



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE FARMÁCIA**

DAVIDSON MARRONY SANTOS WANDERLEY

**ESTUDO COMPARATIVO DE METODOLOGIAS DE OBTENÇÃO DE BIOFILMES
DE QUITOSANA E QUITOSANA/INSULINA**

CAMPINA GRANDE - PB

2016

DAVIDSON MARRONY SANTOS WANDERLEY

**ESTUDO COMPARATIVO DE METODOLOGIAS DE OBTENÇÃO DE BIOFILMES
DE QUITOSANA E QUITOSANA/INSULINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Farmácia da Universidade Estadual da
Paraíba, em cumprimento à exigência para
obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dra. Rosemary Sousa Cunha Lima

CAMPINA GRANDE - PB

2016

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

W245e Wanderley, Davidson Marrony Santos.
Estudo comparativo de metodologias de obtenção de biofilmes de quitosana e quitosana/insulina [manuscrito] / Davidson Marrony Santos Wanderley. - 2016.
41 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2016.

"Orientação: Profa. Dra. Rosemary Sousa Cunha Lima, Departamento de Farmácia".

"Co-Orientação: Profa. Esp. Bruna Pereira da Silva, Departamento de Farmácia".

1. Biofilme. 2. Quitosana. 3. Insulina. 4. Farmácia. I. Título.
21. ed. CDD 615.1

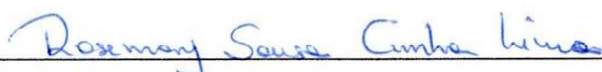
DAVIDSON MARRONY SANTOS WANDERLEY

**ESTUDO COMPARATIVO DE METODOLOGIAS DE OBTENÇÃO DE BIOFILMES
DE QUITOSANA E QUITOSANA/INSULINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Farmácia da Universidade Estadual da
Paraíba, em cumprimento à exigência para
obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

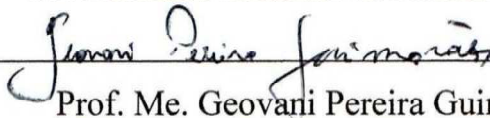
Aprovada em 08 / 09 / 2016

BANCA EXAMINADORA



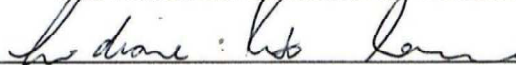
Prof^ª Dr^ª Rosemary Sousa Cunha Lima
(Orientadora)

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Me. Geovani Pereira Guimarães

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof^ª. Dr^ª. Lidiane Pinto Correia

Faculdade Maurício de Nassau (FMN)

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus por sua infinita bondade e misericórdia. Aos meus pais, Cleide e Alexandre, a minha família por se fazer sempre presente em minha caminhada acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Ao meu **Deus**, por sua infinita graça e misericórdia.

Aos meus pais **Cleide Santos Wanderley** e **Alexandre Wanderley Lins**, pelo amor incondicionais. Obrigado pelo apoio, compreensão e pelas oportunidades que sempre me proporcionaram. Sem vocês esta caminhada jamais seria possível.

A minha namorada **Ayalla Waleska**, por todo amor, carinho, dedicação, incentivo, paciência e amparo.

A todos meus colegas e amigos da graduação, que passaram comigo esses anos e os tornaram inesquecível, em especial à **Caio Victor, Danielle Gomes, Géssica Galvão, Lucas Ferreira, Paulo André, Thamyres Dantas e Tiago Santos**, pelo apoio que me deram nos últimos tempos, sem vocês a realização deste trabalho seria mais difícil.

À Professora Dr^a. **Rosemary Sousa Cunha Lima**, minha orientadora, um exemplo a seguir como pessoa e profissional, sempre dedicada, atenciosa e paciente. Obrigada por todos os seus ensinamentos.

À **Bruna Pereira**, minha co-orientadora, pelo carinho, amizade e contribuição científica ao longo da minha formação.

À **Paulo Dantas**, companheiro do Certbio, pelos ensinamentos e disponibilidade ao longo da minha formação.

Aos meus companheiros de iniciação científica **Demis Melo, Wesley Castro e Candice Lima** pela amizade, dedicação e incentivo.

Aos professores Dr^a. **Lidiane Pinto Correia** e Me. **Geovani Pereira Guimarães**, membros da banca examinadora pelas valiosas contribuições.

“Porque dele, e por meio dele, e para ele são todas as coisas. A ele, pois, a glória eternamente. Amém!”

Rm 11:36

ESTUDO COMPARATIVO DE METODOLOGIAS DE OBTENÇÃO DE BIOFILMES DE QUITOSANA E QUITOSANA/INSULINA

Davidson Marrony Santos Wanderley*

RESUMO

O Diabetes *Mellitus* (DM) é uma doença crônica de elevada prevalência global; o DM tipo 1 utiliza insulina como um dos principais meios de tratamento e requer administração diária de injeções subcutâneas múltiplas, que podem trazer desconforto ao usuário. O carreamento de fármacos por sistemas poliméricos, como é o caso da quitosana, torna-se promissor, pois abre a perspectiva de administração de insulina por uma via alternativa, utilizando a liberação controlada de fármacos. Este trabalho objetivou obter e comparar metodologias de biofilmes de quitosana e quitosana/insulina. Os biofilmes foram obtidos por duas metodologias, uma utilizando como técnica de secagem o aquecimento e a outra o resfriamento. As caracterizações envolveram avaliação macroscópica, Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDX) e Análise Térmica- TG e DSC. A obtenção dos biofilmes pelas metodologias propostas mostrou-se eficaz; macroscopicamente foi possível observar diferenças nos materiais obtidos, quanto à coloração, aspecto, flexibilidade, resistência e odor característico de insulina. Através das técnicas de FTIR e EDX foram observados que os grupos funcionais e elementos químicos característicos da quitosana e insulina estavam condizentes com sua estrutura química e que as diferentes formas de obtenção influenciaram na concentração da água e na preservação da insulina. Os ensaios termoanalíticos constataram que a interação entre quitosana e insulina geraram curvas com modificações, que apontam para a diferença no processamento dos biofilmes. Desta forma, a metodologia de secagem por resfriamento apresentou maiores indícios de preservação da insulina nos materiais obtidos.

Palavras-chave: Biofilme. Quitosana. Insulina.

* Aluno de Graduação em Farmácia na Universidade Estadual da Paraíba – Campus I.

1 INTRODUÇÃO

De acordo com as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes- SBD (2016), o Diabetes *Mellitus* (DM) não é uma única doença, mas um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresenta em comum a elevação da glicose no sangue (hiperglicemia). Este processo é resultado de defeitos na ação e/ou secreção da insulina, que é um hormônio produzido no pâncreas, pelas chamadas células beta (β). O DM é classificado em quatro classes clínicas, sendo mais frequentes: o tipo 1 (DM1) e o tipo 2 (DM2).

Atualmente, estima-se que a população mundial com diabetes seja da ordem de 387 milhões e que alcance 471 milhões em 2035. Desses dados, mais de 80% dos óbitos por diabetes ocorrem em países em desenvolvimento. Apesar do DM2 ser mais prevalente na população adulta e idosa, o DM1 requer tratamento dependente a base de insulina que envolve a múltipla administração de injeções subcutâneas, já que pouca ou nenhuma insulina é liberada para o corpo (DIRETRIZES..., 2016). Esta terapia clínica é a causa de possíveis dores e infecções, o que conduz a uma menor aceitação pelo paciente, pois o desconforto associado com este tipo de administração leva ao diabético a negligenciar e até mesmo a desistir da terapia (THATAT et al., 2013). Neste contexto, torna-se necessário o desenvolvimento de outra forma de aplicação de insulina mais cômoda para os pacientes, melhorando esse quadro.

O carregamento de fármacos por sistemas poliméricos, como é o caso da quitosana, torna-se promissor neste âmbito, pois o mesmo é considerado uma valiosa técnica para aperfeiçoar a liberação controlada de fármacos. Um sistema carreador deste tipo permite boa estabilidade, absorção e excelente transferência tissular quantitativa, bem como, a esperada atividade farmacodinâmica (LACAVA, 2006).

A quitosana é um biopolímero do tipo polissacarídeo, que possui uma estrutura molecular quimicamente similar à celulose, diferenciando-se nos grupos funcionais e em sua origem (AZEVEDO et al., 2007). Ao contrário dos polímeros sintéticos, a quitosana é um polissacarídeo natural, derivada da quitina por meio de desacetilação parcial, apresentando cadeias constituídas por unidades de 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose e 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose, unidas por ligações β (1-4) (MESQUITA et al., 2013). A quitina pode ser encontrada no exoesqueleto de insetos, nas conchas de crustáceos e na parede celular de alguns fungos (NEVES et al., 2013; CAETANO, 2012).

Devido às características, tais como: abundância, atoxicidade, hidrofobicidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, atividade antimicrobiana e, também, por sua configuração química, a quitosana vem sendo empregada na preparação de biofilmes, géis, microcápsulas e microesferas, sendo designadas para diversos fins em áreas tecnológicas, como por exemplo, a biotecnológica, de cosméticos, de processamento de alimentos, produtos biomédicos e, principalmente em sistemas de liberação de compostos ativos (MATTÉ; ROSA, 2013).

Este trabalho objetivou obter e caracterizar biofilmes de quitosana com e sem insulina, a partir de duas metodologias, para fins de utilização como formas farmacêuticas de liberação controlada. Dessa forma, abre a perspectiva de novos estudos em busca do desenvolvimento de uma possível alternativa para administração da insulina, por uma via alternativa da convencional, diminuindo os efeitos colaterais que esse tipo de aplicação pode provocar.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Obter e caracterizar biofilmes de quitosana com e sem insulina, utilizando duas metodologias e compará-los através de caracterizações físico-químicas.

2.2 Objetivos Específicos

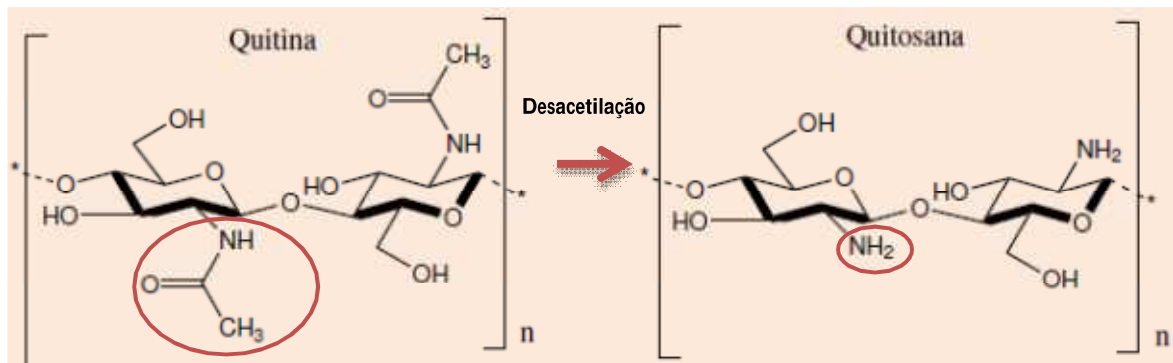
- Analisar macroscopicamente os biofilmes obtidos pela metodologia de secagem por aquecimento e por resfriamento;
- Identificar grupos funcionais e elementos químicos, que possam determinar a presença da quitosana e insulina nos biofilmes desenvolvidos através da Espectroscopia de IV e EDX;
- Verificar o perfil termoanalítico dos biofilmes obtidos por TG e DSC.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Quitosana

A quitosana é um biopolímero natural formado de unidades β -(1 \rightarrow 4)-2- amino-2 desoxi-D-glicopiranosose e constitui o produto do processo de desacetilação parcial da quitina, biopolímero constituído de unidades β -(1 \rightarrow 4)-2- acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose extraída de carapaças de crustáceos, do exoesqueleto de insetos e até mesmo da parede celular de fungos (LUCENA et al., 2015; SANTANA et al., 2014). A Figura 1 representa o grupo acetila na unidade monomérica da quitina e do grupo amino na unidade monomérica da quitosana, e sua respectiva desacetilação.

Figura 1. Estrutura química da quitina e quitosana.



Fonte: Adaptado de LUCENA et al., 2015.

A quitina pode ser convertida em quitosana por meios enzimáticos, pela ação de microrganismos ou por desacetilação alcalina (NaOH ou KOH), sendo este último método o mais utilizado (MELO, 2014; BESSA; GONÇALVES, 2013). A completa desacetilação da quitina é raramente realizada, pois são necessárias muitas reações consecutivas, que também favorecem sua progressiva despolimerização. Assim, o termo quitosana abrange o conjunto de copolímeros que contém pelo menos 50-60% das unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (BLANCO, 2011). Desta forma, quando o grau de desacetilação se torna maior que 50%, a quitina passa a ser solúvel em meio aquoso e o polímero passa a ser denominado quitosana, que pode ser facilmente dissolvida em soluções de ácidos fracos diluídos em função da

protonação dos seus grupos amínicos livres, sendo o ácido acético o solvente mais empregado (MATTÉ; ROSA, 2013; BLANCO, 2011).

As características da quitosana obtida são determinadas pela concentração da solução alcalina e razão quitina/solução alcalina, tamanho das partículas de quitina, temperatura, tempo e atmosfera de reação (HOLANDA, 2011; CAMPANA et al., 2007).

Portanto, a massa molar e o grau de desacetilação da quitosana obtida são os fatores importantes que determinam a aplicação desta, influenciando na maioria de suas características. As quitosanas comerciais geralmente possuem grau de desacetilação variando de 70 a 95%, com massa molar na faixa de 104-106 g/mol (PINTO, 2011).

Em função de sua propriedade filmogênica, várias aplicações estão sendo sugeridas para a quitosana, como sua utilização em envoltórios protetores de alimentos (ZHANG et al., 2015; BESSA; GONÇALVES, 2013). De um modo geral por ser um polímero catiônico, atóxico, biodegradável, biocompatível e renovável, desperta grande interesse para aplicações médicas e farmacêuticas (SHEN et al., 2015; SANTANA et al., 2014). Além disso, possui biocompatibilidade com o organismo humano, o que permite seu uso em várias aplicações médicas, anticoagulantes, bactericidas, transportadores farmacológicos, meios microbiológicos, entre outros (GONZÁLEZ et al., 2015; BESSA; GONÇALVES, 2013).

No contexto de liberação de fármacos, a quitosana tem sido utilizada na área farmacêutica como um potencial transportador para liberação prolongada de fármacos específicos e macromoléculas; em formulações de administração oral, nasal, transdérmica e tópica, e na obtenção de nanopartículas para veiculação de proteínas, vacinas e DNA (SILVA; FIDELES; FOOK, 2015).

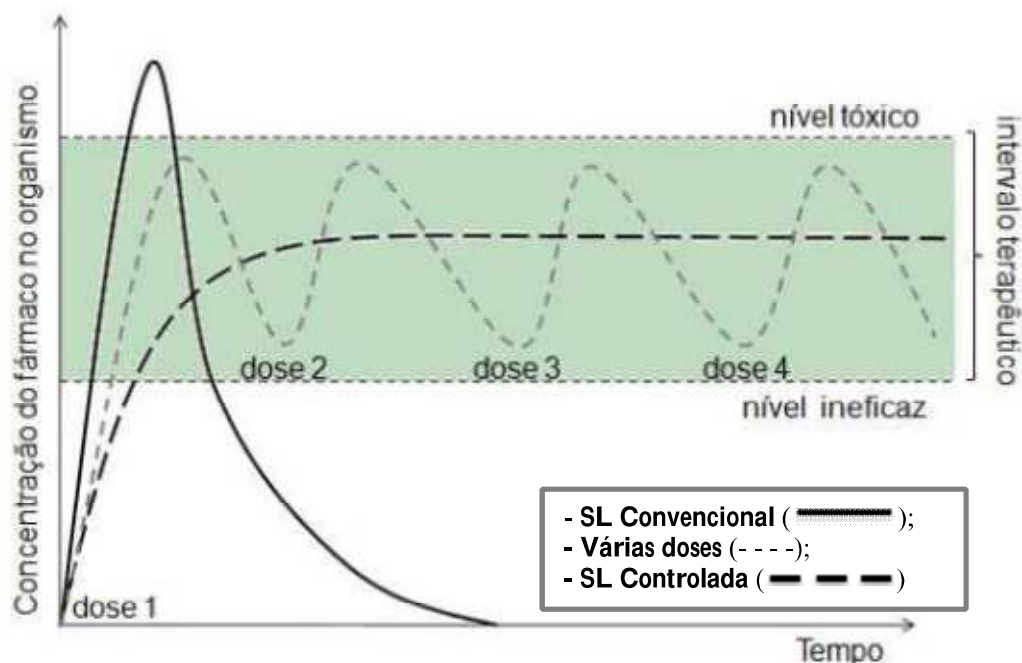
3.2 Liberação Controlada de Fármacos

Quando um fármaco é administrado a um ser vivo, apenas uma pequena fração da dose atinge o tecido alvo, sendo que a maior parte é desperdiçada, devido à sua distribuição por outros tecidos e à sua metabolização e/ou excreção, antes de atingir o local de ação. Neste contexto, a liberação controlada implica a associação, química ou física, dos fármacos com materiais biocompatíveis em sistemas que, quando administrados *in vivo*, tenham a capacidade de controlar, de forma pré-determinada, a taxa de liberação/entrega do fármaco a

partir desse mesmo sistema, e/ou conduzir o fármaco até o sítio específico em que este deve atuar. Estes sistemas são designados assim por sistemas de liberação controlada (SLC) de fármacos (COIMBRA, 2014).

O SLC tem como objetivo manter a concentração do fármaco no organismo dentro do intervalo terapêutico por tempo prolongado, fazendo uso de apenas uma dosagem. A Figura 2 compara os perfis de liberação de um fármaco, administrado através de um sistema convencional (por uma dose e várias doses) e de um sistema de liberação controlada em função do tempo (MOURA, 2012).

Figura 2. Comparação dos perfis de liberação de um fármaco resultantes da administração de um sistema de liberação convencional, por várias doses e de um sistema de liberação controlada, em função do tempo.



Fonte: Adaptado de MOURA (2012).

Os polímeros são constituintes praticamente indispensáveis na preparação de SLC de fármacos, devido a sua versatilidade quanto a aplicações e funcionalidades, baixo custo de obtenção e biocompatibilidade (COIMBRA, 2014; COELHO, 2012; KIM et al., 2009). Neste contexto, a incorporação de fármacos em sistemas poliméricos apresenta-se como uma das inúmeras aplicações desses na tecnologia farmacêutica, como biofilmes, micro e nanopartículas, matrizes injetáveis, adesivos, implantes, entre outros (DASH et al., 2011).

A escolha do polímero ideal como componente de uma formulação para liberação controlada de fármacos depende de diversos fatores. Estes fatores se correlacionam às propriedades do fármaco, a própria estrutura polimérica e aos demais componentes que

compõem a formulação (COELHO, 2012).

A quitosana tem sido produto de escolha no desenvolvimento de SLC de fármacos, por possuir capacidade de ficar carregada positivamente, atribuindo assim característica mucoadesiva, o que permite um aumento no tempo residual do fármaco no local de absorção. Além disso, é um polímero compatível com tecidos vivos, uma vez que causa poucas reações alérgicas e rejeições no corpo humano, já que a quitosana possui metabólitos que são completamente absorvidos pelo organismo humano (TAVARES, 2011).

3.3 Insulina e Diabetes *Mellitus*

A insulina é um hormônio anabólico, secretado pelas células beta nas ilhotas de *Langerhans* do pâncreas. Sua síntese é estimulada pelo aumento da glicose sanguínea após refeições, que varia de acordo com a quantidade e o tipo de alimento ingerido, tendo ação no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo. Suas funções metabólicas incluem captação de glicose, aumento da síntese de proteínas, ácidos graxos e glicogênio, reduzindo a produção hepática de glicose, lipólise e proteólise (FREITAS; CESCHINI; RAMALLO, 2014).

Quando existe dificuldade no organismo em manter adequados os níveis de insulina, ou seja, quando é acometido por uma desordem metabólica, ocorre uma patologia denominada Diabetes *Mellitus* (SPD, 2015). A DM pode ser classificada em DM1, em DM2, em Diabetes *Mellitus* gestacional (DG) ou em outros tipos específicos de diabetes, como: os que englobam causas genéticas, defeitos no pâncreas exócrino, endocrinopatias e fármacos (MARTINS, 2015; SHIVASHANKAR; MANI, 2011).

Segundo os dados revelados pela Federação Internacional da Diabetes- IDF (2015), atualmente existem 320,5 milhões de pessoas em idade ativa (20-64 anos) com diabetes e 94,2 milhões pessoas de terceira idade (65-79 anos) acometidos do mesmo problema. A Tabela 1 mostra a categorização dos dez principais países/territórios relacionados ao número de pessoas com diabetes (20-79 anos) no ano de 2015 e a estimativa para quantidade em 2040.

Tabela 1. Categorização dos países/ territórios relacionados ao número de pessoas com diabetes (20-79 anos) de 2015 e estimativa do ano 2040.

P o s i c ã o	País/Território	2015	P o s i c ã o	País/Território	2040
		Número de pessoas com diabetes			Número de pessoas com diabetes
1	China	109.6 milhões (99.6 – 133.4)	1	China	150.7 milhões (138.0 – 179.4)
2	Índia	69.2 milhões (56.2 – 84.8)	2	Índia	123.5 milhões (99.1 – 150.3)
3	Estados Unidos da América	29.3 milhões (27.6 – 30.9)	3	Estados Unidos da América	35.1 milhões (33.0 – 37.2)
4	Brasil	14.3 milhões (12.9 – 15.8)	4	Brasil	23.3 milhões (21.0 – 25.9)
5	Federação Russa	12.1 milhões (6.2 – 13.7)	5	México	20.6 milhões (11.4 – 24.7)
6	México	11.5 milhões (6.2 – 13.7)	6	Indonésia	16.2 milhões (14.3 – 17.7)
7	Indonésia	10.0 milhões (8.7 – 10.9)	7	Egito	15.1 milhões (7.3 – 17.3)
8	Egito	7.8 milhões (3.8 – 9.0)	8	Paquistão	14.4 milhões (10.6 – 20.4)
9	Japão	7.2 milhões (6.1 – 9.6)	9	Bangladesh	13.6 milhões (10.7 – 24.6)
10	Bangladesh	7.1 milhões (5.3 – 12.0)	10	Federação Russa	12.4 milhões (6.4 – 17.1)

Fonte: Adaptado da Federação Internacional da Diabetes- IDF (2015).

O DM é uma doença crônica, de elevada prevalência global que, embora heterogênea na sua etiologia, a sua frequência tem aumentado tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento (CORREIA, 2014).

Os dois tipos de diabetes mais comum são DM1 e DM2, o primeiro é caracterizado pela deficiência de insulina, isto é, resulta da destruição autoimune das células β do pâncreas; desta forma o uso de insulina exógena é indispensável. Já o DM2 ocorre quando o pâncreas não produz insulina suficiente ou quando o organismo não consegue utilizar eficazmente a insulina produzida, levando então a uma acumulação de glicose no sangue. Normalmente, este tipo de diabetes está associado à hipertensão arterial, obesidade e dislipidemia (MARTINS, 2015).

Na literatura, são descritos diversos estudos sobre sistemas de liberação, nos quais o princípio ativo a ser incorporado pode estar ligado, disperso ou dissolvido na estrutura dos biofilmes poliméricos (RODRIGUES, 2008; WANG et al., 2007). Thatat e colaboradores (2013) trata o encapsulamento da insulina em materiais poliméricos, como um método promissor para melhorar a biodisponibilidade oral e sua absorção na região gastrointestinal. A associação da insulina com a quitosana, formando um biofilme para ser utilizada em um

sistema de liberação controlada de fármacos, pode representar no meio terapêutico uma alternativa para administração da insulina por uma via, ainda a ser definida, porém diferente da convencional (injetáveis), diminuindo os efeitos colaterais que esse tipo de aplicação provoca ao portado de Diabetes *Mellitus* insulino-dependentes (HOLANDA, 2011).

4 METODOLOGIA

4.1 Material

4.1.1 Biopolímero

Quitosana comercial (*Sigma Aldrich*[®]) de médio peso molecular (identificada pelo número do catálogo 448877-250G) e grau de desacetilação (GD) de 84,7%.

4.1.2 Reagentes

- O Ácido Acético (CHEMCO[®] - Indústria e comércio LTDA) e o Hidróxido de sódio (VETEC[®] - Química Fina). Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico PA;
- Insulina ($C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$) – Insulina Humana comercial líquida do tipo NPH - Novolin[®], fabricada pelo laboratório Novo Nordisk[®] Farmacêutica do Brasil Ltda, lote AS6 1049.

4.2 Métodos

Para obtenção dos biofilmes de quitosana, foram utilizados dois métodos de eliminação do solvente. O primeiro, denominado como Metodologia 1 foi baseado em (LIMA, 2010; CUI et al., 2008; DALLAN, 2005), e o segundo método, denominado como Metodologia 2 foi baseado em (HOLANDA, 2011). Estas técnicas podem ser divididas em três etapas: dissolução da quitosana em uma solução ácida diluída, transferência desta solução para placas de Petri e adição de outros componentes, seguido de secagem e formação do biofilme propriamente dito.

4.2.1 Obtenção dos biofilmes de quitosana e quitosana/insulina pela Metodologia 1

Os biofilmes de quitosana (B1) e quitosana/insulina (B2) obtidos pela Metodologia 1 ou Metodologia de secagem a quente, se deu através da dissolução de quitosana em uma solução de ácido acético (1% v/v), sob agitação magnética, por um período de 24 horas. Em seguida, a solução foi filtrada a vácuo utilizando a bomba da marca Primatec[®] (Modelo 121), para remoção de substâncias indesejáveis e vertida em placas de Petri com diâmetro de 5,5 cm, num volume de 5 mL.

4.2.1.1 Obtenção dos biofilmes de quitosana (B1)

As placas com a solução de quitosana foram submetidas à secagem em estufa a 50°C, com circulação de ar, por um período de 12 a 24 horas. Sob os materiais secos, aderidos as placas, foram adicionados 5mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 1M, para a completa neutralização do ácido. Posteriormente, as mesmas placas foram preenchidas em sua capacidade máxima por água destilada, por um período de 1 hora e aferido o pH da água em um pHmêtro (Modelo HANNA[®] instruments). Após a aferição do pH, a água de lavagem foi descartada e substituída por uma nova água destilada, que teve o pH aferido sendo o processo repetido, até que o pH da água atingisse a neutralidade. Por fim, os biofilmes foram secos à

temperatura ambiente em seus respectivos moldes, denominando-se então como biofilme 1 ou B1.

4.2.1.2 Obtenção dos biofilmes B2: Método de incorporação da insulina no B1

Nas placas contendo a solução obtida conforme descrito no item 4.2.1 foram adicionadas insulina, numa proporção de 100 UI. A insulina foi lentamente misturada à quitosana com ajuda de um bastão de vidro. Em seguida, a solução foi colocada em estufa com circulação de ar, a 50°C, para secagem em um período de 24 horas. As demais etapas se sucederam na mesma ordem descrita na elaboração dos biofilmes de B1. O biofilme produzido foi denominado como biofilme 2 ou B2.

4.2.2 Obtenção dos biofilmes de quitosana e quitosana/insulina pela Metodologia 2

Neste método, a evaporação de solventes ocorre sem a utilização de calor sendo denominada Metodologia 2 ou Metodologia de secagem a frio. A obtenção da solução de quitosana se dá de modo similar a metodologia 1, até a etapa de filtração.

4.2.2.1 Obtenção dos biofilmes de quitosana (B3)

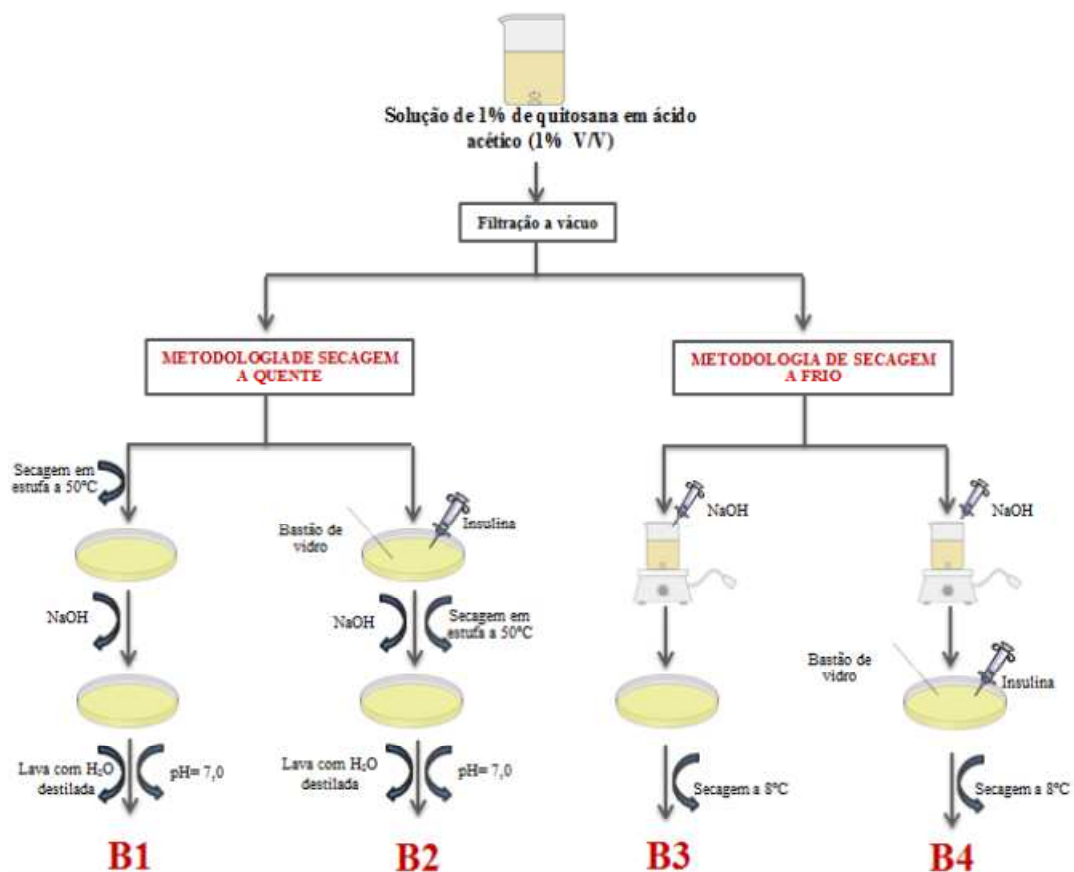
Após a filtração, a solução foi mantida sob agitação magnética, para obtenção da completa neutralização do ácido. Para isso, foi gotejado hidróxido de sódio a 1M e medido, constantemente o pH da solução, até que fosse atingida a neutralidade. A solução, assim formada, foi distribuída em placas de Petri com diâmetro de 5,5 cm, com um volume final em cada placa de 5 mL de solução, submetidas então, à secagem em geladeira à 8°C por 5 dias, para eliminação completa do solvente. Após a secagem, as placas foram tampadas e mantidas sob refrigeração. O biofilme produzido foi denominado biofilme 3 ou B3.

4.2.2.2 Obtenção dos biofilmes B4: Método de incorporação da insulina no B4

A incorporação da insulina foi realizada usando-se a Metodologia 2, porém, após a neutralização, a solução de quitosana foi distribuída em placas de Petri e a insulina foi adicionada em cada placa, de modo que, ao final, para cada 5 mL de quitosana obteve-se 1mL (100 UI) de insulina. A insulina foi lentamente misturada à quitosana com ajuda de um bastão. A seguir as placas foram colocadas na geladeira, a 8°C por 5 dias para eliminação completa do solvente. Após a secagem, as placas foram tampadas e refrigeradas. O biofilme produzido foi denominado biofilme 4 ou B4.

O Fluxograma da Figura 3 esquematiza os quatro tipos de biofilmes obtidos pela metodologia de secagem a quente e a frio.

Figura 3. Fluxograma para obtenção dos quatro biofilmes (B1, B2, B3 e B4), utilizando as duas metodologias adotadas pelo trabalho (Secagem a quente e a frio).



Fonte: Arquivo da pesquisa.

4.3 Caracterização dos biofilmes de quitosana e quitosana/insulina

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

Esta análise foi realizada utilizando um espectrômetro Spectrum 400 *Perkin Elmer*[®] FT-IR/FT-NIR *Spectrometer*, com varredura de 4000 a 650 cm^{-1} , instalado Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais (Certbio), da Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

4.3.2 Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDX)

Para caracterização por EDX foi utilizado um microscópio eletrônico de bancada, modelo TM 1000 HITACHI[®], instalado no Certbio da UFCG.

4.3.3 Análise Térmica

4.3.3.1 Termogravimetria (TG)

As curvas termogravimétricas (TG) foram obtidas em um módulo termogravimétrico TG modelo SDT TG/DTA Q600 (TA[®] - *Instruments*), na razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, com temperatura inicial ambiente e temperatura final de 900°C . Utilizou-se atmosfera de nitrogênio, com fluxo de $20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Foi utilizado massa de $5,00 \pm 0,05 \text{ mg}$ acondicionada em cadinho de alumina para cada amostra. A calibração do equipamento foi realizada com padrão de oxalato de cálcio.

4.3.3.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas DSC do material citado foram obtidas em um módulo Calorimétrico Exploratório Diferencial DSC modelo Q20 (TA[®] - *Instruments*). Foram utilizadas amostras de $2,00 \pm 0,05$ mg, acondicionadas em cadinho de alumínio hermeticamente fechados, analisadas na razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, com temperatura inicial ambiente e temperatura final de 400°C . Utilizou-se atmosfera de nitrogênio, com fluxo de 50 mL min^{-1} . O DSC Q20 foi calibrado para a temperatura utilizando como padrões os pontos de fusão do índio (PF= $156,6^{\circ}\text{C}$) e zinco metálico (PF= $419,5^{\circ}\text{C}$) com pureza de 99,99 %. A calibração para energia foi feita com base na entalpia de fusão do índio metálico ($\Delta H_{\text{Fusão}} = 28,54 \text{ Jg}^{-1}$).

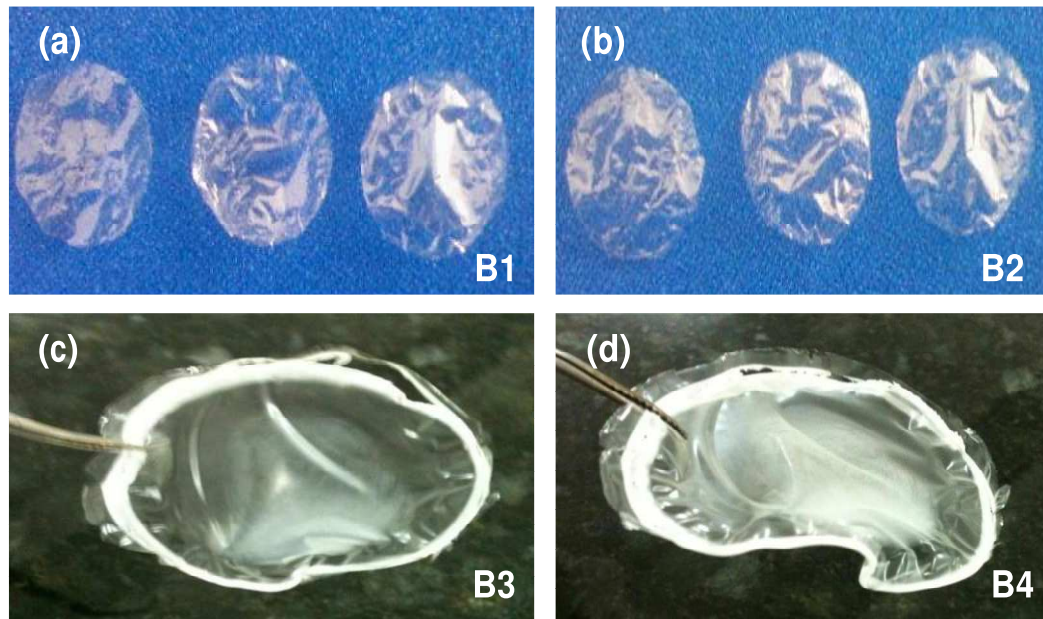
Os dados termoanalíticos foram analisados utilizando o programa TA[®] *Instruments Universal Analysis* 2000, versão 4.7A, da TA[®] *Instruments* e as análises realizadas no Laboratório de Análises Térmicas do Certbio, Departamento de Farmácia, da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção dos biofilmes e análise macroscópica

A Figura 4 apresenta registros fotográficos dos biofilmes desenvolvidos pelo método de secagem a quente e a frio, com o intuito de verificar semelhanças e diferenças macroscópicas no material.

Figura 4. Registros fotográficos dos biofilmes B1(a) e B2 (b) (secagem a quente) e biofilmes obtidos pelo método de secagem a frio B3 (c) e B4 (d). Câmera do celular, modelo XT1033.



Fonte: Arquivo da pesquisa.

Observando-se as fotografias apresentadas foram elencados alguns parâmetros de avaliação, cujos resultados foram utilizados para a elaboração da Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros morfológicos macroscópicos avaliados dos biofilmes desenvolvidos.

Parâmetros	B1	B2	B3	B4
Coloração	Transparente	Transparente	Esbranquiçada	Esbranquiçada
Aspecto	Homogêneo	Homogêneo	Heterogêneo	Heterogêneo
Flexibilidade	Boa	Boa	Insatisfatória	Insatisfatória
Resistência	Boa	Boa	Tendência à desagregação	Tendência à desagregação
Odor característico da solução de insulina	Ausente	Presente	Ausente	Presente

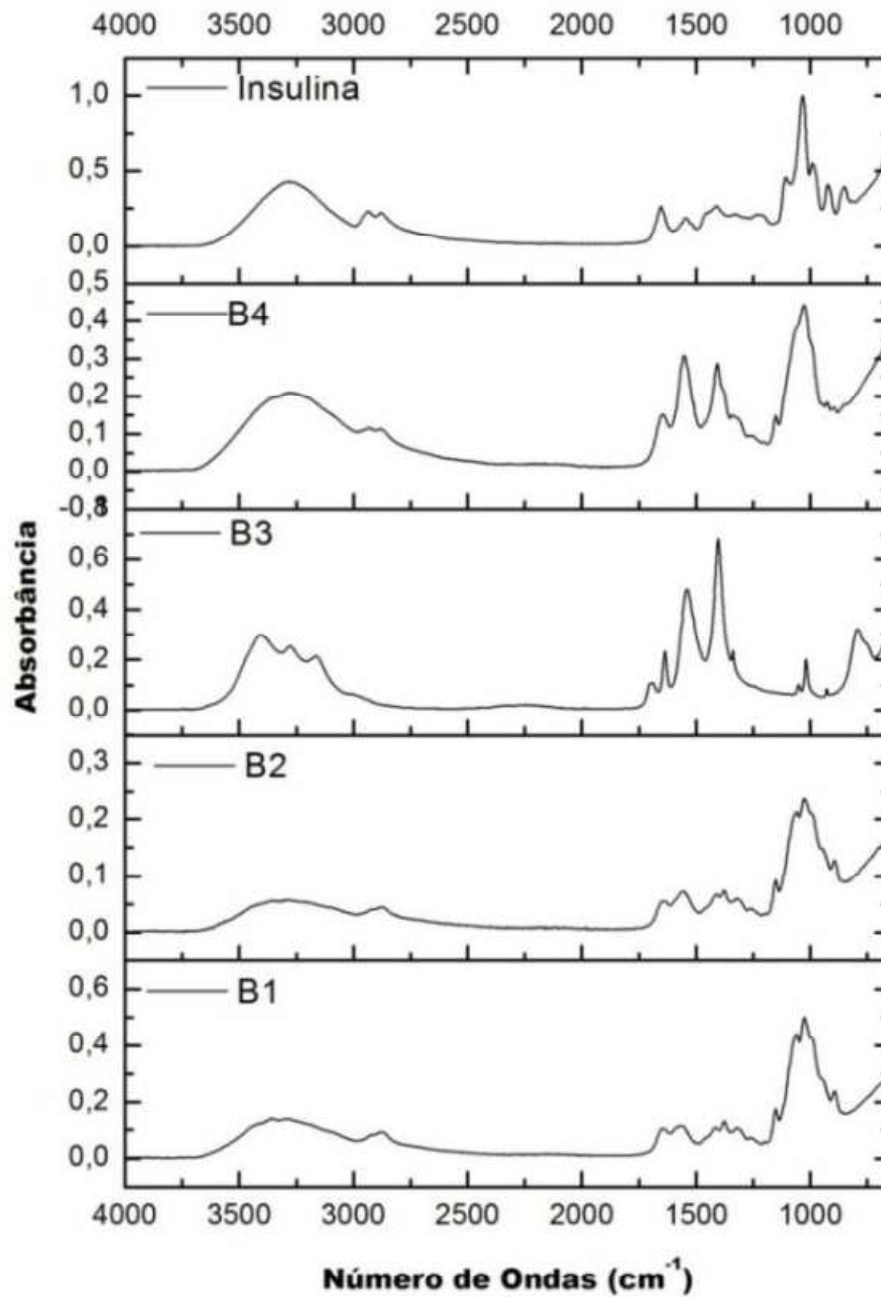
Fonte: Dados da pesquisa.

Os biofilmes obtidos pela metodologia de secagem a quente apresentaram macroscopicamente coloração transparente, aspecto homogêneo e boa flexibilidade. Já os biofilmes obtidos pela metodologia de secagem a frio apresentaram coloração esbranquiçada, aspecto heterogêneo e tendência de desagregação, características estas atribuídas ao alto teor de umidade de sua técnica de obtenção ou baixa capacidade de remoção do solvente por esse método, gerando filmes mais úmidos. Morfologicamente não foram encontradas características consideráveis relevantes à presença de insulina, mas pôde-se constatar o odor característico da respectiva solução utilizada nos biofilmes B2 e B4.

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

O espectro de infravermelho é característico de cada molécula como um todo. Porém, certos grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência, independente da estrutura da molécula (MILIOLI, 2011). As análises de FTIR foram realizadas para insulina isolada e para os quatro tipos de biofilmes que continham ou não insulina (B1, B2, B3 e B4), com o objetivo de observar possíveis interações entre os grupos funcionais dessas substâncias. A Figura 5 mostra os espectros de FTIR da insulina e dos biofilmes desenvolvidos.

Figura 5. Espectro de FTIR da insulina e dos biofilmes B1, B2, B3 e B4.



Fonte: Arquivo da pesquisa.

Os principais valores de faixa de absorvância de FTIR característicos da estrutura da quitosana e da insulina, bem como os respectivos valores reais mensurados neste trabalho, estão resumidos na Tabela 3.

Tabela 3. Principais valores de absorvância detectados no espectro de insulina e dos biofilmes B1, B2, B3 e B4.

Sinal	Faixa de absorvância	Absorções identificadas (cm ⁻¹)				
		Insulina	B1	B2	B3	B4
1 - Estiramento O-H/ Estiramento simétrico e assimétrico do NH₂	3500-3200	3263	3350	3298	3419 3281 3200	3281
2 - Estiramento simétrico e assimétrico metila e metileno	3000- 2800	2934	2881	2900	2986	2934
3 - Estiramento C=O de Amidas	1670-1640	1651	1651	1634	1669	1634
4 - Deformação NH₂	1640-1560	1582	1564	1564	1548	1548
5 - Estiramento simétrico de sais de Ácido Carboxílico	1400	1426	1408	1392	1408	1323
6 - Deformação simétrica C-H	1380-1370	1357	1374	1374	1392	1323
7 Vibrações C-O-C	1159	1183	1149	1149		1149
8 Estiramento C-O de álcoois e fenóis	1250-1000	1045	1027	1027	1027	1045
9 Deformações C-H	1000-650	837	906	906	785	906

Fonte: Dados da pesquisa. Faixa de absorvância adaptado de LIMA (2010).

Os espectros de infravermelho das amostras B3 e B4 apresentaram uma larga e intensa absorção entre 3500 cm⁻¹ e 3200 cm⁻¹, diferentemente dos biofilmes B1 e B2 que nesta faixa de absorção, apresentaram bandas largas e de baixa intensidade, provavelmente decorrente da baixa umidade obtida através do método de secagem a quente. Tais absorções podem ser atribuídas às vibrações de estiramento de ligações de O-H e/ou N-H (NERY, 2014; OSTROWSKA; GIERSZEWSKA, 2009). Como a banda do estiramento de O-H é larga, o mesmo pode está sobrepondo às bandas de estiramento de ligações de N-H (MULLER, 2013).

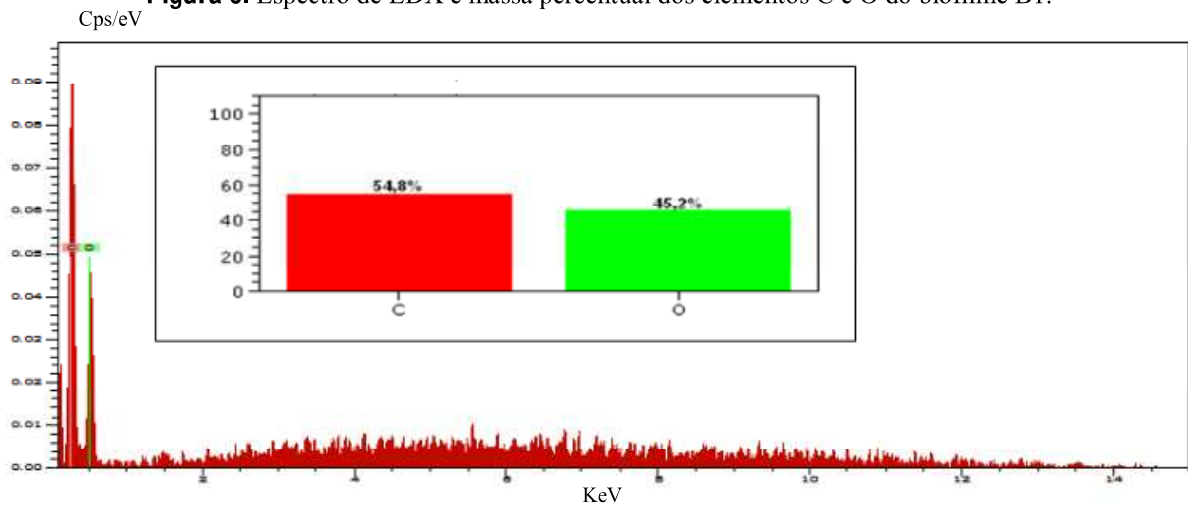
Aproximadamente em 2900 cm^{-1} , observou-se uma banda, que pode ser atribuída aos estiramentos de ligação C-H simétrico e assimétrico dos grupos metila e metileno, presentes nos radicais da quitosana e da insulina (MAHL et al., 2015; LIMA, 2010). Na região de 1670 cm^{-1} a 1560 cm^{-1} , os sinais observados correspondem ao modo de vibração por estiramento de ligação C=O de amida I e à deformação de ligação N-H de amida II, respectivamente, uma vez que a quitosana deriva de um processo de desacetilação elevada. O aparecimento destas duas bandas em conjunto (C=O e N-H), indica a presença de amida, um grupo funcional característico da quitosana (AROF; OSMAN, 2003). Nesta região de 1670 cm^{-1} a 1560 cm^{-1} , bem como a faixa de 1400 cm^{-1} que é referente a um possível estiramento simétrico de ácido carboxílico (LIMA, 2010), os biofilmes B3 e B4 apresentaram bandas intensas quando comparadas aos biofilmes B1 e B2, tais absorções podem estar relacionadas à quebra das ligações pelo aquecimento utilizado para obtenção dos biofilmes B1 e B2. Em 1380 cm^{-1} e 1370 cm^{-1} a absorção visualizada pôde ser atribuída à deformação de ligação C-H (FRAGUAS et al., 2015). Em 1159 cm^{-1} puderam ser detectadas vibrações decorrentes de possíveis ligações C-O-C. Já as absorções detectadas na região entre 1250 cm^{-1} e 1000 cm^{-1} podem ser atribuídos aos estiramentos de ligação C-O de álcoois e fenóis. De 1000 cm^{-1} a 650 cm^{-1} as absorções detectadas provavelmente correspondem à presença de deformações de ligação C-H (LIMA, 2010).

Com estes resultados, fica comprovado a presença dos principais grupamentos químicos funcionais, relativos à quitosana e a insulina, nos biofilmes caracterizados. No entanto, devido à semelhança química detectada nas estruturas de quitosana e insulina, a técnica não se mostrou eficaz para a detecção da insulina no material desenvolvido. Ficou também demonstrado uma maior presença de água nos biofilmes B3 e B4, sendo constatado a baixa eficiência do método 2 na remoção da água.

5.3 Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDX)

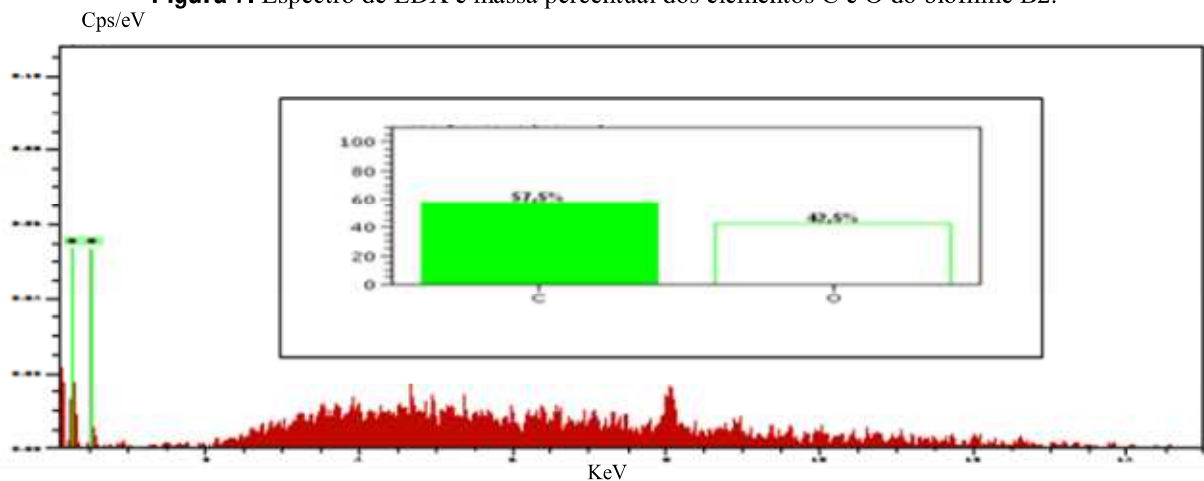
O EDX é uma técnica não destrutiva, onde os raios emitidos pela amostra são convertidos em cargas elétricas para a identificação da energia dos Raios-X e conseqüentemente dos respectivos elementos presentes na amostra (MIOLILI, 2011). Nas Figuras 6 e 7 são apresentados os espectros de EDX para os biofilmes B1 e B2, respectivamente.

Figura 6. Espectro de EDX e massa percentual dos elementos C e O do biofilme B1.



Fonte: Arquivo da pesquisa.

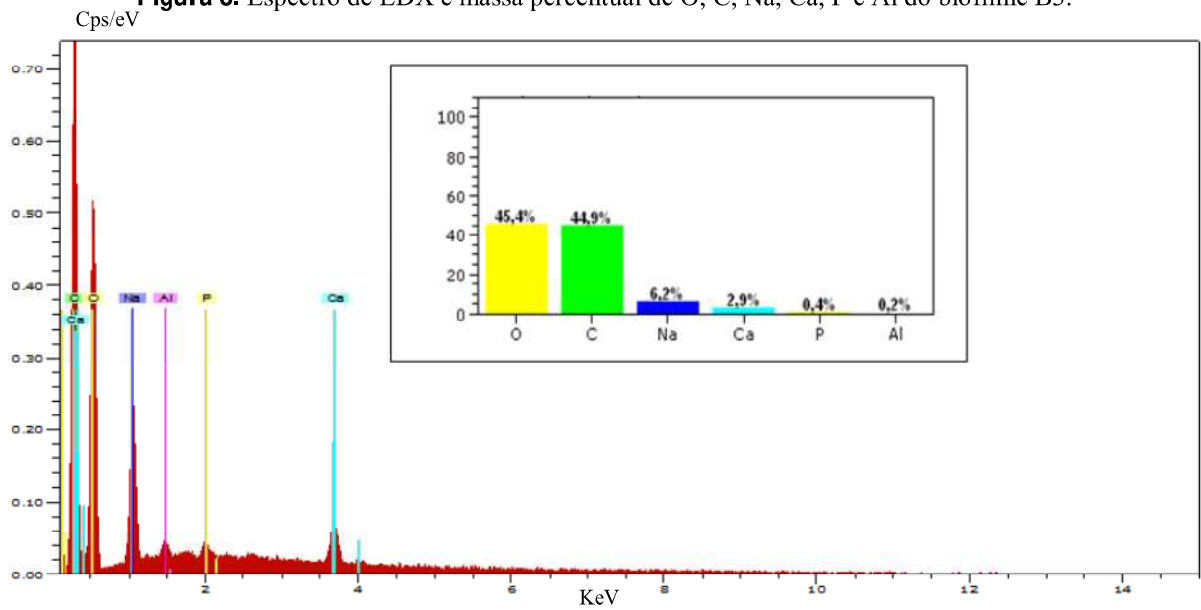
Figura 7. Espectro de EDX e massa percentual dos elementos C e O do biofilme B2.



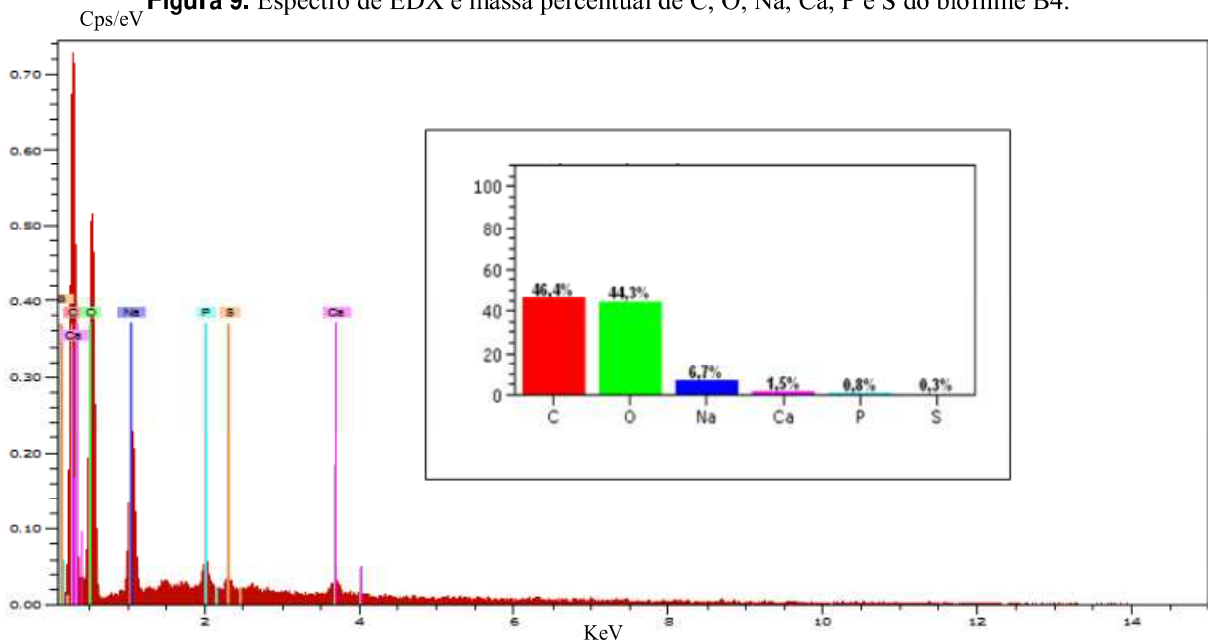
Fonte: Arquivo da pesquisa.

Através dos espectros pôde-se observar que os dois materiais apresentaram picos de Carbono (C) e Oxigênio (O), que são elementos característicos deste biopolímero, dados estes também apresentados por Dotto e colaboradores (2013).

Comparando biofilmes B1 e B2, constatou-se que os elementos encontrados pertencem à estrutura tanto da quitosana quanto da insulina. O elemento Enxofre (S) associado com a composição da insulina, não foi encontrado no espectro de B2. As Figuras 8 e 9 mostram o EDX e massa percentual dos elementos identificados dos biofilmes B3 e B4.

Figura 8. Espectro de EDX e massa percentual de O, C, Na, Ca, P e Al do biofilme B3.

Fonte: Arquivo da pesquisa.

Figura 9. Espectro de EDX e massa percentual de C, O, Na, Ca, P e S do biofilme B4.

Fonte: Arquivo da pesquisa.

Nos espectros de B3 e B4 além dos elementos de C e O encontrados nos biofilmes de B1 e B2, detectou-se a presença de novos elementos como o Sódio (Na), Cálcio (Ca), Fósforo (P) além do Enxofre (S) no biofilme B4. A presença de Na nestes dois biofilmes, provavelmente seja resquício do processo de neutralização por NaOH utilizada para obtenção das amostras. Os outros componentes como Ca e P foram classificados como contaminantes.

Análogos aos resultados obtidos, Holanda (2011), em seu trabalho incorporou o

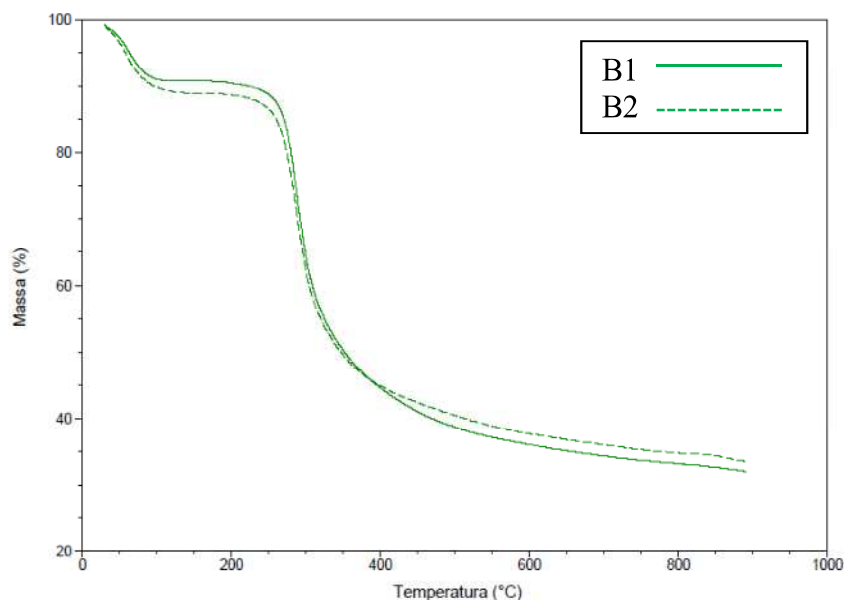
fármaco (insulina) em biofilmes de quitosana, a mesma, constatando a presença de 0,4% de Enxofre. Portanto, os resultados obtidos para o biofilme B4 corroboram com o resultado da autora. No entanto não foi possível fazer a mesma constatação para o biofilme B2.

Desta forma, através desta técnica pontual sugere-se que a metodologia de secagem a frio mostrou-se mais eficiente no que diz respeito à preservação da estrutura da insulina.

5.4 Análise Termogravimétrica (TG)

Esta análise descreve as alterações de massa de uma amostra, sob a forma de produtos voláteis em função da temperatura ou do tempo. Os polímeros quando são submetidos a um tratamento térmico podem apresentar alterações, como modificações estruturais distinguidas através da ruptura de suas ligações químicas nas cadeias principais e laterais (SANTOS, 2015). A Figura 10 mostra as curvas termogravimétricas dinâmicas referentes às preparações de B1 e B2, utilizando a metodologia de secagem a quente.

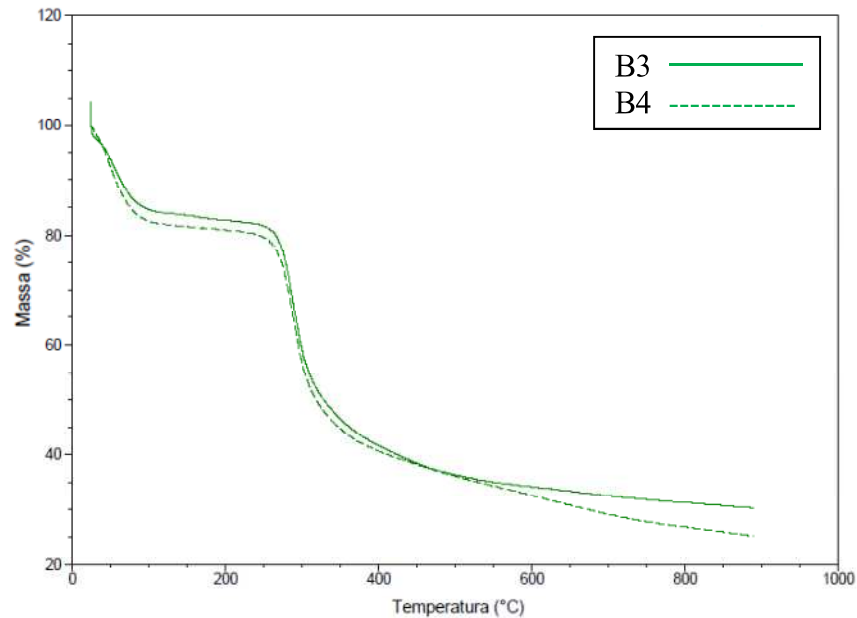
Figura 10. Curvas termogravimétricas referentes aos biofilmes B1 e B2.



Fonte: Arquivo da pesquisa.

A Figura 11 apresenta as curvas termogravimétricas de B3 e B4.

Figura 11. Curvas termogravimétricas referentes aos biofilmes B3 e B4.



Fonte: Arquivo da pesquisa.

Com os dados referentes às Figuras 10 e 11, foram observados os eventos termogravimétricos, cujas temperaturas inicial, final bem como percentual de perda de massa e de resíduo final, estão expostas na Tabela 4.

Tabela 4. Dados termogravimétricos dos biofilmes B1, B2, B3 e B4.

Amostras	Etapas de decomposição						
	1			2			Resíduo Final (%)
	Ti (°C)	Tf (°C)	Perda de massa (%)	Ti (°C)	Tf (°C)	Perda de massa (%)	
B1	51.96	87.31	7.688	270.48	317.45	50.19	
B2	52.61	86.13	9.055	264.00	314.90	45.06	33.51
B3	45.48	79.41	13.33	271.44	310.80	39.94	26.04
B4	41.24	74.21	17.85	269.84	313.62	41.29	25.25

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

Fonte: Dados da pesquisa.

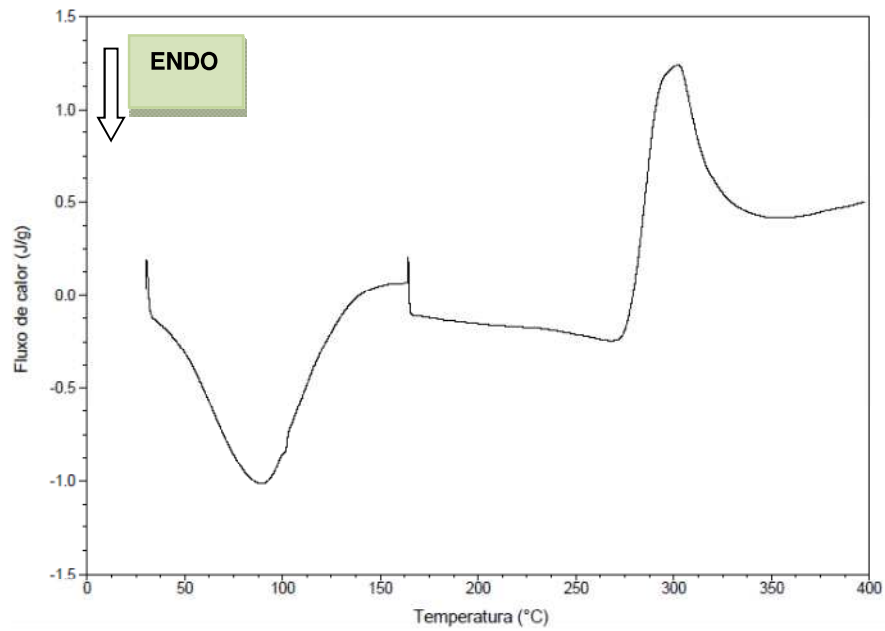
As curvas termogravimétricas dos biofilmes apresentaram duas etapas de decomposição. A primeira etapa, próximo a 100°C refere-se ao desprendimento de água adsorvida ao polímero e resíduos do ácido acético utilizado na produção dos biofilmes (SILVA; FIDELES; FOOK, 2015). Esta perda de água foi verificada em maior quantidade em B3 e B4, este resultado deve-se provavelmente a alta umidade, ou seja, capacidade de retenção de água no material utilizado pela metodologia de secagem a frio. A segunda etapa ocorreu entre as temperaturas de 200 a 400°C, correspondente à decomposição da quitosana, através das quebras de ligações glicosídicas seguida da decomposição das unidades monoméricas do polímero (FRÁGUAS et al., 2015; PILAR, 2014). Para as quatro curvas termogravimétricas, esta decomposição (segunda etapa) é classificada como a principal etapa, por ser a única que ocorre a despolimerização (FRÁGUAS et al., 2015).

Avaliando-se as quatro curvas no que se diz respeito à etapa principal, as curvas termogravimétricas foram semelhantes, quando comparadas a variável forma de obtenção e para aquelas acrescidas ou não de insulina. Esta técnica não se mostrou sensível para diferenciar os biofilmes com e sem insulina, mas foi relevante para distinção das metodologias empregadas, através do evento de perda de água (evento 1).

5.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

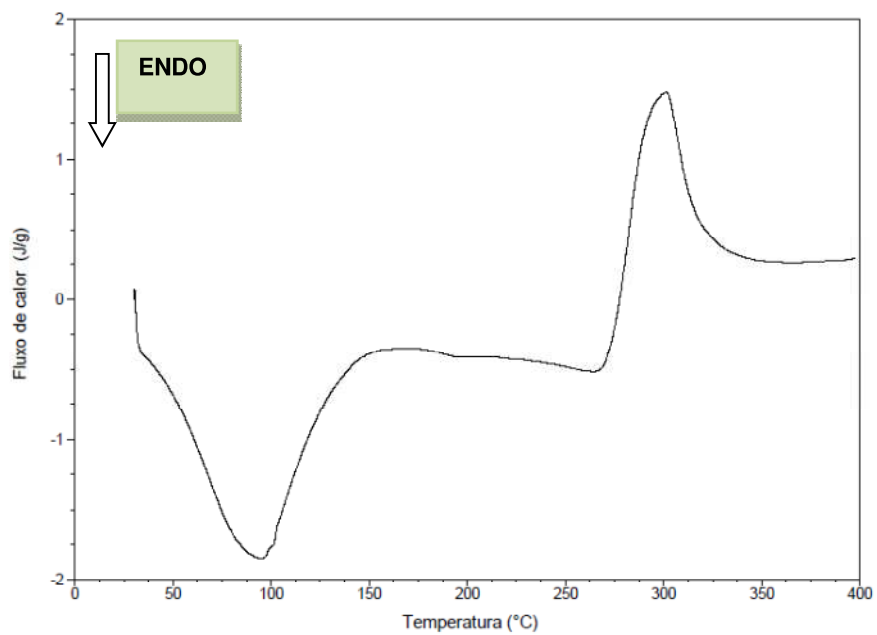
A Calorimetria Exploratória Diferencial é uma técnica na qual se mede a diferença de energia fornecida à substância em relação a um material de referência, termicamente inerte, em função da temperatura, enquanto a substância e a referência são submetidas a uma programação controlada de temperatura (PORTO, 2014). As Figuras 12 e 13 mostram as curvas calorimétricas referentes às preparações de B1 e B2, utilizando a metodologia de secagem a quente.

Figura 12. Curvas calorimétricas do biofilme B1.



Fonte: Arquivo da pesquisa.

Figura 13. Curvas calorimétricas do biofilme B2.



Fonte: Arquivo da pesquisa.

Com os dados referentes às Figuras 12 e 13, foram observados os eventos calorimétricos, cujas temperaturas iniciais, finais e do pico final, bem como do percentual de entalpia, estão expostas na Tabela 5.

Tabela 5. Dados calorimétricos das preparações dos biofilmes B1e B2.

AMOSTRA	Eventos Calorimétricos							
	1				2			
	T _i	Pico	T _f	ΔH	T _i	Pico	T _f	ΔH
	(°C)	(°C)	(°C)	(J/g)	(°C)	(°C)	(°C)	(J/g)
B1	43.98	90.21	163.47	303.3	278.43	299.10	350.21	250.3
B2	43.86	95.10	155.89	493.2	274.02	300.28	357.32	363.1

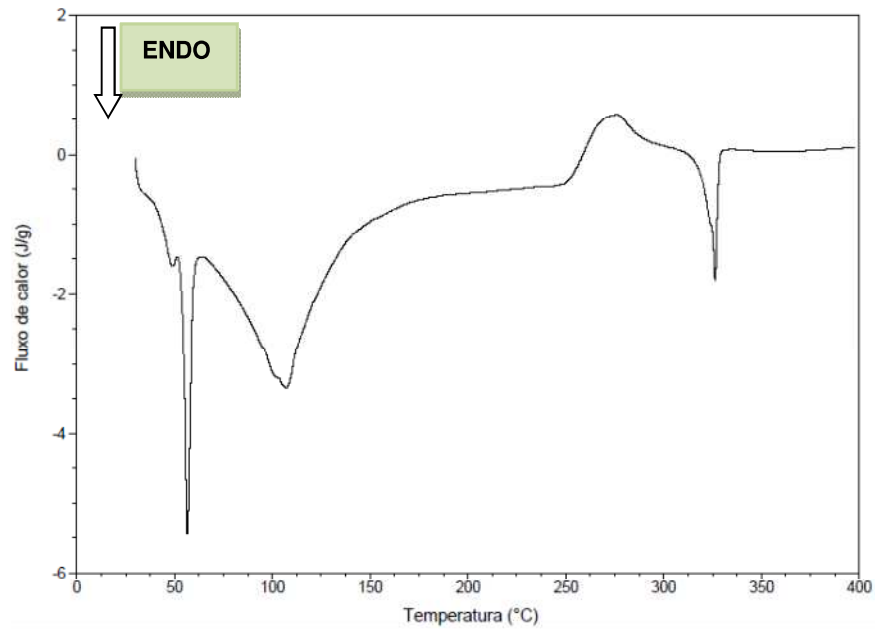
Ti (Temperatura inicial); Tf (Temperatura final).

Fonte: Dados da pesquisa.

Na curva de DSC dos biofilmes B1 e B2 foram observados eventos endotérmicos com picos de temperatura de 90,21°C e 95,10°C respectivamente, referente à desidratação (DOTTO et al., 2013). Em ambas as curvas, foram observadas um segundo evento, classificado como exotérmico, correspondente à decomposição das unidades monoméricas do polímero, cujas temperaturas dos picos foram de 299,10°C e 300,28°C respectivamente, corroborando com a perda de massa da análise termogravimétrica que ocorreu em faixa de temperatura semelhante. Para Sarmiento 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.

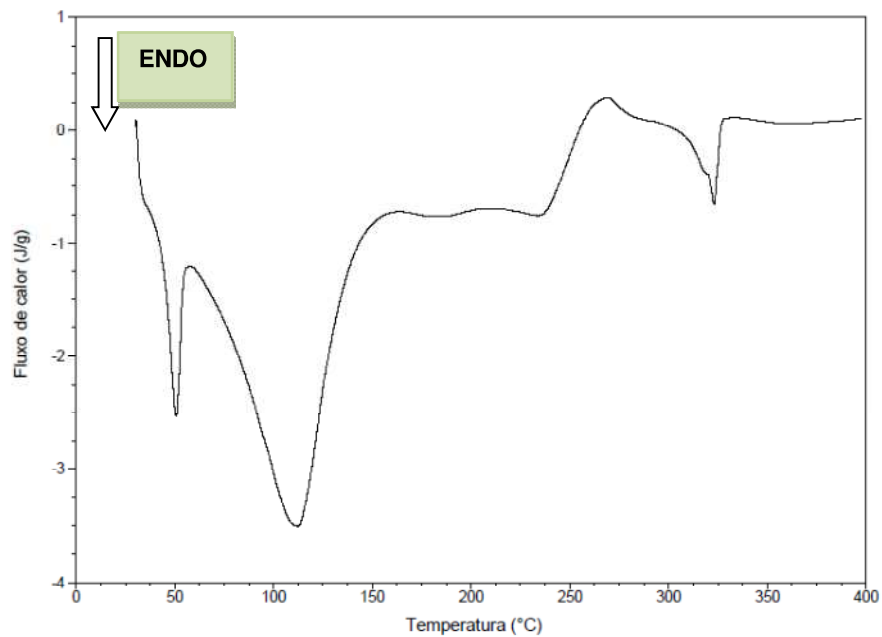
Quanto à variação de entalpia foi observado um maior gasto de energia para o primeiro evento térmico de B2 (ΔH_{B2} = 493.2 J/g e ΔH_{B1} = 303.3 J/g). Isso pode sinalizar a presença da insulina no composto, visto que a diferença observada foi considerável. Nas Figuras 14 e 15 visualizamos as curvas calorimétricas de B3 e B4, utilizando a metodologia de secagem a frio.

Figura 14. Curvas calorimétricas do biofilme B3.



Fonte: Arquivo da pesquisa.

Figura 15. Curvas calorimétricas do biofilme B4.



Fonte: Arquivo da pesquisa.

As curvas de DSC dos biofilmes B3 e B4 apresentaram uma faixa de temperatura de 30C° a 400C° evidenciando três eventos endotérmicos, sendo os dois primeiros correspondentes ao processo de desidratação, que pode está relacionado à elevada adsorção de

umidade, referente à secagem por resfriamento utilizada para obtenção dos biofilmes. Nas faixas de temperatura das curvas de B3 (252,2°C a 268,8°C) e B4 (238,8°C a 259,61°C) os biofilmes apresentaram transições de segunda ordem, que se caracterizam pela variação de capacidade calorífica, porém sem variações de entalpia, não gerando picos nas curvas de DSC, apresentando-se como um deslocamento da linha de base (ULGADE, 2014).

A Tabela 6 resume os principais dados relacionados aos eventos calorimétricos dos biofilmes B3 e B4, cujos dados foram coletados a partir das Figuras 14 e 15.

Tabela 6. Dados calorimétricos das preparações dos biofilmes B3 e B4.

AMOSTRA	Eventos Calorimétricos											
	1				2				3			
	T _i (°C)	Pico (°C)	T _f (°C)	ΔH (J/g)	T _i (°C)	Pico (°C)	T _f (°C)	ΔH (J/g)	T _i (°C)	Pico (°C)	T _f (°C)	ΔH (J/g)
B3	54.32	56.59	63.47	79.86	79.94	107.59	177.21	480.1	323.54	326.50	330.30	61.12
B4	44.13	50.57	57.31	59.05	57.31	112.54	160.15	624.8	317.49	323.15	327.93	32.50

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

Fonte: Dados da pesquisa.

Quanto à variação de entalpia, observou-se que a tendência detectada no primeiro evento de B1 e B2 repetiu-se para B3 e B4, tendo B4 apresentado $\Delta H = 624.8$ J/g e B3, $\Delta H = 480.1$ J/g. Sendo assim, a preparação que contém insulina em sua composição, utilizou mais energia para a sua degradação.

6 CONCLUSÃO

A obtenção dos biofilmes de quitosana e quitosana/insulina, através das metodologias de secagem a quente e a frio, mostrou-se eficaz. Macroscopicamente, as diferentes técnicas de obtenção dos biofilmes influenciaram na aparência das amostras.

Os ensaios de FTIR demonstraram, quimicamente, que os grupos funcionais dos biofilmes obtidos são similares com a estrutura da quitosana e da insulina e que a Metodologia 2 favorece a uma maior quantidade de água nos biofilmes.

A técnica de EDX demonstrou a presença de elementos químicos presentes na estrutura da quitosana para os quatro biofilmes. Nos biofilmes que continha insulina, B4 apresentou o Enxofre (S), elemento característico do fármaco.

Com relação ao TG das amostras, os biofilmes apresentaram duas etapas de decomposição. A primeira etapa referiu-se ao desprendimento de água, no qual os biofilmes B3 e B4 apresentaram maior umidade, provavelmente derivada de sua metodologia de obtenção. Em relação à etapa principal, as curvas termogravimétricas dos quatro biofilmes foram bem semelhantes, tornando-se a técnica não específica para caracterizar a presença da insulina.

A DSC constatou dois eventos (um endotérmico e outro exotérmico) para os biofilmes obtidos por aquecimento e três eventos (endotérmicos) para os biofilmes desenvolvidos pela metodologia de secagem por resfriamento, sendo dois primeiros correspondentes ao processo de desidratação, o que pode está relacionado ao resfriamento utilizado para obtenção dos biofilmes, como foram verificados na TG. Quanto à variação de entalpia foi observado um maior gasto de energia em B2 e B4, o que pode ser indicativo da presença da insulina na amostra.

Nas condições do estudo, os resultados das análises físico-químicas forneceram subsídios que existe uma compatibilidade entre quitosana e insulina, que a metodologia de secagem a frio mostrou-se mais eficaz na preservação da insulina e que a metodologia de secagem a quente foi mais eficaz na remoção da água. Desta forma, sugerem-se novos estudos utilizando-se técnicas de caracterização complementares, para utilização do material desenvolvido, enquanto sistema de liberação controlada de fármacos.

COMPARATIVE STUDY OF METHODS TO OBTAIN CHITOSAN AND CHITOSAN/INSULIN BIOFILMS

Davidson Marrony Santos Wanderley*

ABSTRACT

Diabetes Mellitus (DM) is a chronic disease with high global prevalence; DM type 1 uses insulin as one of the main treatment and requires daily administration of multiple subcutaneous injections which can bring discomfort to the patient. Delivery of drugs using polymers such as chitosan, it is promising because it opens the perspective of insulin administration by an alternate route, using drug delivery systems. This study aimed to obtain and compare methods to obtain chitosan and chitosan/insulin biofilms. Biofilms were obtained by two methods, one using as a drying technique and another using heating and cooling. Characterizations used macroscopic evaluation, Infrared Spectroscopy Fourier Transform (FTIR) Spectroscopy Energy Dispersive X-ray (EDX) analysis and thermally TG and DSC. The proposed methodologies to obtain biofilms proved to be effective; macroscopically, it was possible to observe differences in materials obtained, regarding color, appearance, flexibility, strength and characteristic odor of insulin. Through the techniques FTIR and EDX was observed that the functional groups and the characteristic of the chemical elements chitosan and insulin were consistent with its chemical structure. Furthermore, the different methods of obtaining influence the concentration of water and the preservation of insulin. The thermoanalytical studies showed that the interaction between chitosan and insulin curves generated with modifications related to the difference in processing of biofilms. Thus, the drying by cooling methodology showed greater preservation of insulin in the material obtained.

Keywords: Biofilm. Chitosan. Insulin.

* Pharmacy Undergraduate Student at State University of Paraíba – Campus I.

REFERÊNCIAS

AZEVEDO V.V.C. et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, p. 27-34, 2007.

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

BESSA, J.A.P; GONÇALVES, A.A. Análises econômica e produtiva da quitosana extraída do exoesqueleto de camarão. **Revista Actapesca**, v. 1, n. 1, p. 13-28, 2013.

BLANCO, M.A. **Avaliação da incorporação de nanopartículas de quitosana ao cimento endodôntico AH PLUS™**. 2011. 78f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) - Instituto Alberto Luiz Coimbra, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2011.

CAETANO, G.F. **Biomembrana de quitosana-alginato na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos**. 2012. 89f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto Butantan, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2012.

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

COELHO, S.L. **Desenvolvimento e caracterização de hidrogel para liberação controlada de nitrofurazona**. 2012. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2012.

COIMBRA, P.M.A. **Preparação e caracterização de sistemas de liberação controlada de fármacos com base em polímeros de origem natural**. 2014. 268f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2014.

CORREIA, C.J. **Nanopartículas de insulina para administração oral**. 2014. 77f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Escola de Ciências e Tecnologias de Saúde, Universidade Lusófona de Humanidade e Tecnologias, Lisboa, 2014.

CUI, Z. et al. Ionic interactions between sulfuric acid and chitosan membranes. **Revista Carbohydrate Polymers**, v. 73, p. 1-6, 2008.

DASH, M. et al. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Revista Progress in Polymer Science**, v. 36, p. 981-1014, 2011.

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, SP, 2005.

DOTTO, G. L. et al. Application of chitosan films for the removal of food dyes from aqueous solutions by adsorption. **Chemical Engineering Journal**, v. 214, p. 8-16, 2013.

FRÁGUAS, R. M. et al. Caracterização química e efeito cicatrizante de quitosana, com baixos valores de massa molar e grau de acetilação, em lesões cutâneas. **Revista Polímeros**, v. 25, n. 2, p. 205-211, 2015.

FREITAS, M.C; CESCHINI, F.L; RAMALLO, B.T. Resistência a insulina associada à obesidade: Efeitos anti-inflamatórios do exercício físico. **Revista Brasileira Ciência Movimento**, v. 22, p. 139-147, 2014.

GONZÁLEZ, G. et al. Determining the influence of N-acetylation on water sorption in chitosan films. **Revista Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 110-116, 2015.

HOLANDA, A. L. **Membranas de quitosana para uso em sistema de liberação controlada de insulina: síntese e caracterização**. 2011. 113f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) - Centro de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB, 2011.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**, 2015, p. 144.

KIM, S. et al. Engineered polymers for advanced drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, p. 420-430, 2009.

LIMA, R.S.C. **Desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos: quitosana / insulina**. 2010. 112f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) - Centro de Ciência e Tecnologia Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB, 2010.

LACAVA, Z.G.M. Aplicações biomédicas das nanopartículas magnéticas. **Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. São Paulo: Liber Editora, p. 175-182, 2006.

LUCENA, G.L. et al. Avaliação da Capacidade de Adsorção da Quitosana Quartenizada na Remoção de Íons Cu^{2+} e Cr^{3+} . **Revista Virtual de Química**, João Pessoa, PB, v. 7, n. 6, p. 2166-2179, Julho. 2015. Disponível em:< <http://www.uff.br/rvq>> . Acesso em 11 de março. 2015.

MARTINS, P.A.G. **Diabetes Mellitus- Novas abordagens terapêuticas**. 2015. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Portugal, 2015.

MATTÉ, G.M; ROSA, S. A. Tecnologia da microencapsulação através das microesferas de Quitosana. **Revista Iberoamericana de polímeros**, v. 14, n. 5, p. 206-218, 2013.

MAHL, C.R.A. et al. Obtenção e caracterização de membranas de quitosana funcionalizadas com aminoácidos para adsorção de celulase. 13º Congresso Brasileiro de Polímeros, **Anais: 2176-0020**, Natal, RN, 2015.

MELO, M.R.P. **Bioconversão do exoesqueleto do camarão para elaboração de filme biodegradável a base de quitosana**. 2014. 87f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2014.

MESQUITA, A.K.F. Quitosana na composição de formas mucoadesivas de liberação de

fármacos: uma prospecção tecnológica. **Revista GEINTEC**, v. 3, n. 3, p. 146-154, 2013.

MILIOLI, C. C. **Avaliação da atividade antimicrobiana da quitosana em pó dopada com prata**. 2011. 87f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2011.

MOURA, M.J. Aplicações da quitosana em liberação controlada de fármacos: Algumas considerações. **Revista Enciclopédia Biosfera**, v.8, p. 1489, 2012.

MULLER, L. **Incorporação de óleo essencial de cravo em membranas de quitosana e avaliação da atividade antimicrobiana e cicatrizante**. 2013. 98f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de engenharia química e Engenharia dos alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2013.

NERY, J.C. **Obtenção e caracterização de filmes contendo alginato de sódio e quitosana para potencial aplicação no tratamento de lesões cutâneas**. 2014. 81f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) - Centro de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2014.

NEVES, A. C. et al. Otimização de processos de obtenção de quitosana a partir de resíduo da carcinicultura para aplicações ambientais. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 2, p. 34-47, 2013.

OLIVEIRA, J.E.P; VENCIO, S. (Org.). **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. São Paulo: A.C. Farmacêutica, 2016.

OSTROWSKA, C.J; GIERSZEWSKA, D.M. Effect of ionic crosslinking on the water state inhydrogel chitosan membranes. **Revista Carbohydrate Polymers**, v. 77, pag. 16-18, 2009.

PILAR, F.D. **Preparação de filmes de quitosana e PLGA com polipirrol para aplicação na regeneração nervosa**. 2014. 100f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais) - Pontifca Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, MG, 2014.

PINTO, L.A.A. Quitina e Quitosana obtidas de rejeitos de pescado e aplicações no tratamento

de efluentes. **Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação.** Cap. 4.8 – p. 435-444. São Paulo, SP, 2011.

PORTO, D.L. **Novas contribuições sobre estudos térmicos (TG/ DTG, DTA, DSC E DSC-FOTOVISUAL) da rifampicina e seus principais produtos de degradação.** 2014. 141f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2014.

RODRIGUES, A.P. **Preparação e caracterização de membranas de quitosana e alginato para aplicação na terapia de lesões.** 2008. 173f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2008.

SANTANA, C.C. et al. Utilização do filme de quitosana na reparação de tendão em coelhos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 66, n. 4, p. 995-1002, 2014.

SANTOS, R.Q. **Estudo da estabilidade de filmes de POLI (CLORETO DE VINILA) Aditivado de quitosana.** 2015. 131f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2015.

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

SILVA, M.C; FIDELES, T.B; FOOK, M.V.L. Esferas de quitosana e quitosana/curcumina pelo método de gelificação ionotrópica: influência da incorporação do fármaco. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.10, n.1, p. 21-28, 2015.

SHEN, Q. et al. Controlled formation of surface hydrophilicity enhanced chitosan film by layer-by-layer electro-assembly. **Revista Materials Science and Engineering C**, v. 56, p. 518-521, 2015.

SHIVASHANKAR, M; MANI, D. A brief overview of diabetes. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 22–27, 2011.

TAVARES, I.S. **Obtenção e caracterização de nanopartículas de quitosana**. 2011. 56f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2011.

TAHTAT, D. et al. Oral delivery insulin from alginate/chitosan crosslinked by glutaraldehyde. **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 58, p. 160-168, 2013.

ULGADE, M.L. **Biofilmes ativos com incorporação de óleos essenciais**. 2014. 168f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Integrada do Alto do Uruguai, Erechim, SC, 2014.

WANG, Q. et al. Controlled release of ciprofloxacin hydrochloride from chitosan/polyethylene glycol blend films. **Revista Carbohydrate Polymers**, v. 69, p. 336-343, 2007.

ZHANG, H. et al. Kinetics and functional effectiveness of nisin loaded antimicrobial packaging film based on chitosan/poly (vinyl alcohol). **Revista Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 64-71, 2015.