

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ALIMENTOS
CURSO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

TAMIRES BARLATI VIEIRA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE CARREADORES POLIMÉRICOS PARA A LIBERAÇÃO
DE GLICOSE**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO
2016

TAMIRES BARLATI VIEIRA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE CARREADORES POLIMÉRICOS PARA A LIBERAÇÃO
DE GLICOSE**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Diplomação, do Curso Superior de Engenharia de Alimentos, do Departamento de Alimentos – DALIM – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de Engenheira de Alimentos.

Orientador: Prof.^a. Dr^a. Regiane Gonzalez da Silva.

Co-orientadora Prof.^a Dr^a. Fernanda V. Leimann

CAMPO MOURÃO
2016



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Campo Mourão

Departamento Acadêmico de Alimentos
Engenharia de Alimentos



TERMO DE APROVAÇÃO

DESENVOLVIMENTOS DE CARREADORES POLIMÉRICOS PARA A LIBERAÇÃO DE GLICOSE

POR

TAMIRES BARLATI VIEIRA DA SILVA

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado em 15 de junho 2016 às 15:00 como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Prof^a. Dr^a. Regiane Gonzalez da Silva

Orientador

Profa. Dr. Odinei Hess Gonçalves

Membro da banca

Prof. Dr. Bogdan Demckzuk Junior

Membro da banca

Nota: O documento original e assinado pela Banca Examinadora encontra-se na Coordenação do Curso de Engenharia de Alimentos da UTFPR *Campus* Campo Mourão.

AGRADECIMENTOS

Em todos os momentos da nossa vida devemos agradecer as dificuldades ultrapassadas, as várias oportunidades que nos foram dadas e principalmente as vitórias que alcançamos.

Nesse momento aproveito primeiramente para agradecer a Deus por me conceder saúde e força para que esse trabalho de conclusão de curso fosse concluído.

Aos meus pais e minhas irmãs que não mediram esforços para que eu pudesse estar aqui realizando um sonho e que mesmo longe me incentivaram com palavras de afeto e carinho, nunca deixando com que eu me sentisse desamparada.

A UTFPR, pelas oportunidades de iniciações que a mim foram concedidas, à coordenação do curso de Engenharia de Alimentos e ao corpo docente por ter os melhores profissionais que uma instituição poderia ter, a orientadora Regiane da Silva que me acompanhou desde o início do curso e não mediu esforços para me auxiliar durante essa trajetória acadêmica e a minha co-orientadora Fernanda V. Leimann pelos conhecimentos compartilhados, pela disponibilidade e por ter tamanha paciência comigo. Vocês foram essenciais para que esse trabalho fosse realizado, serei eternamente grata.

Aos meus colegas de laboratório, que me auxiliaram e foram de suma importância durante as análises: Aline e Alexandre, obrigada pelos ensinamentos e pelas risadas das quais fez os meus dias mais leves e descontraídos.

Aos meus amigos amados que fiz em Campo Mourão e que mesmo perto ou longe compartilharam de muitos momentos de desespero e de felicidade. Isadora, Paula, Sara, Nathália, Leslén, Vô, Maki, Giovani, Júlia e ao Professor Alexandre por todo o apoio concedido nessa etapa da vida. Vocês foram essenciais levarei cada um comigo sempre.

Aos meus amigos do ômega, Matheus Hernandes, Danilo Malacoski, Rafael Perbeline, Rafael de Pauli, Larissa Venturini, Maria Elisa e Guilherme Miotto, que se tornaram uma família do coração.

Aos meus amigos de Cambira e Apucarana em especial meus amigos Lorena e Renan, agradeço por permanecerem em minha vida durante todos esses anos.

E por fim, a todos que participaram ou colaboraram de alguma forma no desenvolvimento deste projeto, a todos, muito obrigada!

*“Até os adolescentes podem esgotar-se, e jovens robustos podem cambalear, mas aqueles que esperam no Senhor renovam suas forças; ele dá-lhes asas de águia.
“Correm sem se cansar, vão para frente sem se fatigar.”*

Isaías 40:30,31

RESUMO

SILVA, Tamires Barlati Vieira da. **Desenvolvimento de carreadores poliméricos para a liberação de glicose**. 2016.38f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Engenharia de Alimentos), Departamento Acadêmico de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2016.

A hipoglicemia é uma doença originada do baixo nível de glicose no sangue e as pessoas portadoras de diabetes tipo 1 são as mais afetadas, principalmente os jovens e as crianças. É no período noturno que apresentam-se a maioria dos casos devido à falta de monitoramento da glicose. Uma alternativa para aumentar o tempo de manutenção da glicose seria o desenvolvimento de sistemas que controlem essa liberação. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo sintetizar hidrogéis de gelatina e de caseinato de sódio, reticulados com transglutaminase, contendo glicose e caracterizá-los. Foram produzidos quatro formulações de hidrogéis e seus respectivos brancos, ou seja, sem glicose. Sendo avaliadas as condições: o material utilizado para a fabricação dos hidrogéis e o tratamento de secagem em estufa por convecção de ar e por liofilização. Para caracterizá-los realizou-se análises de liberação em água por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), avaliação da estabilidade térmica dos hidrogéis por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e a caracterização dos hidrogéis obtidos por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). As amostras produzidas se diferenciaram através do tratamento de secagem utilizado, onde foram secas em estufa apresentaram aspecto vitrificado e as secas no liofilizador apresentaram aspecto esponjoso. Em relação à análise de liberação, as amostras secas em estufa apresentam maior taxa inicial de liberação. No entanto observou-se que a quantidade de glicose total liberada foi maior para os hidrogéis liofilizados. Quanto às análises de DSC foi verificado de que a glicose se encontra na fase amorfa, auxiliando então na retenção de água, conseqüentemente na liberação, devido se encontrem na forma amorfa possuem maior capacidade de liberação. Na análise do FTIR verificou-se que, através da presença da banda referente ao grupamento amida monosubstituída nos hidrogéis com e sem glicose, houve reticulação. Além do deslocamento da banda C-O no hidrogel reticulado, onde pode ser indicada a interação entre a glicose e a matriz polimérica. Deste modo foi possível a síntese dos hidrogéis caracterizados por apresentarem alta capacidade de absorção e pela eficácia na liberação da glicose.

Palavras-Chaves: Hidrogel; Glicose ; Liberação.

ABSTRACT

SILVA, Tamires Barlati Vieira da. **Development of polymeric carriers for glucose release**. 2016. 38 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Engenharia de Alimentos), Departamento Acadêmico de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2016.

Hypoglycemia is a disease caused by low blood glucose levels that affects people with diabetes type 1, especially young people and children. Most of cases occurs at night due to lack of glucose monitoring. An alternative to increase glucose level maintenance could be by developing systems that could control glucose release. Thus, this study aims to synthesize and characterize gelatin and sodium caseinate hydrogels, crosslinked with transglutaminase containing glucose. Four types of hydrogels and their respective controls (without glucose) and produced where the conditions evaluated were the material used to manufacture the hydrogel and drying treatment. To characterize glucose release from hydrogels to water the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method was applied, and the thermal stability by Differential Scanning Calorimetry (DSC) as well as the characterization of the hydrogels obtained by Infrared Spectroscopy Fourier Transform (FTIR) were performed. The samples produced were differentiated through the drying treatment used. Oven-dried samples showed a glassy characteristic and the freeze-dried samples presented a porous structure. Regarding to the release analysis the samples dried in an oven presented higher initial rate of release. However, it was observed that the total amount of released glucose was higher for the freeze dried hydrogels. For DSC analysis it was found that glucose was in the amorphous phase in hydrogels matrix, so aiding in the retention of water, thereby the release. For FTIR analysis it was confirmed the enzymatic crosslinking by the presence of the monosubstituted amide group band in hydrogels with and without glucose. Furthermore, the displacement of the C-O band in the crosslinked hydrogel, which can be indicated the interaction between glucose and the polymeric matrix. Thus it was possible to synthesize hydrogels having high absorption capacity and the efficiency in release of glucose.

Key Words: Hydrogel; glucose; Release.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo ilustrativo da reticulação enzimático com transglutaminase do caseinato. Fonte Song et al. (2010).	9
Figura 2. Os espectros de FTIR de gelatina, transglutaminase, glicose, HGE (hidrogel de gelatina seco em estufa) e HGL (hidrogel de gelatina liofilizado).....	14
Figura 3. Os espectros de FTIR de caseinato de sódio, transglutaminase, glicose, HCE (hidrogel de caseinato seco em estufa) e HCL (hidrogel de caseinato liofilizado).....	15
Figura 4. Termogramas de DSC de gelatina, transglutaminase, glicose, HGE (hidrogel de gelatina seco em estufa) e HGL (hidrogel de gelatina liofilizado).....	16
Figura 5. Termogramas de DSC de caseinato, transglutaminase, glicose, HCE (hidrogel de caseinato seco em estufa) e HCL (hidrogel de caseinato liofilizado).	17
Figura 6. Liberação controlada de glicose.....	19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Descrição dos métodos de secagem utilizados.	10
Tabela 2- Valores de Tg e ΔH da gelatina, caseinato, transglutaminase, glicose, HGE (hidrogel de gelatina seco em estufa), HGL (hidrogel de gelatina liofilizado), HCE (hidrogel de caseinato seco em estufa) e HCL (hidrogel de caseinato liofilizado).....	18
Tabela 3- Porcentagem de liberação inicial e final de glicose nos hidrogéis.....	19

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. <i>Objetivo geral</i>	4
2.2. <i>Objetivos específicos</i>	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. <i>Hidrogéis e liberação controlada</i>	6
3.3. <i>Gelatina</i>	7
3.4. <i>Caseinato de sódio</i>	8
3.5. <i>Transglutaminase</i>	8
3.6. <i>Hipoglicemia</i>	5
4. MATERIAL E MÉTODOS	10
4.1 Materiais	10
4.2 <i>Síntese dos hidrogéis</i>	10
4.3 <i>Caracterização química por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR, Fourier Transform Infrared Spectroscopy)</i>	11
4.4 <i>Caracterização térmica por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC, Diferencial Scanning Calorimetry)</i>	11
4.5 <i>Liberação in vitro da glicose</i>	11
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
5.1 <i>FTIR</i>	13
5.2 <i>DSC</i>	16
5.3 <i>Liberação controlada de glicose</i>	18
6. CONCLUSÃO	21
7.REFERÊNCIAS.....	22

1. INTRODUÇÃO

Hidrogéis são redes poliméricas tridimensionais de fácil aplicabilidade devido suas características de absorver e reter quantidades significativas de água, sem se dissolver (KABIRI et al., 2003). A estrutura dos hidrogéis depende de vários parâmetros como a densidade da rede polimérica e a constituição química, uma vez que os mesmos definem tanto a capacidade de absorção de água bem como a maneira através da qual é feita a ligação das cadeias das redes poliméricas. Em geral essas redes podem ser classificadas em permanentes ou temporárias dependendo da maneira em que são formadas: (i) hidrogéis do tipo químico ou permanente, originários de ligações covalentes resultantes de modificações ou reações, (ii) hidrogéis temporários obtidos através de interação física ou forças de van der Waals a exemplo das ligações de hidrogênio (OVIEDO et al., 2008; BHATTARAI; GUNN; ZHANG, 2010).

A síntese dos hidrogéis pode ser feita a partir de polímeros naturais ou sintéticos, o que os diferenciam é a força mecânica não satisfatória dos naturais e as propriedades bioativas não tão boas dos sintéticos. Sua aplicação inclui a utilização como matriz para liberação controlada de determinados componentes biologicamente ativos (BAJPAI et al., 2008). Além da constituição do polímero, outro fator que influencia nas propriedades finais dos hidrogéis é a sua estrutura morfológica que pode ser alterada em função de métodos de secagem após sua síntese. Por exemplo, o modo e a temperatura com que o hidrogel é seco podem proporcionar propriedades distintas na estrutura destes. Dentre estes processos, os hidrogéis podem ser secos em estufa, umidade e corrente de ar controlado. Este método é de grande aplicação devido ao baixo custo. Outro processo importante é a liofilização que, apesar do custo mais elevado com maior gasto energético, consiste na desidratação de produtos em condições de pressão e temperatura controladas. Neste caso a amostra é, primeiramente, congelada (-90 °C) e a água transferida do estado sólido para o gasoso por sublimação. O processo é realizado no vácuo e a baixas temperaturas (GAVA, 1994).

Quando os carregadores estão totalmente secos ao serem exposto a qualquer tipo de fluido têm suas cadeias poliméricas intumescidas. Durante a expansão, a rede reticulada e tende à retração para conter as cadeias do polímero, sendo este efeito denominado força elástica retrativa. Devido à essa força elástica deve-se levar em

consideração a diferenciação do parâmetro intumescimento, sendo este proporcional ao peso do hidrogel, a influência no coeficiente de difusão do soluto, mobilidade, molhabilidade e nas propriedades mecânicas do hidrogel, assim como a viscosidade da dispersão do polímero nos poros (BHATTARAI; GUNN; ZHANG, 2010). Neste contexto pode-se destacar o uso de membranas poliméricas reticuladas que possuem propriedades ótimas para serem aplicadas em diversas áreas, como farmacêuticas, cosmética, agrícola, entre outras (OLIVEIRA, 2004; SILVA, 2014). Sua aplicação inclui a utilização como matriz para liberação controlada de determinados componentes biologicamente ativos (BAJPAI et al., 2008).

Nos últimos anos, devido à mudança que ocorreu no estilo de vida das pessoas, o modo como elas se alimentam também mudou, e isso vem acarretando diversos problemas, sendo um deles a diabetes. A Organização Mundial da Saúde (OMS) aferiu que a quantidade de portadores de diabetes vem crescendo cada vez mais e que cerca de 220 milhões de pessoas no mundo são portadores da doença e, através de estimativas este índice tende a dobrar em 2025 (OMS, 2014). A diabetes normalmente demora para identificada e controlada devido aos sintomas serem discretos dentre os podem ser citados: vontade constante de urinar, fome e sede em excesso, fraqueza, tremores, perda de peso e aumento da quantidade de glicose no sangue, uma vez que o metabolismo não é tão mais eficaz, após o mesmo adquirir a doença (BERNE et al., 2000; GODOY, 2000; SAID et al., 2002).

Ao contrário da diabetes, a hipoglicemia é caracterizada por um teor muito baixo de glicose no sangue, que é decorrente da má alimentação, ou intervalos muito grandes entre as refeições. Este fenômeno se dá com maior frequência no período da noite, podendo levar o indivíduo portador a óbito. Uma vez que a hipoglicemia representa a falta de glicose no organismo, a insulina tem como função metabolizar a glicose do organismo, pode causar em indivíduos diabéticos episódios de hipoglicemia quando a mesma for aplicada de forma descontrolada (GUYTON; HALL, 2002).

Estudos mostram avanços significativos nos estudos de novas formas de dosagem de drogas com o desenvolvimento da liberação controlada. As formulações desenvolvidas para liberação controlada fazem com que engenheiros e farmacêuticos trabalhem juntos com o objetivo comum de produzir produtos mais eficientes (DASH et al., 2010). Nos sistemas de liberação controlada a droga é incorporada numa estrutura polimérica, de tal modo que o fármaco é libertado de uma maneira pré-definida (BHATTARAI; GUNN; ZHANG, 2010).

Com base no referencial teórico descrito, pode-se evidenciar que há um extenso campo de pesquisa para o desenvolvimento de novas alternativas de materiais obtidos a partir da gelatina e do caseinato de sódio devido as suas propriedades, fácil obtenção e baixo custo. Devido à possibilidade de utilização de hidrogéis na liberação controlada de compostos bioativos, propõe-se a utilização de hidrogéis de gelatina e caseinato de sódio como carreadores de glicose. Esta proposta visa atender à necessidade da administração de glicose em pacientes diabéticos durante o período noturno.

2. OBJETIVOS

2.1. *Objetivo geral*

Produção e caracterização de hidrogéis de gelatina e de caseinato de sódio reticulados enzimaticamente contendo glicose.

2.2. *Objetivos específicos*

- Sintetizar hidrogéis de gelatina e caseinato de sódio reticulados com a enzima transglutaminase;
- Incorporar glicose aos hidrogéis sintetizados e caracterizar a sua liberação em água por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Avaliar a estabilidade térmica dos hidrogéis por Calorimetria Diferencial de Varredura (*Differential Scanning Calorimetry*, DSC) ;
- Caracterizar os hidrogéis obtidos por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, FTIR);

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Hipoglicemia

A hipoglicemia é resultante do baixo nível de glicose no sangue e que pode ocasionar graves consequências para o organismo, atinge com frequência muito dos pacientes diabéticos no período noturno (GUYTON; HALL, 2002). Devido à falta de monitoramento, as pessoas que sofrem com essa variação de glicose no sangue não percebem a seu estado hipoglicêmico. Deste modo, não é feita a adequação das doses de insulina o que leva a graves episódios da queda da glicose e podem resultar em convulsões, problemas neuropsicológicos e mortes. O tratamento é simples e pode ser realizado através do consumo de carboidratos e proteínas que tem ação imediata (BEREGSZASZG et al., 1997; TRAN et al., 2007; AHMET et al., 2011).

Normalmente o tratamento é feito através de doses administradas de glicose ou glucagon. Quando o caso é considerado grave, a administração de glicose é feita intravenenosa, pois tem efeito imediato. Porém, quando a quantidade de glicose no sangue se encontra baixa durante o sono, sua capacidade de percepção é mínima (WAJCHENBERG et al., 2000; KALERGIS et al., 2003; AHMET et al., 2011).

A prevenção ou a redução da possibilidade de acontecimentos de hipoglicemia noturna trariam benefícios não apenas ao diabético, mas às pessoas envolvidas no cuidado do paciente para as quais há preocupação com este aspecto negativo da insulino terapia (WAJCHENBERG et al., 2000). O controle do nível de glicose é essencial para reduzir as complicações provocadas pela diabetes, isto engloba a sua absorção no intestino e a captação de glicose pelos tecidos (MARTEL, 2009). Neste contexto, sistemas de liberação controlada de glicose poderia ser uma alternativa promissora no combate à hipoglicemia noturna. Para alcançar este propósito, a glicose incorporada em hidrogéis gelatina e de caseinato, poderiam ser ingeridos antes de dormir, e então ser liberada continuamente na corrente sanguínea, atuando de forma a manter a glicemia estável durante o período noturno.

3.2. Hidrogéis e liberação controlada

Pode-se dizer que os hidrogéis são redes tridimensionais de polímeros, formadas através de vias química, física ou enzimática e que possuem como característica principal o poder de absorver quantidades significativas de água sem solubilizar-se. Os polímeros que geram tais redes podem ser de origem natural, como a gelatina (HE et al., 2016), amido (ACOSTA et al., 2016), caseinato de sódio (Elzoghby et al., 2011) ou sintética como poli(álcool vinílico) (OH et al., 2016), poli(vinil pirrolidona) (SHI et al., 2016) ou poli(etileno glicol) (NEHLS et al., 2016).

O estudo e aplicação de hidrogéis para encapsulação e liberação de drogas e compostos bioativos vêm aumentando devido sua capacidade de absorção e liberação de líquidos enquanto mantêm sua estrutura tridimensional. A utilização desses carreadores poliméricos é uma das técnicas de liberação controlada mais utilizadas devido às suas vantagens, tais como, versatilidade, eficácia e baixo custo. Nestes sistemas matriciais o composto a ser liberado pode estar homogeneamente disperso no carreador, sua liberação envolve processos físicos e químicos, tais como: penetração de água no carreador, difusão do fármaco pelos poros do carreador, degradação do polímero ou por difusão juntamente com a degradação (LYRA, 2007).

Quando se trata de hidrogéis, a porosidade é o fator determinante em relação à retenção de compostos nos mesmos. A porosidade permite que haja um carregamento das substâncias que estão incorporadas no hidrogel pelo solvente do seu interior para o meio fluido. Conseqüentemente a porosidade influencia diretamente na liberação desse fármaco a uma taxa dependente do coeficiente de difusão da molécula ou macromolécula liberada (HOARE et al. 2008).

O método de secagem proporciona características morfológicas e estruturais internas diferentes nos hidrogéis podendo provocar modificações no arranjo tridimensional nas redes poliméricas durante a remoção da água (WANG et al., 2012). Dentre os diversos métodos de secagem, a secagem por convecção de ar é o método em que o calor é transferido para o hidrogel em condições de temperatura, umidade e fluxo de ar controladas.

Nesse método o diferencial se dá através do uso do resfriamento rápido, que produz uma instabilidade termodinâmica dentro de um sistema e causa a separação das fases. Devido à separação de fases, o solvente é removido por sublimação á vácuo

deixando espaços vazios nas regiões que anteriormente eram ocupados. (ANNABI et al., 2010).

Risbud et al. (2000) sintetizaram hidrogéis de poli(vinil pirrolidona) e estimaram os dois tipos de secagem, em estufa de convecção de ar e por liofilização, e observaram poros de até 39 μ m nos hidrogéis secos pelos dois processos. Os autores explicam que devido ao hidrogel liofilizado ser poroso ele oferece uma maior área de superfície de contato conseqüentemente uma melhor interação matriz-solvente, facilitando a absorção rápida do solvente. Também notaram que o hidrogel de Quitosana – PVP liofilizado libera de 40 a 58% de amoxicilina em 1 h, e o hidrogel seco ao ar libera apenas de 12,5 a 18%.

Lien et al. (2009) também analisaram hidrogéis, sendo que os mesmos eram sintetizados de gelatina reticulados com genipina e obtiveram poros de 50 a 500 μ m, a genipina é um agente reticulante naturalmente biocompatível, que pode ser obtida a partir do fruto *Gardenia jasminoides* Ellis, um erva medicinal tradicional chinesa (ZZAMAN; YANG, 2013).

3.3. Gelatina

A gelatina é classificada como um biopolímero natural solúvel e amplamente utilizada nas indústrias biomédica, fotográfica e de alimentos, devido ao seu baixo custo e multifuncionalidade. Sua obtenção é feita através da degradação hidrolítica química de colágeno (insolúvel) a partir do tecido conjuntivo ou de pele de animais. É composta por extensas cadeias de aminoácidos ligados, com glicina, prolina e hidroxiprolina, sendo as duas últimas responsáveis pela formação de uma estrutura única auxiliam na estabilidade durante a formação de tripla hélice feita através de ligações de hidrogênio intercadeias (SCHRIEBER et al., 2007).

Devido à suas características biocompatíveis e biodegradáveis, a gelatina é muito utilizada como material encapsulante na liberação controlada de compostos podendo os sistemas de liberação variar entre hidrogéis, filmes, microesferas e nanopartículas (LAI, 2013; KHAN; SCHENEIDER, 2013). Sua estrutura possui diversos grupos funcionais como -NH₂, -SH e -COOH que formam estruturas tripla-hélice, permitindo várias maneiras de rearranjo e direcionamento de ligantes, como no caso de agentes reticulantes que auxiliam no fortalecimento da rede (KHAN; SCHENEIDER, 2013; LIU; LIU; WANG., 2011).

O uso da transglutaminase para reticular gelatina tem como finalidade aumentar o tempo de liberação controlada de compostos de interesse a partir de hidrogéis. Essa aplicação vem sendo estudada por diversos autores como Nawong et al., (2016) que avaliaram a liberação controlada de bactérias ácido lácticas probióticas a partir de micropartículas de gelatina-maltodextrina, e também Vichasilp et al., (2012) que avaliaram a liberação controlada de 1-deoxynojirimycin de amoreira (DNJ), um inibidor potente da α -glicosidase a partir de microesferas de gelatina.

3.4. Caseinato de sódio

A caseína é uma proteína de origem animal encontrada no leite como partículas coloidais, com o nome de micelas de caseína (SMYTH et al., 2004).

Devido à sua origem ser animal, a caseína é um polímero natural totalmente biodegradável e possui características que favorecem a formação de película, tais como, boa força adesiva e uma forte resistência de alta temperatura. Porém esta não apresenta boa resistência à água devido à sua estrutura, o que poderia restringir suas aplicações práticas (QUNNA et al., 2015).

Hidrogéis de caseinato têm sido utilizados para encapsulação de compostos de interesse como: flutamida (ELZOGHBY et al., 2011), lipídeos poli-insaturados (ZHANG; DECKER; MCCLEMENTS, 2014) e vitamina B12 (SONG et al., 2010).

3.5. Transglutaminase

A transglutaminase é uma enzima encontrada na natureza, no fígado e no sangue dos mamíferos, em plantas e pode ser extraída através de fermentação utilizando *Streptoverticillium mobaraense*. Possui a capacidade de catalisar reações de aciltransferência de grupos γ -carboxiamídico de resíduos de glutamina da cadeia polipeptídica para vários receptores como as amins primárias e de grupos ϵ -amino de lisina em substratos protéicos (YOKOYAMA; NIO; KIKUCHI, 2004). Esta vem se destacando na área alimentícia, devido sua capacidade de melhorar a textura dos alimentos, de auxiliar formação de géis e no aumento do valor nutricional das proteínas devido à incorporação de aminoácidos limitantes sobre o material original (SOARES et al., 2004).

Na formação de hidrogéis a transglutaminase é utilizada como agente reticulante, possibilitando a formação de ligações cruzadas no interior das cadeias de gelatina por meio da modificação enzimática. Estas ligações são estáveis e não se desfazem com o aquecimento ou presença de sal e fosfato (CARVALHO; GROSSO, 2006). O aumento da força do hidrogel de gelatina submetido à ação da enzima depende da ordem e intensidade com que esta forma as ligações cruzadas. Fatores como temperatura de reação ou incubação são determinantes no grau de reticulação (CARVALHO; GROSSO, 2004; CARVALHO; GROSSO, 2006).

De acordo com Song et al., (2010) quando os grupos ϵ -amino de um resíduo peptídico de lisina atua como o substrato, as duas cadeias peptídicas são covalentemente ligadas através de uma ligação ϵ -(-glutamil)lisina (Figura 1).

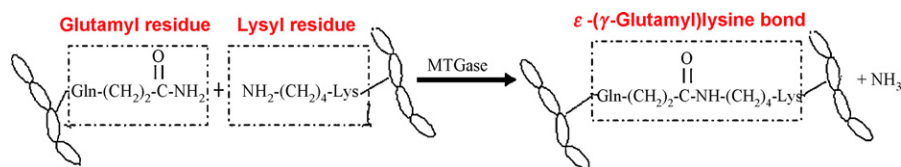


Figura 1. Mecanismo ilustrativo da reticulação enzimático com transglutaminase do caseinato.

Fonte: Song et al., (2010).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais

Para o desenvolvimento do presente trabalho foram utilizados caseinato de sódio (Sigma-Aldrich), glicose (sigma-Aldrich), transglutaminase (Ajinomoto, Activa WS) e gelatina (Vetec).

4.2 Síntese dos hidrogéis

Foram produzidos hidrogéis de gelatina e de caseinato de sódio de acordo com a metodologia descrita por Chambi e Grosso (2006) com algumas modificações. Na Tabela 1 estão apresentados os códigos de descrição das amostras. Primeiramente foram dissolvidos 4,2 g de gelatina ou de caseinato de sódio (7 % p/p) em água destilada (60 mL) a 50 °C sob agitação magnética e então a glicose foi adicionada (2,42 g). A mistura foi resfriada até temperatura ambiente e então a transglutaminase (20 unidades ativas/g proteína) foi acrescentada ainda sob agitação. Por fim, a solução resultante foi vertida em formas de silicone de 4 x 9 cm e levadas para estufa de convecção de ar (Cienlab) a 50 °C por 15 minutos. Em seguida, a temperatura foi elevada à 85 °C para inativação da enzima por 10 minutos. Finalmente, as formas de silicone foram levadas para secagem dos filmes por meio de dois tratamentos: em estufa (Cienlab) à 40 °C por 48 horas ou em ultra-freezer (Liotop) a -90 °C sendo, posteriormente, liofilizadas por 24 h (Liotop L101). Na preparação do branco realizou-se o mesmo procedimento, mas sem a incorporação da glicose.

Tabela 1-Codificação e descrição dos tratamentos utilizados.

Código	Proteína	Método de secagem
HGL	Gelatina	Liofilização
HGE	Gelatina	Estufa
HCL	Caseinato de Sódio	Liofilização
HCE	Caseinato de Sódio	Estufa

4.3 Caracterização química por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR, Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

Para análise da interação entre os componentes dos hidrogéis e caracterização das ligações químicas formadas após a síntese dos mesmos foi realizado ensaio de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). Para isto, com auxílio de um pistilo e um almofariz, 10 mg de amostra foram trituradas juntamente com 0,2 g de brometo de potássio (KBr) para formação da pastilha, possibilitando a análise. As pastilhas foram produzidas em um pastilhador submetido a 7 kgf/cm² de pressão em prensa hidráulica (Bovenau, P15 ST). A leitura do espectro foi realizada em espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (IR AFFINITY-1, Shimadzu) na faixa de 4000-400 cm⁻¹ utilizando 32 acumulações e resolução de 4 cm⁻¹.

4.4 Caracterização térmica por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC, Diferencial Scanning Calorimetry)

As análises de DSC foram realizadas utilizando-se um equipamento Perkin Elmer (DSC, 4000). O equipamento foi calibrado com zinco e índio. As massas das amostras analisadas foram de aproximadamente 5 mg colocadas dentro de painéis de alumínio. As rampas de aquecimento realizadas foram entre 0 e 300 °C a razão de aquecimento de 20°C/min, sob fluxo de nitrogênio gasoso (20 mL/min).

4.5 Liberação in vitro da glicose

A liberação controlada da glicose foi avaliada a partir dos hidrogéis de gelatina e caseinato e sódio, secos em estufa e liofilizados. Para tanto, aproximadamente 1 g de hidrogel foi adicionado a 20 mL de água destilada a temperatura ambiente (20 °C) e mantido sob agitação magnética branda (100 rpm). Imediatamente uma amostra de 200 µL foi retirada com auxílio de uma micropipeta e este volume de meio de liberação (água destilada) foi repostado. A amostra de 200 µL foi filtrada em filtro de seringa de nylon (0,45 µm, Allcrom) e inserida em um *insert* acoplado a um vial de cromatografia líquida. A amostra foi então analisada em Cromatógrafo à Líquido de Alta Eficiência

(CLAE, Ultimate 3000, Dionex) operando com as seguintes especificações: coluna X-bridge Waters, C18, 5 μm , 4,6 mm x150mm, acoplado a um detector de índice de refração, RI-101, Shodex, de fluxo de água Milli-Q de 1 mL/min, 40 °C e volume de injeção de amostra de 5 μL . Uma curva de calibração foi preparada previamente para determinação das concentrações durante a liberação. As amostras de meio de liberação foram coletadas com intervalos de 0, 5, 15, 30, 60, 120, 180 e 240 min de liberação. O cálculo do percentual de glicose liberado foi realizado considerando a massa de glicose inicial na amostra ($0,3551 \text{ g}_{\text{glicose}}/\text{g}_{\text{amostra}}$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os carreadores produzidos além de se diferenciarem pela composição se diferiram pelo método de secagem. Os hidrogéis secos em estufa apresentaram aparência vitrificada e os hidrogéis liofilizados apresentaram aspecto esponjoso (poroso) e esbranquiçado. Cao et al. (2007) notaram que a seção transversal dos filmes de gelatina apresentou uma diminuição do volume livre Guan et al. (2013) também ressaltaram que o uso da Transglutaminaase como agente reticulante de gelatina resultou em filmes com uma microestrutura mais compacta. Os filmes produzidos de gelatina por Cao et al. (2007) and Jiang and Tang (2013) foram secos em temperatura ambiente Betul et al. (2003) e avaliaram o efeito da temperatura de secagem na microestrutura de filmes de glúten de trigo onde observou-se superfícies mais lisas quando secos à 50 ° C.

Durante a liofilização, materiais são secos por sublimação de cristais de gelo sob vácuo e a uma temperatura abaixo do ponto de congelamento de gelo (KANG et al., 1999). Nesses casos, o tamanho dos poros pode ser controlado através do tamanho do cristais de gelo formados durante o processo de congelamento. Peng e Chen (2011) explicam que a água livre no polímero é congelada, formando cadeias poliméricas para unir e condensar a estrutura, que se assemelha um favo de mel depois da sublimação do gelo.

Por outro lado, para o método de secagem ao ar, há mais tempo para evaporar a água, acarretando uma conformação da cadeia do polímero de equilíbrio (ZHANG et al., 2013; AHMAD et al., 2015;). Risbud et al. (2000) descobriram tamanhos de poros igual a 39 μm em filmes secos por liofilização de glutaraldeído reticulado com quitosana/ polivinil pirrolidona.

5.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Na Figura 2 estão contidos os espectros de infravermelho dos componentes puros utilizados na sintetização dos hidrogéis de gelatina e os espectros dos hidrogéis sintetizados. Na Figura 3 são demonstrados os resultados para os espectros dos componentes puros utilizados na sintetização dos hidrogéis de caseinato e os espectros dos hidrogéis sintetizados.

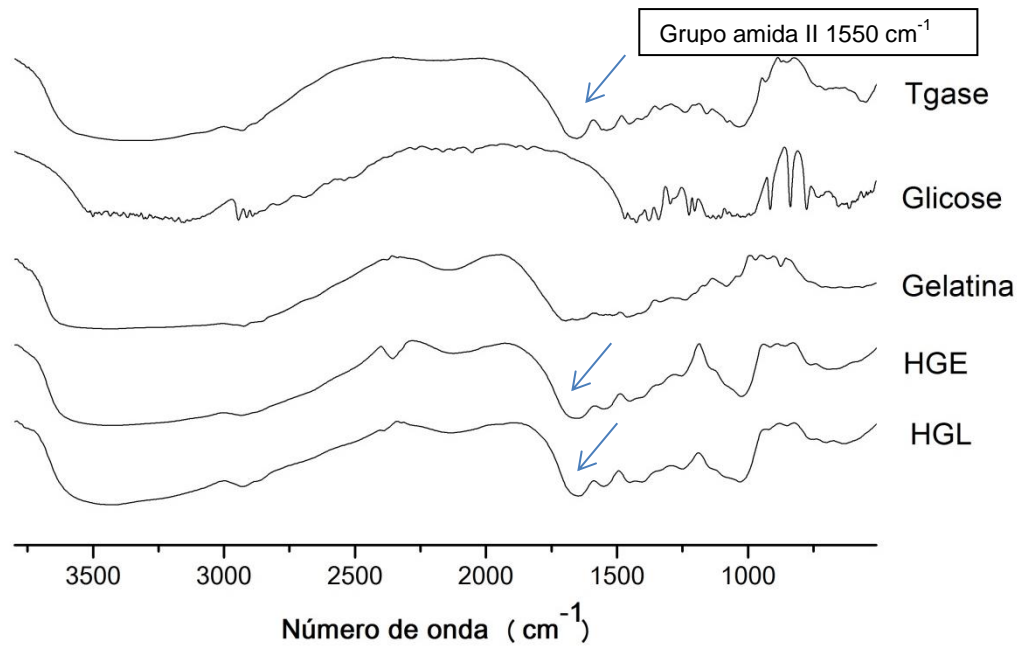


Figura 2. Os espectros de FTIR de gelatina, transglutaminase, glicose, HGE (hidrogel de gelatina seco em estufa) e HGL (hidrogel de gelatina liofilizado).

Através do espectro de FTIR da gelatina pura podem ser observadas as bandas de absorção específica para a amina NH (3068 cm^{-1}), amida I (1646 cm^{-1}) e amida II (1550 cm^{-1}). Já a banda de absorção mais específica da glicose ocorre na região de impressão digital (*fingerprint*) de 1062 a 997 cm^{-1} (Petibois et al., 2000) devido ao estiramento C-O. Por meio da Figura 3 esta banda pode ser observada entre (1086 e 933 cm^{-1}).

Uma vez que a gelatina apresenta tanto resíduos de grupamento glutamina quanto de lisina (FUCHSBAUER et. al., 1996; CORTESI et. al., 1999; CARVALHO e GROSSO, 2006;), o produto da reação de reticulação ocorre através da formação de um grupamento amida monosubstituída bem como amônia. Neste caso, pode-se dizer que o houve formação de hidrogéis reticulados covalentemente, pois como pode ser observada na figura 2 houve um aumento na intensidade da banda ($1630 - 1550\text{ cm}^{-1}$) dos hidrogéis comparado com a da gelatina pura. Isso se dá devido à ação da transglutaminase que promoveu as ligações de reticulação tais grupos.

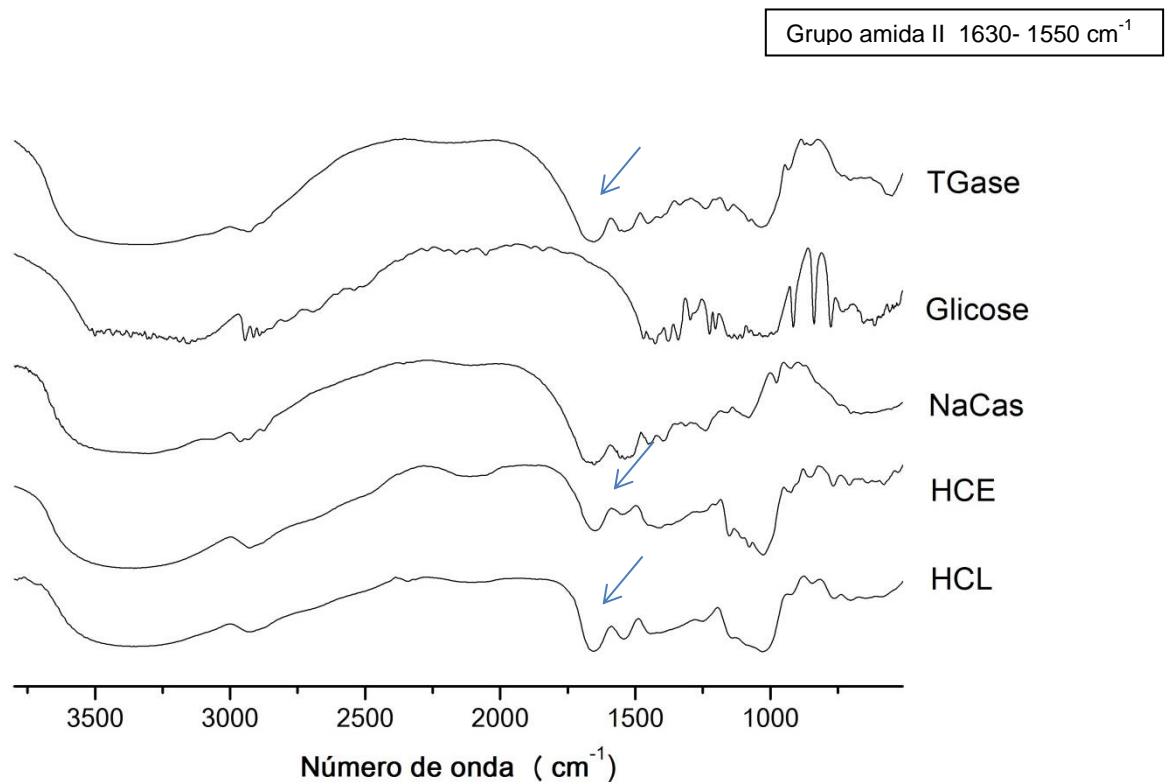


Figura 3. Os espectros de FTIR de caseinato de sódio, transglutaminase, glicose, HCE (hidrogel de caseinato seco em estufa) e HCL (hidrogel de caseinato liofilizado).

Avaliando a Figura 3 pode ser observada a presença da banda localizada em (1700-1750 cm⁻¹), referente ao grupamento C=O. Nesta Figura também é possível observar um aumento de intensidade da banda é possível observar que o caseinato também reticulou devido o aumento na intensidade da banda do grupamento amida monosubstituída (1630 – 1550 cm⁻¹). Nos hidrogéis esta banda tem a intensidade aumentada quando comparado com o caseinato puro, em função da criação das ligações de reticulação promovidas pela transglutaminase. Dessa forma é possível confirmar que a transglutaminase agiu como agente de reticulação na formação dos hidrogéis, ou seja, ajudou no fortalecimento das ligações e na textura do hidrogel.

É possível notar também a presença da banda característica do estiramento C-O na amostra de hidrogel contendo glicose HCE, a qual apresentou um deslocamento para a esquerda, localizando-se, então, entre 1130 e 953 cm⁻¹. Este deslocamento pode ser considerado como indicativo de interação entre a glicose e a matriz polimérica do hidrogel (DEV et al., 2010). De acordo com Puttipipatkachorn et al. (2001), as interações entre o encapsulado e a matriz polimérica levam a modificações na liberação dos compostos encapsulado.

5.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC, Diferencial Scanning Calorimetry)

Na Figura 4 estão contidos os termogramas de DSC dos componentes puros utilizados na síntese dos hidrogéis de gelatina e os termogramas dos hidrogéis sintetizados. Na Figura 5 são demonstrados os resultados para os termogramas dos componentes puros utilizados na síntese dos hidrogéis de caseinato e os termogramas do hidrogéis sintetizados.

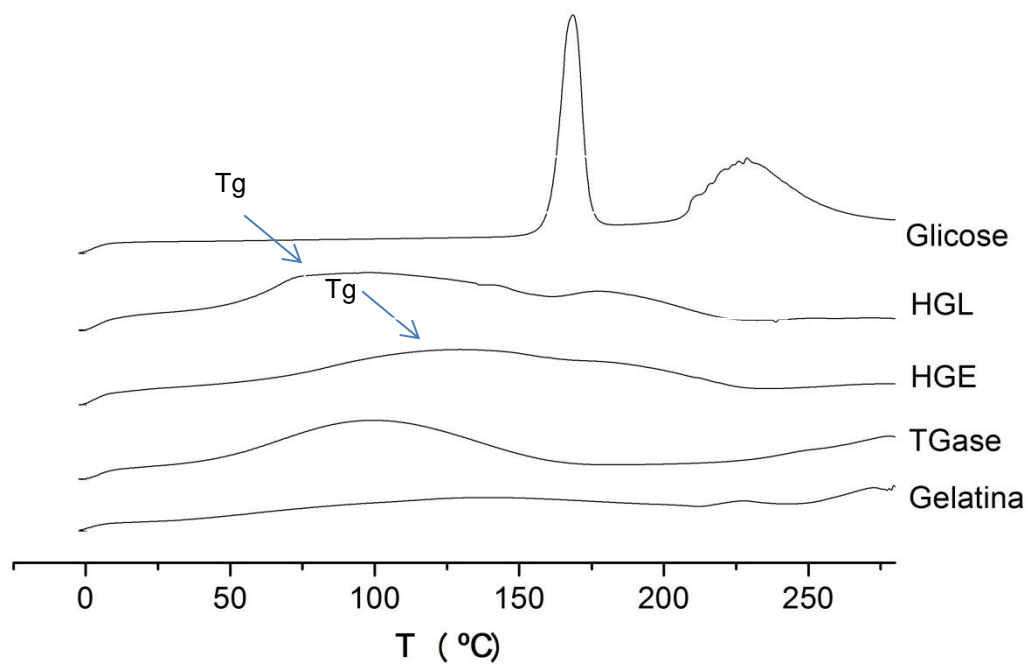


Figura 4. Termogramas de DSC de gelatina, transglutaminase, glicose, HGE (hidrogel de gelatina seco em estufa) e HGL (hidrogel de gelatina liofilizado).

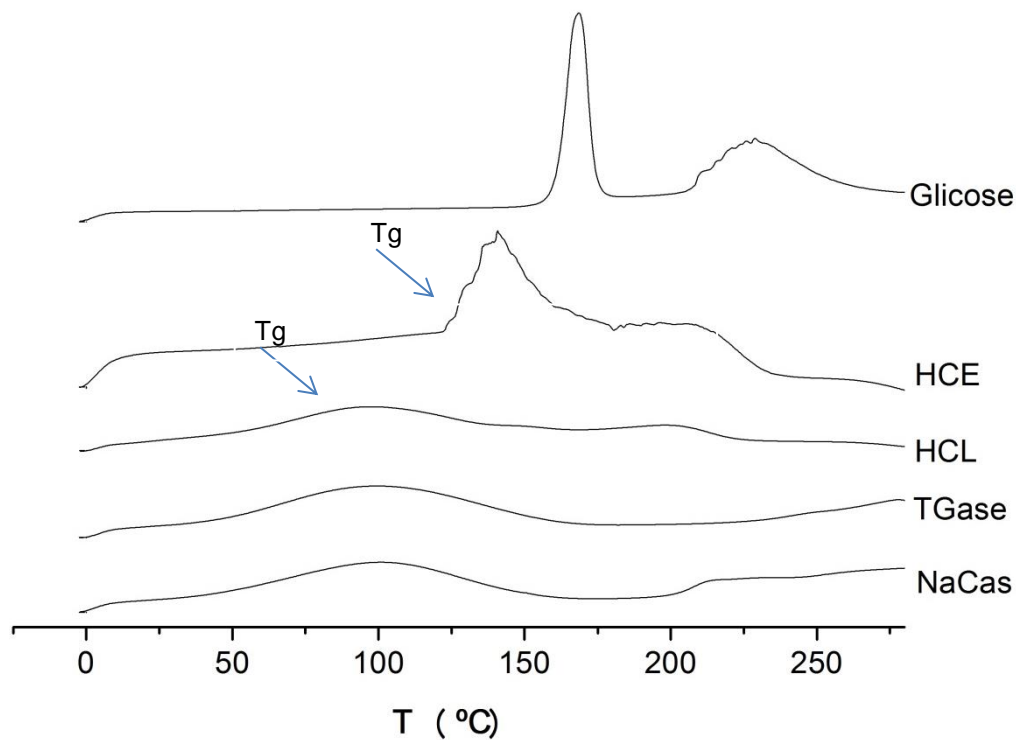


Figura 5. Termogramas de DSC de caseinato, transglutaminase, glicose, HCE (hidrogel de caseinato seco em estufa) e HCL (hidrogel de caseinato liofilizado).

Em relação às análises térmicas, nota-se que a temperatura de fusão cristalina (T_m) da glicose não apareceu em nenhum dos hidrogéis. Isso pode indicar que o composto encapsulado deve estar presente em um estado amorfo ou em um estado de solução sólida na matriz do polímero, ou ainda como uma fase desordenada no seu interior (YALLAPU; JAGGI; CHAUHAN; 2010). Neste caso, este resultado pode ser atribuído a formação de interação entre as moléculas de glicose e as cadeias reticuladas do hidrogel, as quais podem ter evitado a recristalização.

Quando uma estrutura possui componentes na sua forma amorfa possivelmente afetaria a entrada da água durante o inchamento e conseqüentemente influenciaria na liberação controlada. As estruturas amorfas se dão principalmente devido o processo de congelamento seguido de liofilização, onde a tendência da desordem no arranjo é maior. Já os géis secos em estufas possuem estruturas mais organizadas devido ao maior tempo de acomodação das cadeias.

Na Tabela 2 pode-se observar com detalhes a diferença das temperaturas de transição vítreas (T_g) em relação ao método empregado de secagem. Em relação aos

valores de Tg, pode ser observado os valores maiores para os hidrogéis secos em estufa, podendo ser observado também nas Figuras 4 e 5 o deslocamento do pico levemente para a direita. Em contrapartida, os hidrogéis liofilizados apresentaram valores de Tg inferiores confirmando a hipótese de estrutura amorfa uma vez que a matriz polimérica manteve a mesma conformação, durante o processo de secagem, ao contrário das amostras secas em estufas. Nas amostras liofilizadas o valor da entalpia de fusão também foi reduzido em relação as amostras de hidrogéis secos em estufa.

Tabela 2- Valores de Tg e ΔH da gelatina, caseinato, transglutaminase, glicose, HGE (hidrogel de gelatina seco em estufa), HGL (hidrogel de gelatina liofilizado), HCE (hidrogel de caseinato seco em estufa) e HCL (hidrogel de caseinato liofilizado).

Amostra	Tg(°C)	ΔH da glicose (J/g)
Gelatina pura	86,26	56,75
Caseinato de sódio puro	163,83	199,66
Transglutaminase	47,89	197,76
Glicose	155,84	206,76
HGE	221,78	181,67
HGL	217,88	144,75
HCE	181,69	117,90
HCL	38,77	88,87

5.3 Liberação controlada de glicose

Na Figura 8 estão apresentados os resultados obtidos para o estudo da liberação de glicose através dos hidrogéis por CLAE.

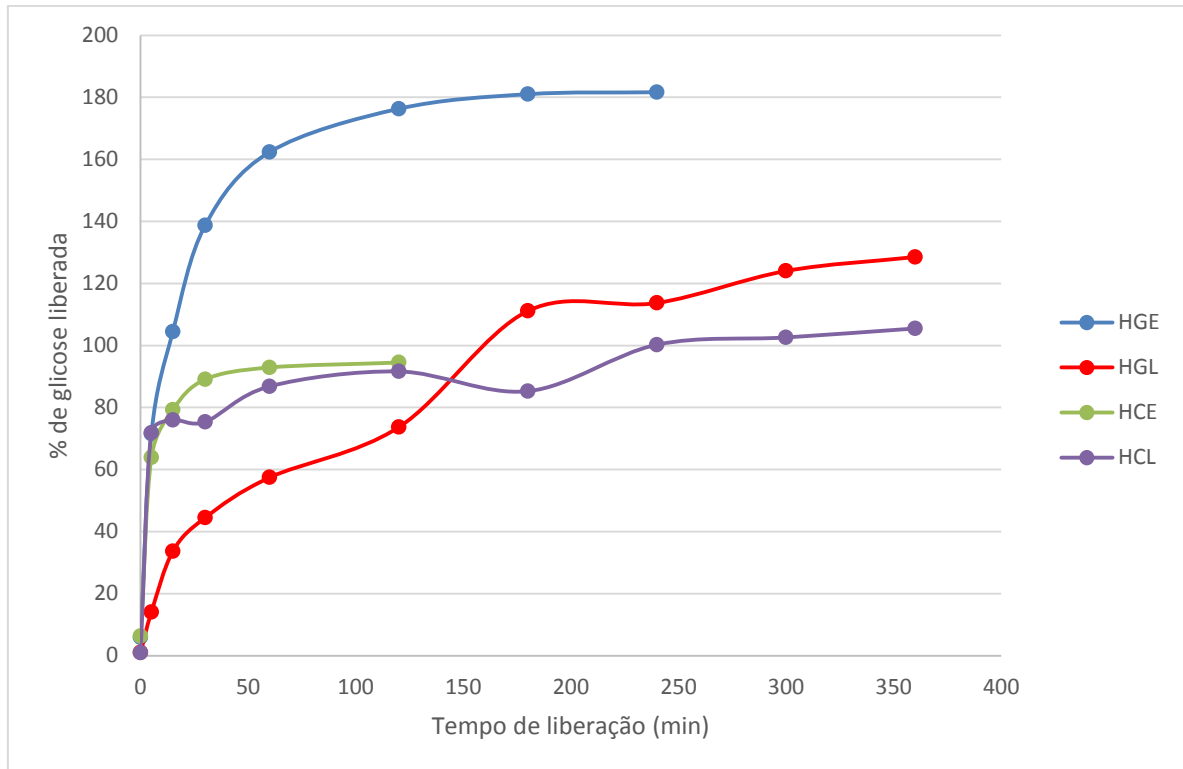


Figura 6. Liberação controlada de glicose

Tabela 3- Porcentagem de liberação inicial e final de glicose nos hidrogéis.

Amostra	% Liberação inicial	% Liberação final	Tempo de liberação
HGE	5,84	181,65	240 min
HGL	1,03	128,52	360 min
HCE	6,26	94,50	120 min
HCL	0,93	105,49	360 min

Conforme se pode observar através da análise dos resultados da Tabela 3, ao comparar os quatro hidrogéis que foram analisados na Figura 6 tem-se que o HCE além de apresentar maior taxa inicial de liberação de glicose também apresentou menor tempo para estabilizar a liberação de glicose. Pode-se observar ainda que a liberação inicial também ocorreu mais rapidamente em relação ao HGE do que em relação ao HGL. Este resultado mostra que os hidrogéis secos em estufa apresentam maior taxa inicial de liberação. Entretanto pode-se observar que a quantidade de glicose total liberada (% Liberação final) foi maior para os hidrogéis liofilizados. Isto

pode se dar pelo fato da matriz polimérica quando liofilizada apresenta sua estrutura altamente porosa a qual permite inicialmente somente a liberação inicial da glicose que esta contida em seu interior, mas que não interagem com as cadeias poliméricas. Além disso, a estrutura expandida devido ao processo de liofilização pode permitir maior interação entre as moléculas de glicose e as cadeias poliméricas resultando em uma maior quantidade de glicose absorvida e, portanto a uma maior taxa de liberação final. Por outro lado na matriz seca na estufa o processo de secagem leva ao empacotamento da matriz o que pode neste caso pode ter resultado na interação da glicose com as cadeias poliméricas de maneira mais homogênea quando comparado ao processo de liofilização, resultado em uma maior taxa inicial de liberação bem como a uma menor quantidade de glicose o que resulta na menor porcentagem de liberação final de glicose.

O hidrogel de gelatina liofilizado que de início apresentou uma liberação menor de glicose, foi o que liberou glicose em maior quantidade até atingir a estabilidade no período de 6 horas, juntamente com o HCE que após 5 min de experimento a matriz polimérica se desfez, e continuou o processo de liberação.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos foi possível sintetizar tanto os hidrogéis de gelatina reticulados com transglutaminase quanto os de caseinato.

Quanto aos espectros obtidos na análise do FTIR verificou-se que, através da presença da banda referente ao grupamento amida monosubstituída nos hidrogéis com e sem glicose, houve reticulação devido a ação da enzima transglutaminase. Além do deslocamento da banda C-O no hidrogel com glicose, onde pode ser indicada a interação entre a glicose e a matriz polimérica, garantindo a encapsulação deste carboidrato.

Nas análises de DSC foi verificado que a glicose se encontrou na fase amorfa no hidrogel, auxiliando então na retenção de água, conseqüentemente na liberação controlada medida por CLAE, onde verificou-se que os polímeros que foram liofilizados apresentaram melhor liberação da glicose em maior tempo.

Os resultados demonstraram que a técnica de reticulação utilizada foi adequada para liberação, encorajando a continuidade do estudo.

7.REFERÊNCIAS

ACOSTA, Manuel Jesús et al. Coenzyme Q biosynthesis in health and disease. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Bioenergetics**, [s.l.], v. 1857, n. 8, p.1079-1085, ago. 2016.

AHMAD, Parvaiz et al. Alleviation of Cadmium Toxicity in Brassica juncea L. (Czern. & Coss.) by Calcium Application Involves Various Physiological and Biochemical Strategies. **Saudi Journal Of Biological Sciences**. Yokohama, p. 1-17. 28 Jan. 2015.

AHMET, A.; DAGENAIS, S.; BARROWMAN, N. J.; COLLINS, C. J.; LAWSON, M. L. Prevalence of nocturnal hypoglycemia in pediatric type 1 diabetes: a pilot study using continuous glucose monitoring. **The Journal of Pediatrics**, v. 159, n. 2, 2011.

ANNABI, Nasim et al. Controlling the Porosity and Microarchitecture of Hydrogels for Tissue Engineering. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, [s.l.], v. 16, n. 4, p.371-383, ago. 2010.

ARAÚJO, A. R.; MARTEL, F. Regulação da absorção intestinal de glicose. **Arquivos de Medicina**, v. 23, n. 2, p. 35-43, 2009.

BAJPAI, A. K.; SHUKLA, S. K.; BHANU, S.; KANKANE, S., Responsive polymers in controlled drug delivery. **Progress in Polymer Science**, v. 33, p. 1088-1118, 2008.

BEREGSZASZG, M. et al. Hypoglycemia in Children and Adolescents Dependent Diabetes Mellitus: Prevalence. **The Journal of pediatrics**. Paris, v. 131, n. 1, p. 27-33, 1997.

BERNE, R. M.; GENUTH, S. M. **Fisiologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 190.

BETUL, S. K.; BAKIR, U.; YILMAZ, L.; AKKAS, N. Drying Temperature and Relative Humidity Effects on Wheat Gluten Film Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 964–968, 2003.

BHATTARAI, N.; GUNN, J.; ZHANG, M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Elsevier, n. 62, p. 83-99, 2010.

CAO, na; FU, Yuhua; HE, Junhui. Preparation and physical properties of soy protein isolate and gelatin composite films. **Food Hydrocolloids**, [s.l.], v. 21, n. 7, p.1153-1162, out. 2007.

CARVALHO, R. A.; GROSSO, C. R. F. Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. **Food Hydrocolloids**, v. 18, n. 5, p. 717- 726, 2004.

CARVALHO, R. A.; GROSSO, C. R. F. Efeito do tratamento térmico e enzimático nas propriedades de filmes de gelatina. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 495- 501, jul.-set. 2006.

CHAMBI, H.; GROSSO, C. Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase. **Food Res. Int.**, n. 39, p. 458–466, 2006.

CORTESI, R.; ESPOSITO, E.; OSTI, M.; SQUARZONI, G.; MENEGATTI, E.; DAVIS, S. S. NASTRUZZI, C. Dextran cross-linked gelatin microspheres as a drug delivery system. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 47, n. 2, p. 153-160, 1999.

DASH, S. et al. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. **Acta Poloniae Pharmaceutica ñ Drug Research**, v. 67, n. 3, p. 217–22, 2010.

DEV, A.; BINULAL, N. S.; ANITHA, A.; NAIR, S. V.; FURUIKE, T.; TAMURA, H.; JAYAKUMAR, R. Preparation of poly(lactic acid)/chitosan nanoparticles for anti-HIV drug delivery applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 833-838, 2010.

ELZOGHBY, Ahmed O.; EL-FOTOH, Wael S. Abo; ELGINDY, Nazik A.. Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems. **Journal Of Controlled Release**, [s.l.], v. 153, n. 3, p.206-216, ago. 2011.

FUCHSBAUER, H. L.; GERBER, U; ENGELMANN, J.; SEEGER, T.; SINKS, C.; HECHT, T. Influence of gelatin matrices cross-linked with transglutaminase on the properties of an enclosed bioactive material using P-galactosidase as model system. **Biomaterials**, v. 17, v. 15, p. 1481-1488, 1996.

GAVA, A. J. **Princípios de Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Nobel, 1994.

GODOY, P. **Pâncreas Endócrino**. In: BOGLIOLO, L. Patologia. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 1004-1008.

GUAN, Wen-juan et al. Transglutaminase 6 interacts with polyQ proteins and promotes the formation of polyQ aggregates. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 437, n. 1, p.94-100, jul. 2013.

GUYTON, A. C. ; HALL, J. E. Insulina, glucagon e diabetes mellitus. In: _____. **Tratado de fisiologia médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002. p. 827-840. 3

HE, Jiankang et al. Fabrication of circular microfluidic network in enzymatically-crosslinked gelatin hydrogel. *Materials Science And Engineering: C*, [s.l.], v. 59, p.53-60, fev. 2016.

HOARE, Todd R.; KOHANE, Daniel S.. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. **Polymer**, [s.l.], v. 49, n. 8, p.1993-2007, abr. 2008.

JIANG, Y.; TANG, CH. Effects of transglutaminase on sorption, mechanical and moisture-related properties of gelatin films. **Food Science and Technology International**, 19(2): 99–108, 2013.

KABIRI K, OMIDIAM H, HASHEMI SA, ZOHURIAAN-MEHR MJ (2003) Synthesis of fast-swelling superabsorbent hydrogels: effect of crosslinker type and concentration on porosity and 103 absorption rate. **European Polymer Journal**, 39 (7), 1341- 1348.

KALERGIS, M.; SCHIFFRIN, A.; GOUGEON, R.; JONES, P. J. H.; YALE, J.-F. Impact of Bedtime Snack Composition on Prevention of Nocturnal Hypoglycemia in Adults With Type 1 Diabetes Undergoing Intensive Insulin Management Using Lispro Insulin Before Meals. **Diabetes Care** 26, 9–15 (2003).

KANG, H.; TABATA, Y.; IKADA, Y. Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials** 20: 2–7, 1999.

LAI, J. Y. Influence of solvent composition on the performance of carbodiimide cross-linked gelatin carriers for retinal sheet delivery. **J Mater Sci: Mater Med**, New York, v. 24, p. 2201- 2210, Mai. 2013.

LIEN, Sio-mei; KO, Liang-yu; HUANG, Ta-jen. Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, [s.l.], v. 5, n. 2, p.670-679, fev. 2009.

LYRA, M. A.-S. (2 de julho de 2007). Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy** , pp. 784-793.

NAWONG, Siriwan et al. Entrapment in food-grade transglutaminase cross-linked gelatin–maltodextrin microspheres protects *Lactobacillus* spp. during exposure to simulated gastro-intestinal juices. **Food Research International**, [s.l.], v. 85, p.191-199, jul. 2016.

NEHLS, Eric M. et al. Enhanced user-control of small molecule drug release from a poly(ethylene glycol) hydrogel via azobenzene/cyclodextrin complex tethers. **J. Mater. Chem. B**, [s.l.], v. 4, n. 6, p.1035-1039, 2016.

OH, S. H. et al. Wide-range stiffness gradient PVA/HA hydrogel to investigate stem cell differentiation behavior. **Acta Biomaterialia**, [s.l.], v. 35, p.23-31, abr. 2016.

OLIVEIRA, R. A.; REZENDE, L. S.; MARTINEZ, M. A.; MIRANDA, G. V. Influência de um polímero hidroabsorvente sobre e a retenção de água no solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.8, n.1, p.160-163, 2004.

OMS. **Diabetes**, n. 312, 2014. Disponível em: . Acesso em: 20 nov. 2014.

OVIEDO, I. R.; MENDEZ, N. A. N.; GOMEZ, M. P. G.; RODRIGUEZ, H. C.; MARTINEZ, A. R. Design of a physical and nontoxic crosslinked poly(vinylalcohol) hydrogel. **International Journal of Polymeric Materials**, New York, v. 57, p. 1095-1103, 2008.

PETIBOIS, C.; MELIN, A. M.; PERROMAT, A.; CAZORLA, G.; DÉLÉRIS, G. Glucose and lactate concentration determination on single microsamples by Fourier-transform infrared spectroscopy. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 135, n. 2, 2000.

PUTTIPIPATKHACHORN, S.; NUNTHANID, J.; YAMAMOTO, K.; PECK, G. E. Drug physical state and drug-polymer interaction on drug release from chitosan matrix films. **Journal of Controlled Release**, v. 75, p. 143-153, 2001.

QUNNA,X.;FAN,Z.;JIANZHONG,M.;TAO,C.;JIANHUA,Z.;DEMETRIA,S.;GAIDAU,C.;
Facile synthesis of casein-based silica hybrid nano-composite for coatings: Effects of silane coupling agent. **Progress in Organic Coatings**. Editorial Board.Volume 88, Pages 1–7. November 2015.

RISBUD, M. V.; HARDIKAR, A. A.; BHAT, S. V.; BHONDE, R. R. pH-sensitive freeze dried chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogels as controlled release system for antibiotic delivery. **Journal of Controlled Release**, Elsevier, n. 68, p. 23-30, 2000.

SOARES, L. H. B.; ALBUQUERQUE, P. M.; ASSMANN, F.; AYUB, M. A. Z. Physicochemical properties of three food proteins treated with transglutaminase. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1219-1223, 2004.

SONG, F. et al. Novel casein hydrogels: Formation, structure and controlled drug release. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. Elsevier, n. 79, p. 142–148, 2010.

SCHIEBER, R. GARAI, H. 2007. **Gelatin handbook**: Theory and industrial practice. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

SHI, Y. et al. Swelling, mechanical and friction properties of PVA/PVP hydrogels after swelling in osmotic pressure solution. **Materials Science And Engineering: C**, [s.l.], v. 65, p.172-180, ago. 2016.

VICHASILP, Chaluntorn et al. A novel gelatin crosslinking method retards release of mulberry 1-deoxynojirimycin providing a prolonged hypoglycaemic effect. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 134, n. 4, p.1823-1830, out. 2012.

WANG, Yuemeng et al. Transglutaminase-induced crosslinking of gelatin–calcium carbonate composite films. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 166, p.414-422, jan. 2015.

WAJCHENBERG, Bernardo L. et al. Menor incidência de hipoglicemia noturna com o uso de insulina lispro comparada à insulina humana regular no tratamento de pacientes com diabetes do tipo 1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, [s.l.], v. 44, n. 2, p.1-2, abr. 2000.

YALLAPU, M. M.; GUPTA, B. K.; JAGGI, M.; CHAUHAN, S. C. Fabrication of curcumin encapsulated PLGA nanoparticles for improved therapeutic effects in metastatic cancer cells. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 351, p. 19-29. 2010

YOKOYAMA, K.; NIO, N.; KIKUCHI, Y. Properties and applications of microbial transglutaminase. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 64, p. 447-454, Jan. 2004.

ZHANG, Zipei; DECKER, Eric Andrew; MCCLEMENTS, David Julian. Encapsulation, protection, and release of polyunsaturated lipids using biopolymer-based hydrogel particles. **Food Research International**, [s.l.], v. 64, p.520-526, out. 2014.

ZZAMAN, Wahidu; YANG, Tajul A.. Moisture, Color and Texture Changes in Cocoa beans during Superheated Steam Roasting. **Journal Of Food Processing And Preservation**, [s.l.], v. 38, n. 3, p.1364-1370, 25 abr. 2013.

