

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDO VILLAVERDE CENDON



MODELAGEM E SIMULAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE INSULINA ENCAPSULADA EM
PARTÍCULAS DE ALGINATO E *WHEY PROTEIN* EM AMBIENTE
GASTROINTESTINAL

CURITIBA
2014

FERNANDO VILLAVERDE CENDON

MODELAGEM E SIMULAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE INSULINA ENCAPSULADA EM
PARTÍCULAS DE ALGINATO E *WHEY PROTEIN* EM AMBIENTE
GASTROINTESTINAL

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, no curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Alvaro Luiz Mathias

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Regina Maria Matos Jorge

CURITIBA
2014

C395m

Cendon, Fernando Villaverde

Modelagem e simulação da liberação de insulina encapsulada em partículas de alginato e *whey protein* em ambiente gastrointestinal/ Fernando Villaverde Cendon. – Curitiba, 2014.

65 f. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, 2014.

Orientador: Alvaro Luiz Mathias – Co-orientador: Regina Maria Matos Jorge.

Bibliografia: p. 57-65.

1. Insulina. 2. Alginatos. 3. Soro do leite - Proteínas. 4. Diabetes. 5. Digestão - Modelos matemáticos - Simulação por computador. I. Universidade Federal do Paraná. II. Mathias, Alvaro Luiz. III. Jorge, Regina Maria Matos. IV. Título.

CDD: 615.365

FERNANDO VILLAVERDE CENDON

**MODELAGEM E SIMULAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE INSULINA
ENCAPSULADA EM PARTÍCULAS DE ALGINATO E “WHEY
PROTEIN” EM AMBIENTE GASTROINTESTINAL**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Orientador:


Prof. Dr. ÁLVARO LUIZ MATHIAS
Setor de Tecnologia, UFPR


Prof. Dr. FERNANDO AUGUSTO PEDERSEN VOLL
Setor de Tecnologia, UFPR


Prof.^a Dr.^a MICHELE RIGON SPIER
Setor de Tecnologia, UFPR

Curitiba, 25 de fevereiro de 2015.

RESUMO

A administração oral de insulina em diabéticos é restringida pela sua degradação enzimática antes de atingir o intestino, que é a região de maior absorção. Porém, esferas de alginato (ALG) ou de sua associação com proteína isolada do soro de leite (WPI) contendo insulina podem protegê-la do ambiente estomacal. A liberação do medicamento em meio aquoso foi descrita como predominantemente controlada pelo processo de difusão *fickiana*. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da matriz, ALG ou ALG-WPI, da concentração inicial de insulina, no intervalo de 0,035 a 0,131 mol.m⁻³, e do diâmetro das esferas, no intervalo de 3,14 a 4,37 mm, com uso de modelagem aplicada aos dados experimentais. O modelo desenvolvido, que descreve adequadamente a liberação observada experimentalmente, tem a absorção de água, o inchamento, a geração térmica e o campo de velocidade das esferas considerados nulos. O método dos elementos finitos foi aplicado a uma geometria bidimensional e resolvido em COMSOL 4.3b. Os resultados demonstram que a matriz ALG é mais adequada, pois apresenta liberação estomacal mais lenta e intestinal mais rápida. O teor inicial maior de insulina provoca uma liberação mais rápida deste hormônio, o que confirma o comportamento fickiano. Maiores diâmetros protegem melhor o medicamento da degradação estomacal. Esses resultados contribuem para o desenvolvimento deste produto terapêutico de modo a minimizar o estresse de insulino-dependentes, bem como para estudos de novos sistemas de administração controlada.

Palavras chave: insulina, alginato, whey protein, diabetes, modelagem, simulação

ABSTRACT

Oral administration of insulin in diabetics is restricted by its enzymatic degradation before reaching the intestine, where absorption is optimal. However, alginate beads or its association with whey protein isolate containing insulin can protect it from the stomach environment. Previously, this case of drug release in aqueous media has been described as predominantly controlled by a Fickian diffusion process. The aim of this study was to evaluate the effect of the matrix (ALG or ALG-WPI), the initial insulin concentration in the range from 0.035 to 0.131 mol.m⁻³, and the diameter in the range from 3.14 to 4.37 mm, applying a model to the experimental data. For the model development, water absorption, swelling, heat generation and the velocity field of the spheres were considered to be zero. Fortunately, it presented an adequate description of the physical data. The finite element method was applied to a two-dimensional geometry and solved in COMSOL 4.3b. The results show that the ALG matrix is most suitable due to a faster intestinal release and a slower delivery in the stomach. Raising the initial amount of insulin in the beads caused a faster release of this hormone, which confirms the Fickian behavior. Larger diameters protected the drug better from stomach degradation. These results contribute to the development of therapeutic products that minimize the stress of insulin dependents and to studies of new controlled delivery systems.

Keywords: insulin, alginate, whey protein, diabetes, modeling, simulation

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1	HEMOGLOBINA GLICADA E RISCO RELATIVO DE COMPLICAÇÕES MICROVASCULARES (FONTE: NETTO ET AL., 2009)	18
FIGURA 3.2	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA INSULINA HUMANA (FONTE: SAMUEL, 2013)	19
FIGURA 3.3	REPRESENTAÇÃO TRIDIMENSIONAL DA INSULINA HUMANA (FONTE: OWENS, 2002)	19
FIGURA 3.4	ESQUEMA DAS MICROAGULHAS TESTADAS PARA ADMINISTRAÇÃO DÉRMICA DE INSULINA (FONTE: DAVIDSON; AL-QALLAFF; DAS, 2006)	29
FIGURA 3.5	SISTEMA DESENVOLVIDO PARA AUMENTAR A PRECISÃO DAS DOSAGENS DE INSULINA ADMINISTRADA CONTINUAMENTE PELA VIA SUBCUTÂNEA (FONTE: LOPEZ-SALAZAR ET AL., 2012)	30
FIGURA 3.6	ESQUEMA DO OLHO HUMANO PARA A MODELAGEM DO PROCESSO DE DIFUSÃO DE MEDICAMENTOS (FONTE: SILVA; FERREIRA; OLIVEIRA, 2012)	30
FIGURA 4.1	COMPORTAMENTO DA ABSORTIVIDADE DO FENOL NA FAIXA DE COMPRIMENTOS DE ONDA CORRESPONDE À INSULINA (FONTE: NIST, 2014)	35
FIGURA 4.2	COMPORTAMENTO DA ABSORTIVIDADE DO METACRESOL NA FAIXA DE COMPRIMENTOS DE ONDA CORRESPONDE À INSULINA (FONTE: NIST, 2014)	35
FIGURA 5.1	RELAÇÃO GRÁFICA ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE CORANTE AMARELO CREPÚSCULO TESTADAS E A ABSORBÂNCIA RESULTANTE A 481 NM	44
FIGURA 5.2	RELAÇÃO GRÁFICA ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE INSULINA <i>DETEMIR</i> E A ABSORBÂNCIA RESULTANTE A 595 NM QUANDO APLICADO O MÉTODO DE BRADFORD, 1976	44
FIGURA 5.3	RELAÇÃO GRÁFICA ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE INSULINA REGULAR EM SOLUÇÃO TAMPÃO DE PH 1,2 E A ABSORBÂNCIA RESULTANTE A 214 NM	45
FIGURA 5.4	RELAÇÃO GRÁFICA ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE INSULINA REGULAR EM SOLUÇÃO TAMPÃO DE PH 6,8 E A ABSORBÂNCIA RESULTANTE A 214 NM	45

- FIGURA 5.5 COMPORTAMENTOS DE LIBERAÇÃO DE INSULINA DAS PARTÍCULAS: A) ALG – AGULHA 18G; B) ALG – AGULHA 22G; C) ALG-WPI – AGULHA 18G; D) ALG-WPI – AGULHA 22G. CÍRCULOS E QUADRADOS REPRESENTAM OS PH'S DE 6,8 E 1,2, RESPECTIVAMENTE. FIGURAS ABERTAS E FECHADAS REPRESENTAM A QUANTIDADE DE INSULINA ADICIONADA ÀS PARTÍCULAS, 5% E 10%, RESPECTIVAMENTE 47
- FIGURA 5.6 RELAÇÃO ENTRE OS COEFICIENTES DE DIFUSÃO, OS DIÂMÉTROS E AS CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE HORMÔNIO NAS PARTÍCULAS. OS NÚMEROS IDENTIFICAM OS PONTOS QUANTO AO TESTE QUE REPRESENTAM 50
- FIGURA 5.7 CURVAS DO MODELO APLICADAS AOS DADOS EXPERIMENTAIS. AS CURVAS SÃO NUMERADAS INDICANDO O TESTE QUE ELAS REPRESENTAM. 51
- FIGURA 5.8 DISTRIBUIÇÃO DE INSULINA NA ESFERA PARA O INSTANTE DE ENTRADA DA PARTÍCULA NO INTESTINO (UMA HORA E TRINTA E CINCO MINUTOS APÓS A INGESTÃO DAS PARTÍCULAS) 53

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1	COMPARAÇÃO ENTRE O NÍVEL DE HEMOGLOBINA GLICADA E A GLICEMIA MÉDIA (FONTE: NETTO ET AL., 2009)	18
TABELA 5.1	CONCENTRAÇÕES INICIAIS E DIÂMETROS DAS ESFERAS UTILIZADAS NOS TESTES DE LIBERAÇÃO	48
TABELA 5.2	COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS ENTRE OS DOIS MODELOS DESENVOLVIDOS	49
TABELA 5.3	PORCENTAGEM DE INSULINA LIBERADA NO INTESTINO	53

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

abs	Absorbância
A; B; C; D;	
E; F; G	Coefficientes de ajuste
ALG	Alginato
c	Velocidade da luz $\cong 2,998.10^{-17}$ nm/s
C_A	Concentração de insulina em função de raio e tempo (U.I./mL)
C_{A_0}	Concentração inicial de insulina (U.I./mL)
C_{A_m}	Concentração média de insulina (U.I./mL)
C_{A_s}	Concentração superficial de insulina (U.I./mL)
D_{AB}	Coefficiente de difusão (m^2/s)
e	Número neperiano $\cong 2,718$
f	Frequência de onda (Hz)
h	Constante de Planck = $6,626196.10^{-34}$ J.s
I; I_0	Intensidade luminosa transmitida; Intensidade luminosa incidente (cd)
l	Distância (m)
M_t	Massa de insulina liberada em função do tempo (U.I.)
M_∞	Massa de insulina liberada no equilíbrio do processo (U.I.)
N_A	Fluxo difusivo de insulina ($mol/m^2.s$)
N_P	Número de partículas
r	Raio indefinido (m)
R	Raio definido (m)
S_P	Área da partícula (m^2)
t	Tempo (s)
U.I.	Unidades Internacionais
UV	Ultravioleta
V_{meio}	Volume de meio de liberação (m^3)
V_P	Volume da partícula (m^3)
WPI	<i>Whey Protein Isolate</i> (Proteína isolada de soro de leite)
w/w	Relação mássica (g/g)
α, β	Coefficientes difusivo e erosivo do modelo de Harland, <i>et al.</i> (1998)

ε	Coeficiente de absorção molar
$\theta; \varnothing$	Coordenadas esféricas angulares
λ	Comprimento de onda (nm)
π	$\text{Pi} \cong 3,142$

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1	DIABETES <i>MELLITUS</i>	16
3.2	INSULINA E SEUS ANÁLOGOS	19
3.3	MEIOS DE ADMINISTRAÇÃO DE INSULINA	22
3.4	ADMINISTRAÇÃO DE INSULINA POR VIA ORAL	23
3.5	MÉTODOS DE ENCAPSULAMENTO COM ALGINATO E WPI	25
3.6	ESPECTROFOTOMETRIA	26
3.7	MODELAGEM E SIMULAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DE MEDICAMENTOS	29
4	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1	MATERIAL	32
4.2	CONFECÇÃO DE PARTÍCULAS DE WPI, ALG e ALG-WPI	33
4.3	INSULINA REGULAR E INSULINA <i>DETEMIR</i>	34
4.4	ANÁLISES ESPECTROFOTOMÉTRICAS	35
4.4.1	Corante Amarelo Crepúsculo	35
4.4.2	Insulina <i>detemir</i> – Método de Bradford (1976)	36
4.4.3	Insulina regular	36
4.5	ENCAPSULAMENTO E LIBERAÇÃO DO CORANTE AMARELO CREPÚSCULO CONTIDO EM PARTÍCULAS DE ALG	37
4.6	ENCAPSULAMENTO E LIBERAÇÃO DE INSULINA CONTIDA EM PARTÍCULAS DE ALG	37
4.7	TESTES DE LIBERAÇÃO DEPENDENTES DO TEMPO	38
4.8	MODELAGEM MATEMÁTICA DO PROCESSO DE LIBERAÇÃO	38
4.9	SIMULAÇÃO DOS PROCESSOS DE LIBERAÇÃO	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	CONFECÇÃO DE PARTÍCULAS DE WPI, ALG E WPI/ALG	43
5.2	ANÁLISES ESPECTROFOTOMÉTRICAS	43
5.3	ENCAPSULAMENTO E LIBERAÇÃO DO CORANTE AMARELO CREPÚSCULO CONTIDO EM PARTÍCULAS DE ALG	46
5.4	ENCAPSULAMENTO E LIBERAÇÃO DE INSULINA CONTIDA EM	

PARTÍCULAS DE ALG	46
5.5 TESTES DE LIBERAÇÃO	47
5.6 MODELAGEM MATEMÁTICA DO PROCESSO DE LIBERAÇÃO	49
5.7 SIMULAÇÃO DO PROCESSO DE LIBERAÇÃO	52
6 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

Insulina é um hormônio que controla a entrada de glucose nas células para se obter energia. Sua produção ocorre nas células *beta* do pâncreas. O diabetes *mellitus* é uma enfermidade que pode ser causada pela baixa produção desse polipeptídeo ou até mesmo causar essa baixa produção. No Brasil, quase 7% da população convive com a doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). O indivíduo portador apresenta alterações na sua fisiologia, modificando o consumo celular de carboidratos, a síntese de proteínas e o armazenamento de lipídios. O Diabetes Juvenil (ou diabetes do tipo I), que representa de 5% a 10% do total de diabéticos *mellitus* (ELI LILLY, 2013), é geralmente atribuído à destruição das células *beta* do pâncreas em decorrência do desenvolvimento de doença autoimune. Esses pacientes são insulino-dependentes para atingir a homeostasia. Os diabéticos tipo II, que representam 90% dos casos (INCA, 2013), nem sempre controlam a doença com a administração de insulina. Apenas cerca de 27% necessitam de injeções de insulina exógena (MAYFIELD; WHITE, 2004). Os demais podem controlar a doença com novos hábitos alimentares e prática regular de exercícios físicos. Os insulino-dependentes necessitam controlar o nível glicêmico com avaliações periódicas do teor de glucose no sangue e com as injeções de insulina (GUYTON; HALL, 2006).

Peptídeos como a insulina sofrem degradação enzimática no estômago pelas pepsinas e no intestino pela tripsina, alfa-quimotripsina, elastase e as carboxipeptidases A e B (REIS, 2007). Daí ocorre a ineficiência da administração oral da mesma. Logo, observa-se a necessidade de desenvolvimento de matrizes protetoras da insulina para garantir que o medicamento atinja a porção do sistema digestivo onde há maior absorção, sendo esta a região intestinal formada pelo jejuno e o íleo (SILVA, 2003).

A modelagem de fenômenos biológicos, físicos e químicos, e a simulação computacional são tecnologias que facilitam o entendimento dos fenômenos de transporte e diminuem a necessidade de experimentos físicos, acelerando trabalhos de pesquisa em diversas áreas. Vários trabalhos têm relatado simulações de processos envolvendo transporte de matéria, energia e quantidade de movimento

(PERUSSELLO *et al.*, 2013; COGNÉ *et al.*, 2013; STUTE; KRUPP; VON LIERES, 2013), particularmente, estudos que usam simulações computacionais para resolver problemas de administração de medicamentos (DAVIDSON; AL-QALLAFF; DAS, 2008; LOPEZ-SALAZAR *et al.*, 2012; SILVA; FERREIRA; OLIVEIRA, 2012).

DÉAT-LAINÉ *et al.* (2012) confirmaram a hipótese de que a liberação de insulina contida em esferas de alginato e WPI (*Whey Protein Isolate* ou Proteína isolada de soro de leite) é controlada predominantemente pelo processo de difusão de Fick. Tal constatação foi efetivada usando um modelo empírico proposto por HARLAND *et al.* (1998), o qual iguala a fração de soluto liberado à soma de dois termos: um referente ao processo difusivo e outro ao processo erosivo. No caso específico, DÉAT-LAINÉ *et al.* (2012) alegam que o termo erosivo é, na prática, nulo.

Baseando-se na associação das necessidades dos diabéticos insulíndependentes com a administração oral da insulina em partículas de alginato ou WPI e com as peculiaridades do sistema gastrointestinal, um modelo matemático foi proposto, desenvolvido e simulado com elementos finitos com uso de dados da literatura e confirmado com dados laboratoriais em condições fisiológicas para avaliar o comportamento de biodisponibilização desse hormônio na região de melhor absorção no intestino, sendo esta uma ferramenta exploratória de desenvolvimento do fármaco com apresentação adequada por via oral.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as condições de produção de partículas de alginato (ALG) e WPI (*Whey Protein Isolate* ou Proteína isolada de soro de leite) contendo insulina e seu potencial de liberação controlada em ambiente gastrointestinal para uso farmacológico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a metodologia de produção de partículas esféricas de ALG para encapsulamento de composto orgânico com uso de corante amarelo crepúsculo como modelo para testes preliminares.
- Estudar a produção de partículas de ALG, WPI ou ambos para encapsulamento de insulina para controle glicêmico.
- Avaliar a liberação de insulina de partículas de ALG e de ALG-WPI em condições gastrointestinais ideais para sua absorção.
- Desenvolver um modelo compatível com dados experimentais da liberação de insulina para prever a influência da concentração inicial e do diâmetro da partícula para as matrizes ALG e ALG-WPI.
- Simular a liberação de insulina encapsulada em partículas de ALG ou ALG-WPI em ambiente gastrointestinal.

Parte dos resultados foram publicados e apresentados no XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ 2014).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 DIABETES *MELLITUS*

Primeiramente, é necessário apresentar a diferença existente entre os tipos de diabetes. A palavra diabetes deriva da palavra grega que significa sifão, pelo fato de os diabéticos sentirem sede constantemente e eliminarem grandes quantidades de urina (FEUDTNER, 2003). Dentre os grandes grupos, existe o diabetes *mellitus* e o diabetes *insipidus*.

O diabetes *insipidus*, que é uma doença rara, é uma síndrome caracterizada pela inabilidade de reabsorver água nos rins, levando à eliminação de grandes volumes de urina. A causa pode ser a deficiência na produção do hormônio antidiurético arginina vasopressina ou a falta de sensibilidade renal ao hormônio (NEOCLEOUS *et al.*, 2012). O diabetes *mellitus*, ao qual se relaciona este trabalho, é um grupo de doenças metabólicas caracterizado pela hiperglicemia, a qual pode decorrer da falta de secreção de insulina, da ação ineficiente desta ou da combinação de ambos os fatores (DANS; CONDE; ARIAS, 2005).

O diabetes mellitus tipo I é uma doença auto-imune caracterizada pela destruição das células *beta* das ilhotas de Langerhans do pâncreas (CASTANO; EISENBARTH, 1990). Essas células produzem e secretam um polipeptídeo chamado de insulina. Este hormônio, em conjunto com outros, regula a concentração de glucose no sangue. Sem insulina, o diabético entra em hiperglicemia porque suas células não conseguem absorver a glucose presente no sangue (CARINO; MATHIOWITZ, 1999).

O diabetes tipo II é caracterizado pela resistência à ação da insulina, que é associada a fatores genéticos e a maus hábitos alimentares (LEAHY, 2005). Normalmente, inicia com uma leve alteração da glicemia pós-prandial (depois das refeições), seguida de aumentos na glicemia de jejum. Existem dois principais problemas no organismo do diabético tipo II: resistência à insulina e falhas na função das células *beta*. A resistência à insulina costuma atingir seu máximo ainda no início

do desenvolvimento da doença. Nessa fase, o controle glicêmico é mantido com um aumento na secreção de insulina, produzindo um quadro de hiperinsulinemia. Quando essa secreção hormonal exacerbada diminui, desenvolve-se um quadro hiperglicêmico, o qual contribui para uma piora na característica inicial de resistência à insulina (LUPI; DEL PRATO, 2008).

Existem outras categorias de diabetes *mellitus* que incluem o diabetes gestacional e outras causas raras como algumas síndromes genéticas, processos adquiridos como a pancreatite, doenças como fibrose cística, exposição a certas drogas ou vírus e algumas causas ainda desconhecidas (WHO, 2013).

A maioria dos diabéticos tipo I e aproximadamente 27% dos diabéticos tipo II necessitam de injeções parenterais diárias de insulina para o controle da glicemia (MAYFIELD; WHITE, 2004).

O diagnóstico do diabetes *mellitus* é feito ao constatarem-se glicemias superiores a 126mg/dL em jejum ou superiores a 200mg/dL quando a amostra de sangue é colhida 2 horas após a ingestão de uma solução contendo 75g de glucose (WHO, 2013).

A hiperglicemia causa sintomas como sede excessiva, aumento do volume urinário, aumento do apetite, visão turva e perda de peso. Alguns dos efeitos em longo prazo são a retinopatia (que pode levar à cegueira), nefropatia (a uma falha renal), neuropatia (à impotência, perda de sensibilidade nos pés e consequente amputação de membros inferiores devido a infecções) e doenças cardiovasculares (infarto, derrame e diminuição da circulação sanguínea nas pernas). Estudos demonstram que um bom controle glicêmico previne ou posterga essas complicações (WHO, 2013). A concentração alta de glucose no sangue é tóxica por três razões: a promoção da glicação de proteínas (reação de Maillard), a hiperosmolalidade e o aumento na concentração de sorbitol das células (NETTO *et al.*, 2009).

A hemoglobina glicada (A1C) é o produto de reações entre a hemoglobina A (HbA) e alguns açúcares. A quantidade de glucose ligada à hemoglobina é diretamente proporcional à concentração média de glucose no sangue. Como os eritrócitos têm um tempo de vida de aproximadamente 120 dias, a medida da

hemoglobina glicada fornece uma avaliação do controle glicêmico médio dos últimos 90 a 120 dias (Tabela 3.1) (NETTO *et al.*, 2009).

TABELA 3.1 - COMPARAÇÃO ENTRE O NÍVEL DE HEMOGLOBINA GLICADA E A GLICEMIA MÉDIA

Hemoglobina Glicada (%)	Nível médio de Glicemia (mg/dL)
4	65
5	100
6	135
7	170
8	205
9	240
10	275
11	310
12	345

(FONTE: NETTO *ET AL.*, 2009)

NETTO *et al.* (2009) apresentam as relações entre o aumento da hemoglobina glicada e o aumento no risco de desenvolvimento de doenças microvasculares (Figura 3.1). Um risco relativo igual a 1 significa o mesmo risco que pessoas não diabéticas (hemoglobina glicada menor que 6%) tem de desenvolver as enfermidades citadas. Exemplificando, uma pessoa que apresente uma hemoglobina glicada de 11% tem aproximadamente dez vezes o risco de desenvolver uma doença renal (nefropatia) quando comparado a uma pessoa saudável.

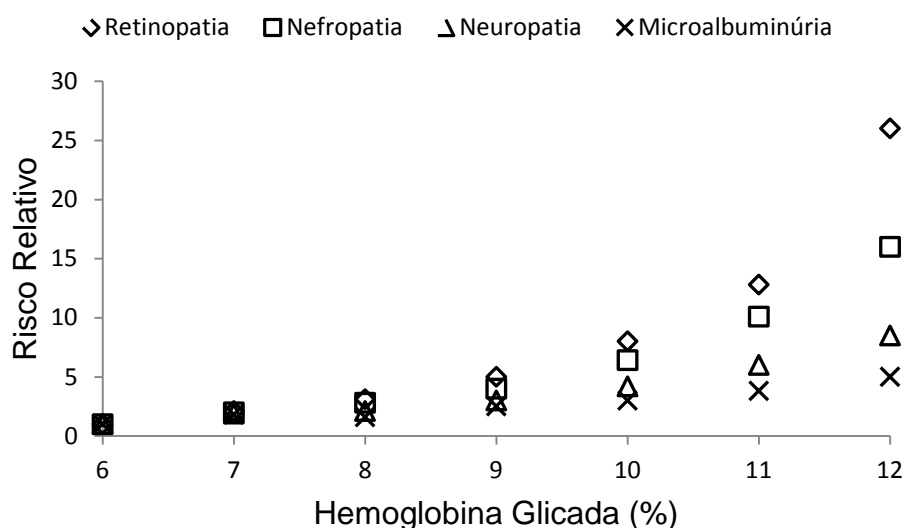


FIGURA 3.1 - HEMOGLOBINA GLICADA E RISCO RELATIVO DE COMPLICAÇÕES MICROVASCULARES (FONTE: NETTO *ET AL.*, 2009)

3.2 INSULINA E SEUS ANÁLOGOS

Antes da descoberta da insulina, no século XX, as pessoas diagnosticadas com diabetes não viviam mais que seis anos após o diagnóstico, falecendo em decorrência de coma, de infecções ou de fome (FEUDTNER, 2003). Nesse tempo, os diabéticos eram obrigados a adotar dietas muito rígidas e possuíam uma péssima qualidade de vida. A insulina foi isolada pela primeira vez na década de 20 por Frederick Banting e Charles Best (ALLAN, 1972). A formulação desenvolvida por Banting e Best, que primeiramente usava insulina extraída de um pâncreas canino, foi posteriormente padronizada pela companhia Eli Lilly (SINDING, 2002).

Segundo CUATRECASAS *et al.* (1990), o hormônio é constituído por duas cadeias polipeptídicas, chamadas de A (21 aminoácidos) e B (30 aminoácidos), conectadas por duas ligações dissulfídicas (Figura 3.2 e Figura 3.3).

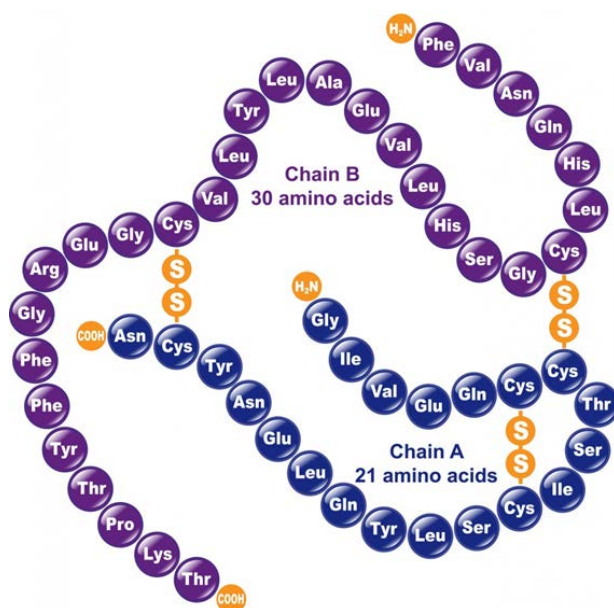


FIGURA 3.2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA INSULINA HUMANA (FONTE: SAMUEL, 2013)

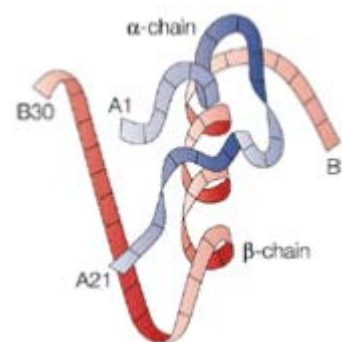


FIGURA 3.3 - REPRESENTAÇÃO TRIDIMENSIONAL DA INSULINA HUMANA (FONTE: OWENS, 2002)

Existe uma cadeia de aminoácidos que faz parte de um precursor da insulina produzida pelas ilhotas de Langerhans, chamada de peptídeo C. A

quantificação desse peptídeo em amostras sanguíneas de diabéticos é uma indicação de quanto de insulina ainda é produzida pelas ilhotas. Estudos mostram que a preservação dos níveis de peptídeo C, mesmo que residuais, estão relacionados com complicações menos acentuadas da doença (LUDVIGSSON *et al.*, 2013).

Encontram-se na natureza formas de insulina como monômero, dímero ou hexâmero. Essas associações dependem da presença e da concentração de zinco, o qual auxilia a formação dos complexos hexaméricos (SADRZADEH *et al.*, 2007).

Atualmente, além da insulina humana (chamada de regular), são usados análogos de insulina no tratamento do diabetes *mellitus*. Tais análogos são moléculas muito semelhantes à molécula da insulina humana, contendo pequenas alterações nas sequências de aminoácidos. Essas alterações têm como objetivo controlar a velocidade de ação do medicamento, evitando períodos de hipoglicemia e de hiperglicemia ao longo do dia. Esses análogos podem ser de longa duração, como as insulinas *glargina* (Lantus®) e *detemir* (Levemir®), de ação intermediária, como a insulina *NPH* (Neutral Protamine Hagedorn), e de ação ultra rápida, como as insulinas *asparte* (NovoRapid®/NovoLog®), *lispro* (Humalog®) e *glulisina* (Apidra®). Pode ser usada também a chamada insulina regular, que é idêntica à insulina humana e poderia ser classificada como uma insulina de ação rápida (NETTO *et al.*, 2011).

Estudos demonstram que a ação das endopeptidases (enzimas que rompem peptídeos nas porções centrais da cadeia) na desativação da insulina é muito mais importante do que a das exopeptidases (enzimas que rompem peptídeos nas porções exteriores das cadeias) (SILVA *et al.*, 2003). As alterações feitas na estrutura da insulina para a produção dos análogos são possíveis pelo fato de serem feitas nos terminais da molécula, o que causa pouca modificação em sua atividade farmacológica.

A insulina *lispro* foi criada pela inversão dos aminoácidos 28 e 29 da cadeia B da insulina humana, prolina e lisina. A *asparte* foi gerada pela substituição da prolina da posição B28 pelo ácido aspártico. Já a *glulisina* foi criada pela substituição da asparagina da posição B3 por lisina e da lisina da posição B29 por ácido glutâmico. Essas alterações estruturais nesses três análogos geram novas

conformações nos terminais da cadeia B, evitando a formação de hexâmeros de insulina, que são formas inativadas do hormônio. O impedimento da formação de hexâmeros faz com que a ação do medicamento seja mais rápida do que a da insulina regular (MCAULEY, 2012).

Dentre os análogos de longa duração, a insulina *glargina* difere da insulina humana devido à asparagina da posição A21 substituída por glicina e por causa de duas argininas adicionadas na treonina de um dos terminais da cadeia B. Essas alterações diminuem drasticamente a solubilidade da molécula em água em pH neutro. O medicamento é comercializado em soluções de pH igual a 4, no qual o análogo é solúvel. Ao ser injetada, a solução é instantaneamente neutralizada, gerando precipitados que se solubilizam lentamente ao longo do tempo, mantendo um efeito basal homogêneo (MCAULEY, 2012).

Na insulina *determir*, a treonina B30 é substituída por uma cadeia de ácido mirístico. Essa alteração faz com que a insulina interaja fortemente com a albumina presente no sangue, evitando sua ação instantânea e permitindo um efeito de liberação prolongado. A *NPH* é uma suspensão de insulina humana cristalina com adição de protamina e zinco para retardar a ação. A protamina forma um complexo pouco solúvel com a insulina. Após a administração, as enzimas proteolíticas degradam a protamina, permitindo a absorção da insulina (MCAULEY, 2012).

As dosagens de insulina são quantificadas em uma unidade internacional (U.I.) que, por convenção, representa 0,0347 mg de insulina humana. Cada análogo de insulina possui uma relação diferente de massa/U.I.. Essa é a mínima quantidade de insulina almejada pela administração por via oral para chegar à corrente sanguínea. Quantidades menores não teriam efeito significativo na alteração da glicemia.

De acordo com Schilling e Mitra (1990), a insulina administrada por via oral apresenta uma biodisponibilidade de cerca de 10% a 20%. Isso se deve aos diversos obstáculos que dificultam a chegada do hormônio à corrente sanguínea. Um exemplo é a passagem pelo fígado, que elimina cerca de metade da quantidade de insulina que chega ao órgão através da veia porta hepática (RAMKISSOON-GANORKAR *et al.*, 1999). Uma biodisponibilidade de 20% significa a ingestão de 5

U.I. de insulina pra obter o efeito de apenas 1 U.I., o que acaba encarecendo o custo do tratamento e expondo o organismo a uma condição fisiológica desnecessária.

3.3 MEIOS DE ADMINISTRAÇÃO DE INSULINA

Atualmente, a insulina é administrada pela via subcutânea com o uso de seringas ou canetas aplicadoras. Algumas alterações do tecido cutâneo são observadas como decorrentes desse tipo de administração. A presença de vermelhidão (eritema) e inchaço (edema) nos locais de aplicação é causada por impurezas presentes no medicamento. A lipodistrofia (distribuição anormal da gordura corporal) manifesta-se na forma de lipoatrofia (atrofia do tecido adiposo com perda de gordura), que se deve a reações imunológicas, e de lipo-hipertrofia (aumento dos depósitos do tecido adiposo subcutâneo), causada pela aplicação repetida de insulina na mesma região. Observam-se também nódulos e hematomas decorrentes de traumas causados pelas agulhas (SOUZA; ZANETTI, 2000).

Por esses motivos, os pacientes são orientados a fazer um rodízio de locais de aplicação (braços, coxas, abdômen e nádegas), permitindo a regeneração das regiões afetadas. Como algumas regiões possuem maior circulação sanguínea que outras, observam-se diferenças nas velocidades de absorção. Essas diferenças confundem os pacientes que normalmente não tem acesso a esse tipo de informação, atrapalhando a manutenção de uma glicemia estável.

Dentre os métodos alternativos de administração de insulina pesquisados até hoje incluem-se: via dérmica (SINTOV; WORMSER, 2007), nasal (PRINGELS *et al.*, 2006), pulmonar (TODO *et al.*, 2001), retal (ONUKE *et al.*, 2000) e oral (OWENS; ZINMAN; BOLLI, 2003). Esses métodos de administração não têm sido bem sucedidos por questões fisiológicas de absorção. O único método alternativo que chegou a ser comercializado foi um equipamento da Pfizer, o Exubera®, que provia as doses de insulina pela via pulmonar. O produto apresentava absorção rápida graças à alta vascularização presente no pulmão. Segundo Mathieu *et al.* (2007), o medicamento foi descontinuado devido à preocupação com casos de hipoglicemia ocorridos associados ao seu uso. Por outro lado, Maia (2007) afirma que a empresa

declara que retirou o produto do mercado devido à baixa aceitação e que a decisão não está relacionada com problemas de segurança.

Além do tratamento a base de múltiplas injeções diárias de insulina, existem também alternativas como as bombas de infusão de insulina (SULMONT *et al.*, 2011), os transplantes de ilhotas de Langerhans (TAKITA *et al.*, 2011) e os anti-diabéticos orais, os quais têm a vantagem de serem administrados de forma não invasiva (TORRES, 2007). Todas essas possibilidades podem ser usadas em conjunto ou separadamente, adequando-se às necessidades de cada paciente.

3.4 ADMINISTRAÇÃO DE INSULINA POR VIA ORAL

A insulina sofre degradação no estômago pelas pepsinas e no intestino pelas enzimas tripsina, alfa-quimotripsina, elastase e as carboxipeptidases A e B (REIS, 2007). Assim, há a necessidade de serem desenvolvidas matrizes protetoras desse peptídeo para garantir que o princípio ativo atinja as porções do jejuno e do íleo do sistema digestivo, onde há maior absorção. Deste modo, são estudados também alguns inibidores dessas enzimas, como a quimostatina, a aprotinina, o glicocolato de sódio e a bacitracina (SILVA *et al.*, 2003).

Mesmo nas regiões mais propícias, a absorção de insulina por via oral continua sendo muito baixa, o que motiva pesquisas que buscam encontrar promotores de absorção para viabilizar essa via de administração. Uma dessas estratégias de aumento da capacidade de absorção de insulina no intestino é a dissociação dos hexâmeros para a forma monomérica a partir de reações com substâncias como glicolato de sódio, salicilato de sódio, dodecilmaltosídeo e dimetil- β -ciclodextrina (SILVA *et al.*, 2003).

De acordo com Graft, Brinch e Madsen (2001), o tempo médio de permanência de sólidos no estômago de indivíduos jovens e saudáveis é de aproximadamente duas horas, enquanto que no intestino é de três horas e meia. Para líquidos, estes valores mudam para uma hora e trinta e cinco minutos e três horas e cinquenta e cinco minutos, respectivamente. Estes valores devem ser

considerados no planejamento dos estudos referentes à absorção gastrointestinal de insulina, já que a formulação deve manter o peptídeo protegido até a chegada à região de maior taxa de absorção. Para tanto, deve-se definir qual é a melhor posologia do medicamento e se o mesmo deverá ser ingerido durante refeições ou em jejum.

O encapsulamento de drogas para administração por via oral pode ser efetuado utilizando matrizes de polímeros ou de fosfolipídios (RE, 1998). Essa técnica é frequentemente empregada na indústria farmacêutica para afetar a farmacodinâmica e a estabilidade de medicamentos (TEWA-TAGNE; BRIANCON; FESSI, 2007).

Os lipossomos, que são as partículas de fosfolipídeos carregadas com o fármaco a ser administrado, são usados devido à sua característica hidrofóbica, que posterga o contato do medicamento com os fluidos gastrointestinais (TROTTA *et al.*, 2005). Infelizmente, os lipossomos apresentam baixa estabilidade, tanto durante o armazenamento quanto depois da administração. Além disso, a quantidade de princípio ativo que pode ser carregada nas partículas é pequena (SOPPIMATH *et al.*, 2001).

Em indivíduos saudáveis, a insulina é secretada na veia porta-hepática para que haja a correção da dose necessária pelo organismo no fígado antes do hormônio ser enviado para o resto do corpo. Esse sistema evita que uma quantidade exagerada do peptídeo circule na corrente sanguínea, o que causaria episódios de hipoglicemia. A administração de insulina pela via subcutânea impede esse processo, disponibilizando um alto teor do medicamento na corrente sanguínea e gerando a possibilidade da ocorrência de hipoglicemias. No entanto, como todas as substâncias que são absorvidas pelo sistema digestivo são enviadas ao fígado pela veia porta-hepática, a administração por via oral utiliza o caminho natural da insulina antes da entrada na grande circulação. Assim, essa filosofia diminuiria a incidência dos episódios de hipoglicemia observados atualmente em insulino-dependentes que utilizam a via tradicional. Além disso, levando-se em conta que a insulina é um hormônio que facilita o ganho de peso, já que tem papel no metabolismo da glucose, dos lipídios e dos aminoácidos, a redução da hiperinsulinemia evitaria o ganho de peso que ocorre normalmente nos pacientes que iniciam o tratamento insulínico

subcutâneo (ARBIT; KIDRON, 2009). Assim sendo, a redução da hiperinsulinemia e a eliminação do desconforto, do constrangimento e das complicações associadas com as aplicações subcutâneas são vantagens significativas proporcionadas pela via oral.

3.5 MÉTODOS DE ENCAPSULAMENTO COM ALGINATO E WPI

O alginato de sódio é um sal polimérico hidrossolúvel extraído de algas da classe Phaeophyceae e derivado do ácido algínico, um polímero que combina unidades dos ácidos α -D-manurônico e β -L-gulurônico. A presença de grupos carboxila, que dissociam ou incorporam prótons (H^+), faz com que o comportamento do alginato seja dependente do pH. Com o pH abaixo da faixa de pKa dos ácidos constituintes (pKa do α -D-manurônico = 3,38; pKa do β -L-gulurônico = 3,65), o polímero incorpora prótons e torna-se insolúvel, protegendo o medicamento encapsulado. Acima desse valor, o alginato torna-se solúvel, liberando o fármaco (WILSON; CROWLEY, 2011). Outra forma comumente empregada para tornar o polímero insolúvel e imobilizar fármacos é o gotejamento de soluções de alginato de sódio contendo a substância encapsulada em soluções de cloreto de cálcio. Cátions divalentes, como o íon cálcio, formam hidrogéis com o alginato rapidamente associando-se à carboxila do ácido gulurônico, formando a chamada estrutura “egg-box”, uma analogia que relaciona os íons de cálcio aprisionados pelo polímero ácido com ovos numa embalagem tradicional (CLARK; ROSS-MURPHY, 1987). Como essa estrutura é capaz de absorver água (JUNIOR, 2006), a substância encapsulada pode difundir lentamente através da matriz para o meio de liberação. Este processo é classificado como uma gelificação a frio, podendo ser usado para encapsular substâncias termolábeis (CAVALLIERI, 2007).

O WPI (*Whey Protein Isolate* ou Proteína isolada de soro de leite) é um subproduto de queijarias. No estado do Paraná, 46% do soro de leite produzido são utilizados na alimentação animal e 32% são vendidos para produtores de soro em pó e de concentrados proteicos, como é o caso do WPI (IPARDES, 2010).

As proteínas isoladas do soro de leite, majoritariamente compostas de β -lactoglobulina e α -lactoglobulina, sofrem desnaturação (enfraquecimento das ligações secundárias e terciárias) quando submetidas a tratamento térmico brando, formando pequenos agregados solúveis que aprisionam água em redes tridimensionais formadas pelas novas interações entre as proteínas e o solvente. Se realizado em condições de alta repulsão eletrostática (longe do ponto isoelétrico e com baixa concentração salina), o tratamento térmico gera agregados mais ordenados devido à melhor distribuição na água e, conseqüentemente, produz géis translúcidos (CAVALLIERI, 2007). Posteriormente, pode-se induzir a gelificação a frio, como no caso do alginato de sódio, gotejando o produto em soluções ácidas ou de alguns sais, como o cloreto de cálcio (DOHERTY *et al.*, 2011).

Outros métodos, como o tratamento térmico do WPI em emulsão água/óleo (SAGLAM *et al.*, 2013), a secagem de soluções contendo o agente encapsulante e a substância encapsulada em *spray dryer* (CARNEIRO *et al.*, 2013), a precipitação de WPI com variações no pH (GIROUX; HOUDE; BRITTEN, 2010) e a combinação de duas substâncias encapsulantes, seja numa matriz homogênea (DÉAT-LAINÉ *et al.*, 2012) ou em camadas heterogêneas (TIOURINA; SUKHORUKOV, 2002), podem ser usados para a imobilização de substâncias. Uma possibilidade para o encapsulamento de insulina é a adição de inibidores de proteases, como a quimostatina e a aprotinina, e de promotores de absorção intestinal, como o dodecilmaltosídeo e a dimetil- β -ciclodextrina, na matriz para melhorar a biodisponibilidade da droga quando administrada oralmente (SILVA *et al.*, 2003).

3.6 ESPECTROFOTOMETRIA

A espectroscopia é baseada nas transições eletrônicas moleculares provocadas por fótons de radiação eletromagnética (RODGER; SANDERS, 1999). A luz, seja ela visível ou não, é tecnicamente chamada de radiação eletromagnética. Quando a radiação interage com a matéria (por exemplo, uma amostra), vários processos como reflexão, espalhamento, absorção, fluorescência, fosforescência e reações fotoquímicas acontecem (OWEN, 2000), os quais podem ser mensurados e

correlacionados com as características da radiação e da matéria (amostra) utilizados.

Existem várias regiões de diferentes comprimentos de onda e frequência. Como a diferença de escala entre essas regiões é muito grande, é de se esperar uma grande variação de características ao longo dos espectros (ANDREWS, 1999). Tradicionalmente, a leitura da concentração de insulina ou de seus análogos em soluções aquosas é feita em espectrofotômetro em comprimentos de onda que variam de 214 nm a 280 nm (Déat Laine *et al.*, 2012; ROSA *et al.*, 2000; FAN *et al.*, 2006), faixa que compõe o intervalo ultravioleta (UV).

O espectro UV compreende a faixa de 10 nm até aproximadamente 380 nm. Esta região é comumente dividida em duas: ultravioleta afastado, também conhecido como ultravioleta de vácuo pelo fato de o oxigênio atmosférico absorver radiação nesta faixa de até 200 nm, e ultravioleta próximo, que é a região acima de 200nm (ANDREWS, 1999).

A radiação ultravioleta ou a visível são absorvidas por uma molécula quando a frequência da luz está na energia correta para causar um rearranjo dos elétrons da molécula para um estado mais energético. O espectro de absorção do UV-visível está diretamente relacionado a ligações intramoleculares e, logo, à estrutura da molécula analisada. O desafio é relacionar o gráfico de absorbância versus comprimento de onda com a estrutura da molécula. A energia de cada fóton da radiação aplicada é dada pela Equação 3.1 (RODGER; SANDERS, 1999).

$$\text{Energia} = h \cdot f = h \cdot c / \lambda \quad \text{Equação 3.1}$$

A absorbância é um valor adimensional e é definida em termos da intensidade de luz que incide sobre as moléculas de uma amostra e a intensidade de luz transmitida (Equação 3.2) (RODGER; SANDERS, 1999).

$$\text{abs} = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) \quad \text{Equação 3.2}$$

Na maioria dos experimentos que usam espectrometria de absorção na faixa do UV-visível, usa-se a lei de Lambert-Beer (Equação 3.3), a qual relaciona a concentração da molécula absorvedora de fótons na amostra estudada e a

absorbância medida. Ainda compões esta relação o coeficiente de absorção molar e a distância percorrida pela luz dentro da amostra (RODGERS; SANDERS, 1999).

$$\text{abs} = \epsilon \cdot C \cdot l \quad \text{Equação 3.3}$$

A lei de Lambert-Beer torna-se inválida quando a amostra absorve uma porcentagem muito grande ou muito pequena de fótons para o equipamento responder às variações de concentração dentro de uma faixa detectável de modo a ser precisa e exata (RODGERS; SANDERS, 1999).

3.7 MODELAGEM E SIMULAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DE MEDICAMENTOS

Nos últimos anos, a modelagem matemática e a simulação computacional têm sido empregadas para o estudo e desenvolvimento de temas relacionados à administração controlada de medicamentos.

Davidson, Al-Qallaff e Das (2008) estudaram o efeito de diferentes geometrias, comprimentos, diâmetros e espaçamentos de microagulhas recobertas com um filme contendo insulina (Figura 3.4). O objetivo da tecnologia é possibilitar a administração por via dérmica através de emplastos, utilizados atualmente em tratamentos hormonais, para aliviar dores e em terapias para parar de fumar.

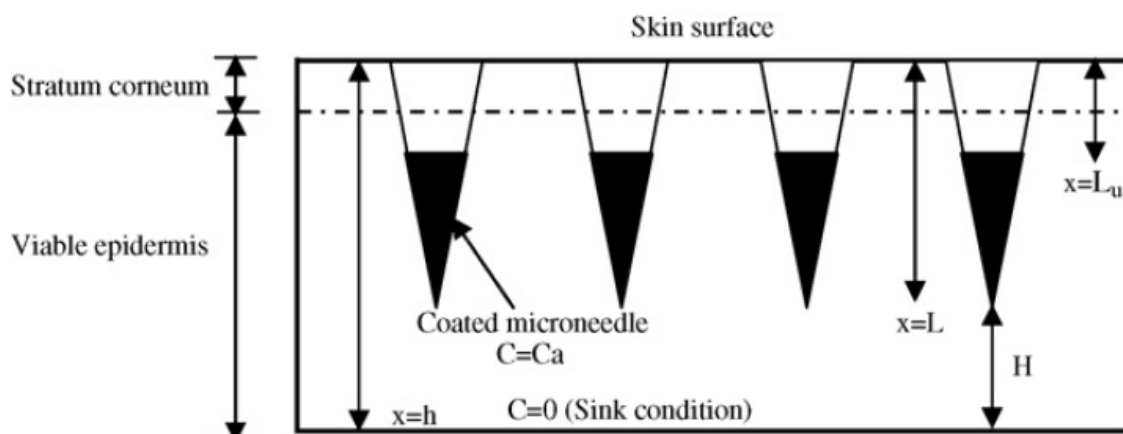


FIGURA 3.4 – ESQUEMA DAS MICROAGULHAS TESTADAS PARA ADMINISTRAÇÃO DÉRMICA DE INSULINA (FONTE: DAVIDSON; AL-QALLAFF; DAS, 2008)

Um dispositivo para microdosagem de insulina foi desenvolvido também através de simulação computacional por Lopez-Salazar *et al.*, 2012. O sistema (Figura 3.5) dispersa microgotas da solução do hormônio (cinza claro) em uma solução de transporte (cinza escuro) que as carrega para o ponto de aplicação subcutânea. O objetivo é diminuir o tamanho do incremento que diferencia uma dosagem da outra em sistemas de infusão contínua de insulina, facilitando a personalização da terapia para cada paciente.

liberação do medicamento no fluido estomacal (meio ácido) e no meio intestinal (meio básico) são predominantemente governadas pelo processo difusivo, no qual a insulina difunde através da partícula até atingir o meio, ou pelo erosivo, no qual a transferência do medicamento para o fluido gastrointestinal se daria pela dissolução das esferas. A resposta foi obtida através de um modelo empírico proposto por Harland *et al.* (1998), que iguala a fração de hormônio liberado à soma de dois termos: um referente ao processo difusivo e outro ao erosivo (Equação 3.4).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \alpha \cdot \sqrt{t} + \beta \cdot t \quad \text{Equação 3.4}$$

Os valores encontrados por Déat-Lainé *et al.* (2012) para α foram de 0,516 para o meio ácido e de 0,810 para o meio básico. Para β , os valores foram nulos nos dois meios. Assim, demonstrou-se que a liberação gastrointestinal do hormônio encapsulado na matriz descrita é um processo controlado pelo fenômeno da difusão, e não de dissolução da matriz.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

- Ácido Fosfórico (Vetec, Brasil)
- Água destilada
- Alginato de sódio (Gastronomy Lab, Brasil)
- Cloreto de Cálcio (Gastronomy Lab, Brasil)
- Corante amarelo crepúsculo (F. Trajano, Brasil)
- Corante azul de coomassie G (Sigma-Aldrich, Estados Unidos)
- Etanol P.A. (Synth, Brasil)
- Fosfato monossódico, fosfato dissódico (Vetec, Brasil), ácido clorídrico (Isofar, Brasil) e cloreto de sódio (Synth, Brasil) foram utilizados para preparar soluções tampão de pH 6,8 (fosfato) e 1,2 (cloreto). Os tampões serviram para simular os ambientes intestinal e gástrico, respectivamente.
- Insulina comercial *detemir*, em solução pronta para aplicação (Levemir FlexPen, 100 U.I./mL, Novo Nordisk, Dinamarca). Este material foi necessário para a realização de testes preliminares durante o período em que não havia o hormônio puro.
- Insulina regular, humana, em pó (*Recombinant Human Insulin* 91077C, 27,5 U.I..mg⁻¹, Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Este material foi usada para preparar uma solução estoque de 100UI/mL, a qual foi conservada em geladeira por até 6 dias.
- *Whey Protein Isolate* (BiPro, Davigco, Estados Unidos)
- Agitador magnético com aquecimento (Mod. 500C, Jouan, Estados Unidos)
- Agitador magnético sem aquecimento (Mod. 257, Fanem, Brasil)
- Agitador mecânico (Mod. 710, Fisatom, Brasil)
- Agulhas de 22Gx1" (diâmetro interno: 0,413 mm) e 18Gx1½" (diâmetro interno: 0,838 mm) (Solidor, Brasil)

- Balança Analítica (AR 2140, OHAUS, Estados Unidos)
- Banho térmico (EEQ 9074, Edutec, Brasil)
- Beckeres de 30mL, 50mL, 250mL
- Cronômetro de relógio de pulso comum
- Espátula
- Espectrofotômetro UV-vis cedido pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Paraná durante o período de reforma do Laboratório de Química Analítica Aplicada do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da mesma universidade (Pró-Análise, Brasil).
- Espectrofotômetro UV-vis do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná (Shanghai Mapada Instruments, China).
- Filme Plástico
- Medidor de pH (MPA210, TecnoPON, Brasil)
- Papel Filtro
- Paquímetro (Mitutoyo 530-321, Mitutoyo, Brasil)
- Pipetas Micrométricas (50-200µl e 200-1000 µl, Boeco, Alemanha)
- Seringa
- Termômetro de mercúrio (Incoterm, 5003)
- Tubos de Ensaio

4.2 CONFECÇÃO DE PARTÍCULAS DE WPI, ALG e ALG-WPI

As partículas de WPI (*Whey Protein Isolate* ou Proteína isolada de soro de leite) foram produzidas a partir do procedimento descrito por DÉAT-LAINÉ *et al.* (2012). Uma solução 11% (w/w) de WPI (BiPro, DAVISCO, USA) foi preparada com água destilada e coberta com filme plástico. Manteve-se a mistura em agitação suave por 60 minutos. Depois, para uma melhor hidratação, a solução foi mantida por 120 minutos em descanso. Para desnaturar as proteínas, o líquido foi mantido a 80°C sob agitação suave em agitador magnético com aquecimento por 40 minutos.

As partículas de ALG foram produzidas a partir do procedimento descrito por DÉAT-LAINÉ *et al.* (2012). Uma solução 3% (w/w) de alginato de sódio em água destilada foi preparada com água destilada e com um bastão de vidro para uma melhor dissolução.

Uma mistura de 20% (w/w) da solução de alginato de sódio e de 80% (w/w) da solução de WPI tratada termicamente foi feita para o caso de não ser possível extrudar as partículas feitas somente de WPI, como descrito por Déat-Lainé *et al.*, 2012.

Para a esferificação das partículas, os géis descritos foram gotejados em uma solução 0,1 M de cloreto de cálcio em água destilada (GastronomyLab, Brasil) com o auxílio de uma seringa acoplada a uma agulha posicionada na vertical com uma distância de aproximadamente 25 cm entre a ponta da agulha e a superfície da solução. Foram utilizadas agulhas 22G (0,413 mm) e 18G (0,838 mm) para obter partículas de diferentes diâmetros. As partículas formadas permaneceram na solução por um minuto, foram retiradas com uma espátula e tiveram a umidade superficial absorvida com um breve contato com papel filtro.

4.3 INSULINA REGULAR E INSULINA *DETEMIR*

Conforme mencionado na seção 3.6, a leitura da concentração da insulina ou de seus análogos em soluções aquosas é feita em espectrofotômetro. Os comprimentos de onda utilizados variam de 214 nm a 280 nm. Porém, os análogos são comercializados na forma de soluções aquosas contendo outras substâncias, como o fenol e o metacresol (Levemir Penfill®). Compostos como estes podem interferir na leitura da concentração de insulina por apresentarem altas absorvidades na faixa de comprimentos de onda utilizada para a quantificação do hormônio (Figura 4.1 e Figura 4.2). Essa influência pode levar a erros de leitura em processos de liberação controlada, como os estudados neste trabalho.

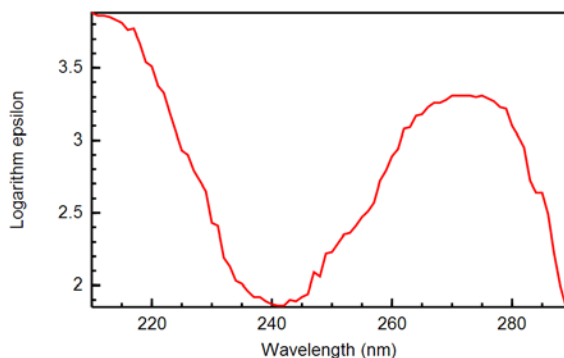


FIGURA 4.1 – COMPORTAMENTO DA ABSORTIVIDADE DO FENOL NA FAIXA DE COMPRIMENTOS DE ONDA CORRESPONDE À INSULINA (FONTE: NIST, 2014)

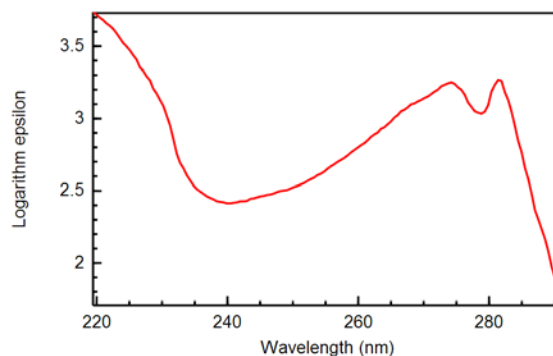


FIGURA 4.2 - COMPORTAMENTO DA ABSORTIVIDADE DO METACRESOL NA FAIXA DE COMPRIMENTOS DE ONDA CORRESPONDE À INSULINA (FONTE: NIST, 2014)

A falta de disposição imediata de insulina pura obrigou o uso de insulina comercial (*detemir*). Esse fato exigiu o uso do método de BRADFORD (1976), que é mais complexo e demorado, para os ensaios preliminares.

4.4 ANÁLISES ESPECTROFOTOMÉTRICAS

4.4.1 Corante Amarelo Crepúsculo

O desenvolvimento da metodologia de liberação de moléculas orgânicas foi realizado previamente com o corante amarelo crepúsculo, ao invés de insulina, encapsulado em partículas de ALG devido a sua disponibilidade (baixo custo) e facilidade de acompanhamento visual. A leitura das absorvâncias (SHANGHAI MAPADA INSTRUMENTS CO. LTDA., China) foi feita até a concentração de 30 mg/L em água destilada a 481 nm (DEZHAMPANAH; MOUSAZADEH; MOUSAZADEH, 2014).

4.4.2 Insulina *detemir* e o Método de Bradford (1976)

Como já mencionado, a metodologia analítica de BRADFORD (1976) foi usada para análise quantitativa da insulina *detemir*, disponibilizada pelo próprio autor deste trabalho (que é insulínodépendente), antes do recebimento da insulina regular adquirida pelo programa.

Uma solução reagente foi preparada com a dissolução de 100 mg de Coomassie Blue G-250 em 47,5 mL de etanol P.A., transferindo-se a mistura analiticamente com água destilada para um balão volumétrico, adicionando-se 100 mL de ácido fosfórico 85% (w/w) e completando-se o volume de 1 litro com água destilada. A solução apresentou uma cor marrom escura e avermelhada.

Separadamente, diluiu-se a insulina *detemir* em água destilada em concentrações de 3 U.I./mL até 30 U.I./mL. 50 mL da solução de corante preparada foram adicionados a 1 mL de cada uma das soluções. A mistura foi diluída tomando-se 10 mL e adicionando-se água destilada até o volume de 100 mL. O produto teve sua absorvância determinada em espectrofotômetro a 595 nm para todas as concentrações usando-se água destilada como branco.

4.4.3 Insulina Regular

Para as análises da insulina regular, recebida posteriormente, duas análises espectrofotométricas foram efetuadas: uma em pH 1,2 e outra em pH 6,8. As concentrações analisadas foram de 0,15 UI/mL até 3,00 UI/mL em água destilada (YILMAZ; KADIOGLU, 2012).

4.5 ENCAPSULAMENTO E LIBERAÇÃO DO CORANTE AMARELO CREPÚSCULO CONTIDO EM PARTÍCULAS DE ALG

Para praticar a metodologia de encapsulamento e liberação, dez partículas foram confeccionadas gotejando-se uma solução de 3% (w/w) de alginato e 0,2% (w/w) de corante amarelo crepúsculo em água destilada em uma solução 0,1 M de cloreto de cálcio. Foram produzidas também 10 partículas de alginato não carregadas para servir de controle. As partículas foram mantidas em 50 mL de água destilada por 24 horas sob agitação suave para liberar todo o corante encapsulado no fluido. Os diâmetros das partículas carregadas foram medidos com um paquímetro logo após a confecção e depois do período de 24 horas de liberação.

4.6 ENCAPSULAMENTO E LIBERAÇÃO DE INSULINA CONTIDA EM PARTÍCULAS DE ALG

Partículas de alginato foram confeccionadas como descrito na seção 4.2. Adicionou-se 30 U.I. de insulina *detemir* a 0,3 g de alginato de sódio e completou-se a massa total de 10 g com água destilada. As 9 partículas produzidas foram pesadas antes e depois de passarem 24 horas sob agitação suave em 50 mL de água destilada em recipiente fechado. A absorbância foi então determinada na mistura de uma alíquota de 10 mL do meio de liberação com 1,087 mL da solução de corante descrita na seção 4.4. Este último volume foi medido obtendo-se a densidade da solução de corante por meio da pesagem de 10 mL, resultando em 1061,80 mg/mL, e pesando a massa correspondente a 1,087 mL (1154,18 mg) utilizando um conjunto seringa-agulha para maior exatidão.

A concentração de insulina na solução foi determinada a partir da curva padrão produzida pelo procedimento descrito na seção 4.4. A concentração no meio de liberação foi calculada relacionando-se volumes e concentrações iniciais e finais durante a adição do corante.

4.7 TESTES DE LIBERAÇÃO DEPENDENTES DO TEMPO

Partículas de alginato (ALG) e mistas de alginato e WPI (ALG-WPI) produzidas adicionando-se insulina regular ao gel pré-extrudado nas quantidades de 5% (5 U.I./g de gel) ou 10% e efetuando a extrusão do gel com agulhas de dois diâmetros diferentes (22G e 18G) foram produzidas, assim como partículas sem adição de insulina, que formam o grupo branco. As absorvâncias lidas nos testes com partículas não carregadas (branco) foram descontadas das leituras dos testes com as esferas que continham o medicamento para inibir a influência de outros compostos presentes nas matrizes das partículas.

As oito combinações e suas respectivas versões não carregadas foram avaliadas mantendo-se 400 partículas recém produzidas em 150 mL de meio de liberação (solução tampão de pH 1,2 ou 6,8) por 24 horas sob leve agitação em banho térmico a 37°C. A cada 15 minutos na primeira hora e a cada hora nas primeiras 4 horas, foram coletadas alíquotas de 3mL para a determinação da concentração de insulina no meio de liberação por análise espectrofotométrica a 214 nm. Os volumes retirados foram repostos com solução tampão fresca. Considerou-se que toda a insulina havia difundido das partículas para o meio de liberação quando finalizado o período de 24 horas, quando a última alíquota foi coletada.

Separadamente, cada grupo de partículas teve o diâmetro médio avaliado medindo-se o diâmetro de cinco partículas com um paquímetro.

4.8 MODELAGEM MATEMÁTICA DO PROCESSO DE LIBERAÇÃO

A Segunda Lei de Fick aplicada para regime transiente, sem reações e em coordenadas esféricas (Equação 4.1) foi usada para a modelagem do processo de difusão de insulina através das partículas. Essa equação diferencial pode ser resolvida analiticamente pelo método de separação de variáveis (WELTY *et al.*, 2008). Crank (1975) fornece as soluções (Equações 4.2 e 4.3) considerando que o

processo de difusão é descontínuo e que a concentração de soluto na superfície da partícula é constante.

$$-\frac{\partial C_A}{\partial t} = D_{AB} \cdot \left(\frac{\partial^2 C_A}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \cdot \frac{\partial C_A}{\partial r} \right) \quad \text{Equação 4.1}$$

para $r \neq 0$

$$\frac{C_A - C_{A_0}}{C_{A_S} - C_{A_0}} = 1 + \frac{2 \cdot R}{\pi \cdot r} \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n} \cdot \text{sen} \left(\frac{n \cdot \pi \cdot r}{R} \right) \cdot e^{-D_{AB} \cdot n^2 \cdot \pi^2 \cdot t / R^2} \quad \text{Equação 4.2}$$

para $r = 0$

$$\frac{C_A - C_{A_0}}{C_{A_S} - C_{A_0}} = 1 + 2 \cdot \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \cdot e^{-D_{AB} \cdot n^2 \cdot \pi^2 \cdot t / R^2} \quad \text{Equação 4.3}$$

A temperatura e a concentração inicial no interior das partículas foram consideradas homogêneas ao longo do raio. A concentração do peptídeo na superfície das partículas foi calculada a partir de um balanço de massa (Equação 4.4) para maior grau de detalhamento do modelo, mesmo que Crank (1975) tenha considerado esse parâmetro constante.

$$C_{A_S} = \frac{(C_{A_0} - C_{A_m}) \cdot N_p \cdot V_p}{V_{meio}} \quad \text{Equação 4.4}$$

O teor de insulina residual nas partículas ao longo do tempo a ser usado na modelagem é a concentração média, sendo necessário integrar a equação do fluxo global de insulina em direção à superfície da partícula (Equação 4.4), que fornece a relação entre o fluxo molar avaliado na superfície das partículas e o tempo. A combinação entre as Equações 4.5 e 4.2 gera a Equação 4.6, que é uma equação diferencial separável. Esta pode ser resolvida a partir da condição de que $C_{A_m} = C_{A_0}$ para o tempo inicial, obtendo-se a Equação 4.7. O único parâmetro desconhecido dessa equação é o coeficiente de difusão. Para encontrá-lo, uma curva foi ajustada aos valores de concentração de insulina residual das partículas obtidos experimentalmente conforme descrito na seção 4.7, sendo obtido o valor do coeficiente de difusão que gera o menor erro relativo médio quando comparados os valores do modelo com os dados experimentais. Para o ajuste, o somatório da Equação 4.7 foi calculado até o termo $n=50$, já que se observou previamente, a partir

dos dados publicados por DÉAT-LAINÉ *et al.* (2012), que os resultados apresentam variação de ordem menor que 0,1% a partir desse termo.

$$N_A = -D_{AB} \cdot \frac{\partial C_A(r=R,t)}{\partial r} \quad \text{Equação 4.5}$$

$$\begin{aligned} N_A &= \frac{dC_{A_m}(t)}{dt} \cdot \frac{V_p}{S_p} = \\ &= \frac{2 \cdot R \cdot D_{AB} \cdot (N_p \cdot V_p \cdot C_{A_0} - N_p \cdot V_p \cdot C_{A_m} - V_{meio} \cdot C_{A_0})}{\pi \cdot r \cdot V_{meio}} \cdot \\ &\cdot \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \cdot e^{-D_{AB} n^2 \pi^2 \frac{t}{R^2}} \cdot \left[\frac{\pi}{R} \cos\left(\frac{n\pi r}{R}\right) - \frac{1}{r \cdot n} \operatorname{sen}\left(\frac{n\pi r}{R}\right) \right] \end{aligned} \quad \text{Equação 4.6}$$

Condição inicial: $t=0 \rightarrow C_{A_m}(t=0) = C_{A_0}$

$$\begin{aligned} C_{A_m}(t) &= \frac{C_{A_0}}{N_p \cdot V_p} \cdot [V_{meio} \exp\left(\frac{N_p \cdot S_p \cdot 2 \cdot R}{V_{meio} \cdot \pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{e^{-D_{AB} n^2 \pi^2 \frac{t}{R^2}} - 1}{n^2}\right) \\ &+ N_p \cdot V_p - V_{meio}] \end{aligned} \quad \text{Equação 4.7}$$

4.9 SIMULAÇÃO DO PROCESSO DE LIBERAÇÃO

As simulações foram realizadas com o software COMSOL Multiphysics 4.3b (COMSOL, Inc, Burlington, MA, EUA). Uma geometria bidimensional foi utilizada e a transferência de massa convectiva foi desconsiderada. A absorção de água, o inchamento, a geração térmica e o campo de velocidade das partículas foram considerados nulos. Os coeficientes de difusão utilizados foram obtidos a partir do procedimento descrito na seção 4.8. O fluxo foi definido pela Equação 4.6, sendo que o somatório desta equação também foi desenvolvido até o termo $n=50$. Como já mencionado na seção 3.4, o tempo médio de permanência de líquidos no estômago e no intestino de indivíduos jovens e saudáveis é estimado em uma hora e trinta e cinco minutos e três horas e cinquenta e cinco minutos, respectivamente (GRAFT; BRINCH; MADSEN, 2001). Estes foram os tempos usados para simular o processo de liberação em ambiente fisiológico. Esse estudo não simula a ingestão do

medicamento com sólidos (como no caso de a pessoa tomar o medicamento durante uma refeição), já que os coeficientes de difusão disponíveis provêm de experimentos de liberação em ambiente líquido.

As condições iniciais para as simulações em ambiente intestinal foram obtidas a partir dos resultados das simulações em ambiente estomacal, aos quais se ajustaram equações de sexto grau que descrevam os perfis de concentração nas partículas no final do processo de liberação. O efeito desejado é o de simular a passagem das partículas do meio gástrico para o meio intestinal. As simulações foram feitas utilizando-se um passo de 60 segundos, já que se observou previamente que variações no passo geram alterações irrelevantes nos resultados.

Para conhecer a concentração média de insulina nas partículas a partir dos resultados das simulações, que são fornecidos pelo programa na forma de uma tabela relacionando posição (raio) e concentração pontual, os valores foram ajustados a uma equação do sexto grau. Esta equação foi multiplicada pela forma diferencial do volume de uma esfera, sendo o total integrado para se obter o número de U.I. de insulina contido na esfera. Tal valor foi então dividido pelo volume total da partícula, obtendo-se uma concentração média de insulina, a qual pode ser comparada com os dados experimentais. A Equação 4.8 representa a forma geral do cálculo da concentração média de insulina nas partículas a partir dos perfis de concentração gerados pela simulação, enquanto a Equação 4.9 é sua forma integrada.

$$C_{Am} = \frac{\int_0^R \int_0^{2\pi} \int_0^\pi (A.r^6 + B.r^5 + C.r^4 + D.r^3 + E.r^2 + F.r + G).r^2.\text{sen}(\vartheta).d\vartheta.d\theta.dr}{\frac{4\pi R^3}{3}} \quad \text{Equação 4.8}$$

$$C_{Am} = 3. \left(\frac{A.R^6}{9} + \frac{B.R^5}{8} + \frac{C.R^4}{7} + \frac{D.R^3}{6} + \frac{E.R^2}{5} + \frac{F.R}{4} + \frac{G}{3} \right) \quad \text{Equação 4.9}$$

Concentrações médias de insulina nas esferas foram obtidas a partir dos perfis de concentração resultantes das simulações no instante correspondente à entrada da partícula no intestino (ou saída do estômago) e no instante referente à saída do intestino. A diferença entre essas duas concentrações médias foi dividida pela concentração inicial de insulina na partícula (correspondente àquela definida

para a partícula ao entrar no estômago) e expressas em porcentagem de insulina liberada no intestino (Equação 4.10).

$$\begin{array}{l} \text{Insulina} \\ \text{Liberada} \\ \text{no Intestino} \end{array} (\%) = \frac{C_{A_m}(\text{entrada}) - C_{A_m}(\text{saída})}{C_{A_0}} \cdot 100\% \quad \text{Equação 4.10}$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CONFECÇÃO DE PARTÍCULAS DE WPI, ALG E WPI/ALG

As esferas foram facilmente produzidas pelo procedimento descrito por DÉAT-LAINÉ *et al.* (2012) com exceção do uso individual do WPI, o qual gerou partículas disformes quando o gel foi carregado com insulina dos dois tipos utilizados, *detemir* e regular. O gotejamento deve ser feito a uma altura adequada (aproximadamente 25 cm) para que as partículas tenham um formato esférico. De outra maneira, foram observadas imperfeições que impediriam a modelagem proposta.

Observou-se também que, durante o processo de tratamento térmico do WPI, a ausência de agitação causou o endurecimento do material, impedindo sua extrusão. Por isso os cozimentos foram conduzidos mantendo-se uma agitação branda.

5.2 ANÁLISES ESPECTROFOTOMÉTRICAS

Os valores de absorbâncias do corante amarelo crepúsculo apresentaram uma ótima correlação de linearidade ($R^2 = 0,9983$) até a concentração de 20 mg/L (Figura 5.1). O comportamento inesperado observado acima dessa concentração não pode ser justificado.

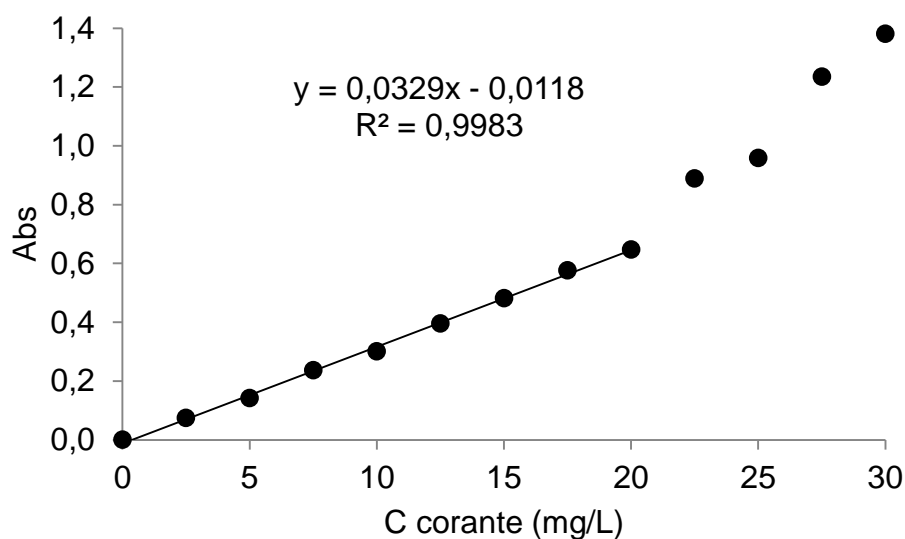


FIGURA 5.1 - RELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE CORANTE AMARELO CREPÚSCULO E A ABSORBÂNCIA A 481 NM

As absorvâncias para a análise espectrofotométrica com o método de BRADFORD (1976) foram anotadas e apresentaram boa correlação de linearidade até a concentração de 0,0353 U.I./mL (Figura 5.2).

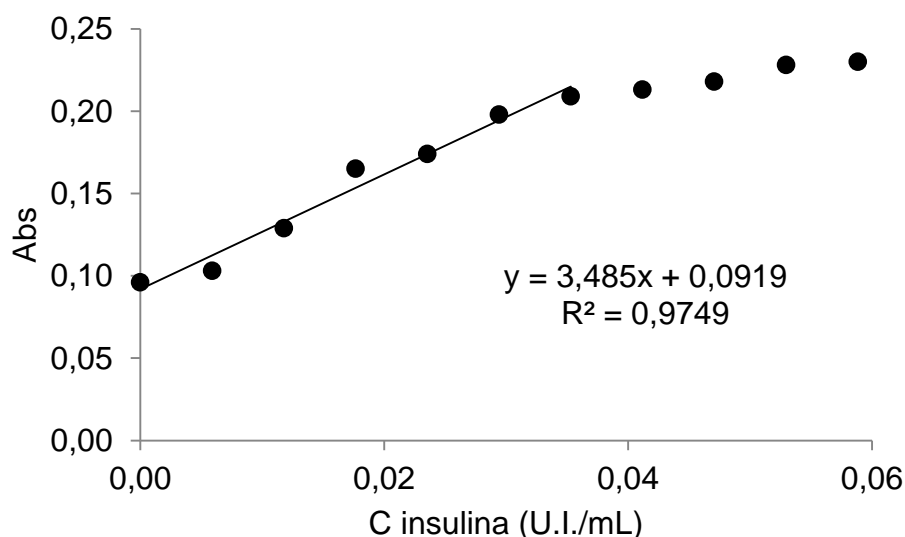


FIGURA 5.2 - RELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE INSULINA *DETEMIR* E A ABSORBÂNCIA A 595 NM COM USO DO MÉTODO DE BRADFORD (1976)

Os coeficientes de determinação nas análises da insulina regular misturada com as soluções tampão de pH 1,2 (Figura 5.3, $R^2=0,9994$) e 6,8 (Figura 5.4, $R^2=0,9996$) foram também elevados.

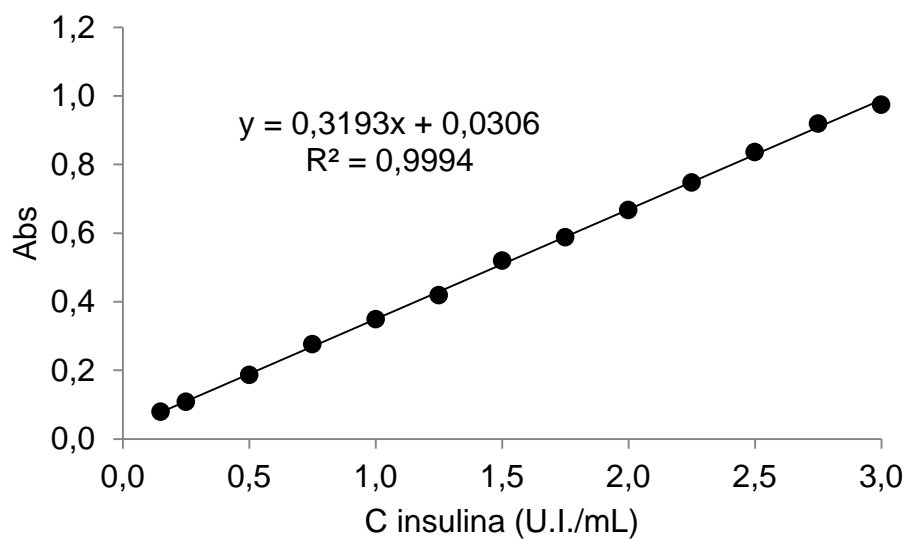


FIGURA 5.3 - RELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE INSULINA REGULAR EM SOLUÇÃO TAMPÃO DE PH 1,2 E A ABSORBÂNCIA A 214 NM

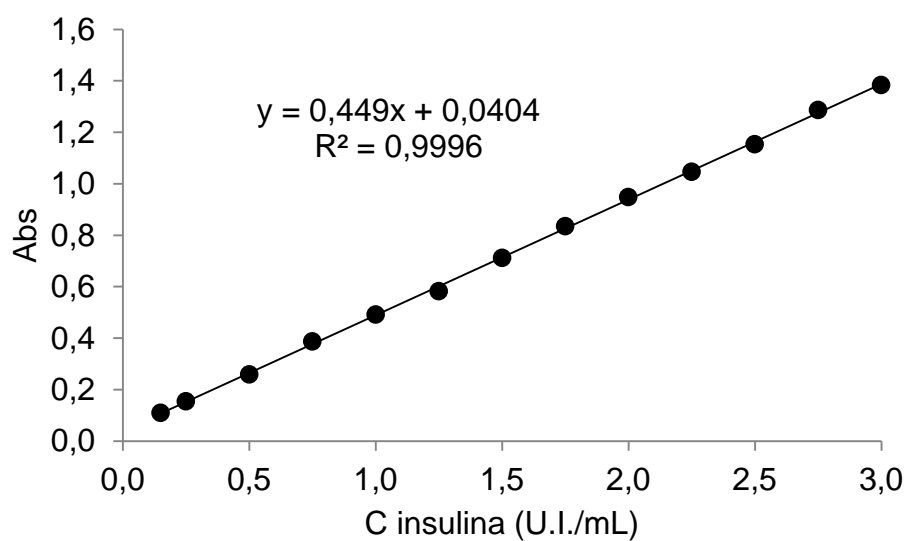


FIGURA 5.4 - RELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE INSULINA REGULAR EM SOLUÇÃO TAMPÃO DE PH 6,8 E A ABSORBÂNCIA A 214 NM

5.3 ENCAPSULAMENTO E LIBERAÇÃO DO CORANTE AMARELO CREPÚSCULO CONTIDO EM PARTÍCULAS DE ALG

As concentrações do meio de liberação para partículas carregadas ou não foram 8,1 mg/L e 0,4 mg/L, respectivamente. Logo, a concentração no meio de liberação foi 7,7 mg/L, o que equivale a 0,385 mg de corante liberado nos 50 mL de meio e a uma massa de 0,0385 mg de corante por partícula. Os diâmetros anteriores e posteriores ao processo de liberação foram em média (desvio padrão) 3,43 ($\pm 0,11$) e 4,06 ($\pm 0,17$) mm.

5.4 ENCAPSULAMENTO E LIBERAÇÃO DE INSULINA CONTIDA EM PARTÍCULAS DE ALG

A concentração de insulina lida no final do processo foi de 0,0124 U.I..mL⁻¹ no meio de liberação. O teor de insulina liberada foi 0,62 U.I., equivalente a uma média de 0,069 U.I. por partícula. Esse valor está compreendido pela faixa relatada por DÉAT-LAINÉ *et al.* (2012) (0,028 a 0,147 U.I. por partícula).

5.5 TESTES DE LIBERAÇÃO

O comportamento da liberação de insulina foi avaliado em pH similares aos ambientes estomacal (pH 1,2, quadrado) e intestinal (6,8, círculo), conforme descrito por DÉAT-LAINÉ *et al.* (2012) (Figura 5.5).

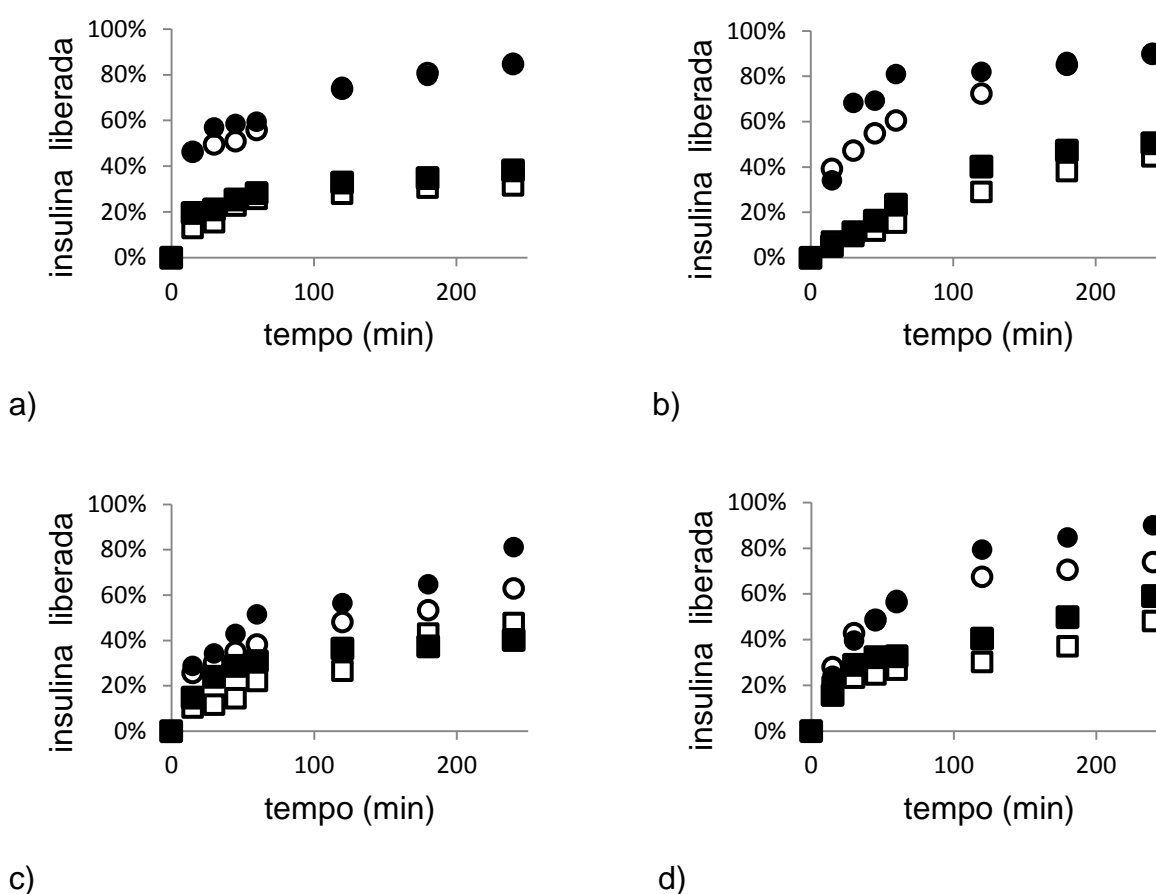


FIGURA 5.5 – COMPORTAMENTOS DE LIBERAÇÃO DE INSULINA DAS PARTÍCULAS: A) ALG – AGULHA 18G; B) ALG – AGULHA 22G; C) ALG-WPI – AGULHA 18G; D) ALG-WPI – AGULHA 22G. CÍRCULOS E QUADRADOS REPRESENTAM OS PH'S DE 6,8 E 1,2, RESPECTIVAMENTE. FIGURAS ABERTAS E FECHADAS REPRESENTAM A QUANTIDADE DE INSULINA ADICIONADA ÀS PARTÍCULAS, 5% E 10%, RESPECTIVAMENTE.

Nota-se que em todos os casos a liberação foi mais rápida no ambiente intestinal (círculos) quando comparado ao estomacal (quadrados). Esse fenômeno é benéfico para evitar a perda do hormônio por degradação proteolítica no estômago

(REIS, 2007) e também para disponibilização desta biomolécula na região de maior absorção, intestino, e incorporação na corrente sanguínea (SILVA *et al.*, 2003).

Houve liberação mais rápida de insulina para as partículas produzidas com maior teor de insulina (10%), exceto para os experimentos da matriz ALG-WPI com agulha 18G em pH ácido. Esse comportamento é previsto pela primeira lei de Fick, que diz que quanto maior for o gradiente de concentração (entre as partículas e o meio de liberação), maior será o fluxo na direção da concentração mais baixa (meio de liberação).

É possível perceber graficamente que a distância entre as curvas de liberação intestinal e estomacal é maior para a matriz ALG do que para a ALG-WPI. Esse fato demonstra que, em relação à matriz ALG-WPI, as esferas de ALG protegem melhor a insulina no estômago sem afetar a alta velocidade de liberação no intestino.

As concentrações iniciais e os diâmetros de cada tipo de partícula também foram obtidos (Tabela 5.1). As concentrações possuem valores próximos para os dois pH porque os dados provêm de partículas produzidas através do mesmo método (por exemplo, testes 1 e 9, 2 e 10, 3 e 11, etc.).

TABELA 5.1 – CONCENTRAÇÕES INICIAIS E DIÂMETROS DAS ESFERAS UTILIZADAS NOS TESTES DE LIBERAÇÃO

Teste	Matriz	Agulha	Insulina adicionada	Diâmetro das esferas (mm)	Concentração inicial (UI/100 MP*)			
					Teste	pH 1,2	Teste	pH 6,8
1	ALG	18G	5%	4,30±0,18	1	48,3	9	48,9
2			10%	3,84±0,15	2	58,1	10	60,6
3		22G	5%	4,00±0,12	3	21,0	11	19,6
4			10%	3,27±0,12	4	17,9	12	17,1
5	ALG-WPI	18G	5%	4,37±0,10	5	49,9	13	50,4
6			10%	3,90±0,10	6	63,4	14	68,1
7		22G	5%	4,23±0,08	7	28,0	15	27,1
8			10%	3,14±0,08	8	15,3	16	14,1

* MP = micropartícula

5.6 MODELAGEM MATEMÁTICA DO PROCESSO DE LIBERAÇÃO

Dois modelos foram avaliados para prever a concentração liberada de insulina no meio aquoso: um completo, que admite a influência da concentração da insulina no meio de liberação (seção 4.8), e um modelo simplificado, previamente usado, que desconsidera essa influência (CENDON *et al.*, 2014).

Na maioria dos casos, o modelo completo apresentou erro médio menor, chegando a uma redução de quase 3% no teste 10, e coeficiente de determinação maior, passando de 0,918 a 0,955 no teste 12, exceto para cinco testes; 3, 4, 5, 14 e 16 (Tabela 5.2). Isto sugere que o mesmo seja mais fiel para descrever o fenômeno.

TABELA 5.2 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS ENTRE OS DOIS MODELOS DESENVOLVIDOS

Teste	pH	Modelo simplificado			Modelo completo		
		Dab (x10 ⁻¹²) m ² /s)	Erro médio	R ²	Dab (x10 ⁻¹²) m ² /s)	Erro médio	R ²
1	1,2	5,68	4,4%	0,898	5,88	4,2%	0,902
2		6,37	5,7%	0,905	6,52	5,6%	0,909
3		6,45	4,4%	0,955	6,34	4,5%	0,952
4		6,21	5,2%	0,955	6,48	5,3%	0,954
5		9,13	4,5%	0,951	10,26	4,8%	0,946
6		7,81	5,9%	0,904	8,31	5,7%	0,909
7		8,68	4,8%	0,932	9,76	4,4%	0,934
8		8,38	3,4%	0,975	8,60	3,4%	0,976
9	6,8	55,50	9,6%	0,959	62,12	7,0%	0,965
10		48,50	15,6%	0,944	53,53	12,7%	0,954
11		56,00	5,0%	0,992	66,77	4,3%	0,994
12		48,25	30,4%	0,918	79,29	27,9%	0,955
13		18,79	4,8%	0,976	21,11	3,9%	0,980
14		32,49	7,4%	0,975	33,03	7,9%	0,975
15		43,26	10,5%	0,971	48,60	8,8%	0,979
16		32,44	7,5%	0,988	36,45	7,4%	0,985

Para o modelo proposto (seção 4.8), os erros médios se mantiveram entre 3% e 9%, com exceção dos testes 10 (12,7%) e 12 (27,9%). O menor coeficiente de determinação foi de 0,902 (Teste 1), chegando a valores como 0,994 (Teste 11).

O coeficiente de difusão (D_{AB}) é maior para o pH intestinal (6,8) do que o pH estomacal (1,2), confirmando o comportamento verificado graficamente (Figura 5.5).

Esse aumento é mais pronunciado nas partículas ALG (aproximadamente dez vezes) do que nas ALG-WPI (aproximadamente de duas a cinco vezes).

O coeficientes de difusão mais baixo e mais alto foram encontrados nos testes 1 e 12, respectivamente (Figura 5.6), confirmando que a velocidade de liberação é menor no meio estomacal e maior no intestinal. É possível observar na Figura 5.7 que partículas compostas da mesma matriz possuem coeficientes de difusão semelhantes para diâmetros e concentrações iniciais diferentes (testes de 1 a 4, de 5 a 8, de 9 a 12 e de 13 a 16). Isso sugere a possibilidade de calcular-se um coeficiente de difusão médio para cada composição de matriz, independente do diâmetro e das concentrações iniciais de insulina das esferas. Caso isso realmente seja possível, os materiais normalmente utilizados para encapsular medicamentos e suas combinações entre si poderiam ser caracterizados utilizando o modelo proposto, facilitando a realização de simulações que otimizem o planejamento experimental no desenvolvimento de sistemas de administração controlada de fármacos.

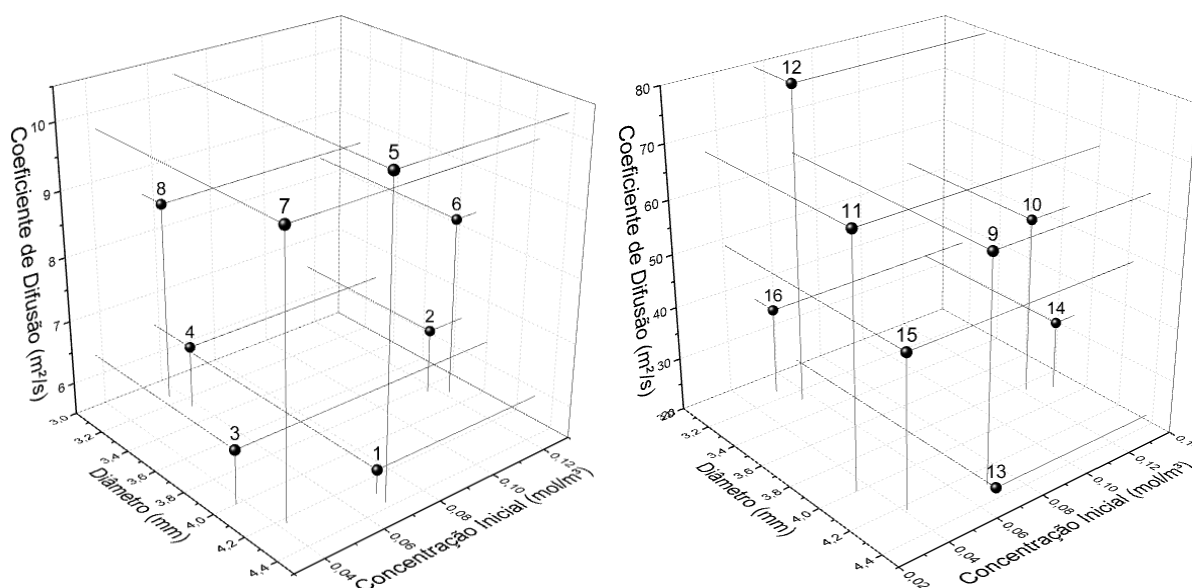


FIGURA 5.6 – RELAÇÃO ENTRE OS COEFICIENTES DE DIFUSÃO, OS DIÂMETROS E AS CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE HORMÔNIO NAS PARTÍCULAS. OS NÚMEROS IDENTIFICAM OS PONTOS QUANTO AO TESTE QUE REPRESENTAM.

Rasmussen, Snabe e Pedersen (2003) encontraram o valor de $35 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ para partículas de 2,5 mm de alginato de cálcio produzidas a partir de uma solução

de 2% de alginato de sódio (não de 3%, como no caso deste trabalho) liberando insulina em uma solução de pH 7,4. Os testes 9 a 12 representam as situações mais parecidas com as descritas por Rasmussen, Snabe e Pedersen (2003), sendo que nesses testes os coeficientes variaram de 60 a 80×10^{-12} m^2/s , relativamente parecidos com o valor referenciado na literatura, considerando a diferença na composição da matriz.

O bom funcionamento do modelo fica evidenciado graficamente na Figura 5.7. É possível notar um ótimo comportamento preditivo quando comparados os resultados do modelo e os dados experimentais.

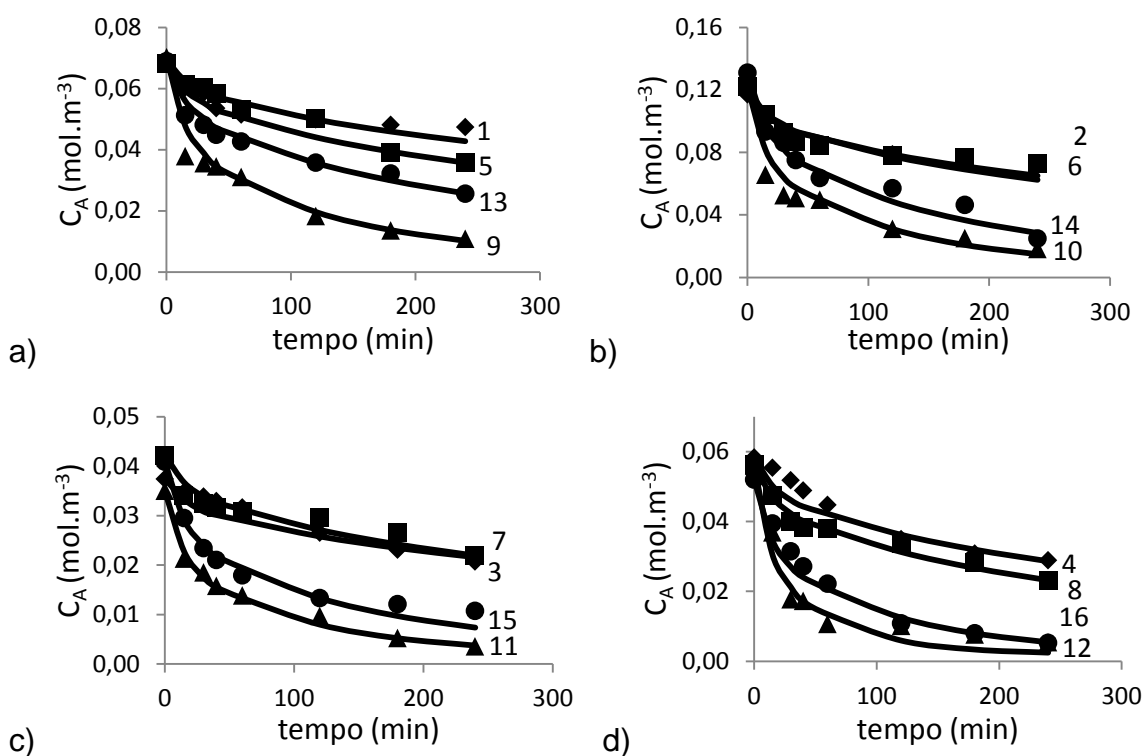


FIGURA 5.7 – CURVAS DO MODELO APLICADAS AOS DADOS EXPERIMENTAIS. AS CURVAS SÃO NUMERADAS INDICANDO O TESTE QUE ELAS REPRESENTAM. AS LETRAS INDICAM PARTÍCULAS PRODUZIDAS COM A) AGULHA 18G E 5% DE ADIÇÃO DE INSULINA; B) AGULHA 18G E 10% DE ADIÇÃO DE INSULINA; C) AGULHA 18G E 5% DE ADIÇÃO DE INSULINA; D) AGULHA 22G E 10% DE ADIÇÃO DE INSULINA. OS SÍMBOLOS REPRESENTAM OS TESTES REALIZADOS: LOSANGO, TESTES DE 1 A 4; QUADRADO, TESTES DE 5 A 8; TRIÂNGULO, TESTES DE 9 A 12; E CÍRCULO, TESTES DE 13 A 16.

5.7 SIMULAÇÃO DOS PROCESSOS DE LIBERAÇÃO

Os perfis de concentração de todos os tipos de partícula testados depois da suposta passagem pelo estômago, ou seja, o teor insulina ao entrar no intestino, foram obtidos como resultado das simulações de transferência de massa efetuadas em COMSOL 4.3b (Figura 5.8).

Observam-se as influências do diâmetro e da concentração inicial de insulina. Quanto maior o diâmetro, maior a quantidade residual de medicamento na partícula, já que maiores diâmetros conferem uma maior massa total de insulina na partícula e dificultam a difusão do hormônio contido no centro da esfera. O aumento da concentração inicial aumenta também, evidentemente, a concentração de insulina nas partículas quando chegam no início do intestino.

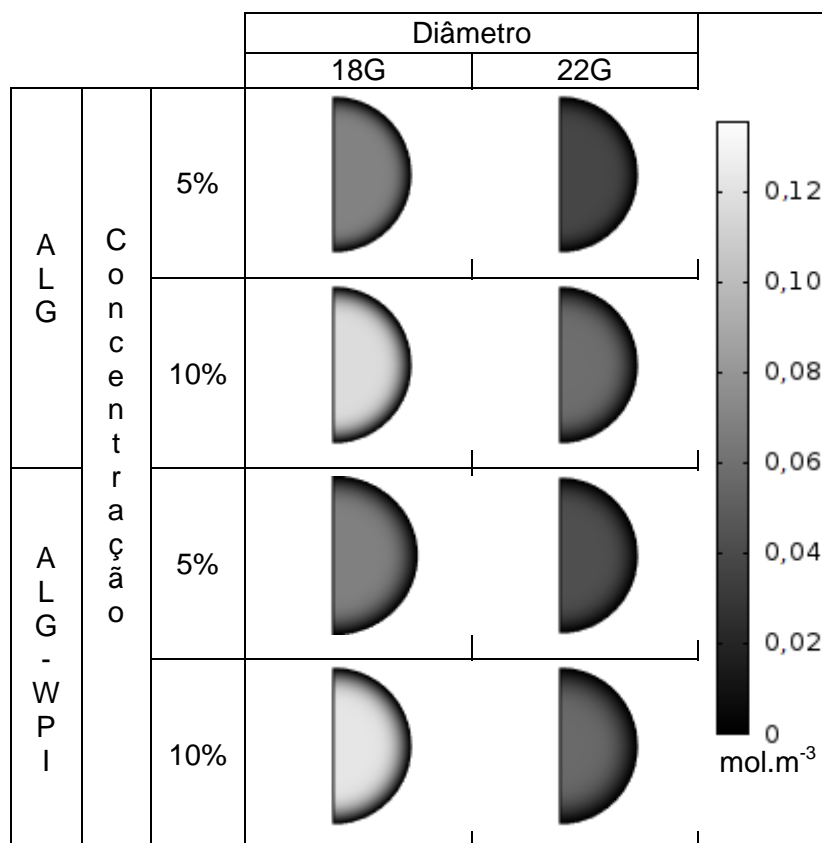


FIGURA 5.8 – DISTRIBUIÇÃO DE INSULINA NA ESFERA PARA O INSTANTE DE ENTRADA DA PARTÍCULA NO INTESTINO (UMA HORA E TRINTA E CINCO MINUTOS APÓS A INGESTÃO DAS PARTÍCULAS)

A quantidade de hormônio supostamente liberado na região intestinal em relação à quantidade total administrada oralmente foi calculada para todos os tipos de partículas testadas (Tabela 5.3). Os valores variaram de 35,4% a 62,5%. Para todos os diâmetros e concentrações, as partículas A apresentaram uma melhor eficiência de disponibilização do medicamento no intestino.

TABELA 5.3 – PORCENTAGEM DE INSULINA LIBERADA NO INTESTINO

		Diâmetro		
			18G	22G
ALG	Concentração	5%	51,2%	62,5%
		10%	55,4%	57,4%
ALG-WPI	Inicial	5%	40,3%	46,9%
		10%	53,3%	35,4%

Em CENDON *et al.* (2014) conduziu-se o mesmo procedimento com partículas de composição semelhante às ALG-WPI. As eficiências variaram de 0,26% (partículas de 0,79 mm) a 34% (partículas de 2,37 mm). Este último grupo

teve o valor de eficiência mais próximo dos observados na Tabela 5.3, possivelmente devido à maior proximidade do diâmetro das esferas com os das usadas neste trabalho (aproximadamente de 3,0 a 4,5 mm).

A Tabela 5.3 mostra que as eficiências foram menores para a matriz ALG-WPI em todos os casos quando comparados à matriz pura de ALG. Porém, existem outros aspectos a ser analisados quanto à inserção do WPI na matriz.

Déat Lainé *et al.* (2012) afirma que o WPI possui um melhor efeito de inibição da atividade enzimática da tripsina e da alfa-quimotripsina (41% e 67% para o WPI, 21% e 56% para o ALG, para as enzimas citadas, respectivamente, em 2 horas de incubamento das enzimas com partículas carregadas com insulina). Além disso, recentemente, Morato *et al.* (2013) descobriram que as proteínas do soro de leite induzem a ativação do transportador de glicose GLUT-4 de maneira similar à ação da insulina. Ou seja, mesmo que a adição das proteínas piore a eficiência de liberação na região ótima, ainda existem vantagens importantes associadas à utilização desse material.

Como exemplo da possível aplicação prática das partículas na vida de um diabético, para uma dose de 20 U.I. de insulina (similar ao que o autor aplica diariamente em jejum), considerando uma eficiência de liberação no intestino de aproximadamente 50% (Tabela 5.3), uma absorção intestinal de 10% (SILVA *et al.*, 2003), um degradação hepática de 50% (RAMKISSOON-GANORKAR *et al.*, 1999) e uma concentração inicial de 60 U.I./100MP (Tabela 5.1), seria necessário ingerir aproximadamente 1300 partículas. Esse número representa um volume de aproximadamente 45 mL (para esferas com 4 mm de diâmetro), demonstrando que a quantidade de partículas a ser ingerida é viável fisicamente e possivelmente não causaria desconforto no paciente.

6 CONCLUSÃO

Partículas em gel podem ser produzidas com alginato (ALG) ou com proteína isolada de soro de leite (*whey protein isolate*, WPI), inclusive com a associação desses materiais. Cuidados especiais devem ser tomados no tratamento térmico do WPI, para evitar a gelificação, e no procedimento de extrusão, para garantir a esfericidade das partículas.

O corante amarelo crepúsculo foi um ótimo composto orgânico modelo para a implementação da metodologia de incorporação e liberação da matriz das esferas. A visualização de sua cor facilitou o acompanhamento empírico, bem como sua facilidade de aquisição e de custo tornaram-no conveniente.

Partículas de ALG ou da associação ALG-WPI (20% e 80%, respectivamente) foram produzidas com sucesso com a incorporação de insulina em sua matriz. No entanto, não foi possível produzir partículas de WPI puro com este hormônio, o que sugere alteração na interação intramolecular do WPI.

A espectrofotometria UV-VIS foi eficiente para o estudo da dessorção dos compostos orgânicos amarelo crepúsculo e insulina de partículas esféricas de gel de ALG e a associação ALG/WPI, desde que se obedeça aos limites de reprodutibilidade analítica e em condições que não ocorra sobreposição de detecção quantitativa.

Um modelo foi desenvolvido para estimar a evolução da liberação de insulina das partículas de ALG ou mistas de ALG-WPI. O inchamento por absorção de água, a geração térmica e o campo de velocidade das esferas foram considerados nulos. O aumento da concentração de insulina no meio de liberação é previsto no modelo a partir de um balanço de massa. O modelo foi comparado com outro previamente desenvolvido (CENDON *et al.*, 2014), que não considera a presença do hormônio na solução. Ambos os modelos apresentaram boas correlações com os dados experimentais (R^2 entre 0,898 e 0,992), sendo que a consideração do aumento de concentração de hormônio no meio de liberação melhorou as estimativas.

Os coeficientes de difusão das dezesseis condições previstas foram calculados adequadamente, apresentando erros médios que variaram de 3,4% a 8,8% na maioria dos casos, mas que chegaram a 12,7% (teste 10) e 27,9% (teste 12). Os coeficientes para as duas matrizes apresentaram valores próximos para diferentes condições de diâmetro e concentração, sugerindo que a composição da matriz é mais influente no coeficiente de difusão médio do que os outros dois fatores.

O método de elementos finitos aplicado em COMSOL 4.3b simulou a liberação de insulina no estômago (95 min e pH 1,2) e no intestino (235 min e pH 6,8). Assim, o teor residual da partícula ao ser admitida no intestino e sua disponibilização nesse órgão pôde ser simulado. Ilustrações da concentração radial de hormônio na esfera demonstram a evolução do fenômeno a cada instante de liberação.

Além desses perfis, os teores de insulina liberadas na porção intestinal também foram calculadas em relação à quantidade hipoteticamente administrada oralmente. Os valores resultaram entre 35,4% (matriz ALG/WPI, menor diâmetro e maior concentração) e 62,5% (matriz ALG, menor diâmetro e menor concentração) dependendo do diâmetro da partícula, da concentração inicial e do tipo de matriz de encapsulamento. Observou-se que a adição de WPI na matriz das esferas diminui a proporção de hormônio que é liberado na região intestinal. Apesar desse fato, existem outras vantagens associadas à adição das proteínas, como a atividade de inibição das enzimas gastrointestinais que degradam o medicamento e o efeito de diminuição da glicemia, similar ao da insulina.

Assim, a biodisponibilidade no intestino de insulina encapsulada para proteção da degradação estomacal pode ser prevista pelo modelo proposto, facilitando o desenvolvimento de um produto terapêutico que minimize o estresse de insulíndependentes. Essa técnica pode ser estendida a outros fármacos que usem sistemas de administração controlada.

REFERÊNCIAS

- ALLAN, F.N. **Diabetes before and after insulin.** Medical History v.16, n.3, p.266-273, 1972.
- ANDREWS, D.L. **Electromagnetic Radiation.** Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry v.1, p.397-401, 1999.
- ARBIT, E.; KIDRON, M. **Oral Insulin: The Rationale for This Approach and Current Developments.** Journal of Diabetes Science and Technology v.3, n.3, p.562-567, 2009. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2769870/>>. Acesso em: 5 mai. 2014.
- BRADFORD, M.M. **A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.** Analytical Biochemistry v.72, p.248-254, 1976.
- CARINO, G.P., MATHIOWITZ, E. **Oral insulin delivery.** Advanced Drug Delivery Reviews v.35, p.249-257, 1999.
- CARNEIRO, H.C.F.; TONON, R.V.; GROSSO, C.R.F.; HUNBIGER, M.D. **Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials.** Journal of Food Engineering v.115, p.443-451, 2013.
- CASTANO, L., EISENBARTH, G.S. **Type-I diabetes: A chronic autoimmune disease of human, mouse and rat.** Annual Review of Immunology v.8, p.647-679, 1990.
- CAVALLIERI, A.L.F. **Gelificação a frio de proteínas do soro de leite: efeito da taxa de acidificação, pH final e adição de polissacarídeos.** 2007. 218p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas. Disponível em:
<http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver_documento.php?did=395>. Acesso em: 11 mai. 2014.
- CENDON, F.V.; JORGE, R.M.M.; WEINSCHUTZ R., MATHIAS, A.L. **Simulação computacional por elementos finitos da liberação de insulina encapsulada em**

partículas de alginato e whey protein em ambiente gastrointestinal. Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2014.

CLARK, A.H., ROSS-MURPHY, S.B. **Structural and mechanical properties of biopolymer gels.** Advances in Polymer Science v.83, p.57-192, 1987.

COGNÉ, C.; NGUYEN, P.U.; LANOISELLÉ, J.L.; VAN HECKE, E.; CLAUSSE, D. **Modeling heat and mass transfer during vacuum freezing of puree droplet.** International Journal of Refrigeration v.36, n.4, p.1319-1326, 2013

CRANK, J. **Mathematics of Diffusion.** Londres: Oxford University Press, 1975, 414p.

DANS, A.C., CONDE, J.B., ARIAS, M.P. **Incidencia y características clínicas al manifestarse la diabetes mellitus tipo 1 en niños de Galicia (España, 2001-2002).** Anales de Pediatría v.62, n.2, p.123-127, 2005.

DAVIDSON, A.; AL-QALLAF, B.; DAS, D.B. **Transdermal drug delivery by coated microneedles: Geometry effects on effective skin thickness and drug permeability.** Chemical Engineering Research and Design v.86, n.11, p.1196-1206, 2008.

DEZHAMPANAH, H.; MOUSAZADEH, A.; MOUSAZADEH, I. **Removal of an Anionic Dye from Wastewaters by Adsorption on Modified Rice Husk and Sugarcane Bagasse.** International Journal of Hybrid Information Technology v.7, n.2, p. 309-320, 2014. Disponível em: <http://www.sersc.org/journals/IJHIT/vol7_no2_2014/27.pdf>. Acesso em: 17 mai. 2014.

DOHERTY, S.B.; GEE, V.L.; ROSS, R.P.; STANTON, C.; FITZGERALD, G.F.; BRODKORB, A. **Development and characterisation of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection.** Food Hydrocolloids v.25, p.1604-1617, 2011.

ELI LILLY **Diabetes Tipo 1 (DM1).** Disponível em: <https://www.lilly.com.br/Diabetes/O_Que_E_Diabetes/Diabetes_Tipo1>. Acesso em: 30 out. 2013.

FAN, Y.F.; WANG, Y.N.; FAN, Y.G.; MA, J.B. **Preparation of insulin nanoparticles and their encapsulation with biodegradable polyelectrolytes via the layer-by-layer adsorption.** International Journal of Pharmaceutics v.234, p.158-167, 2006.

FEUDTNER, C. **Bittersweet: Diabetes, Insulin and the Transformation of Illness.** Chapel Hill: The University of North Carolina Press, 2003, 290p.

GIROUX, H.J.; HOUDE, J.; BRITTEN, M. **Preparation of nanoparticles from denatured whey protein by pH-cycling treatment.** Food Hydrocolloids v.24, p.341-346, 2010.

GRAFT, J.; BRINCH, K.; MADSEN, J.L. **Gastrointestinal mean transit times in young and middle-aged healthy subjects.** Clinical Physiology v.21, n.2, p.253-259, 2001.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2006, 1115p.

HARLAND, R.S.; GAZZANIGA, A.; SANGALLI, M.E.; COLOMBO, P.; PEPPAS, N.A. **Drug/Polymer Matrix Swelling and Dissolution.** Pharmaceutical Research v.5, n.8, p.488-494, 1988.

INCA (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER) **Inquérito Domiciliar: Diabetes.** Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/inquerito/docs/diabete.pdf>>. Acesso em: 30 out. 2013.

IPARDES (Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico) **Caracterização da indústria de processamento e transformação do leite no Paraná.** Disponível em: http://www.ipardes.gov.br/pdf/caracterizacao_industria_leite.pdf. Acesso em: 10 fev. 2015.

JUNIOR, W.C.S. **Imobilização de células permeabilizadas de Debaryomyces hansenii UFV-1 em alginato de cálcio e sua aplicação na hidrólise de galactoligossacarídeos.** 2006. 67p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. Disponível em: <http://www.tede.ufv.br/tedesimplificado/tde_arquivos/28/TDE-2006-11-07T090343Z-52/Publico/texto%20completo.pdf>. Acesso em: 6 mai. 2014.

LEAHY, J.L. **Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus**. Archives of Medical Research v.36, n.3, p.197-209, 2005.

Levemir Penfill®. Márcia R. Alexandre. Bagsvaerd, Dinamarca. Novo Nordisk A/S, 2005. Bula de remédio.

LOPEZ-SALAZAR, R.; CAMACHO-LEON, S.; OLIVARES-QUIROZ, L.; HERNANDEZ, J. **Design and Simulation of High Precision Drug Delivery System**. Procedia Technology v.3, p.334-341, 2012

LUDVIGSSON, J.; CARLSSON, A., DELI, A., FORSANDER, G., IVARSSON, S., KOCKUM, I., LINDBLAD, B., MARCUS, C. **Decline of C-peptide during the first year after diagnosis of Type 1 diabetes in children and adolescents**. Diabetes Research and Clinical Practice v.100, p.203-209, 2012.

LUPI, R., DEL PRATO, S. **β -cell apoptosis in type 2 diabetes: quantitative and functional consequences**. Diabetes & Metabolism v.34, n.2, p.S56-S64, 2008.

MAIA, F. Pfizer suspende venda da insulina inalável Exubera. **Folha Online**, São Paulo, 18 out. 2007. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/folha/ciencia/ult306u337920.shtml>>. Acesso em: 3 set. 2013.

MAYFIELD, J.A., WHITE, R.D. **Insulin therapy for type 2 diabetes: Rescue, augmentation, and replacement of beta-cell function**. American Family Physician v.70, n.3, p.489-500, 2004.

MCAULEY, D.F. **Insulins: Classes, Kinetics and Mixing**. GlobalRPh, 2012. Disponível em: <http://www.globalrph.com/insulin_tables.htm>. Acesso em: 26 set. 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE **Vigitel: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico**. 2013. Disponível em: <portaldasaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/abril/30/Lancamento-Vigitel-28-04-ok.pdf>. Acesso em: 16 dez. 2014.

MORATO, P.N.; LOLLO, P.C.B.; MOURA, C.S.; BATISTA, T.M.; CARNEIRO, E.M.; AMAYA-FARFAN, J., **A dipeptide and an amino acid present in whey protein**

hydrolysate increase translocation of GLUT-4 to the plasma membrane in Wistar rats. Food Chemistry, v. 139, p. 853-859, 2013.

NEOCLEOUS, V.; SKORDIS, N.; SHAMMAS, C.; EFSTATHIOU, E.; MASTROYIANNOPOULOS, N.P.; PHYRACTOU, L.A. **Identification and characterization of a novel X-linked AVPR2 mutation causing partial nephrogenic diabetes insipidus: A case report and review of the literature.** Metabolism Clinical and Experimental v.61, p.922-930, 2012.

NETTO, A.P.; ANDRIOLO, A.; FRAIGE, F.; TAMBASCIA, M.; GOMES, M.B.; MELO, M.; SUMITA, N.M; LYRA, R.; CAVALCANTI, S. **Atualização sobre hemoglobina glicada (HbA1C) para avaliação do controle glicêmico e para o diagnóstico do diabetes: aspectos clínicos e laboratoriais.** Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial v.45, p.31-48, 2009.

NETTO, A.P.; TSCHIEDEL, B.; PEDROSA, H.; REIS, J.S.; FONSECA, R.C.; RÉA, R.; FORTI, A.C. **Revisão Sobre Análogos de Insulina: Indicações e Recomendações para a Disponibilização pelos Serviços Públicos de Saúde.** Sociedade Brasileira de Diabetes. 2011. 23p. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/attachments/posicionamento/posicionamento-sbd-n-01-2011.pdf>>. Acesso em: 28 set. 2013.

NIST (National Institute of Standards and Technology). **NIST Chemistry Webbook.** Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/chemistry>>. Acesso em: 17 mai. 2014.

ONUJI, Y.; MORISHITA, M.; TAKAYAMA, K.; TOKIWA, S.; CHIBA, Y.; ISOWA, K.; NAGAI, T. **In vivo effects of highly purified docosahexaenoic acid on rectal insulin absorption.** International Journal of Pharmaceutics v.198, n.2, p.147-156, 2000.

OWEN, T. **Fundamentals of UV-visible spectroscopy.** Alemanha: Agilent Technologies, 2000, 148p.

OWENS, D.R. **New horizons-alternative routes for insulin therapy.** Nature Reviews Drug Discovery v.1, n.7, p.529-540, 2002.

OWENS, D.R.; ZINMAN, B.; BOLLI, G. **Alternative routes of insulin delivery.** Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association v.20, n.11, p.886-898, 2003.

PERUSSELLO, C.A.; KUMAR, C.; CASTILHOS, F.; KARIM, M.A. **Heat and mass transfer modeling of osmo-convective drying of yacon roots (*Smallanthus sonchifolius*).** Applied Thermal Engineering v.63, n.1, p.23-32, 2013

PRINGELS, E.; CALLENS, C.; VERVAET, C.; DUMONT, F.; SLEGERS, G.; FOREMAN, P.; REMON, J.P. **Influence of deposition and spray pattern of nasal powders on insulin bioavailability.** International Journal of Pharmaceutics v.310, n.1-2, p.1-7, 2006.

RAMKISSOON-GANORKAR, C.; LIU, F.; BAUDYS, M.; KIM, S. W. **Modulating insulin-release profile from pH/thermosensitive polymeric beads through polymer molecular weight.** Journal of Controlled Release, v. 59, p.287-298, 1999.

RASMUSSEN, M.R.; SNABE, T.; PEDERSEN, L.H. **Numerical modeling of insulin and amyloglucosidase release from swelling Ca-alginate beads.** Journal of Controlled Release v.91, p.395-405, 2003.

RE, M.I. **Microencapsulation by spray-drying.** Drying Technology v.16, p.1195-1236, 1998.

REIS, A.C.B.P. **Encapsulação de Fármacos Peptídicos pelo Método de Emulsificação/Gelificação Interna.** 2007. 577p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade de Coimbra, Coimbra. Disponível em: <<https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/213/3/Tese%20Catarina%20Reis.pdf>>. Acesso em: 25 mai. 2014.

RODGER, A.; SANDERS, K. **Biomacromolecular Applications of UV-Visible Absorption Spectroscopy.** Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry v.1, p.130-139, 1999.

ROSA, G.; IOMMELLI, R.; ROTONDA, M.I.; MIRO, A.; QUAGLIA, F. **Influence of the co-encapsulation of different non-ionic surfactants on the properties of PLGA insulin-loaded microspheres.** Journal of Controlled Release v.69, p.283-295, 2000.

SAGLAM, D.; VENEMA, P.; VRIES, R.; SHI, J.; LINDEN, E. **Concentrated whey protein particle dispersions: Heat stability and rheological properties.** Food Hydrocolloids v.30, p.100-109, 2013.

SAMUEL, L. **The Basics of Protein Structure and Function.** Interactive Biology, 2013. Disponível em: <<http://www.interactive-biology.com/3730/the-basics-of-protein-structure-and-function/>>. Acesso em: 29 set. 2013.

SCHILLING, R. J.; MITRA, A. K. **Intestinal mucosal transport of insulin.** International Journal of Pharmaceutics v. 62, p. 53-64,1990.

SILVA, C., RIBEIRO, A., FERREIRA, D., VEIGA, F. **Administração oral de peptídeos e proteínas: III. Aplicação à insulina.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas v.39, n.1, p. 21-40, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v39n1/03.pdf>. Acesso em: 1 nov. 2013.

SILVA, P.M.; FERREIRA, J.A.; OLIVEIRA, P. **A mathematical tool for studying drug delivery to the eye in case of glaucoma.** COMSOLConference in Milan, 2012.

SINDING, C. **Making the unit of insulin: Standards, clinical work and industry, 1920-1925.** Bulletin of the History of Medicine v.76, n.2, p.231-270, 2002.

SINTOV, A.C.; WORMSER, U. **Topical iodine facilitates transdermal delivery of insulin.** Journal of Controlled Release v.118, n.2, p.185-188, 2007.

SOPPIMATH, K.S.; AMINABHAVI, T.M.; KULKARNI, A.R.; RUDZINSKI, W.E. **Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices.** Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society v.70, n.1-2, p.1-20, 2001.

SOUZA, C.R.; ZANETTI, M.L. **Administração de insulina: uma abordagem fundamental na educação em diabetes.** Revista da Escola de Enfermagem da USP v.34, n.3, p.264-270, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0080-62342000000300007>>. Acesso em: 4 mai. 2014.

STUTE, B.; KRUPP, V.; VON LIERES, E. **Performance of iterative equation solvers for mass transfer problems in three-dimensional sphere packings in COMSOL.** Simulation Modeling Practice and Theory v.33, p.115-131, 2013.

SULMONT, V.; LASSMANN-VAGUEB, V.; GUERCI, B.; HANAIRE, H.; LEBLANC, H.; LEUTENEGGER, E.; MIHAILEANU, M.; TUBIANA-RUFI, N. **Access of children and adolescents with type 1 diabetes to insulin pump therapy has greatly increased in France since 2001.** Diabetes & Metabolism v.37, p.59-63, 2011.

TAKITA, M., MATSUMOTO, S., SHIMODA, M., CHUJO, D., ITOH, T., IWAHASHI, S., SORELLE, J.A., ONACA, N., NAZIRUDDIN, B., LEVY, M.F. **Association Between the Secretary Unit of Islet Transplant Objects Index and Satisfaction with Insulin Therapy Among Insulin-Dependent Islet Recipients.** Transplantation Proceedings v.43, p.3250-3255, 2011.

TEWA-TAGNE, P.; BRIANCON, S.; FESSI, H. **Preparation of redispersible dry nanocapsules by means of spray-drying: Development and characterization.** European Journal of Pharmaceutical Sciences : Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences v.30, n.2, p.124-135, 2007.

TIOURINA, O.P.; SUKHORUKOV, G.B. **Multilayer alginate/protamine micro-sized capsules: encapsulation of α -chymotrypsin and controlled release study.** International Journal of Pharmaceutics v.242, p.155-161, 2002.

TODO, H.; OKAMOTO, H.; IIDA, K.; DANJO, K. **Effect of additives on insulin absorption from intratracheally administered dry powders in rats.** International Journal of Pharmaceutics v.220, n.1-2, p.101-110, 2001.

TORRES, J.F.M. **Lo que el cardiólogo debe conocer sobre antidiabéticos orales e insulinas.** Revista Española de Cardiología v.7, p.49H-57H, 2007.

TROTTA, M.; CAVALLI, R.; CARLOTTI, M.E.; BATTAGLIA, L.; DEBERNARDI, F. **Solid lipid micro-particles carrying insulin formed by solvent-in-water emulsion-diffusion technique.** International Journal of Pharmaceutics v.288, n.2, p.281-288, 2005.

WELTY, J.R.; WICKS, C.E.; WILSON, R.E.; RORRER, G.L. **Fundamentals of Momentum Heat, and Mass Transfer**. Nova Jersey: John Wiley & Sons, 2008, 711p.

WHO (World Health Organization). **Diabetes Programme**. Disponível em: <http://www.who.int/diabetes/action_online/basics/en/>. Acesso em: 23 ago. 2013.

WILSON, C.G.; CROWLEY, P.J. **Controlled Release in Oral Drug Delivery**. Nova Iorque, Springer, 2011, 399p.

YILMAZ, B.; KADIOGLU, Y. **Determination of Human Insulin in Pharmaceutical Preparation by Zero, First and Second Order Derivative Spectrophotometric Methods**. International Research Journal of Pharmaceutics, v.2, p. 21-29, 2012.