, constatou-se a presença da insulina nas preparações respectivas, pelo aumento da intensidade de absorção dos picos referentes aos grupos funcionais que são comuns a quitosana e insulina, quando comparados as preparações que não contém insulina.

### 5.2.2 *Biofilmes B1*

A Figura 19 apresenta os espectros da região do infravermelho dos biofilmes de quitosana B1, ou seja, obtidos a partir da quitosana adquirida do fornecedor B (Sigma Aldrich®) com Grau de Desacetilação – GD ~85,01 e alta Massa Molar.



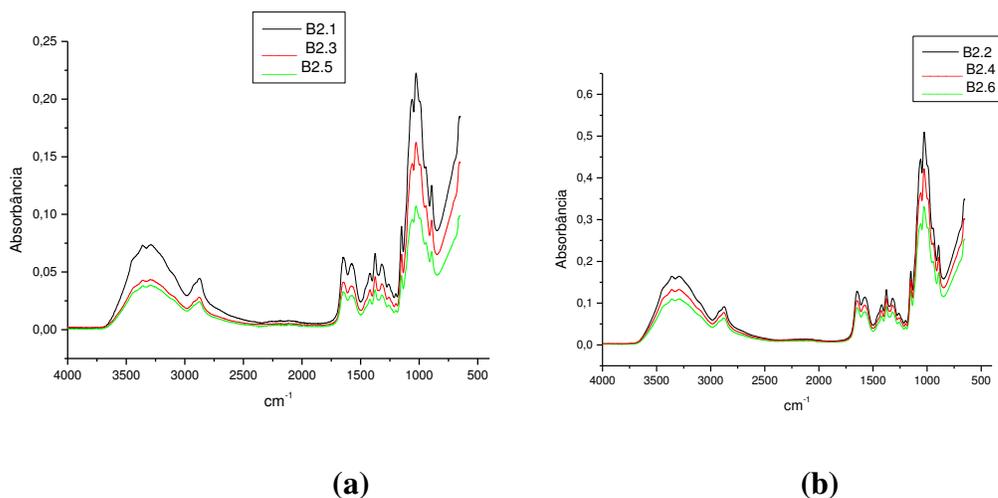
**Figura 19.** Espectro de Infravermelho das preparações Sigma Aldrich<sup>®</sup>, GD 85%

Este espectro assemelha-se ao espectro apresentado na Figura 18, confirmando a tendência de sobreposição de picos referentes aos grupos funcionais que são comuns a quitosana e insulina, quando comparados as preparações que não contém insulina. Desta maneira está estabelecido forte indício da presença da insulina nas preparações respectivas, pelo aumento da intensidade de absorção dos picos.

A similaridade entre os dois espectros apresentados já era esperada devido à semelhança apresentada entre os graus de desacetilação das duas preparações. Desta forma, fica constatado que não ocorreram diferenças consideráveis nos materiais produzidos, a partir dos dois fornecedores diferentes.

### 5.2.3 Biofilmes B2

A Figura 20 apresenta os espectros da região do infravermelho dos biofilmes de quitosana B2, ou seja, obtidos a partir da quitosana adquirida do fornecedor B (Sigma Aldrich<sup>®</sup>) com Grau de Desacetilação – GD ~75% e alta Massa Molar, apresentados em duas etapas devido a diferença de escala de absorção constatada, na medida em que se aumentou a concentração da quitosana.



**Figura 20.** Espectro de Infravermelho das preparações Sigma Aldrich®B2: (a) Preparações com 1% de quitosana e (b) Preparações com 1,5% de quitosana

Os resultados foram apresentados em duas fases, devido à grande diferença na escala de intensidade de absorção dos grupos funcionais, sendo que as preparações que tiveram maior concentração de quitosana tiveram maior intensidade de absorção que as preparações de menor concentração de quitosana.

Outro aspecto singular das preparações apresentadas na Figura 20, diz respeito ao efeito ocorrido com a presença da insulina na quitosana de alta massa molar: observa-se uma inibição dos picos de absorção ao contrário do que ocorreu com as preparações apresentadas anteriormente. Sendo assim, nesta preparação, a presença da insulina diminui a intensidade da absorção e as preparações de quitosana pura apresentaram maior intensidade na absorção do que as preparações que continham insulina.

Uma possível explicação para este fenômeno está associada à alta massa molar da quitosana utilizada nesta preparação, que pode ser interpretado como maior grau de polimerização, pois neste caso as cadeias devem ser maiores. Desta forma, o efeito polar dos grupos funcionais característicos da insulina é atenuado quanto maior for o comprimento da matriz polimérica da quitosana.

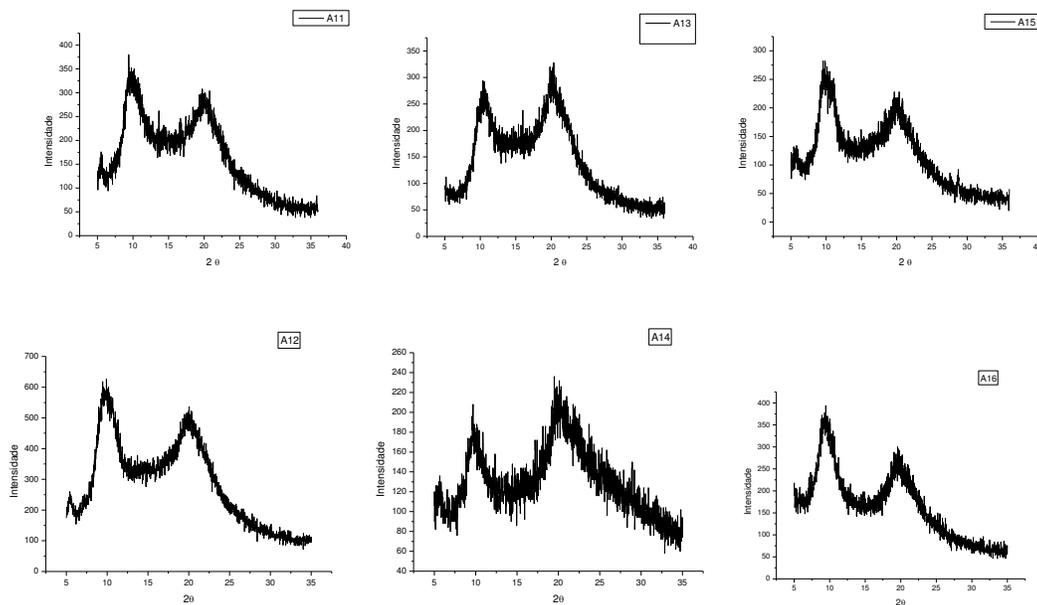
Por outro lado, as interações entre quitosana e insulina, fundamentadas na atração manifestada entre grupos polares e apolares, restringe as vibrações dos respectivos grupos funcionais.

### 5.3 Espectroscopia por Difração de Raios X

Este tópico será apresentado em subdivisões que apresentam o delineamento dos difratogramas e o cálculo do Índice de Cristalinidade.

#### 5.3.1 Difratoformas

Os difratogramas referentes às preparações Polymar<sup>®</sup> estão apresentados na Figura 21.



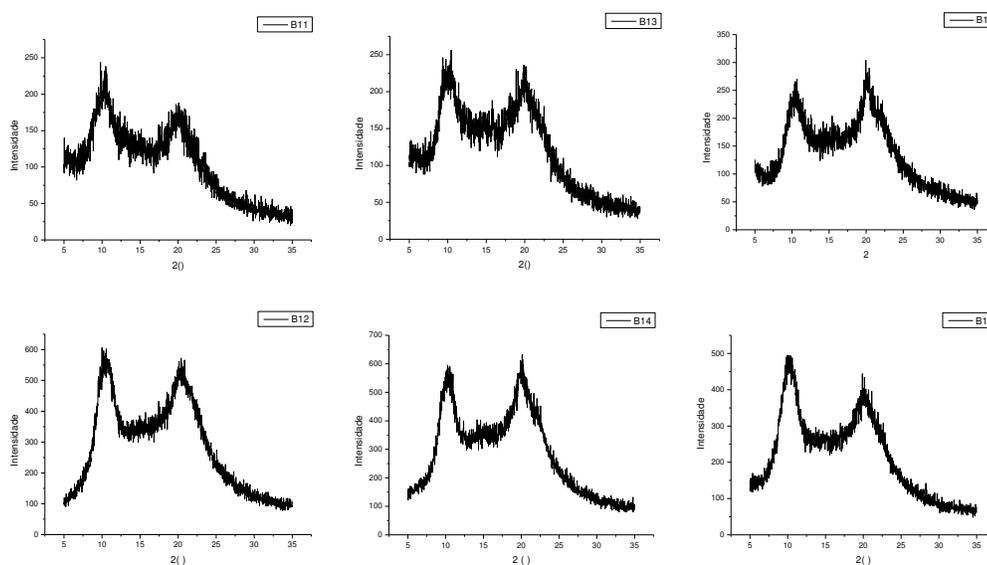
**Figura 21.** Difratoformas dos biofilmes Polymar<sup>®</sup>

Todas as amostras apresentaram forte reflexão iniciadas entre 9 e 10° e entre 19 e 20° características dos difratogramas de quitosana apresentados por autores como Signini e Campana Filho (2001), Campana Filho et al.(2001), Prashant, Kittur, Tharanathan (2002), Trung (2006), Baskar e Kumar (2009), Uygun et al.(2010).

Estes dois halos de difração indicam que a base polimérica da quitosana seguida pelas ligações N-glicosídicas que ligam os monômeros faz com que esta estrutura não tenha um ordenamento cristalino a longas distâncias interatômicas, gerando uma estrutura aleatória (FRAGA et al., 2006), comprovada pelo difratograma condizente com a ficha 39-1894 JCPDS (2003), correspondente a quitosana. Por outro lado, na maioria das vezes, os polímeros são classificados como semicristalinos, uma mistura de cadeias cristalinas e amorfas que podem estar interconectadas, conforme foi apresentado na Figura 5.

O caráter amorfo da estrutura também pode ser atribuído às ligações amino terminais, pois as pontes de hidrogênio que atuam como ligações secundárias também contribuem para a mudança do ângulo de ligação entre as moléculas de quitosana (FOOK, 2005).

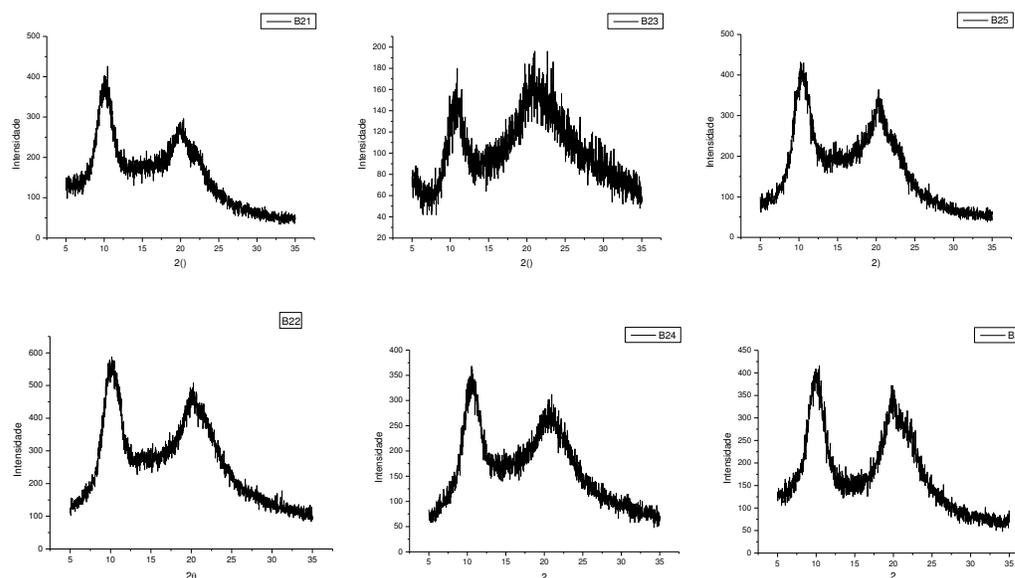
A Figura 22 apresenta os difratogramas referentes às preparações Sigma Aldrich<sup>®</sup>, GD 85% e baixa massa molar (B1).



**Figura 22.** Difratograma dos biofilmes Sigma Aldrich<sup>®</sup>, GD 85% e baixa massa molar (B1)

O delineamento geral dos difratogramas apresentados acima não difere, em linhas gerais, dos anteriores, de modo que todas as afirmações apresentadas, anteriormente, são plenamente aplicáveis aqui.

A Figura 23 apresenta os difratogramas dos biofilmes Sigma Aldrich<sup>®</sup>,GD 75% e alta massa molar (B2).



**Figura 23.** Difratogramas dos biofilmes Sigma Aldrich<sup>®</sup>,GD 75% e alta massa molar (B2)

A série B2 tem como característica principal o alto peso molecular da quitosana utilizada. Apesar desta diferença, em termos de comportamento da cristalinidade não foi possível destacar grandes diferenças em relação às preparações apresentadas anteriormente. Foi constatado que a preparação que contém 50 UI de insulina apresentou-se com aspecto mais amorfo, no caso em que a concentração de quitosana foi 1%, mas não foi constatada esta mesma alteração na preparação equivalente com concentração de 1,5% de quitosana.

Esta discussão poderá ser melhor fundamentada, a partir do cálculo do índice de cristalinidade que será apresentado a seguir.

### 5.3.2 Cálculo do Índice de Cristalinidade

Utilizando-se os dados das caracterizações por DRX, calculou-se os índices de cristalinidade  $I_{cr}$ , que podem ser visualizados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Índice de Cristalinidade ( $I_{CR}$ ) das amostras calculados a partir da Intensidade refratada relativa à região cristalina ( $I_C$ ) e Intensidade refratada relativa à Região Amorfa ( $I_A$ )

Amostras	Concentração de Quitosana/ Insulina	$I_C$	$I_A$	$I_{CR}$
Série A1 – A1.1	1%	379,8	307,9	18,9
<b>GD=86%</b> A1.3	1% / 50UI	328,7	294,3	<b>10,4</b>
A1.5	1% / 100 UI	288,4	227,8	21,0
A1.2	1,5%	629,0	532,9	15,2
A1.4	1,5% / 50UI	236,4	208,1	<b>11,9</b>
A1.6	1,5% / 100UI	394,2	298,9	24,1
Série B1 – B1.1	1%	244,0	186,8	22,2
<b>GD=85%</b> B1.3	1% / 50UI	256,5	236,1	<b>7,9</b>
B1.5	1% / 100 UI	303,3	271,1	10,6
B1.2	1,5%	606,3	572,0	5,6
B1.4	1,5% / 50UI	494,23	472,24	<b>4,44</b>
B1.6	1,5% / 100UI	494,2	444,8	9,9
Série B2 – B2.1	1%	426,7	296,3	30,5
<b>GD=75%</b> B2.3	1% / 50UI	196,2	180,7	<b>7,9</b>
B2.5	1% / 100 UI	430,7	365,0	15,2
B2.2	1,5%	559,99	474,51	15,26
B2.4	1,5% / 50UI	368,7	311,9	<b>15,3</b>
B2.6	1,5% / 100UI	416,11	372,3	10,5

De acordo com os resultados apresentados, considerando-se as preparações que contem apenas quitosana, pode-se afirmar que o aumento da concentração da quitosana diminuiu a cristalinidade das amostras. Uma possível explicação para este fenômeno deve-se ao fato de que o volume moldado foi constante nas situações avaliadas, o que ocasionou uma redução da orientação molecular devido à restrição da mobilidade das cadeias.

Analisando as amostras agrupadas por grupos de mesmo tipo e mesma concentração de quitosana, outra tendência revelada foi a diminuição da cristalinidade das amostras com a presença da insulina na concentração menor (amostras com 50UI de insulina), para todas

as preparações, e que esta cristalinidade tende a se restabelecer com uma concentração de insulina maior (amostras com 100UI de insulina), com exceção do grupo B2.2, B2.4 e B2.6. Esta maior amorficidade na preparação que contém menor concentração de insulina sugere que este composto desorganiza as cadeias de quitosana, quando introduzida em pequena quantidade, mas que, numa maior concentração favorece a formação de ligações cruzadas que reorganizam as cadeias.

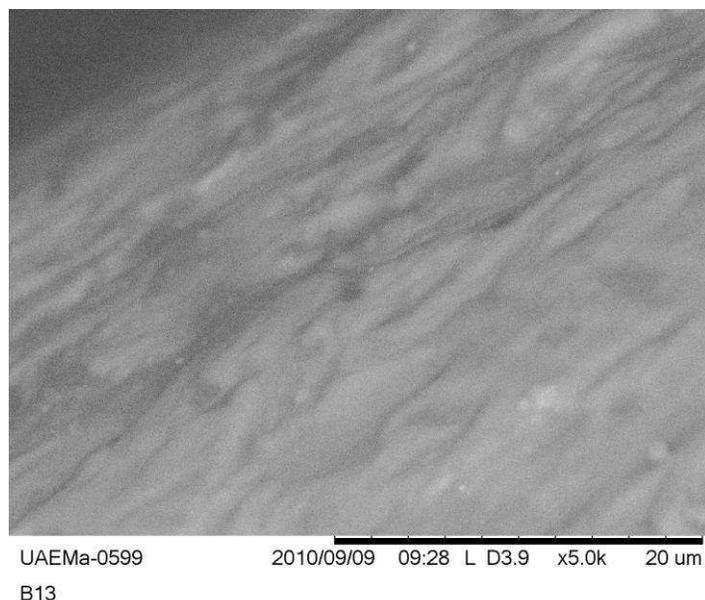
Esta tendência corrobora com os resultados do teste de tensão superficial, em que o ângulo de contato da maioria das preparações que contém 50UI de insulina foi menor que o das outras duas preparações de mesma concentração de quitosana, expressando uma maior hidrofiliabilidade do material e está de acordo com afirmações de Signini e Campana filho (2001). Estes autores descrevem três formas de quitosana que apresentam hidrofiliabilidades e cristalinidades semelhantes, mas nos casos dos cloridratos, a presença de cargas e de contra-íons provenientes de um ácido forte aumenta a hidrofiliabilidade, confere hidrossolubilidade e altera significativamente as interações inter e intracadeias, modificando o empacotamento no estado sólido e resultando em importante decréscimo de cristalinidade. No caso de acetato de quitosana é observado que os cristalitos são menores, o que pode ser atribuído à protonação parcial dos grupos amino e à presença de ânions acetato. Nas regiões amorfas, nas quais a acessibilidade aos sítios reativos é maior, a hidrofiliabilidade é maior.

A cristalinidade das membranas de quitosana de alta massa molar, nas condições desta pesquisa, foi maior do que a de baixa massa molar, corroborando os dados de Trung et al (2006) que estudou as características funcionais de quitosana de camarão e suas membranas em função do grau de desacetilação.

Embora não se possa desconsiderar que a cristalinidade da quitosana está relacionada a diversos fatores como origem, processo de dissolução, grau de acetilação, alguns autores afirmam que quanto maior o grau de acetilação maior a cristalinidade (BRANT, 2008; ANTONINO, 2007). Os dados obtidos neste trabalho, para as preparações que possuem apenas quitosana, corroboram esta afirmação.

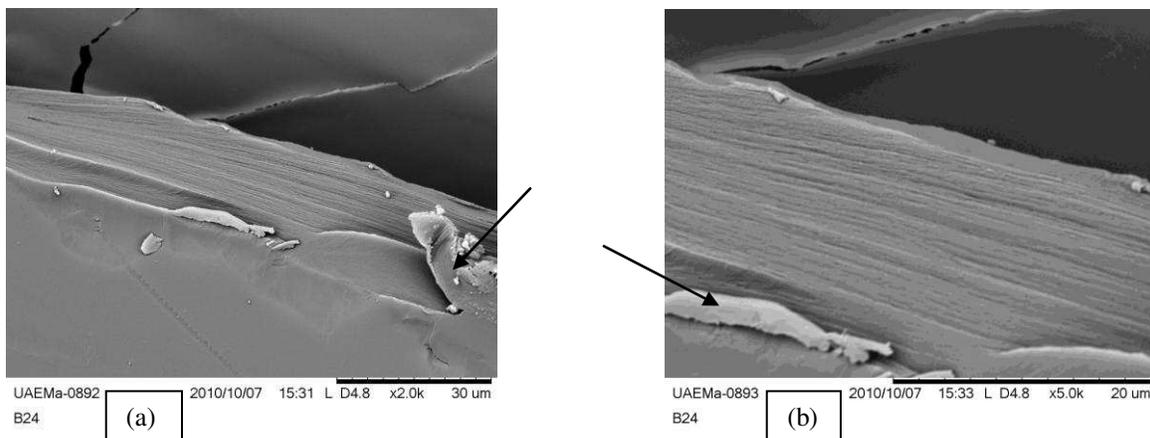
#### 5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

A Figura 24 apresenta um corte transversal de um biofilme de quitosana Sigma Aldrich<sup>®</sup>, baixo peso molecular, com 1% de quitosana e 50 UI de insulina, com aumento de 5.000 vezes. Os cortes transversais permitem a visualização de uma estrutura polimérica fibrosa, multicamadas característica de polímeros, especialmente da quitosana, conforme relatado em Pillai, Paul e Charma (2009) e Li e Hsieh (2006).



**Figura 24.** Corte transversal de um biofilme de quitosana de baixo peso molecular a 1% com 50 UI de insulina

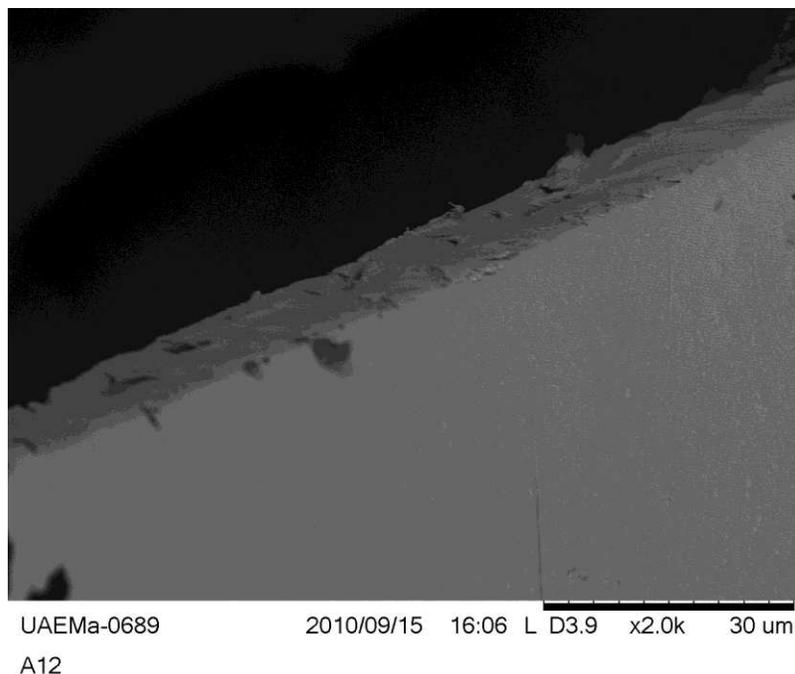
A Figura 25 apresenta um corte transversal de um biofilme de quitosana Sigma Aldrich<sup>®</sup>, alto peso molecular, com 1,5% de quitosana e 50 UI de insulina, com aumento de 2.000 vezes e 5.000 vezes.



**Figura 25.** Corte transversal de um biofilme de quitosana de alto peso molecular a 1,5% com 50 UI de insulina; (a) 2.000 vezes; (b) 5.000 vezes. As setas apontam falhas provocadas pela utilização de tesoura.

Neste caso, a estrutura multicamadas característica dos polímeros fica ainda mais evidente. As setas apontam falhas visualizadas nos cortes laterais, atribuídas aos cortes das membranas feitos com tesoura comum.

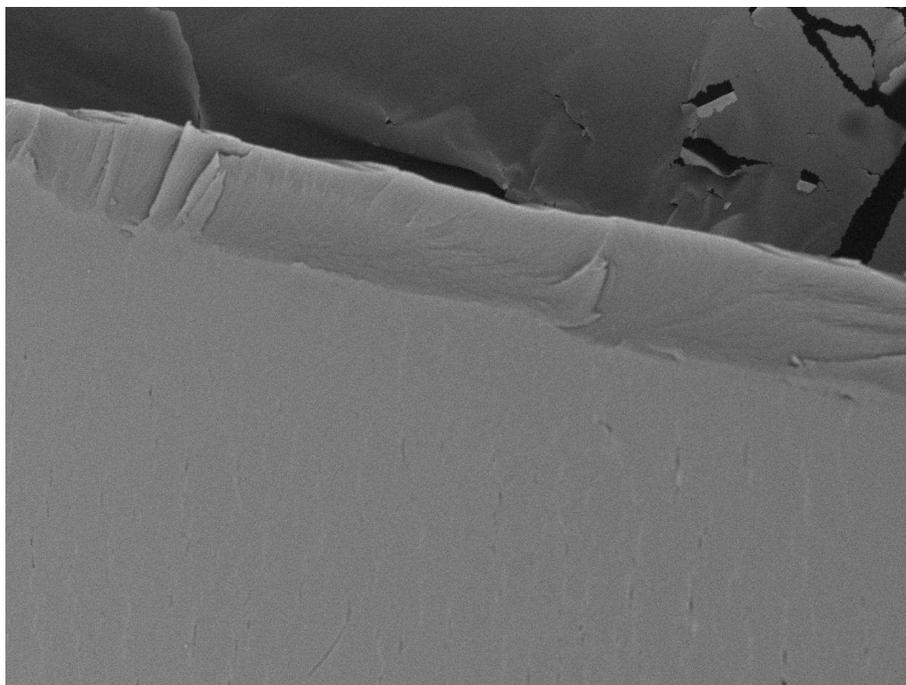
A Figura 26 mostra um corte lateral de um biofilme de quitosana Polymar<sup>®</sup> 86% a 1,5%.



**Figura 26.** Corte transversal de um biofilme de quitosana Polymar<sup>®</sup> a 1,5%, com 2.000 vezes.

Na microfotografia apresentada é possível visualizar a estrutura de membrana densa do tipo isotrópica do biofilme, ou seja, é uniforme em toda a sua superfície, compactas, lisas, sem poros visíveis, apresentando as mesmas características morfológicas ao longo de sua espessura.

A Figura 27 mostra um corte lateral de um biofilme de quitosana Sigma Aldrich<sup>®</sup> a 1%, GD = 85%, com 50 UI de insulina.



UAEMa-0828                      2010/10/05 14:21 L D4.8 x2.0k 30 um  
B13

**Figura 27.** Corte transversal de um biofilme de quitosana Sigma Aldrich® a 1%, com 2.000 vezes.

Da mesma forma que a Figura 26, a Figura 27 mostra que a estrutura desta membrana é densa e não apresenta macroporos. A incorporação da insulina não interferiu consideravelmente na morfologia dos biofilmes, de modo que não foram detectadas alterações visíveis na estrutura das preparações estudadas.

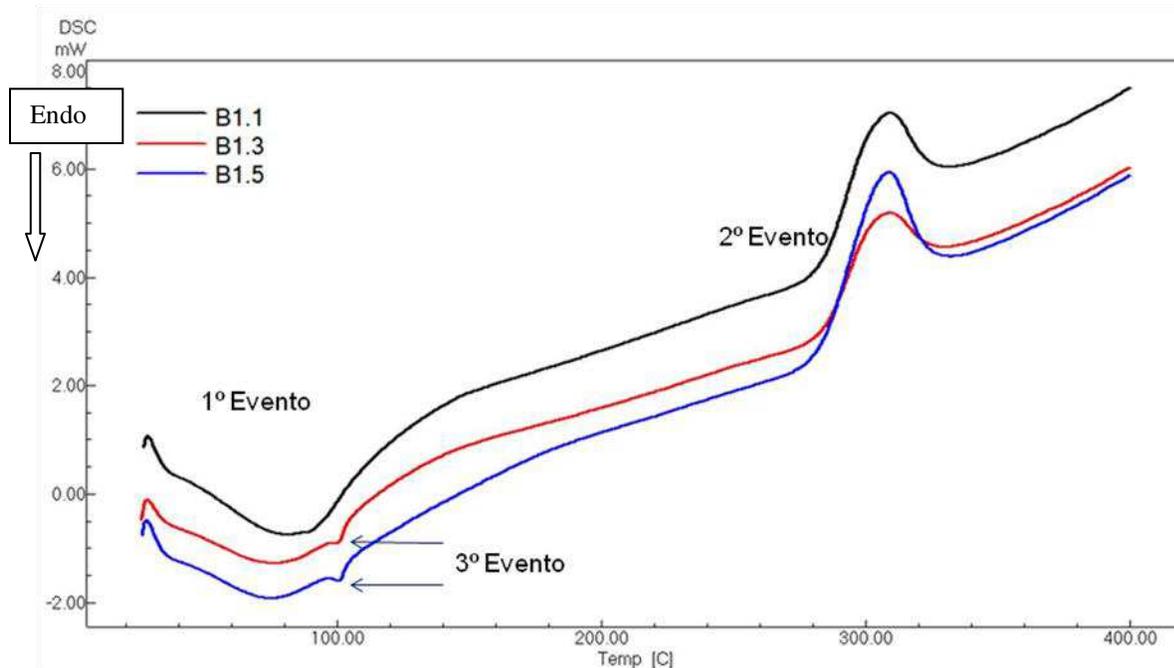
## 5.5 Análise Térmica

Para esta análise foram escolhidas as preparações da quitosana Sigma Aldrich® a 1% pura e com insulina (50 e 100UI), ou seja, B1.1; B1.3; B1.5; B2.1; B2.3 e B2.5

### 5.5.1 Calorimetria Exploratória Diferencial

A Figura 28 apresenta as curvas calorimétricas referentes às preparações B1.1, B1.3 e B1.5. Em todas elas é possível visualizar a presença de dois eventos principais, sendo o primeiro endotérmico e o segundo exotérmico. O evento endotérmico pode ser atribuído à

perda de água e o evento exotérmico à decomposição das unidades monoméricas do polímero corroborando com Azevêdo et al., (2010); Zawadzki; Kaczmarek (2010); Guinési; Carvalheiro (2006) e Sarmento et al. (2006).

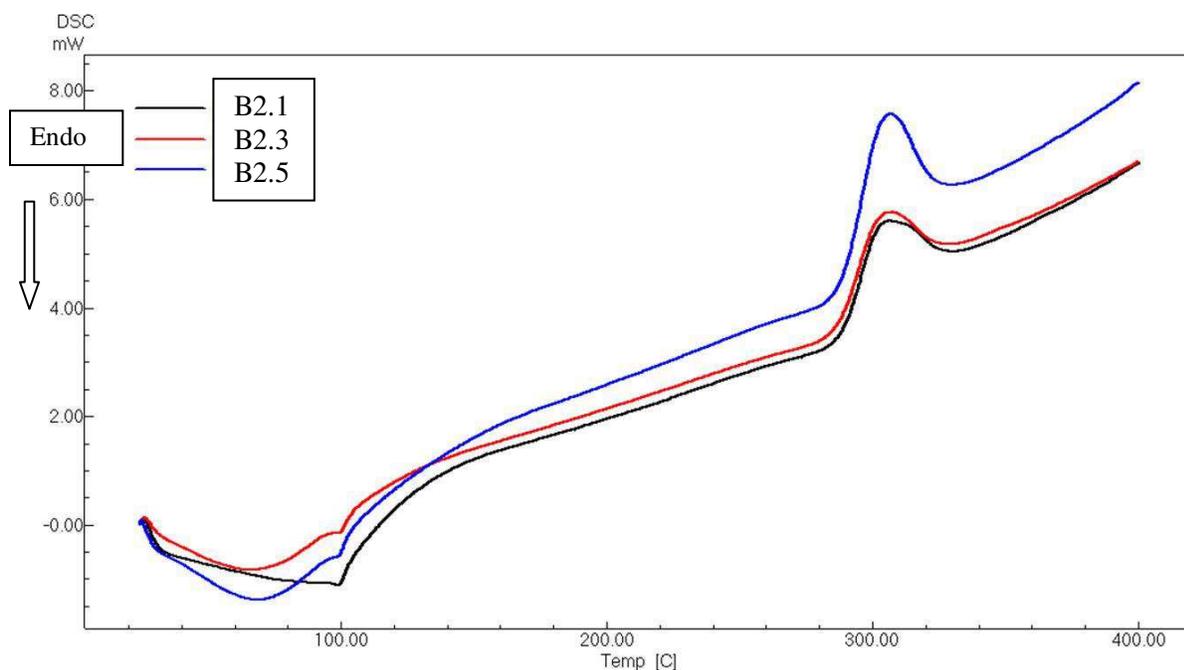


**Figura 28.** Curvas calorimétricas referentes aos biofilmes de quitosana Sigma Aldrich® a 1%, GD 85%, baixa massa molar, sem insulina (B1.1), com 50UI de insulina (B1.3) e 100UI de insulina (B1.5).

Polissacarídeos usualmente têm uma forte afinidade por água e no estado sólido estas macromoléculas podem ter estruturas desordenadas, as quais podem ser facilmente hidratadas. Como se sabe, as propriedades de hidratação dos polissacarídeos dependem da estrutura primária e supramolecular e a presença de ligações de água também tem uma forte influência na natureza polimórfica como um todo da macromolécula (PRASHANTH; KITTUR; THARANATHAN, 2002).

Foi possível também constatar a presença de um terceiro evento endotérmico nas curvas calorimétricas referentes às preparações que contém insulina (B1.3 e B1.5), na temperatura aproximada de 100,3°C, possivelmente atribuído à presença da insulina nestas preparações, corroborando com Sarmento et al. (2006), que mencionam a presença da insulina relacionada a um evento endotérmico, em temperatura aproximada. Desta forma, é evidente a compatibilidade entre quitosana e insulina, pois a presença da insulina parece ter causado um deslocamento no pico e um efeito diferenciado no primeiro evento térmico.

A Figura 29 apresenta as curvas calorimétricas referentes às preparações B2.1, B2.3 e B2.5.



**Figura 29:** Curvas calorimétricas referentes aos biofilmes de quitosana Sigma Aldrich® a 1%, GD 75%, alta massa molar, sem insulina (B2.1), com 50UI de insulina (B2.3) e 100UI de insulina (B2.5).

Da mesma forma que a anterior as curvas caracterizam-se pela presença de dois eventos principais, sendo o primeiro endotérmico e o segundo exotérmico. O terceiro evento está presente em todas as preparações e uma possível explicação para isto é que a massa molar elevada nas composições B2 se equivaleu aos fenômenos relacionados à presença da insulina, quando comparados com os fenômenos das composições de baixa massa molar (B1). Este fenômeno pode estar relacionado com o efeito indutivo e o caráter linear da quitosana.

A Tabela 8 resume os principais dados relacionados aos eventos calorimétricos dos dois tipos de preparações.

**Tabela 8.** Dados calorimétricos das preparações Sigma Aldrich® de baixa e alta massa molar (B1 e B2) respectivamente, a razão de aquecimento 10°C/min.

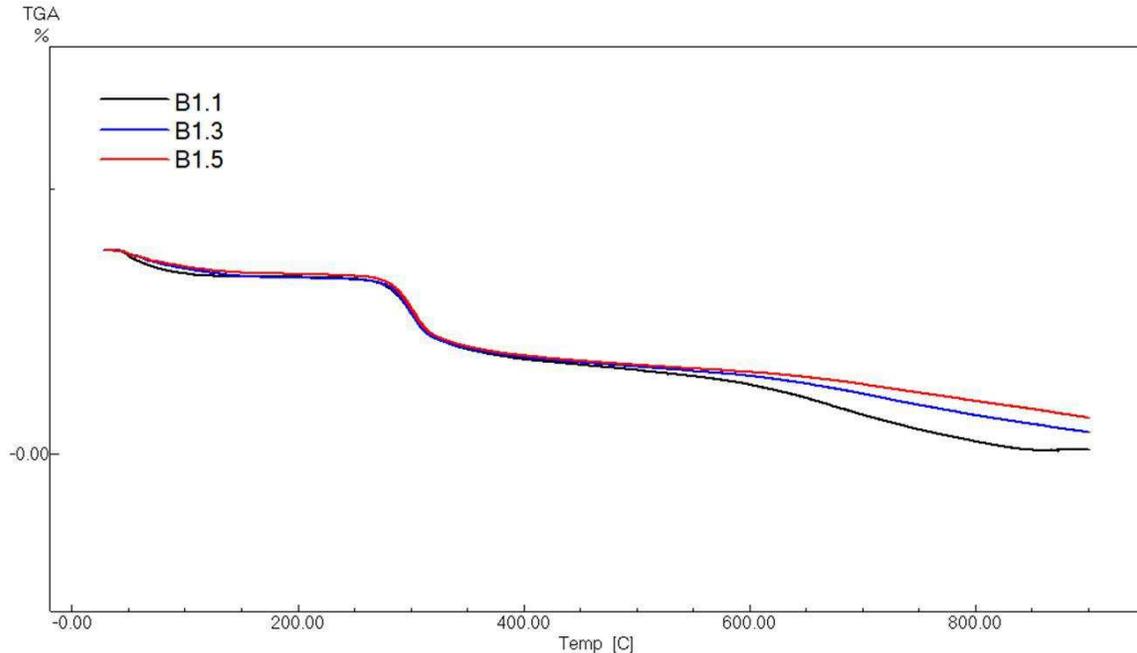
Amostra	Eventos calorimétricos							
	1				2			
	T <sub>i</sub> (°C)	Pico (°C)	T <sub>f</sub> (°C)	$\Delta H$ (mW/mg)	T <sub>i</sub> (°C)	Pico (°C)	T <sub>f</sub> (°C)	$\Delta H$ (mW/mg)
<b>B1.1</b>	31,86	80,88	112,72	1,86	284,17	309,31	324,43	1,93
<b>B1.3</b>	30,85	75,65	105,97	1,53	284,78	309,17	324,35	1,43
<b>B1.5</b>	29,67	76,07	105,27	1,54	283,51	308,84	322,70	2,44
<b>B2.1</b>	27,99	98,94	109,60	1,58	289,04	306,29	327,54	1,54
<b>B2.3</b>	28,46	65,88	104,78	1,30	287,31	307,31	325,00	1,44
<b>B2.5</b>	26,51	68,19	104,25	1,88	288,55	306,67	324,54	2,44

Ti (temperatura inicial); Tf (Temperatura final).

As amostras apresentaram um evento endotérmico com valores descritos na Tabela 8, referente à perda de água associada a grupos hidrofílicos do polímero e sua posterior degradação, corroborando com Azevêdo et al, (2010). Também foi constatado um evento exotérmico, que segundo Guinési e Carvalheiro (2006) está relacionada a decomposição das unidades monoméricas de glicosamina. Para Sarmento et al. (2006), o pico exotérmico resulta da degradação de polieletrólitos devido às reações de desidratação e despolimerização, mais provavelmente da descarboxilação parcial dos grupos carboxílicos protonados e reações de oxidação dos polieletrólitos.

### 5.5.2 Termogravimetria

A Figura 30 mostra as curvas termogravimétricas dinâmicas referentes às preparações Sigma Aldrich® de baixa massa molar a 1% com e sem insulina.

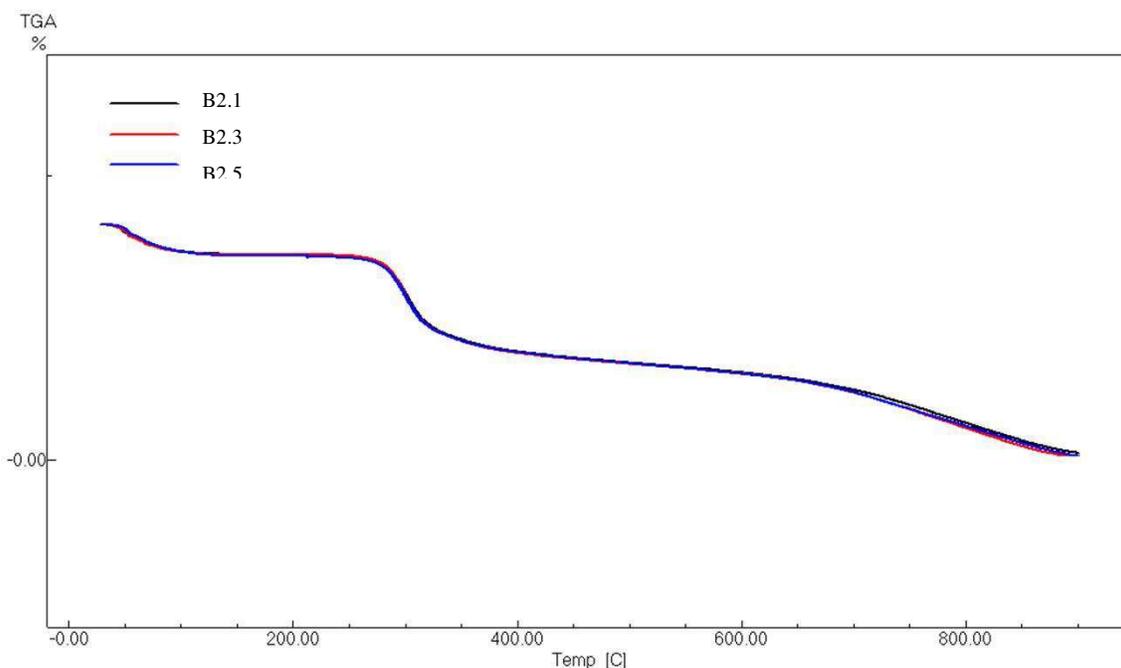


**Figura 30.** Curvas termogravimétricas referentes aos biofilmes de quitosana Sigma Aldrich® a 1%, GD 85%, baixa massa molar, sem insulina (B1.1), com 50UI de insulina (B1.3) e 100UI de insulina (B1.5).

A primeira impressão que se tem ao visualizar as três curvas é sua similaridade, estando às curvas praticamente sobrepostas. No entanto, existem diferenças que serão analisadas após a exposição numéricas dos principais dados.

As etapas da decomposição térmica constatada na termogravimetria relacionam-se aos eventos anteriormente descritos na DSC, sendo possível, por esta razão, explicá-los com os mesmos argumentos apresentados na análise apresentada anteriormente.

A Figura 31 apresenta as curvas termogravimétricas dinâmicas referentes às preparações Sigma Aldrich® de alta massa molar a 1% com e sem insulina, que estão sendo analisadas nesta técnica de caracterização.



**Figura 31:** Curvas termogravimétricas referentes aos biofilmes de quitosana Sigma Aldrich® a 1%, GD 75%, alta massa molar, sem insulina (B2.1), com 50UI de insulina (B2.3) e 100UI de insulina (B2.5).

A decomposição térmica das preparações também apresentou três etapas de perda de massa (%). A similaridade entre as curvas é ainda maior e sua diferenciação está melhor evidenciada na Tabela 9.

**Tabela 9.** Dados termogravimétricos dinâmicos das preparações Sigma Aldrich® de baixa e alta massa molar (B1 e B2) respectivamente.

Amostras		Etapas de decomposição								
		1			2			3		
		Ti (°C)	Tf (°C)	Perda de massa (%)	Ti (°C)	Tf (°C)	Perda de massa (%)	Ti (°C)	Tf (°C)	Perda de massa (%)
<b>B1</b>	<b>B1.1</b>	33,91	109,59	<b>12,177</b>	226,98	400,13	<b>40,156</b>	399,16	840,08	<b>44,302</b>
	<b>B1.3</b>	32,82	148,67	<b>12,791</b>	249,15	357,87	<b>34,733</b>	358,42	893,76	<b>39,858</b>
	<b>B1.5</b>	34,77	141,82	<b>10,674</b>	247,22	355,92	<b>35,492</b>	355,92	896,12	<b>34,061</b>
<b>B2</b>	<b>B2.1</b>	33,08	109,99	<b>11,882</b>	256,11	398,39	<b>40,204</b>	398,39	896,09	<b>43,016</b>
	<b>B2.3</b>	32,64	109,58	<b>12,083</b>	254,68	406,36	<b>41,597</b>	406,36	897,70	<b>43,361</b>
	<b>B2.5</b>	34,06	120,42	<b>12,880</b>	252,98	404,79	<b>40,511</b>	404,79	897,61	<b>43,699</b>

Ti (temperatura inicial); Tf (Temperatura final).

Os dados estão em consonância com os de Zawadzki e Kaczmarek (2010), em que na primeira etapa, a perda de massa ocorreu em torno de 10% e foi atribuída a adsorção de

água, que é evaporada a temperaturas relativamente baixas (abaixo de 100°C). Isto pode significar que a água esteja fisicamente adsorvida ou ligada fracamente a pontes de hidrogênio nas cadeias de quitosana.

Os mesmos autores atribuem os próximos 10% de perda de massa, à perda de água fortemente ligada à estrutura. O principal estágio de degradação é atribuído à despolimerização da cadeia da quitosana, à decomposição do anel de piranose através da desidratação, à desaminação e finalmente às reações de rompimento do anel.

Considerando as preparações de baixa massa molar (B1), embora, aparentemente, não haja diferenças consideráveis nos números apresentados, ao compararmos as três preparações em análise, observa-se que a preparação que contém apenas quitosana apresentou uma perda de massa mais acentuada do que as preparações que contém quitosana e insulina. Esta diferença pode ser constatada ao somarem-se as perdas de massa verificadas nas três etapas de decomposição, sendo mais evidente nas duas últimas. Nas preparações de alta massa molar esta constatação não pode ser verificada.

Também considerando as preparações de baixa massa molar foi evidenciada uma diferença na primeira etapa de decomposição, pois a faixa de temperatura da preparação que não contém insulina foi menor do que as das preparações que contém insulina. Para esta mesma preparação, a faixa de temperatura da segunda etapa de decomposição foi maior na preparação de quitosana pura e menor nas preparações que contém insulina. Continuando a análise, observa-se que na terceira etapa, a faixa de temperatura de decomposição foi menor na preparação de quitosana pura e maior nas preparações que contém insulina. Nas preparações de alta massa molar, estas tendências não foram reveladas.

## **5.6 Ensaio de Biodegradação**

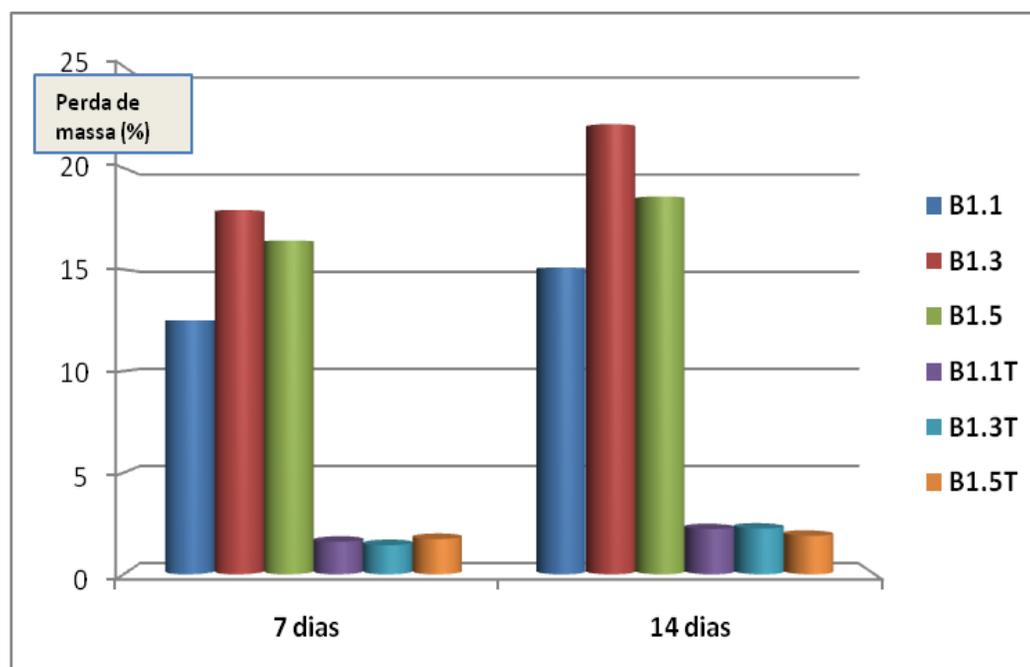
Na avaliação deste ensaio, foi considerada a perda de massa das amostras degradadas em dois lotes.

A Tabela 10 apresenta os resultados de perda de massa, obtidos através do cálculo das médias das preparações de biofilmes submetidos à lisozima (B1.1, B1.3 e B1.5) e somente ao tampão PBS (B1.1T, B1.3T e B1.5T), com respectivos desvios padrão.

**Tabela 10.** Perda de massa percentual de biofilmes de quitosana e quitosana/insulina submetidos a ensaios de biodegradação e respectivos desvios padrão

Tipo	1º lote		2º lote	
	Média (%)	D.Padrão	Média (%)	D.Padrão
B1.1	12,5	0,5	15,1	0,7
B1.3	17,9	0,4	22,1	0,6
B1.5	16,4	0,5	18,6	0,6
B1.1T	1,6	0,3	2,2	0,7
B1.3T	1,4	0,5	2,3	0,3
B1.5T	1,7	0,6	1,9	0,4

Os dados visualizados na Tabela 9 serviram de base para a elaboração da Figura 32. Observou-se que dentre as amostras que foram submetidas à ação da lisozima, o biofilme B1.3 apresentou maior perda de massa do que os biofilmes B1.1 e B1.5 e que o B1.1 apresentou menor perda de massa que o B1.5.



**Figura 32.** Perda de massa expressa em percentual dos biofilmes submetidos à ação da lisozima (B1.1, B1.3 e B1.5) e ao Tampão PBS (B1.1T, B1.3T e B1.5T)

Foi possível constatar que esta perda ocorreu de forma gradativa entre os dois lotes e que as amostras que foram expostas ao tampão PBS tiveram perda de massa mínima. Comparando estes resultados com os que foram obtidos no ensaio de difração de Raios X, verificamos que os dados obtidos estão coerentes entre si e com a literatura, pois as amostras que apresentaram maior grau de cristalinidade apresentaram menor perda de massa.

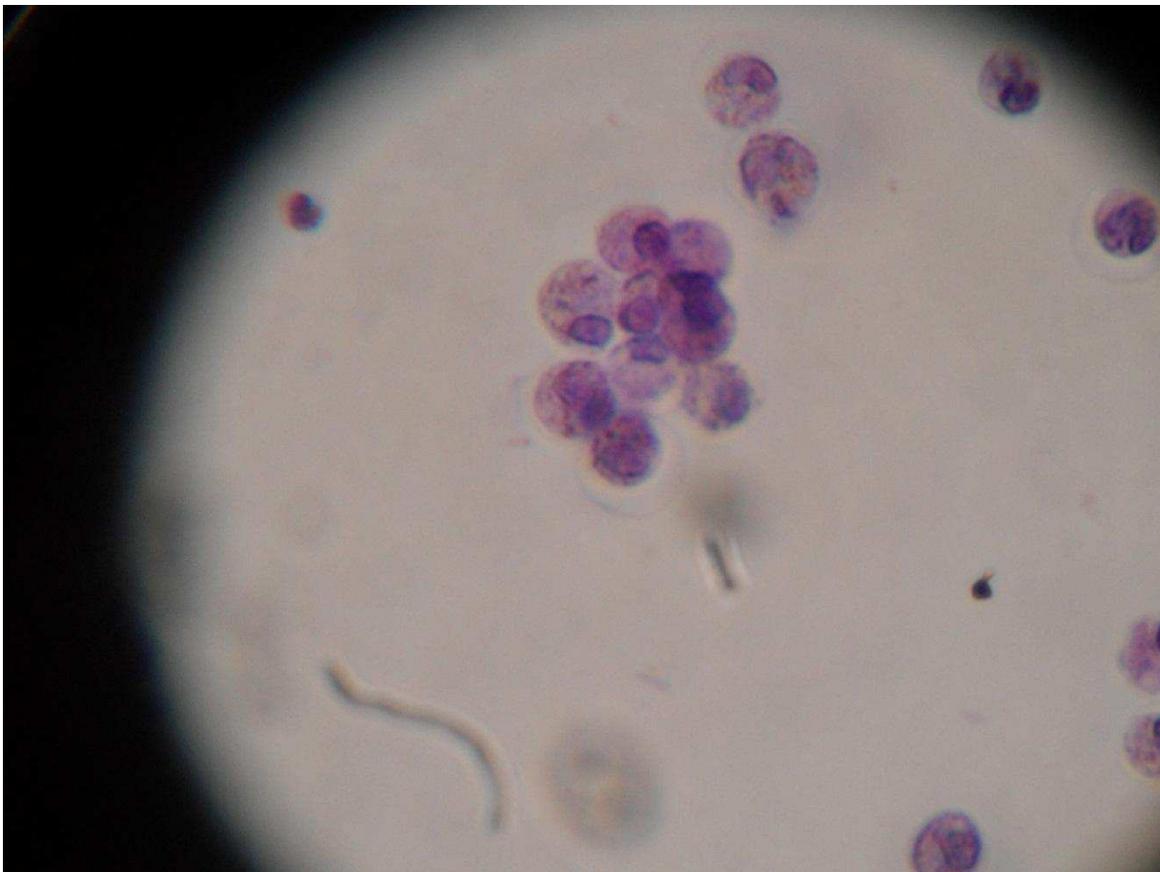
A lisozima é a principal enzima responsável pela degradação *in vivo* da quitosana, através da hidrólise dos resíduos acetilados. A velocidade de degradação da quitosana é inversamente proporcional ao grau de cristalinidade e ao grau de desacetilação. Uma correlação direta entre o grau de desacetilação da quitosana e a adesão celular tem sido observada e é considerada de grande relevância para a engenharia de tecidos (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009; MARTINO; SITTINGER; RISBUD, 2005). Neste trabalho, não foi possível avaliar a degradação do material em função do grau de desacetilação, pois neste experimento só foram utilizadas amostras de um mesmo grau de desacetilação.

## **5.7 Avaliação da Viabilidade Celular dos Macrófagos**

Este teste teve o objetivo de avaliar a viabilidade das células perante o material produzido para uso em organismos vivos.

### *5.7.1 Obtenção das células do Exsudado Peritoneal*

As células foram obtidas pela técnica descrita na metodologia e apresentaram aspecto característico de macrófagos de exsudado peritoneal com morfologia apresentada na Figura 33. Os macrófagos mostrados correspondem aos que foram coletados nos camundongos utilizados na pesquisa que fundamentou este trabalho.



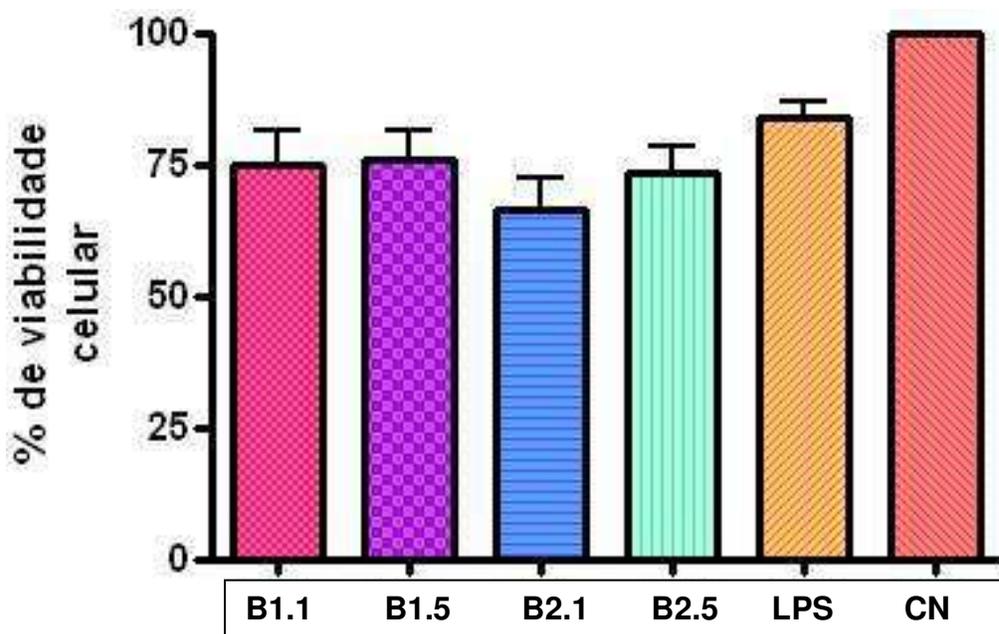
**Figura 33.** Células obtidas do exsudato peritoneal de Camundongos Swiss após 3 dias de estimulação com inoculação peritoneal de 3 mL de tioglicolato de sódio

- Imagem feita em Microscópio ótico (MO)

A utilização de tioglicolato três dias antes do período de coleta do exsudado peritoneal, proporcionou uma alta concentração de macrófagos no peritônio, proporcionando a coleta por meio da pela introdução de tampão PBS na cavidade peritoneal. Uma vez obtidas as células do exsudado peritoneal procedeu-se a sua contagem em Câmara de Neubauer, conforme relatado na metodologia e ajustada a concentração para a obtenção do volume requerido, sendo dado prosseguimento à cultura de células.

### *5.7.2 Avaliação da Viabilidade Celular de Macrófagos*

Os biofilmes testados apresentaram como média uma viabilidade celular acima de 66%. A Figura 34 foi construída com os valores obtidos.



**Figura 34. Viabilidade de macrófagos de camundongos Swiss na presença dos biofilmes B1.1, B1.5, B2.1e B2.5.** Foram preparadas suspensões de células do exsudato peritoneal ajustadas à concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL. Solução de MTT foi adicionada à cultura de macrófagos peritoneais previamente incubados com discos de biofilmes B1.1, B1.5, B2.1e B2.5, ou LPS  $10 \mu\text{g/mL}$  ou somente meio de cultura durante 24h de incubação

As células em meio de cultura (RPMI-16400) foram utilizadas como controle, equivalendo a 100% de viabilidade e estão representadas na última coluna (CN = controle negativo). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de triplicata de 3 animais.

As quatro primeiras colunas expressam os resultados de viabilidade dos biofilmes de baixa e alta massa molar de quitosana pura e com insulina. O valor mínimo requerido para o teste de biocompatibilidade é de 50% (BISPO, 2009). Portanto, os valores obtidos neste teste, revelam que o material em estudo é considerado compatível para uso como biomaterial, podendo-se, a partir dos resultados, inferir que todas as matrizes produzidas mostram-se promissoras para serem testadas em ensaios *in vivo*.

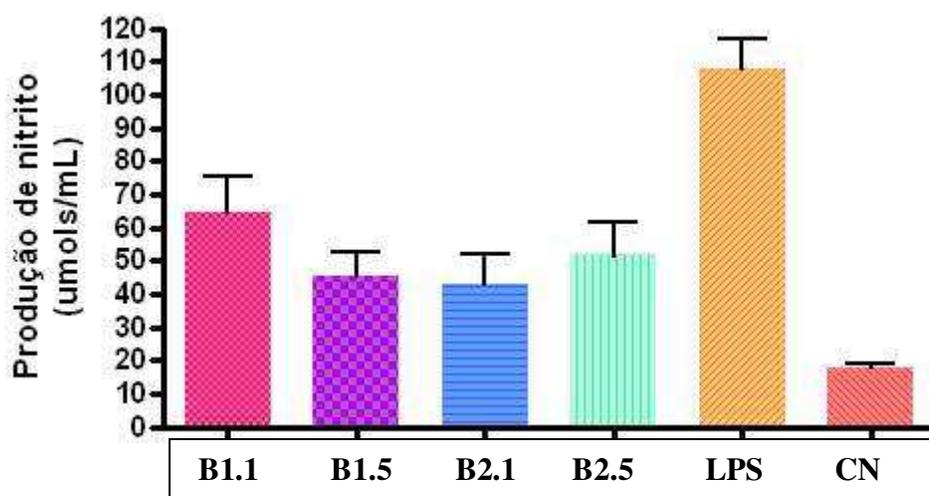
A coluna LPS diz respeito a um teste efetuado com lipopolissacarídeo e é útil para comprovar a viabilidade das células utilizadas, nesta dosagem da substância permanecendo um quantitativo maior de células viáveis do que o próprio material testado.

Os testes de citotoxicidade utilizando culturas de células foram aceitos como o primeiro passo na identificação de compostos ativos para serem usados em testes de biossegurança.

### 5.7.3 Determinação da produção de óxido nítrico

Uma das principais funções dos macrófagos no organismo está relacionada a produção de óxido nítrico, que é convertido nos nitratos. Esta conversão se dá através da ação da enzima NO sintetase induzida (iNOS), cuja síntese é estimulada por citocinas, tal como  $\gamma$ -interferon. Uma vez iniciada a produção de óxido nítrico pela iNOS, ela se prolonga por várias horas e em concentrações altas o suficiente (da ordem de  $\mu\text{M}$ ) para se mostrarem tóxicas à célula-alvo (QUEIROZ; BATISTA, 1999; BOGDAN, 2001).

A produção de óxido nítrico pelos macrófagos a partir da exposição aos biofilmes testados situou-se na faixa de 42 a 64  $\mu\text{mols/mL}$  que podem ser considerados valores positivos, pois situam-se acima do valor do controle negativo e abaixo do valor do controle positivo. A Figura 35 ilustra a produção de óxido nítrico.



**Figura 35. Produção de óxido nítrico por macrófagos de camundongos Swiss na presença dos biofilmes B1.1, B1.5, B2.1e B2.5.** Foram preparadas suspensões de células do exsudato peritoneal ajustadas à concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL. Meio de cultura RPMI-16400 foi adicionado à cultura de macrófagos peritoneais previamente incubados com discos de biofilmes B1.1, B1.5, B2.1e B2.5, ou LPS  $10 \mu\text{g/mL}$  ou somente meio de cultura durante 24h de incubação. As preparações foram colocadas em contato com reagente de Griess por 3 horas. As células em meio de cultura (RPMI-16400) foram utilizadas como controle, equivalendo a 100% de viabilidade. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de triplicata de 3 animais

A Tabela 11 apresenta os valores obtidos pelos teste de Tukey para os biofilmes testados e respectiva significância.

**Tabela 11.** Análise de Variância - ANOVA Teste de Tukey para os biofilmes testados confrontados com o padrão positivo e negativo

Preparações	Valores		
B11 vs LPS	-43.314	5.018	** P<0.01
B15 vs LPS	-62.513	7.634	*** P<0.001
B21 vs LPS	-64.900	7.925	*** P<0.001
B25 vs LPS	-56.095	6.850	*** P<0.001
LPS vs CN	90.019	10.993	*** P<0.001
B11 vs CN	46.705	5.411	** P<0.01

O organismo utiliza o NO em funções fisiológicas nas quais é necessária uma resposta rápida, devido à sua penetração intracelular sem intermediários membranosos. O NO também faz parte do arsenal de primeira defesa do organismo com poder microbicida. Assim, está demonstrado sua ação antibactericida, antiparasítica e antiviral. Nestes casos, o NO atua em concentrações maiores do que as de mensageiro, sendo tóxico aos microorganismos invasores. O limite de concentração tissular de NO entre a não-toxicidade às células do hospedeiro e a toxicidade necessária para ação antimicrobicida, é tênue. No caso de doenças autoimunes e situações de sobrecarga exageradas do organismo, o NO encontra-se em concentrações tóxicas para as células do organismo (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

É importante enfatizar que a regulação precisa da produção de óxido nítrico (NO) pela atividade da enzima iNOS é necessária, tanto para processos de regeneração epitelial e de utilização de biomateriais, pois seus efeitos são dose dependentes. Ressalte-se que uma alta concentração de óxido nítrico local pode levar a uma rejeição do biomaterial. Além disto, esta molécula atua como mediadora no processo de re-epitelialização sendo importante no processo de regeneração do tecido epitelial, além de outras funções relacionadas (COSTA JR.et al., 2003).

É essencial que os biomateriais não estimulem a produção exacerbada de óxido nítrico, nem inibam sua síntese por células estimuladas, uma vez que ambos estes eventos

levariam a problemas na sua utilização em médio e longo prazo. Diante disso, os resultados aqui apresentados são promissores e estimulantes para que o estudo tenha continuidade aprofundando mais essa inter-relação material/hospedeiro.

Por outro lado, foi observado também que, nas condições estabelecidas neste estudo, não foi constatada ação antiinflamatória da quitosana, pois para isto seria necessário que os níveis de produção de óxido nítrico estivessem abaixo dos valores apresentados pelo controle negativo.

## 6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos, através da aplicação da metodologia desta pesquisa, pode-se concluir que:

- O processo utilizado para a obtenção do biofilme (biomaterial) constituído de uma matriz polimérica de quitosana e do fármaco insulina mostrou-se eficaz. Os resultados obtidos nos ensaios de FTIR, tensão superficial e DRX constataram esta formação.
- A morfologia do biofilme não foi modificada significativamente com a presença da insulina, em quaisquer das concentrações e do tipo de quitosana utilizada, sendo a morfologia característica de polímeros de natureza fibrosa, típica da quitosana.
- Os ensaios realizados por difração de raios X demonstraram a variação da cristalinidade nas composições com maior cristalinidade para a preparação Sigma Aldrich® a 1%/alta massa molar (B2.1) e menor para a preparação Sigma Aldrich® a 1,5%/ baixa massa molar/50UI de insulina (B1.4).
- O DSC acusou três eventos térmicos mostrando que a presença da insulina nas preparações de baixa massa molar se equivaleu aos efeitos constatados em uma preparação de alta massa molar.
- A perda de massa constatada na TG foi mais acentuada nas preparações que continham apenas quitosana e as faixas de temperatura em que ocorreram estas perdas de massa foram diferentes nas preparações que continham quitosana e insulina.
- Os ensaios de biodegradação foram aplicados aos biofilmes Sigma Aldrich® /baixa massa molar (B1) resultando numa maior degradação para a composição que contém quitosana/50UI de insulina (B1.3) e menor para a composição que contém apenas quitosana (B1.1).
- Os ensaios de toxicidade demonstraram nas composições B, a viabilidade da continuação dos estudos que garantam a utilização deste sistema para o tratamento do Diabetes *mellitus*.

A quitosana tem sido apresentada por diversos autores como um excelente material a ser explorado como veículo de preparações cosméticas e farmacêuticas, devido as suas características como biocompatibilidade, biodegradabilidade e perfil atóxico. Suas propriedades biológicas têm sido explicadas, muitas vezes, pelo grupamento amínico livre, suscetível de protonação.

Além disto, a possibilidade de reutilização de um material obtido a partir de resíduos da indústria pesqueira traz viabilidade econômica e ecológica ao material desenvolvido neste projeto que, devido a interação eletrostática entre a molécula de quitosana e a molécula de insulina aponta para uma possibilidade real de desenvolvimento de um novo material, que servirá como alternativa no tratamento do Diabetes *mellitus*.

Os resultados das análises físico-químicas, termoanalíticas e biológicas fornecem subsídios para afirmar que existe uma compatibilidade entre os dois materiais e que o material desenvolvido apresenta forte potencial para novas pesquisas, que viabilizem a utilização do material em sistemas de liberação controlada de fármacos para o tratamento do Diabetes *mellitus*.

Considerando a relevância do assunto e a carência de docentes/pesquisadores na área nos diversos seguimentos compreendidos na pesquisa, este trabalho representou clara importância científica e tecnológica na formação de quadros para as Universidades de nossa região, possibilitando inclusive, a integração das Instituições envolvidas. Como docente do Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, atuante na disciplina Farmacotécnica e em Grupos de Assistência Farmacêutica de Hipertensos e Diabéticos, este trabalho abriu uma perspectiva pessoal de atuação para a pesquisadora, que consolidou conhecimentos teóricos e alavancou a pesquisa nesta área, em sua instituição de origem.

## REFERÊNCIAS

ABD-ELMOHDY, F.A. et al. Controlling chitosan molecular weight via bio-chitosanolsis. **Carbohydrate Polymers**, v.82, 2010, p.539-542.

AGNIHOTRI S. A., MALLIKARJUNA N. N.; AMINABHAVI. T. M. Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release** Karnatak University, Dharwad India, n. 100, p. 5 –28, 2004.

ALLEN JR. L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. Porto Alegre: Artmed, 2007, 775p.

ALLSTAR HEALTH. Disponível em: <http://www.allstarhealth.com/blog/products-and-ingredients/amino-acid-supplement-guide> Acesso em 26.09.2010

ANTONINO, N.A. **Otimização do Processo de Obtenção de Quitina e Quitosana de Exoesqueletos de Camarões Oriundos da Indústria Pesqueira Paraibana**. 2007. 89f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

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

ASSIS, O. B. G.; SILVA, V. L. Caracterização estrutural e da capacidade de absorção em água em filmes finos de quitosana processadas em diversas concentrações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 223-228, 2003.

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

ASTM International: F1635-04 *Standard Test Method for in vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants*. Disponível em <http://www.astm.org/ABOUT/index.html>. Acesso em 20.07.2009.

AULTON, M.E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2ª ed., São Paulo: Artmed, 2005, 677p.

AZEVEDO, J. R. et al. Caracterização Físico-química de nanopartículas de quitosana-TPP contendo insulina. In: VII Congresso Brasileiro de análise Térmica e Calorimetria. São Pedro, 2010. **Anais.**, São Pedro, SP, 2010.

AZEVÊDO; M. M. M. **Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos**. Laboratório de Química do Estado Sólido – Instituto de Química – UNICAMP. Disponível em: <[http://www.lqes.iqm.unicamp.br/images/vivencia\\_lqes\\_monografias\\_marcelo\\_nanoesferas](http://www.lqes.iqm.unicamp.br/images/vivencia_lqes_monografias_marcelo_nanoesferas)>. Acesso em: 19 abr. 2008.

BANGYEKAN, C.; AHT-ONG,D.; SRIKULKIT,K. Preparation and properties evaluation of chitosan-coated cassava starch films. **Carbohydrate Polymers**, v.63, 2006, p.61-71.

BASKAR,D.; KUMAR,T.S.S. Effect of deacetylation time on the preparation, properties and swelling behavior of chitosan films. **Carbohydrate Polymers** v.78, 2009, p767-772.

BATICH,C.; LEAMY,P. Biopolymers. In: KUTZ,M.(Ed.) **Standard Handbook of Biomedical Engineering and Design**. U.S.A.:Library of Congress Cataloging-in-publication Data, 2003, p.11.3-11.30.

BEPPU, M.M.; ARRUDA, E.J.; SANTANA,C.C. Síntese e Caracterização de Estruturas Densas e Porosas de Quitosana. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, out/dez, p.163-169, 1999.

**BIOMATERIALS & DRUG DELIVERY**. Cornell University Department of Biomedical Engineering. Disponível em:  
<<http://www.bme.cornell.edu/research/biomaterials.cfm> .Acesso em 19 abr. 2008>.

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

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nat. Immunol.**, v.2, 2001, p.907-916.

BOLLEN, L. S.; SVENDSEN, O. **Biocompatibility**. Department at Scantox A/S (Lille Skensved, Denmark). Disponível em:  
<<http://www.devicelink.com/mpb/archive/97/05/001.html>>. Acesso em 02 maio 2008.

BOYCE, S.T.Regulatory Issues and Standardization. In: ATALAMethods of Tissue Engineering In: ATALA,A.; LANZA,R.P. Methods of Tissue Engineering. Orlando: Academic Press, p.3-17. 2002.

BRANT, A.J.C.**Preparação e Caracterização de Hidrogéis a partir de misturas de soluções de quitosana epoli (N-Vinil-2-Pirrolidona)**. 2008. 170f. (Doutorado em Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

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

BROWN, C.D.; HOFFMAN, A.L. Modification of Natural Polymers: Chitosan. IN: ATALA, A.; LANZA, R.P. (Edited). **Methods of Tissue Engineering**. Academic Press: Orlando, 2002, p. 565-823.

CALLISTER JR.,W.D. **Fundamentals of Materials Science and Engineering: An interactive e-text**. Utah: John Wiley & Sons Incorporation, 2001, 920p.

CAMPANA FILHO et al. Extração, estrutura e propriedades de  $\alpha$  e  $\beta$ -quitina. **Química Nova**, v. 3, n. 3, p. 644-650, 2007.

CANELA, K. M. N.C.; GARCIA, R.B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel: influência do método de preparação e do solvente. **Química Nova**, v.24, n.1, p.13-17, 2001.

CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.46; n.4, 2002.

CLEASEN, C. ; WHILHELMS, T. ; KULICKE, W. M. Formation and characterization of chitosan membranes. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 3210-3222, 2006.

CHAGAS, E.F.; VALENTIM, A. C. M.; GARCIA, R.B. A. Avaliação da tensão Superficial e Comportamento Reológico de um Complexo Polimérico para Reestruturação de Poços de Petróleo. In: Congresso Brasileiro de Petróleo, 3, 2005, Salvador. **Anais...** Salvador, 2005, p.

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

**COSTA JR. Desenvolvimento de matriz de Quitosana/PVA quimicamente reticulada para aplicação potencial em Engenharia de Tecido Epitelial.** 2008, 151f. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Minas). Escola de Engenharia da UFMG, Universidade Federal de Minas Gerais

COSTA JR., E.S.; MANSUR, H.S. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/Poli(Álcool Vinílico) reticuladas quimicamente com Glutaraldeído para aplicação em Engenharia de Tecido. **Quím. Nova**, v.31, N°6, 1460-1466, 2008.

COSTA, M.T.; FABENI, R.C.; APTEKMANN, K.P.; MACHADO, R.R. Diferentes papéis do óxido nítrico com ênfase nas neoplasias. **Ciência Rural**, v.33, 2003, p.967-974.

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

CUI, Z. et al. Ionic interactions between sulfuric acid and chitosan membranes. **Carbohydrate Polymers**, p. 1-6, 2008.

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

DARDE, M.; COLILLA, M.; HITZKY, E. R. Biopolymer-clay Nanocomposites based on Chitosan intercalated in Montmorillonite. **Chem. Mater**, v. 15, p. 3774-3780, 2003.

DEE, K.C.; PULEO; D.A.; BIZIOS,R. Biomaterials. In: **An Introduction to Tissue-Biomaterial Interactions**. John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey, 2002, p1-13.

DUGGI, K. Diabetes Mellitus. CARVALHO, A.L. (Tradução). Disponível em: [www.scienceinschool.org/.../diabetes/portuguese](http://www.scienceinschool.org/.../diabetes/portuguese). Acesso em: 26.05.2009

FELDMAN, D. et al. Biomaterial-Enhance Regeneration for Skin Wonds. In: WISE, D.L. Biomaterials and Bioengennering Handbook. Cap. 36. p.807-836, 2003.

FERREIRA, V.F; ROCHA, D.R.; SILVA,F.C. Potencialidades o Oportunidades na Química da Sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, v.32, n.3, 2009, p.623-638.

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

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev Ass Med Brasil**; v.46, n.3, 2000, p. 265-271.

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

FRAGA, A. F. et al. , Ensaio de membranas de quitosana recobertas com hidroxiapatita: efeito da adição de hidróxido de sódio. In: Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2006, Foz do Iguaçu, **Anais...** Foz de Iguaçu : IPEN, 2006, p. 2715-2725.

FREIER, T. et al. Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by N-acetylation. **Biomaterials**, v.26, 2005, p.5872-5878.

GEORGE, M.; ABRAHAM, T.E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan – a review. **Journal of Controlled Released**, v. 114, 2006, p.1-14.

GINTY, P. J.; HOWDLE, M.; ROSE, F.R.A.J.; SHAKESHEFF,K.M. An Assessment of the role of Polymers for Drug Delivery in Tissue Engeneering. In: UCHEGBU, I.F.; SCHÄTZLEIN, A.G. (Ed.) **Polymers in Drug Delivery**. United States of American: CRC Press, , cap.6, 2006, p.63-80.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v.126, n.1, 1982, p.131-138.

GUINESI, L.S.; CAVALHEIRO, E.T.G. The use of DSC curves to determine the acetylation degree of chitin/chitosan samples. **Thermochímica Acta**, v. 444, 2006, p. 128-133.

HEJAZI, R.; AMIJI, M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. **Journal of Controlled Release** v. 89, 2003, p.151-165.

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

HERDMAN, R. C. **Biopolymer Research and Development in the United States**. Washington DC: U.S. Government printing Office, 1993. cap.4, p.67-80.

ILLUM, L. Chitosan and its use as a Pharmaceutical Excipient. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n.9, p. 1326-1331, 1998.

JCDPS, *Diffraction Data Base*, Newton Square: International Centre for diffraction data, PCPDFWIN v.24, 2003.

JEONG, S.H.; HUH, K.M.; PARK, K. Hydrogel Drug Delivery System. In: UCHEGBU, I.F.; SCHÄTZLEIN, A.G. (Ed.) **Polymers in Drug Delivery**. United States of American: CRC Press, 2006, cap.5, p.49-62.

JOSUÉ, A.; LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE; KIMURA, I.Y. PEDROSA, R. C. Liberação controlada de Eosina Impregnada em Microesferas de Copolímero de Quitosana e Poli (ácido acrílico). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 10, n.3, p. 116-121, 2000.

KAHN, C.R. SCHECHTER, Y. Insulina, Drogas Hipoglicemiantes orais e a s Farmacologia do Pâncreas Endócrino. In: GILMAN, A.G. et al. Goodman and Gilman. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991, cap.61, p.973-994.

KAPARISSIDES, C. et al. **Recent advances in novel drug delivery systems**. Copyright AZoM., 2006. Disponível em: <<http://www.azonano.com/oars.asp>>. 25 abr. 2007.

KASAAI, M.R. A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. **Carbohydrate Polymers** 71, p. 497-508, 2008.

KASHYAP, N. et al. Designe and evaluation of biodegradable, biosensitive in situ gelling system for pulsatile delivery of insulin. **Biomaterials**, v. 28, p. 2051-2060, 2007.

KEAN, T.; THANOU, N. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Advanced Drug Delivery Review**, v.62, p.3-11, 2010.

KOHN, J.; WELSH, W.J.; KNIGHT, D. A new approach to the rationale discovery of polymeric biomaterials. **Biomaterials**, v. 28, p. 4171-4177, 2007.

KUMAR, M.N.V.R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Funcional Polymers**, v.46, p.1-27, 2000.

LACAVA, Z. G. M. Aplicação biomédicas das nanopartículas magnéticas. In: DURAN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. **Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. Artliber: São Paulo, 2006, 207p.

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

LAUS et al. Microesferas de Quitosana Reticuladas com Tripolifosfato Utilizadas para Remoção da Acidez, Ferro(III) e Manganês(II) De Águas Contaminadas pela Mineração de Carvão. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p.34-39, 2006.

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.

LI, L., HSIEH, Y. Chitosan biocomponent nanofibers and nanoporous fibers. **Carbohydrate Research**, v.341, p.374-381, 2006.

LOPES, W.A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação dos espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v.2, n.4, 2004, p.670-673.

LUZ, A.P.; RIBEIRO, S. ; PANDOLFELLI, V. C. Uso da molhabilidade na investigação do comportamento de corrosão de materiais refratários. **Cerâmica** São Paulo, v. 54, p. 174-183, 2008.

MAEDA, M.;INOUE, Y.; KANEKO, K.;SUGAMORI, T.;IWASE, H.;TSURATANI, R. Chitin and Its Derivatives. In: WISE, D.L. **Biomaterials and Bioengineering Handbook**. 2003, cap. 36. p.867-879, 2003.

MAO, S.; GERMERSHAUS, O.; FISCHER, D.; LINN, T.; SCHNEPF, R.; KISSEL, T. Uptake and Transport of PEG-Graft-Trimethyl-Chitosan Copolymer-Insulin Nanocomplexes by Epithelial Cells. **Pharmaceutical Research**,. December 2005, v.22, 1211p.

MARTINO, A.D.; SITTINGER, M.; RISBUD, M.V. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. **Biomaterials**, v. 26, 2005, p.5983-5990.

MORATO; A.; NARVAÉZ, I.; TORIBIO; C. **Ciencias de la salud el futuro de los biomateriales: tendencias tecnológicas a medio y largo plazo**. Madri: Cyan, Proyectos e Producciones Editoriales, 2004, 43 p.

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

OGAWA, K. **Effect of heating an aqueous suspension of chitosan on the crystallinity and polymorphs.** *Agric Biol Chem*; v.55, p. 2375–2379, 1991.

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

OTTENBRITE, R.M.; FADEEVA, N. Polymer Systems for Biomedical Applications: An overview. In: OTTENBRITE, R.M. (Edit.) **Polymeric drugs and drug administration.** U.S.A.: Library of congress, 1994, cap.1, p.1-14

OZGUNEY, I. S.; KARASULU, H. Y.; KANTARCI, G.; SOZER, S.; GUNERI, T.; EERTAN, G. Transdermal delivery of diclofenac sodium through rat skin from various formulations. **AAPS PharmSciTech.** v. 7, n. 4, p. E1-E7, 2006.

PADILHA, A.F. **Materiais de Engenharia, Microestrutura e Propriedades.** Curitiba: Hemus, 2000. 343p.

PIAI et al. Desenvolvimento de Hidrogéis de Quitosana Reticulada contendo Sulfato de Condroitina. 58ª Reunião Anual da SBPC: **Anais.** Florianópolis, SC - Julho/2006.

PILLAI, C.K.S.; PAUL, W., SHARMA, C.P. Chitin and chitosan polymers: chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science**, v. 34, 2009, 641-678.

PORTAL FATOR BRASIL. A evolução da insulina humana e a revolução no tratamento do diabetes. Disponível em: <http://www.revistafatorbrasil.com.br>. Acesso em 15.05.2008

PRASHANTH,K.V.H., KITTUR,F.S.; THARANATHAN,R.N. Solid state structure of chitosan prepared under different n-deacetylating conditions. **Carbohydrate Polymers**, v.50, p.27-33, 2002.

QUEIROZ; S.L.; BATISTA; A.A. Funções biológicas do óxido nítrico. **Quím. Nova**, São Paulo, July/Aug. 1999, v.22, n.4, p.584-590.

QUITINA. Disponível em: <<http://www.tiosam.com/enciclopedia/?q=Quitinosas>> Acesso em: 01 abr. 2008.

RAMALHO, A.C.E. Insulina e Hipoglicemiantes Oraís. In: SILVA, P.Farmacologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 5ª Ed.,cap. 80, p.746-759, 1998

RANG,H.P. DALE,M.M. RITTER,J.M. O Pâncreas endócrino e o controle da glicemia. **Farmacologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.22, p.318-329, 2001.

RATNER, B. D; Biomaterials Science: an interdisciplinary endeavor. In: RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. (Ed.). **An introductions to materials in medicine.** San Diego: Academic Pres, 1996. p. 1-8.

RATNER, B. D.; BRYANT,S. J. Biomaterials – where we have been and where we are going. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v.6, 2004, p. 48-75.

RIBEIRO, G. FREUDENRICH, C. *HowStuffWorks* – como funciona o diabetes (Publicado em 22 de junho de 2001). Disponível em: <<http://saude.hsw.uol.com.br/diabete.htm>> Acesso em 24 abr.2008.

RINAUDO, M. Chitin and Chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science** v. 31, p. 603-632, 2006.

SANTOS, J. E. et al. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros**, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

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

SARMENTO, B. et al., Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation though DSC and FTIR studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, p.1-7, 2006.

SHALABY W. S.; BURG K. Absorbable biodegradable polymers: Technology evolution. In: SHALABY W. S.; BURG K **Absorbable biodegradable polymers**. CRC PRESS: Boca Raton London, New York, Washington, p.3-11, 2005.

SHALABY ,M.; SHALABY W. S. Implantable Insulin Controlled Release System for Treating Diabetes Mellitus. In: SHALABY W. S.; BURG K **Absorbable biodegradable polymers**. CRC PRESS: Boca Raton London, New York, Washington, p.206-226, 2005.

SIGNINI,R. CAMPANA FILHO, S. P. Características e propriedades de Quitosanas Purificadas nas formas Neutra, Acetato e Cloridrato. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. v. 11, n.2, p.58-64, 2001.

SILVA, G.L. **Estudo da ação inibitória da quitosana sobre os enteropatógenos *Salmonella entérica, Shigella sonnei e Escherichia coli***. Programa de pós-graduação inter-unidades em Bioengenharia (Dissertação); São Carlos e outras, 2005.

SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA,E. I. Quitosana: derivados Hidrossolúveis, aplicações farmacêutica e avanços. **Química nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.

SINHA, V.R.; SINGLAA.K.; WADHAWAN,S.; KAUSHIK,R.; KUMRIA,R.; BANSAL, K.; DHAWAN, S. Chitosan microspheres as a potencial carrier for drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, 274, p.1-33, 2004.

SINKO, P.J.(Org.) **Martin**: físico-farmácia e Ciências Farmacêuticas. 5ª ed. Artmed: São Paulo, 2008, 810p.

STEVENS, M.P. **Polymer Chemistry**: An Introduction.Oxford University Press: New York, 3ª ed., 551p., 1999.

STORPIRTIS,S.; GAI,M.N. Biofarmacotécnica: Princípios de Biodisponibilidade, Bioequivalência, Equivalência Farmacêutica, Equivalência Terapêutica e Intercambialidade de Medicamentos. In: STORPIRTIS,S. **Ciências Farmacêuticas: Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009, p.3-10

TAKAHASHI, T.; IMAI, M.; SUZUKI, I. Water permeability of chitosan membrane involved in deacetylation degree control. **Biochemical Engineering Journal** v. 36, p. 43-48, 2007.

TONHI, E.; PLEPIS, A.M.G.; Obtenção e caracterização de Blendas Colágeno-Quitosana. **Química Nova**, v.25, n.6, 2002, p. 943-948.

TORRES,M.A; VIEIRA,R.S.; BEPPU,M.M.; SANTANA,C.C.. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. Associação Brasileira de Polímeros: São Carlos. Out.-nov. ano/v.15; n.004, p.306-312, 2005.

TORRES et al. **Produção e Caracterização de Microesferas de Quitosana Natural e Modificada Quimicamente e o seu Uso na Adsorção das Proteínas BSA e Lisozima**. 2006, 146f , Tese. Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas

TRUNG, T.S. et al. Functional characteristics of shrimp chitosan and its membranes as affect by degree of deacetylation. **Bioresource Technology**, v.97, 2006, p. 659-663.

URQHART, J. Controlled Drug Delivery: therapeutic and pharmacological aspects. **J Intern Med**, v.248, p.357-376, 2000.

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

UYGUN,B.E.et al. Membrane thickness is an important variable in membrane scaffolds: Influence of chitosan membrane structure on the behavior of cells. **Acta Biomaterialia**, 6, 2010, p.2126-2131.

VILLANOVA, J.C.O.; ORÉFICE, R.L.; CUNHA, A.S. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, nº 1, p. 51-64, 2010.

VITALINE C. GERBRAS. Química Farmacêutica. Disponível em: <[http://www.gerbras.com.br/produtos/vitaline\\_c.asp](http://www.gerbras.com.br/produtos/vitaline_c.asp)>. Acesso em 23 nov.2010

WAN, Y.; PEPPLEY, B.; CREBER, K.A.M. BUI, V.T. Anion-exchange membranes composed of quaternized-chitosan derivatives for alkaline fuel cells. **Journal of Power Sources**, v.195, p.3785-3793, 2010.

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

ZAWADZKI, J.; KACZMAREK, h Termal treatment of chitosan in various conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 20, 2010, p. 394-400.

ZHANG, Y. et al. Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction. **Carbohydrate Research**, v. 340, 2010, p.1914-1917.