

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

RAYSSA CRISTINE SIMONI

**ENCAPSULAÇÃO DE GLICOSE EM HIDROGÉIS DE GELATINA RETICULADOS
COM TRANSGLUTAMINASE**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO

2014

RAYSSA CRISTINE SIMONI

**ENCAPSULAÇÃO DE GLICOSE EM HIDROGÉIS DE GELATINA RETICULADOS
COM TRANSGLUTAMINASE**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado a disciplina de Trabalho de Diplomação, do Curso Superior de Engenharia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Campo Mourão, como requisito parcial para obtenção do título de Engenheira de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a. Dra. Fernanda Vitória Leimann

CAMPO MOURÃO

2014



TERMO DE APROVAÇÃO

**ENCAPSULAÇÃO DE GLICOSE EM HIDROGÉIS DE GELATINA RETICULADOS
COM TRANSGLUTAMINASE**

POR

RAYSSA CRISTINE SIMONI

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado em 19 de dezembro de 2014 às 9 horas como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos. A candidata foi argüida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Vitória Leimann
Orientadora

Prof^ª. Dr^ª. Mirela Vanin dos Santos Lima
Membro da banca

Prof^º. Dr. Alberto Cavalcanti Vitorio.
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.

*Dedico este trabalho aos meus pais Nivaldo Simoni e Dorcilene Ap. Z. Simoni
e à minha irmã Rubya Karla Simoni que me ajudaram e incentivaram
na conclusão de mais uma etapa da minha trajetória.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por toda sabedoria e discernimento que me concedeu ao longo do curso para fazer minhas escolhas e por me agradecer com mais essa conquista. Nos momentos mais difíceis, em que a vontade de desistir era tremenda, Ele me fortaleceu e me mostrou que grandes eram os seus sonhos para minha vida.

Aos meus pais Nivaldo Simoni e Dorcilene Ap. Zussa Simoni e minha irmã Rubya pela paciência, apoio e força que me ajudaram a persistir e a toda minha família pelo amor e compreensão, por sempre acreditarem que eu conseguiria chegar até aqui.

À minha professora orientadora Dr^a Fernanda Vitória Leimann pela oportunidade e por todo ensinamento que me foi concedido, pela disponibilidade em estar sempre me auxiliando nas dúvidas e na prática do laboratório, que foi essencial para meu desenvolvimento e aprendizado. Serei sempre grata por toda atenção e dedicação.

Agradeço a todos os professores que ao longo da graduação acrescentaram muitos ensinamentos para o meu desenvolvimento e, em especial aos professores Drs. Odinei e Bogdan e à professora Dr^a Marianne, que auxiliaram na observação dos resultados da pesquisa e manipulação dos equipamentos, além dos técnicos e auxiliares do laboratório por toda ajuda, especialmente ao Marcos e à Daniele.

À todos os meus amigos pela força e companheirismo, incluindo não somente os da universidade, mas aqueles do colégio e os amigos de infância que estão presentes em cada momento.

À Alini, Marília e Ana Gabriela pela amizade durante todos esses anos que me permitiram conhecer um pouco de cada e mesmo nas diferenças nos permitimos dividir todas as preocupações, conquistas, medos, companheirismo nos trabalhos e estudos, momentos de superação e de muita diversão, que estiveram sempre presente até mesmo durante as análises no laboratório me ajudando no que fosse possível. Com certeza levarei para sempre em meu coração cada lembrança. À Jéssica e Fernanda que também me auxiliaram, pelos momentos de dificuldades e alegrias e ao Mateus que por todo seu conhecimento sempre esteve disposto a mostrar suas teorias e ajudar nas minhas dificuldades.

Por fim, agradeço a banca examinadora, professora Dr^a. Mirela e professor Dr. Alberto pelos conselhos, sugestões e incentivo na pesquisa.

À todos o meu “muito obrigada!”.

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo.
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos,
no mínimo fará coisas admiráveis.”*

José de Alencar

RESUMO

SIMONI, Rayssa Cristine. **Encapsulação de glicose em hidrogéis de gelatina reticulados com transglutaminase**. 2014. 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2014.

A hipoglicemia tem afetado grande parte da população portadora de diabetes tipo 1, principalmente jovens e crianças no período noturno, em alguns casos são apresentados danos no desenvolvimento e funcionamento neuropsicológico, convulsões ou até mesmo a morte. Uma alternativa para aumentar o tempo de manutenção da glicose no sangue seria a liberação controlada da glicose a partir de hidrogéis comestíveis. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo sintetizar hidrogéis de gelatina, reticulados com transglutaminase, contendo glicose e caracterizá-los. Foram produzidos oito tipos de hidrogéis e seus respectivos brancos, ou seja, sem glicose. Foram avaliadas as condições: temperatura de reticulação (40/50°C), quantidade de transglutaminase (10/20 U/g de proteína) e o tratamento de secagem (estufa/liofilização), de acordo com o planejamento fatorial 2³. Para caracterizá-los foram realizadas análises de espessura, inchamento de equilíbrio em água Milli-Q, inchamento em fluidos gástrico e intestinal simulados e Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). As amostras produzidas por tratamento em estufa apresentaram aspecto vitrificado e os hidrogéis produzidos por liofilização apresentaram aspecto esponjoso, onde as primeiras foram caracterizadas por serem menos espessas. O índice de inchamento dos hidrogéis G4020 e G5020 em água foi maior para as amostras secas em estufa e para o inchamento nos fluidos simulados verificou-se que após 1 hora de análise as amostras de hidrogéis liofilizadas apresentaram maior índice de inchamento, esta diferença pode ser pelo fato dos hidrogéis liofilizados apresentarem uma estrutura mais aberta e permanecerem por mais tempo em contato com fluidos que favorecem a hidrólise destes, levando a uma maior solvatação da matriz. Quanto ao planejamento fatorial não houve significância em relação as variáveis independentes escolhidas, com isso estas não influenciaram no comportamento dos hidrogéis sintetizados em condições distintas. Na análise do FTIR foi observado que houve reticulação na rede do hidrogel devido a presença da banda amida monosubstituída, composto obtido pela ação da reticulação da enzima transglutaminase, além da verificação da presença da glicose no hidrogel através da banda característica do estiramento C-O, no qual observou-se um deslocamento desta, que pode ser representado pela interação da glicose com a matriz polimérica. Deste modo foi possível a síntese dos hidrogéis caracterizados por apresentar alta capacidade de absorção e pela eficácia na encapsulação da glicose, sendo indicado a produção por secagem em estufa por ser um método de menor custo e gasto de energia.

Palavras-chave: hidrogel, gelatina, transglutaminase, glicose.

ABSTRACT

SIMONI, Rayssa Cristine. **Glucose encapsulation in gelatin hydrogels crosslinked with transglutaminase.** 2014 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2014.

The hypoglycemia has been affecting a large number of type 1-diabetes patients, especially young people and children in the night period, in some cases people present problems in neuropsychological development and its functions as well as convulsion and even death. An alternative to increasing the maintenance time of glucose in the blood would be controlled release of glucose from edible hydrogels. Regarding to that, the main aim of this article is to synthesize gelatin hydrogels crosslinked with transglutaminase, which contains glucose and then, characterized them. Also, eight types of hydrogels were made as well as its blanks, in other words, without glucose. Furthermore, some conditions were analyzed such as: crosslinking temperature (40/50 °C), amount of transglutaminase (10/20 U/g of protein) and the treatment of drying (oven/lyophilization), according to 2³ factorial experimental design. Thus, to characterize them, was done thickness analyses, of balance swelling in Milli-Q water, swell in simulation gastric and intestinal fluids and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The samples which were made by treatment of oven and lyophilization, presented glazed and spongy aspects, respectively. Also was noted that, the first one presented less thickness than the second one. The swelling ratio of the hydrogels G4020 and G5020 in water was higher for samples dried in an oven and was noted that after 1 hour the simulations of swelling fluids presented higher ratio of swelling. That difference is due to hydrogels which were lyophilized presented its structure more opened than the other one in the oven, also, the structure stayed for longest time with fluids which helps the hydrolysis function, leading to increased solvation of the matrix. As for the factorial experimental design was not significant in relation to the chosen independent variables, so these did not influence the behavior of the hydrogels synthesized in different conditions. In FTIR analysis showed that there was crosslinking in the hydrogel network due to the presence of the band monosubstituted amide, which is obtained by the action of the transglutaminase crosslinking, beyond the presence of glucose in hydrogel through the band characterized of stretch C-O, which has moved and can be presented by relation between glucose and polymer matrix. Finally, it can be concluded that was possible to synthesize the hydrogels characterized by having high absorption capacity and the efficiency of the encapsulation of glucose production and also, it indicates, by oven drying as a method of lower expenditures such as financial costs and energy.

Key-words: hydrogel, gelatin, transglutaminase, glucose.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura da molécula de gelatina	18
Figura 2 – Estrutura do glicerol.....	20
Figura 3 – Hidrogel de gelatina obtido por tratamento em (a) estufa e por (b) liofilização....	25
Figura 4 – Gráfico de Tempo (min) por Inchamento (%) para os hidrogéis G4020E, G4020L, G4020bE e G4020bL.....	30
Figura 5 – Gráfico de Tempo (min) por Inchamento (%) para os hidrogéis G5020E, G5020L, G5020bE e G5020bL.....	31
Figura 6 - Espectros de Infravermelho dos componentes puros, utilizados na sintetização dos hidrogéis, e da glicose.	32
Figura 7 - Espectros de Infravermelho da glicose e dos hidrogéis G5020E e G5020bE	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fatores e níveis avaliados no planejamento fatorial 2^3	22
Tabela 2 – Descrição das variáveis referentes aos códigos atribuídos aos hidrogéis sintetizados	25
Tabela 3 – Médias das espessuras das amostras de hidrogéis medidas através do micrômetro digital.....	26
Tabela 4 – Análise de Variância (ANOVA) dos resultados referentes à espessura das amostras com glicose.....	27
Tabela 5 – Análise de Variância (ANOVA) dos resultados referentes à espessura das amostras sem glicose (brancos).....	27
Tabela 6 – Resultados obtidos para o inchamento de equilíbrio dos hidrogéis.....	28
Tabela 7 – Análise de Variância (ANOVA) dos resultados referentes ao inchamento de equilíbrio para amostras com glicose.	28
Tabela 8 – Análise de Variância (ANOVA) dos resultados referentes ao inchamento de equilíbrio para amostras sem glicose (brancos).....	29

SUMÁRIO

1 Introdução	11
2 Objetivos	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3 Revisão Bibliográfica	14
3.1 Diabetes Mellitus	14
3.2 Hidrogéis	15
3.3 Gelatina.....	17
3.4 Transglutaminase.....	18
3.5 Glicerol	19
4 Materiais e Métodos	21
4.1 Materiais	21
4.2 Métodos	21
4.2.1 Planejamento experimental.....	21
4.2.2 Síntese dos hidrogéis	22
4.2.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	23
4.2.4 Inchamento de equilíbrio	23
4.2.5 Cinética de inchamento dos hidrogéis em fluidos gástricos e intestinal simulados	23
4.2.6 Espessura dos hidrogéis.....	24
5 Resultados e Discussões	25
5.1 Espessura	26
5.2 Inchamento de equilíbrio e planejamento experimental.....	28
5.3 Cinética de inchamento nos fluidos gástrico e intestinais simulados	30
5.4 FTIR	32
6 Conclusão	35
7 Sugestões para Trabalhos Futuros	36
8 Referencias Bibliográficas	37

1 Introdução

A hipoglicemia é determinada pelo baixo nível de glicose no sangue de pacientes que possuem diabetes mellitus e tem afetado principalmente crianças e adolescentes durante o período noturno, o que torna um fator preocupante por muitas vezes não ser percebido rapidamente, podendo levar a danos no desenvolvimento e funcionamento neuropsicológico, convulsões ou até mesmo a morte (KAUFMAN et al., 2002; PORTER et al., 1997; BEREKSZASZG et al., 1997). Ao longo das últimas décadas, avanços significativos têm sido alcançados na área das 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).

Os hidrogéis são redes poliméricas que absorvem grandes quantidades de água, mantendo-se insolúveis em soluções aquosas devido à reticulação química ou física das cadeias individuais do polímero (LIN; METTERS, 2006). Segundo Jorgen-Sen et al. (2006), as proteínas tem sido uma alternativa na formulação de medicamentos com melhor adesão pelos pacientes, contudo, é necessário conhecer as características físico-químicas e biológicas e a estabilidade química e física destas. A gelatina que é um componente natural presente nos ossos, pele e tecido conjuntivo e é obtida através da hidrólise do colágeno. Devido a sua biodegradabilidade, biocompatibilidade em ambientes fisiológicos, fácil manuseio e baixo custo tem sido muito utilizada na área médica, farmacêutica e alimentícia, principalmente na formação de cápsulas (BIGI et al., 2002).

Agentes como glutaraldeído podem ser utilizados para obter a reticulação formadora da rede tridimensional do hidrogéis, mas, devido aos seus efeitos citotóxicos tem-se utilizado alternativas naturais como genipina, ácido tânico e ferúlico, proantocianidinas e a enzima transglutaminase, apesar desta apresentar um custo mais elevado (RIVERO; GARCÍA; PINOTTI, 2010). A transglutaminase atua como catalisador das reações de acil-transferência entre grupos γ -carboxiamídico e resíduos de glutamina da cadeia polipeptídica (acil-doadores) e uma variedade de aminas primárias (acil-receptores) e, em determinadas proteínas, os grupos ϵ -amino de resíduos de lisina (DONG et al., 2008).

As características de hidrogel, incluindo o inchamento, propriedades mecânicas e perfil de liberação de compostos encapsulados, podem ser moduladas pelas condições de síntese como a quantidade de agente de reticulação, temperatura de reação e secagem do hidrogel. Dessa forma torna-se interessante a síntese de hidrogéis de gelatina reticulados com transglutaminase contendo glicose, bem como a sua caracterização.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Produzir e caracterizar hidrogéis de gelatina reticulados com transglutaminase contendo glicose, com a possibilidade de futuramente ser utilizado para consumo noturno de pessoas que possuem diabetes.

2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar os hidrogéis de gelatina reticulados com transglutaminase contendo glicose;
- Caracterizar o hidrogel quanto ao inchamento de equilíbrio em água;
- Avaliar a cinética de inchamento dos hidrogéis em fluido gástrico simulado e fluido intestinal simulado;
- Determinar a espessura do material produzido;
- Identificar as interações entre os componentes dos hidrogéis e a glicose por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Diabetes Mellitus

A diabetes mellitus é uma doença metabólica crônica que pode afetar diversos órgãos quando não realizado o tratamento adequado. Na diabetes tipo 1 ocorre a destruição de células do pâncreas que são responsáveis pela produção de insulina, substância produzida neste órgão para auxiliar a manter o nível adequado de glicose no sangue, por isso a necessidade da aplicação deste hormônio. O pâncreas recebe um sinal através da glicose para liberar o hormônio que auxiliará no transporte desta até o interior das células, com a ausência da insulina este monossacarídeo se acumula no sangue, desencadeando os sintomas relacionados ao estado hiperglicêmico, e o excesso é eliminado através da urina sem ser absorvido como nutriente pelas células. Já a diabetes tipo 2 acarreta na deficiência parcial da produção de insulina, obtendo uma resistência ao efeito desta (COTRAN; CRAWFORD, 2000; BRATS, 2010).

Grande parte da população tem sido afetada nos últimos anos, isto devido ao novo estilo de vida com hábitos alimentares inadequados; consumo de bebida alcóolica e cigarro; rápido envelhecimento e sedentarismo, além do fator genético. De acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), no mundo há mais de 220 milhões de pessoas com diabetes, já no ano de 2025 este índice tende a dobrar, o que será considerado um fator responsável por um elevado índice de mortalidade, (MENDES et al., 2011; OMS, 2014). O diagnóstico muitas vezes é mais difícil quando em crianças e adolescentes, sendo este mais evidente com o passar do tempo. Com a descoberta desta doença muitas outras são desenvolvidas como a depressão, ansiedade, estresse dos pacientes e familiares (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014; MAIA; ARAÚJO, 2005).

Os sintomas compreendem a sede e fome em excesso, vontade incessante de urinar, perda de peso, fraqueza e aumento do nível de glicose no sangue, pois o metabolismo de carboidratos, gordura e proteína é afetado (BERNE et al., 2000; GODOY, 2000; SAID et al., 2002). Os riscos de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares são maiores para pacientes com a doença, assim como complicações que podem levar a cegueira, falência renal, neuropatia, entre outros (COMMITTE REPORT, 2003).

A hipoglicemia, resultante do baixo nível de glicose no sangue e que pode ocasionar graves consequências para o organismo levando até mesmo a morte, atinge com frequência muito dos pacientes no período noturno. Isto é considerado um efeito adverso da insulina, pelo fato desta ser aplicada para liberação rápida de grande quantidade de hormônio para evitar a hiperglicemia e, por fim, resulta na percepção da hipoglicemia (GUYTON; HALL, 2002). Comumente não é realizado o monitoramento da glicose durante o período de sono, por isso, há muitos casos em que os diabéticos não percebem seu estado hipoglicêmico. Deste modo, não é feita a adaptação das doses de insulina o que leva a graves episódios da queda da glicose e pode resultar em convulsões, problemas neuropsicológicos e mortes. Quando detectada a hipoglicemia, o tratamento é realizado através do consumo de carboidratos e proteínas que tem ação imediata, não se prolongando por muitas horas (BEREGSZASZG et al., 1997; TRAN et al., 2007; AHMET et al., 2011).

Segundo Araújo e Martel (2009), os carboidratos são as principais fontes de energia para o organismo humano e, para absorção, são degradados através de enzimas nos monossacarídeos glicose, frutose e galactose. O controle do nível de glicose é essencial para reduzir as complicações provocadas pela diabetes, isto engloba a sua absorção no intestino, ação das glicosidades intestinais e a captação de glicose pelos tecidos.

3.2 Hidrogéis

Os hidrogéis são polímeros que apresentam grande capacidade de absorção de água, podendo ser compostos por uma única rede tridimensional ou mais. O componente estrutural de um hidrogel é baseado em vários parâmetros, incluindo a quantidade de água que o hidrogel é capaz de absorver e o método de ligação das cadeias de polímero para formação da rede. Assim, as redes podem ser formadas por ligações covalentes, originadas da reticulação e conhecidos como hidrogéis do tipo químico, ou ligações físicas, que seriam as ligações de hidrogênio e forças de van der Waals (OVIEDO et al., 2008; BHATTARAI; GUNN; ZHANG, 2010).

A sintetização 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).

O intumescimento da cadeia polimérica ocorre ao entrar em contato com um fluido, aquoso ou não, promovendo a interação interna entre estes, o que leva a expansão até o estado de completa solvatação. Durante a expansão, quando a rede é reticulada, há uma força de retração para conter as cadeias do polímero que é denominada força elástica retrativa. Por isso a importância da diferenciação do parâmetro de inchamento, já que o equilíbrio deste, em proporção ao peso do hidrogel, influencia no coeficiente de difusão do soluto, mobilidade, molhabilidade e nas propriedades mecânicas do hidrogel, assim como a viscosidade da dispersão do polímero nos poros, como uma geleificação, no qual uma taxa elevada reduz a velocidade de transporte do composto (BHATTARAI; GUNN; ZHANG, 2010).

Dependendo do elemento que se deseja encapsular deve ser escolhido o tipo de matriz adequada com base nas características físico-químicas do composto. Logo, elementos lipofílicos podem ser utilizados em matrizes hidrofílicas, tendo coeficiente de partição adequado para liberação, já os hidrossolúveis podem ser aplicados em matrizes hidrofílicas, avaliando sempre a interação com o polímero (COLOMBO et al., 2000).

Para sintetização dos hidrogéis podem ser utilizados tratamentos de secagem diferenciados, proporcionando características e propriedades distintas na estrutura destes filmes de hidrogéis. Dentre os processos há a secagem em estufa que consiste na aplicação de calor quando em condições de temperatura, umidade e corrente de ar controlados. É de grande aplicação devido ao baixo custo, porém, pode proporcionar a perda de alguns componentes. Outro processo seria a liofilização, sendo de custo mais elevado com maior gasto energético e consiste na desidratação de produtos em condições de pressão e temperatura controladas. A amostra é, primeiramente, congelada e a água transferida do estado sólido para o gasoso por sublimação. O processo é realizado no vácuo e a baixas temperaturas (GAVA, 1994).

Pal, Banthia e Majumdar (2007) prepararam hidrogéis de poli(álcool vinílico) e gelatina obtendo um material caracterizado como superabsorvente, retendo até 260% em peso de água com relação à sua massa seca. Garcia et al. (2014) incorporaram epigallocatequina galato (EGCG) em hidrogéis preparados a partir de interação iônica entre gelatina e ácido γ -poliglutâmico (γ -PGA), com etilcarbodiimida (EDC) como agente de reticulação. A reticulação do hidrogel afetou significativamente as propriedades do perfil de liberação do composto bem como o inchamento em pHs diferentes. Também foi observado que para a formulação otimizada pelos autores o perfil de liberação de EGCG em todos os pHs avaliados não mostrou a liberação brusca no início do período (*burst release*). Esta boa

propriedade do hidrogel sintetizado sugere que a liberação sustentada de EGCG pode durar várias horas e suportar diferentes pHs.

Song et al. (2010) produziram hidrogéis de caseína reticulados com transglutaminase e observaram que um aumento da quantidade de enzima resultou numa diminuição do tempo de gelificação e um aumento da força do hidrogel e que a temperatura teve uma grande influência sobre a reação. A liberação *in vitro* de vitamina B12 encapsulada no hidrogel demonstrou um grande potencial para este sistema de liberação controlada. Quanto ao caseinato de sódio alguns trabalhos apresentam a formação de micropartículas de pectina e caseinato de sódio reticuladas para proteção da oxidação de lipídeos (MATALANIS; DECKER; MCCLEMENTS, 2012) e encapsulação de probióticos (HEIDEBACH; FÖRST; KULOZIK, 2009). Filmes de caseinato de sódio foram produzidos por diversos autores (KRISTO; KOUTSOUMANIS; BILIADERIS, 2008; FABRA; TALENS; CHIRALT, 2008 & ATARÉS; BONILLA; CHIRALT, 2010), porém, os filmes não foram sintetizados como hidrogéis. Poucos trabalhos são encontrados na literatura sobre a síntese e caracterização de hidrogéis de caseinato de sódio, como o de Audic e Chaufer (2005), porém os autores utilizam formaldeído como agente de reticulação, que por apresentar toxicidade não desperta interesse em aplicações práticas.

3.3 Gelatina

A gelatina é caracterizada pela cor, variando de incolor à ligeiramente amarelada, por ser frágil, inodora e solúvel em água quente e é aplicada como clarificante de bebidas, agente espessante em iogurtes, sintetização de cápsulas, alimentos e medicamentos, molhos e sopas instantâneas, filmes comestíveis para confeitos, estabilizante de sorvetes e na indústria têxtil (CRISTIANO, 2009). Na Figura 1 está representada a estrutura da molécula de gelatina.

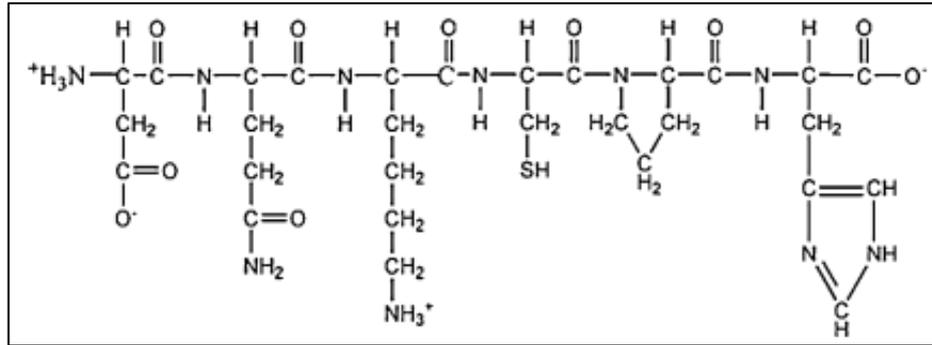


Figura 1 – Estrutura da molécula de gelatina.

Fonte: Liu, Liu e Wang, 2011.

A gelatina é considerada um biopolímero natural solúvel a base de proteína e obtida a partir da hidrólise parcial do colágeno que é insolúvel. Por apresentar características biocompatíveis e biodegradáveis, esta representa uma alternativa como material de encapsulação com liberação controlada de drogas, onde o sistema de entrega pode contemplar os hidrogéis, filmes, microesferas e nanopartículas (LAI, 2013; KHAN; SCHENEIDER, 2013). Filmes de hidrogéis produzidos a partir de proteínas apresentam alta permeabilidade ao vapor de água e efetiva barreira contra gases como CO₂ e O₂ (CARVALHO; GROSSO, 2006).

Uma vantagem da sua utilização é a naturalidade que leva ao baixo custo e facilidade na obtenção, além de possuir antigenicidade. Com relação a estrutura da gelatina, esta apresenta muitos grupos funcionais acessíveis como -NH₂, -SH e -COOH, que são capazes de formar estrutura tripla-hélice, permitindo maiores oportunidades de modificação para o acoplamento e direcionamento de ligantes, como no caso de agentes reticulantes que auxiliam no fortalecimento da rede, como dos hidrogéis, por exemplo (KHAN; SCHENEIDER, 2013; LIU; LIU; WANG, 2011).

3.4 Transglutaminase

A transglutaminase é uma enzima encontrada na natureza, em plantas e microrganismos, e nos tecidos de animais. Possui a capacidade de catalisar reações de acil-transferência de grupos γ -carboxiamídico de resíduos de glutamina da cadeia polipeptídica

para vários receptores como as aminas primárias e de grupos ϵ -amino de lisina em substratos proteicos (YOKOYAMA; NIO; KIKUCHI, 2004).

Na área alimentícia tem sido muito utilizada para promover a polimerização, melhorar texturas, na formação de géis, reestruturação de carnes e no aumento de valor nutricional das proteínas devido a incorporação de aminoácidos limitantes sobre o material original (SOARES et al., 2004).

Na formação de hidrogéis a transglutaminase atua como agente reticulante, o qual forma ligações cruzadas no interior das cadeias de gelatina por meio da modificação enzimática, sendo um meio alternativo para melhorar a resistência mecânica da estrutura polimérica, alterando a funcionalidade através da permeabilidade ao vapor de água e diminuição da solubilidade (CARVALHO; GROSSO, 2006).

O aumento da força do hidrogel de gelatina submetido a 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).

3.5 Glicerol

A descoberta do glicerol ocorreu em 1779 por Carl W. Scheele durante um processo de saponificação de azeite de oliva, sendo também um subproduto da fermentação alcóolica quando há concentrações de etanol de 2,5 – 3,6 % (REHM, 1988). É conhecido como glicerol e 1,2,3 propanotriol, quando puro, ou glicerina, para produtos comerciais com 95 % ou mais de glicerol. Este é atóxico, incolor, oleoso, viscoso, com gosto adocicado, solúvel em água e álcool devido a presença de três hidroxilas em sua estrutura, como observado na Figura 2, mas pouco solúvel em éter, acetato de etila e dioxano e insolúvel em hidrocarbonetos (ARRUDA; RODRIGUES; FELIPE, 2007; BEATRIZ; ARAÚJO; LIMA, 2011).

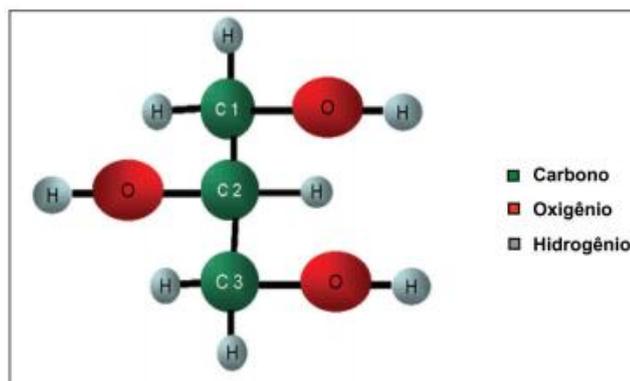


Figura 2 - Estrutura do glicerol.

Fonte: Arruda, Rodrigues e Felipe, 2007.

O glicerol é considerado um plastificante hidrofílico que, quando aplicado em outros tipos de materiais tem por função alterar as propriedades físicas e mecânicas destes, assim é muito utilizado na interação das cadeias de polímeros tornando-os mais flexíveis, com maior mobilidade e hidrofiliçidade, possibilitando o aumento da permeação de fluido através da matriz polimérica (MALI et al., 2004). Segundo Gennadios (2002), os filmes de proteínas são mais frágeis e por isso emprega-se os plastificantes que competem pela ligação de hidrogênio e interações eletrostáticas com as cadeias de proteínas.

Esse composto é aplicado na indústria alimentícia devido as suas propriedades estabilizantes, antioxidantes, sequestrantes, emulsificantes e umectantes (ARRUDA; RODRIGUES; FELIPE, 2007). Na indústria farmacêutica é aplicado na produção de cápsulas, anestésicos, xaropes, cremes, antibióticos e anti-sépticos (BARBOSA, 2009).

4 Materiais e Métodos

4.1 Materiais

A gelatina (Vetec) e o glicerol (Vetec) foram utilizados na síntese do hidrogel, assim como a glicose (Isofar). A água destilada foi utilizada no preparo das soluções e na verificação do inchamento de equilíbrio dos hidrogéis. A enzima transglutaminase (ACTIVA GM, 80 unidades ativas (U) para 1 g de mistura enzimática) foi disponibilizada pela Ajinomoto, sendo aplicada como agente reticulante. O fluido gástrico foi preparado com ácido clorídrico (HCl) (Vetec) e cloreto de sódio (NaCl) (Vetec). Para o fluido intestinal simulado, o tampão fosfato salino (PBS) foi preparado com fosfato de potássio monobásico e fosfato de potássio dibásico.

4.2 Métodos

Os experimentos foram realizados na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), campus Campo Mourão, nos laboratórios de Cromatografia, de Análise Instrumental I e II, onde encontravam-se disponíveis todos os reagentes e equipamentos necessários para o projeto.

4.2.1 Planejamento experimental

Um planejamento experimental 2^3 foi realizado para sintetização dos hidrogéis e, posteriormente, avaliação do inchamento de equilíbrio, sendo os dados tratados no *software* Statistica 7.0. Foram considerados os fatores e níveis apresentados na Tabela 1, onde utilizou-se para a transglutaminase 10 U/g (-1) e 20 U/g (+1), para a temperatura 40 °C (-1) e 50 °C (+1) e o tratamento em estufa (-1) e por liofilização (+1). O planejamento foi aplicado para os

hidrogéis com e sem glicose. Os resultados de inchamento de equilíbrio e de espessura foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com uso do *software* Statistica 7.0.

Tabela 1 – Fatores e níveis avaliados no planejamento fatorial 2³.

Experimento	Transglutaminase (U/g)	Temperatura (°C)	Tratamentos
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1

4.2.2 Síntese dos hidrogéis

A formação do hidrogel foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Chambi e Grosso (2006), com algumas alterações. Primeiramente foram dissolvidos 4,2 g de gelatina (7 % p/p) em água destilada (60 mL) à 50 °C sob agitação magnética. Em seguida foi pesado 1,05 g de glicerol (25 g/100 g proteína seca) em um béquer, onde foi adicionada a solução. A mistura foi resfriada a temperatura ambiente e então a transglutaminase (10 U/g proteína ou 20 U/g proteína) foi acrescentada ainda sob agitação. Em seguida, foi adicionado 1,12 g de glicose. 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) à 40 °C ou 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 e obtenção dos hidrogéis por meio de dois tratamentos: em estufa (Cienlab) à 40 °C por 24 horas e 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.

4.2.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Para análise da interação entre os componentes dos hidrogéis e caracterização das ligações químicas formadas após a síntese dos hidrogéis 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 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} .

4.2.4 Inchamento de equilíbrio

O inchamento de equilíbrio dos hidrogéis foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Wang et al. (2012) com algumas modificações. As amostras de 30x30 mm foram mantidas em estufa de convecção a 40 °C por 24 h e pesadas (W_0). Então, as amostras foram imersas em 200 mL de água destilada a 25 °C por 24 h e pesadas novamente (W_{24}). O inchamento de equilíbrio em água foi calculado com a Equação (1).

$$IEA(\%) = \frac{W_{24} - W_0}{W_0} \cdot 100 \quad (1)$$

4.2.5 Cinética de inchamento dos hidrogéis em fluidos gástricos e intestinal simulados

As propriedades de inchamento em fluido gástrico simulado (FGS) (pH 1,2) e fluido intestinal simulado (FIS) (pH 7,4) foram determinadas através do mesmo método aplicado na verificação do inchamento de equilíbrio, porém, a uma temperatura de 37 °C e com um volume de 100 mL de cada fluido. Para isso as amostras permaneceram por 2 horas imersas

no FGS e, posteriormente, foi transferida para o FIS até completar as 6 horas de análise, considerando este o tempo de digestão da glicose. A pesagem dos hidrogéis foi realizada durante os intervalos de tempo de 5, 10, 20, 30, 60 e 120 min imersos no FGS e nos intervalos de 30, 60, 120, 180 e 240 min no FIS. Os graus de inchamento nos fluidos simulados foram então calculados com o uso da Equação (2).

$$GIF (\%) = \frac{(W_t - W_0)}{W_0} \cdot 100 \quad (2)$$

4.2.6 Espessura dos hidrogéis

A espessura foi determinada com um micrômetro digital (Starrett) com resolução de 0,001 mm. Foram utilizados 10 pontos aleatórios sobre a superfície de cada hidrogel e calculada a média destas medidas.

5 Resultados e Discussões

As amostras foram codificadas de modo a facilitar o controle e a realização das análises como, por exemplo, G4010E e G5020L, onde G refere-se a proteína utilizada, 40/50 à temperatura em que os hidrogéis permaneceram em estufa para reticulação, 10/20 à quantidade de transglutaminase utilizada e “E”/“L” ao tratamento aplicado na secagem dos hidrogéis. Os que apresentam a letra “B” são os brancos. A Tabela 2 contém os exemplos mais explícitos das variáveis.

Tabela 2 – Descrição das variáveis referentes aos códigos atribuídos aos hidrogéis sintetizados.

Código	Proteína (Gelatina)	Temperatura da estufa (°C)	Quantidade de transglutaminase (U/g)	Tratamento utilizado para secagem
G4010E	G	40	10	Estufa
G4010L	G	40	10	Liofilização
G4020E	G	40	20	Estufa
G4020L	G	40	20	Liofilização
G5010E	G	50	10	Estufa
G5010L	G	50	10	Liofilização
G5020E	G	50	20	Estufa
G5020L	G	50	20	Liofilização

Na Figura 3 são apresentados os hidrogéis de gelatina obtidos por tratamento em estufa (a) e por liofilização (b).

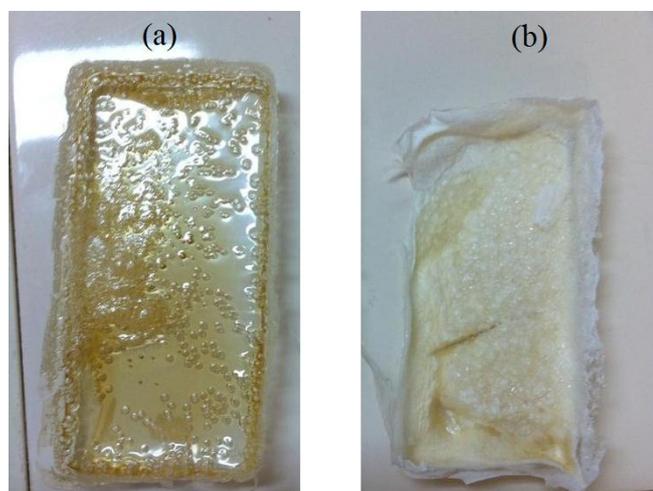


Figura 3 – Hidrogel de gelatina obtido por tratamento em (a) estufa e por (b) liofilização.

O hidrogel produzido por secagem em estufa apresentou aspecto vitrificado e o hidrogel produzido por liofilização apresentou aspecto esponjoso. Possivelmente, isso se deve ao fato da secagem em estufa permitir uma maior acomodação da estrutura com o tempo, ao contrário da liofilização que mantém a estrutura original em que foi congelada a amostra.

5.1 Espessura

Na Tabela 3 estão apresentadas as médias obtidas para as medidas das espessuras dos hidrogéis. Nas Tabelas 4 e 5 estão apresentadas as análises de variância (ANOVA) para as medidas de espessura das amostras contendo glicose e branco, respectivamente.

Tabela 3 – Médias das espessuras das amostras de hidrogéis medidas através do micrômetro digital.

Amostra	Espessura (mm)
G4010E	0,387
G4010L	5,170
G4010bE	0,368
G4010bL	3,706
G4020E	0,870
G4020L	2,406
G4020bE	1,786
G4020bL	3,743
G5010E	0,953
G5010L	1,804
G5010bE	0,961
G5010bL	1,796
G5020E	1,407
G5020L	1,890
G5020bE	1,532
G5020bL	1,830

Tabela 4 – Análise de Variância (ANOVA) dos resultados referentes à espessura das amostras com glicose.

Fator	Soma dos quadrados (SQ)	Grau de liberdade (GL)	Quadrado Médio (QM)	F	Probabilidade (p)
(1) Transglutaminase	0.96536	1	0.965355	0.931091	0.511361
(2) Temperatura	0.37932	1	0.379321	0.365857	0.653688
(3) Tratamento	7.32105	1	7.321051	7.061199	0.229139
(1) e (2)	0.99476	1	0.994755	0.959447	0.506588
(1) e (3)	3.10503	1	3.105032	2.994823	0.333571
(2) e (3)	1.63353	1	1.633528	1.575548	0.428263
Resíduo	1.03680	1	1.036800		
Total	15.43584	7			

Tabela 5 – Análise de Variância (ANOVA) dos resultados referentes à espessura das amostras sem glicose (brancos).

Fator	Soma dos quadrados (SQ)	Grau de liberdade (GL)	Quadrado Médio (QM)	F	Probabilidade (p)
(1) Transglutaminase	1.51772	1	1.517718	17.02478	0.151372
(2) Temperatura	0.52968	1	0.529678	5.94159	0.247843
(3) Tratamento	5.16409	1	5.164095	57.92751	0.083168
(1) e (2)	0.09042	1	0.090419	1.01426	0.497746
(1) e (3)	2.16476	1	2.164760	24.28290	0.127459
(2) e (3)	0.46008	1	0.460080	5.16089	0.263983
Resíduo	0.08915	1	0.089148		
Total	10.01590	7			

A análise de variância dos resultados obtidos para as amostras contendo glicose e para os brancos, indicaram que os fatores avaliados não foram significativos, bem como de suas interações de segunda ordem, considerando um nível de significância de 95%. Foram obtidos coeficientes de determinação (R^2) iguais a 0,93 e a 0,99, respectivamente, e os coeficientes R^2 ajustados foram iguais a 0,53 e 0,93 para amostras contendo glicose e sem glicose, respectivamente. Esse resultado mostra que os valores obtidos para as amostras branco foram bem descritos pelo modelo do planejamento experimental 2^3 , porém estas variáveis não afetaram significativamente os resultados. Para o caso das amostras contendo glicose o modelo não descreveu adequadamente os resultados de espessura. Possivelmente existem outros fatores afetando os resultados neste caso, que não foram considerados, como a presença ou não do plastificante glicerol na formulação.

5.2 Inchamento de equilíbrio e planejamento experimental

Com a análise de inchamento de equilíbrio em água destilada obtiveram-se os resultados demonstrados na Tabela 6 para os hidrogéis contendo glicose e brancos. Nas Tabelas 7 e 8 são apresentados os dados da análise de variância (ANOVA) para os resultados obtidos de inchamento de equilíbrio com glicose e sem glicose, respectivamente.

Tabela 6 – Resultados obtidos para o inchamento de equilíbrio dos hidrogéis.

Amostra	Inchamento de Equilíbrio (%)
G4010-E	357,836
G4010-L	464,910
G4010-bE	427,173
G4010-bL	582,342
G4020-E	362,532
G4020-L	332,061
G4020-bE	413,783
G4020-bL	407,006
G5010-E	334,354
G5010-L	358,936
G5010-bE	428,169
G5010-bL	409,213
G5020-E	397,187
G5020-L	325,128
G5020-bE	486,515
G5020-bL	390,959

Tabela 7 – Análise de Variância (ANOVA) dos resultados referentes ao inchamento de equilíbrio para amostras com glicose.

Fator	Soma dos quadrados (SQ)	Grau de liberdade (GL)	Quadrado Médio (QM)	F	Probabilidade (p)
(1) Transglutaminase	1228,30	1	1228,301	5,872	0,249
(2) Temperatura	1293,75	1	1293,754	6,186	0,243
(3) Tratamento	106,04	1	106,042	0,507	0,606
(1) e (2)	3088,17	1	1088,168	14,765	0,162
(1) e (3)	6855,35	1	6855,355	32,777	0,110
(2) e (3)	1924,47	1	1924,465	9,201	0,203
Resíduo	209,15	1	209,153		
Total	14705,24	7			

Tabela 8 – Análise de Variância (ANOVA) dos resultados referentes ao inchamento de equilíbrio para amostras sem glicose (brancos).

Fator	Soma dos quadrados (SQ)	Grau de liberdade (GL)	Quadrado Médio (QM)	F	Probabilidade (p)
(1) Transglutaminase	2761.56	1	2761.564	3.033051	0.331825
(2) Temperatura	1666.07	1	1666.073	1.829864	0.405262
(3) Tratamento	143.48	1	143.483	0.157588	0.759424
(1) e (2)	6544.71	1	6544.713	7.188120	0.227276
(1) e (3)	7113.09	1	7113.094	7.812378	0.218732
(2) e (3)	8639.70	1	8639.696	9.489059	0.199833
Resíduo	910.49	1	910.490		
Total	27779.11	7			

Com o planejamento fatorial realizado para avaliação do inchamento de equilíbrio é possível observar, através das Tabelas 7 e 8, que os fatores avaliados não foram significativos por apresentarem $p > 0,05$, assim como as interações entre estes, porém, o modelo alcançou um coeficiente de determinação de 0,99 para as amostras com glicose e de 0,97 para as amostras branco. Isto pode ter ocorrido pela escolha não adequada dos níveis das variáveis independentes, no qual verifica-se que alterações simultâneas na temperatura, tipo de tratamento e quantidade de enzima transglutaminase não interfere nos resultados da análise de inchamento.

Já os coeficientes de ajuste obtidos foram de 0,90 e 0,77 para amostras com glicose e branco, respectivamente. Conclui-se que o modelo apresentou ajuste adequado para as amostras com glicose, porém não mostrou-se adequado para as amostras sem glicose, possivelmente por interferência de outros fatores que não foram avaliados.

Uma variável que poderia conferir alguma significância seria a produção do hidrogel com adição de outra proteína para formação de blends, como o caseinato de sódio, por exemplo. De acordo com LIU et al. (2004), esta é uma proteína natural, não tóxica, isolada do leite, sendo de fácil obtenção e aplicado na formação de micelas, proporcionando estabilidade a estrutura, e na formação de gel. Segundo Rodrigues (2006), quando há combinação de polímeros obtêm-se materiais com propriedades diversificadas resultando em funcionalidades específicas e respostas diferentes às atuações dos hidrogéis. Assim, essa relação pode influenciar na flexibilidade, processabilidade, resistência a impactos e tensões.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 6 é possível observar que o inchamento dos hidrogéis ficou entre 325 e 582%. Estes valores estão de acordo com o trabalho de Einerson, Stevens e Kao (2003) que produziram hidrogéis de gelatina com

glutaraldeído como reticulante e obtiveram inchamento em torno de 649 %, assim como o trabalho de Bigi et al. (2002), que avaliaram a estabilização de filmes de hidrogel de gelatina reticulados com genipina e obtiveram inchaço considerável de cerca de 700 %, em solução fisiológica, tendo o grau de inchaço reduzido em valores de, aproximadamente, 200 % quando a concentração de genipina é aumentada.

5.3 Cinética de inchamento nos fluidos gástrico e intestinais simulados

Com o teste da cinética de inchamento nos fluidos gástrico e intestinal simulados obteve-se resultados para as amostras G4020 (estufa e liofilizador, com glicose e branco) e G5020 (estufa e liofilizador, com glicose e branco), demonstrados nas Figuras 4 e 5, respectivamente. Para todos os casos, até 120 minutos a avaliação foi feita em fluido gástrico simulado e após este tempo são avaliações referentes ao fluido intestinal simulado.

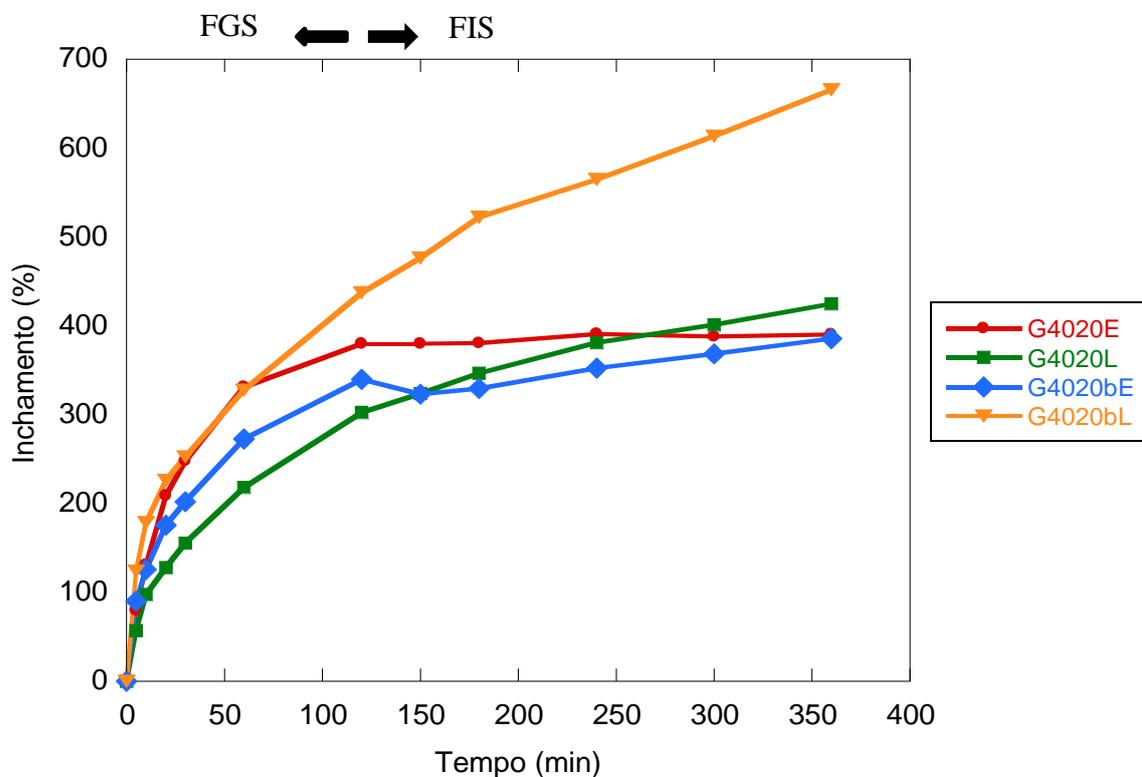


Figura 4 – Gráfico de Tempo (min) por Inchamento (%) para os hidrogéis G4020E, G4020L, G4020bE e G4020bL.

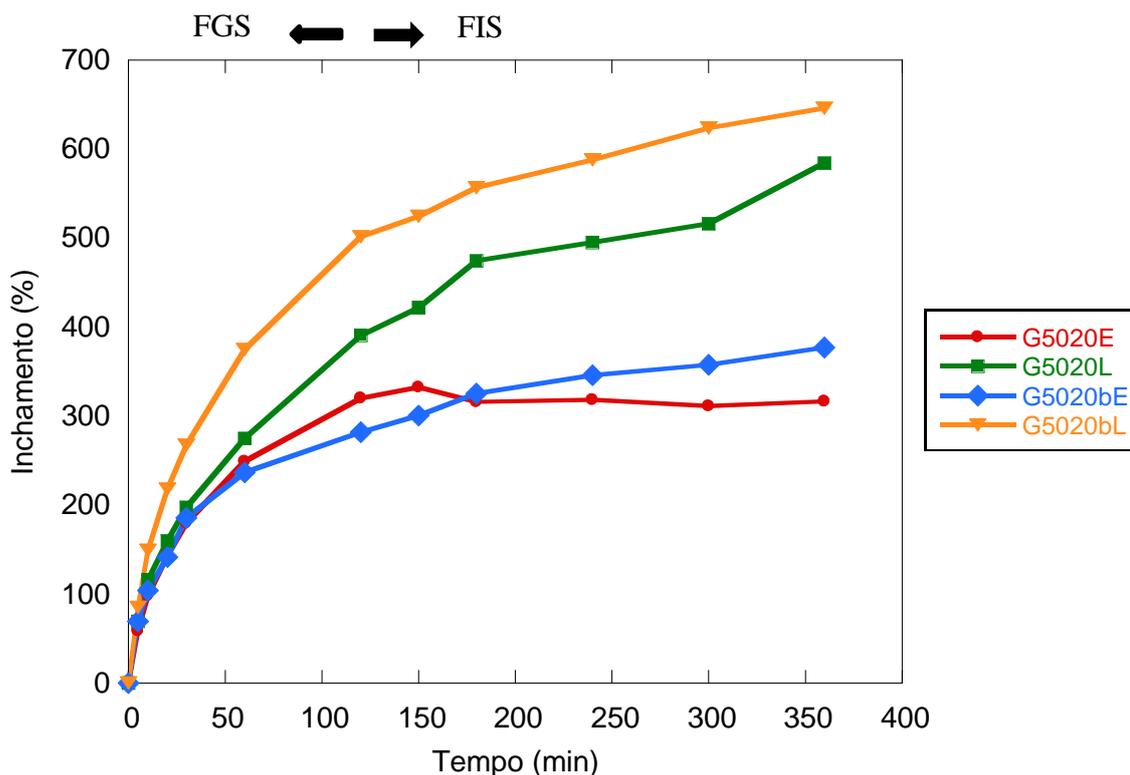


Figura 5 – Gráfico de Tempo (min) por Inchamento (%) para os hidrogéis G5020E, G5020L, G5020bE e G5020bL.

Através das curvas representadas na Figura 4 é possível concluir que a amostra reticulada em temperatura de 40°C e seca em liofilizador, sem adição de glicose, permitiu um inchamento mais elevado que as demais amostras após, aproximadamente, uma hora de análise. As demais amostras permaneceram no mesmo patamar de inchamento ao longo do tempo. Ou seja, para a amostra sem glicose houve diferença no comportamento da cinética de inchamento nos fluidos gástrico e intestinais simulados. Esta diferença observada se deve à estrutura formada na secagem do hidrogel, permanecendo mais aberta com elevada porosidade conforme descrito por Risbud et al. (2000). Este efeito não foi observado na análise de inchamento de equilíbrio em água. Possivelmente o tempo de contato com o fluido gástrico simulado (até 120 min) levou a hidrólise de parte da estrutura tridimensional do hidrogel, levando a uma maior solvatação da estrutura. Akala et al. (1998) avaliaram a degradação por hidrólise dos hidrogéis (formados pelos monômeros N, N-dimetilacrilamina, ter-butilacrilamina, ácido acrílico, 4,4-di-metacrililamin-azobenzeno, N-alcanoilo e O-metacrilil hidroxilamina) e notaram que o equilíbrio de inchamento era mais elevado quanto maior o conteúdo do hidrolisável do hidrogel.

Os hidrogéis sintetizados a 50°C e com 20 U de transglutaminase por grama de proteína (Figura 5) apresentaram o mesmo comportamento que o relatado anteriormente para 40°C e 20 U.

Os últimos pontos de todas as amostras que continham glicose (após 6 horas) apresentaram maior índice de inchamento pelos hidrogéis liofilizados, o que pode ocorrer devido a estrutura mais aberta com maior capacidade de absorção, como mencionado acima por Risbud et al. (2000), além disso o autor também relata que as amostras liofilizadas, por oferecerem uma maior área de superfície, constam de uma matriz com melhor interação com o solvente, ou o fluido, permitindo absorção mais rápida deste.

Os resultados, tanto na água quanto nos fluidos gástricos e intestinais, confirmaram a capacidade do hidrogel em absorver grande quantidade de fluido.

5.4 FTIR

Na Figura 6 estão contidos os espectros de infravermelho dos componentes puros utilizados na sintetização dos hidrogéis. Na Figura 7 são demonstrados os resultados para o espectro da glicose e dos hidrogéis G5020E e G5020bE.

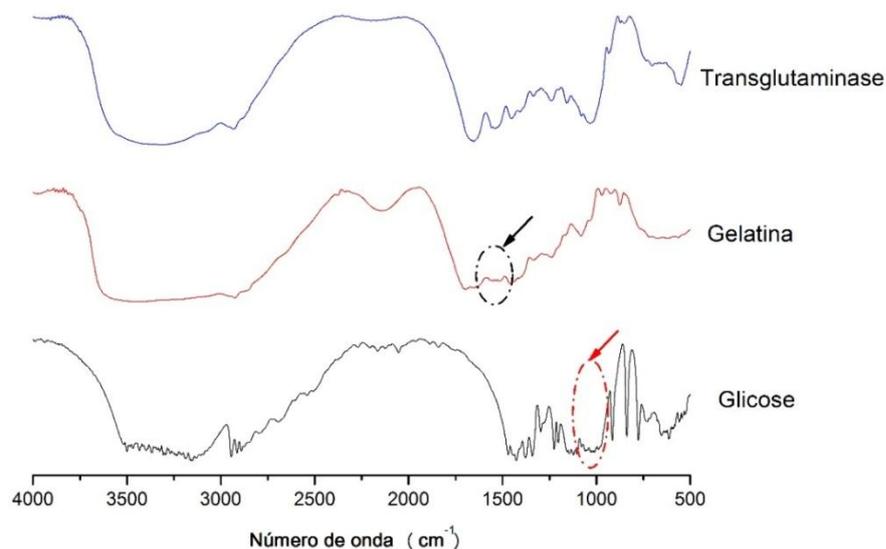


Figura 6 – Espectros de Infravermelho dos componentes puros, utilizados na sintetização dos hidrogéis, e da glicose.

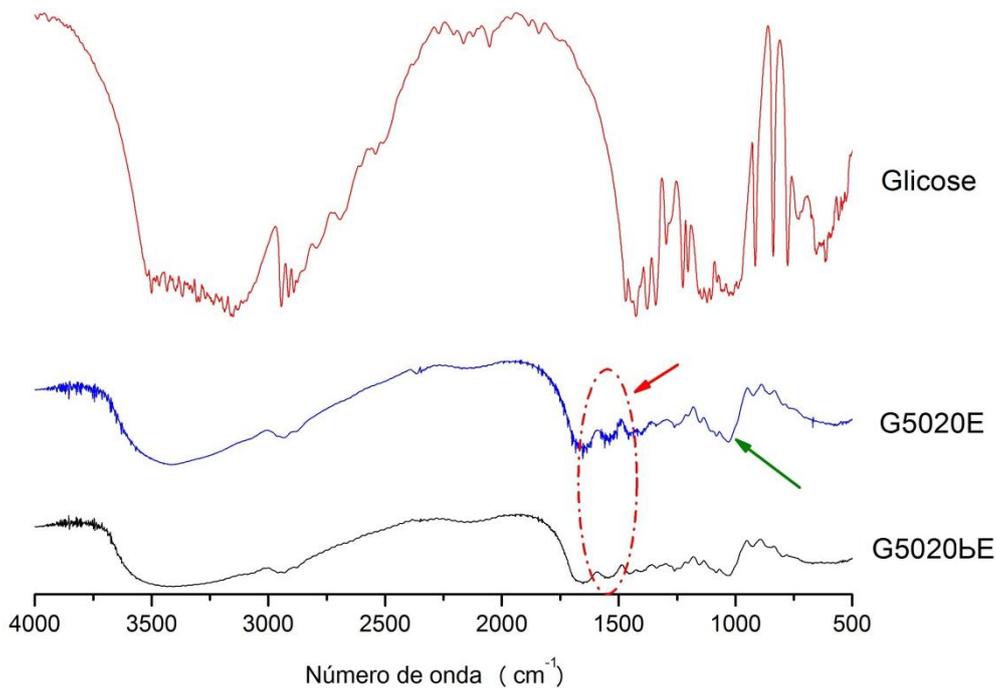
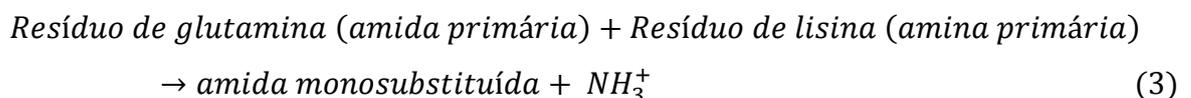


Figura 7 – Espectros de Infravermelho da glicose e dos hidrogéis G5020E e G5020bE.

De acordo com Petibois et al (2000) a banda de absorção mais específica da glicose se dá para o estiramento C-O na região de impressão digital (*fingerprint*) de 1062 a 997cm^{-1} . Na Figura 6 esta banda pode ser observada entre 1086 e 933cm^{-1} , a região indicada com um círculo vermelho.

Avaliando a Figura 7 pode ser observado a presença da banda localizada em 1550cm^{-1} , referente ao grupamento amida monosubstituída, tanto para o hidrogel contendo glicose, quanto para branco. Esta banda também está presente no espectro de gelatina pura (Figura 6, indicada com círculo preto). Nos hidrogéis esta banda tem a intensidade aumentada quando comparado com a gelatina pura, 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. O modo geral de ação da enzima transglutaminase na reticulação da gelatina ocorre de acordo com a descrição de Macedo e Sato (2005) apresentada na Equação 3.



A gelatina apresenta tanto resíduos de grupamento glutamina quanto de lisina (FUCHSBAUER et. al., 1996; CARVALHO e GROSSO, 2006; CORTESI et. al., 1999). Dessa forma, o produto da reação de reticulação é a formação de um grupamento amida monosubstituída bem como amônia.

Ainda na Figura 7 é possível notar a presença da banda característica do estiramento C-O também na amostra de hidrogel contendo glicose (indicação com seta verde). Houve um deslocamento para a esquerda desta banda, 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 do compostos encapsulado.

6 Conclusão

Com base nos resultados obtidos foi possível sintetizar os hidrogéis de gelatina reticulados com transglutaminase de modo a serem aplicados de forma eficaz à encapsulação da glicose, sendo estes capazes de absorver grande quantidade de fluido.

Em relação a espessura pode-se notar visualmente um hidrogel mais espesso para as amostras liofilizadas, e o seco em estufa ficou mais fino, com base que a secagem em estufa mantém uma maior acomodação estrutural. Porém, pode-se verificar que não houve diferença significativa ao avaliar este parâmetro.

O modelo do planejamento foi adequado para as amostras contendo glicose, mas não para os brancos. As variáveis independentes escolhidas não foram ideais, já que os fatores avaliados não apresentaram significância. Assim, conclui-se que o comportamento do hidrogel pode ser diferenciado no caso da utilização de blendas de proteínas. Como não houve grandes diferenças entre as amostras, em relação ao tipo de tratamento aplicado, pode-se indicar a produção de hidrogéis por secagem em estufa por ser um método de menor custo e com redução no gasto de energia. Em relação aos fatores de temperatura e quantidade de transglutaminase verifica-se que os valores escolhidos podem ter estado entre uma faixa estreita de avaliação, não tendo tanta influência, ou seja, não sendo significativos.

Quanto aos espectros obtidos na análise do FTIR verificou-se que houve reticulação devido a ação da enzima transglutaminase e a interação entre a glicose e a matriz polimérica, garantindo a encapsulação deste carboidrato.

7 Sugestões para Trabalhos Futuros

Para os trabalhos futuros podem ser consideradas as seguintes sugestões:

- Avaliação de outro tipo de agente de reticulação como a genipina;
- Avaliação da liberação controlada;
- Avaliação do grau de reticulação;
- Caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura;
- Avaliação da propriedades mecânicas dos hidrogéis;
- Formulações sem glicerol;
- Utilizar faixas maiores de comparação no planejamento experimental para a temperatura e a quantidade de transglutaminase.

8 Referencias Bibliográficas

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.

AKALA, E. O.; KOPECKOVÁ, P.; KOPECEK, J. Novel pH-sensitive hydrogels with adjustable swelling kinetics. **Biomaterials**, v. 19, p. 1037-1047, jul. 1998.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes. **Diabetes Care**, v. 37, p. 514-579, Jan. 2014. Suplemento 1.

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

ARRUDA, P. V.; RODRIGUES, R. C. L. B.; FELIPE, M. G. A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**, n. 26, p. 56-62, 2007.

ATARÉS, L., BONILLA, J.; CHIRALT, A. Characterization of Sodium Caseinate-Based Edible Films Incorporated with Cinnamon or Ginger Essential Oils. **Journal of Food Engineering**, n. 100, p. 678–687, 2010.

AUDIC, J-L.; CHAUFER, B. Influence of plasticizers and crosslinking on the properties of biodegradable films made from sodium caseinate. **European Polymer Journal**. Elsevier, n. 41, p. 1934–1942, 2005.

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.

BARBOSA, C. R. **Avaliação do glicerol proveniente da fabricação do biodiesel como substrato para produção de endotoxinas por *Bacillus thuringiensis* var. *israelenses***. 2009. 133 f. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de concentração: Conversão de biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

BEATRIZ, A.; ARAUJO, Y. J. K.; LIMA, D. P. Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. **Química Nova**, v.34, n.2, p. 306-319, 2011.

BEREGSZASZG, M. et al. Rpolyglycemia in Children and Adolescents Ependent 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.

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.

BIGI, A.; COJAZZI, G.; PANZAVOLTA, S.; ROVERI, N.; RUBINI. Stabilization of gelatina films by crosslinking with genipin. **Biomaterials**, Elsevier, v. 23, p. 4827-4832, 2002.

BRATS – Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde, n. 13, 2010.

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.

COLOMBO, P.; BETTINI, R.; SANTI, P.; PEPPAS, N. A. Swellable matrices for controlled drug delivery: gel-layer behaviour, mechanisms and optimal performance. **Pharmaceutical science & technology today**, Elsevier, v. 3, p. 198-204, 2000.

COMMITTEE REPORT. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 26, p. 155-220, Jan. 2003. Suplemento 1.

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.

COTRAN, R. S.; CRAWFORD, J. M. **Pâncreas**. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Patologia estrutural e funcional. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000.

CRISTIANO, C. M. Z. **Blendas fromadas por caseína e gelatina: efeito da adição de plastificante e de agente reticulante e interações com copolímeros**. 2009. 139 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina.

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.

DONG, Z.-J. et al. Optimization of cross-linking parameters during production of transglutaminase-hardened spherical multinuclear microcapsules by complex coacervation. **Colloids Surf. B. Biointerfaces**, n. 63, p. 41–7, 2008.

EINERSON, N. J.; STEVENS, K. R.; KAO, W. J. Synthesis and physicochemical analysis of gelatin-based hydrogels for drug carrier matrices. **Biomaterials**, Elsevier, v. 24, p. 509-523, 2002.

FABRA, M. J.; TALENS, P.; CHIRALT, A. Tensile Properties and Water Vapor Permeability of Sodium Caseinate Films Containing Oleic Acid–beeswax Mixtures. **Journal of Food Engineering**, n. 85, p. 393–400, 2008.

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.

GARCIA, J. P. D. et al. Synthesis of Gelatin- γ -Polyglutamic Acid-Based Hydrogel for the In Vitro Controlled Release of Epigallocatechin Gallate (EGCG) from *Camellia sinensis*. **Polymers**, v. 6, p. 39-58, 2014.

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

GENNADIOS, A. **Protein-based films and coatings**. CRC Press. Flórida, USA. 650 p., 2002.

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

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.

HEIDEBACH, T.; FÖRST, P.; KULOZIK, U. Transglutaminase-Induced Caseinate Gelation for the Microencapsulation of Probiotic Cells. **International Dairy Journal**. Elsevier, n. 19, p. 77–84, 2009.

JORGENSEN, L; MOELLER, E.H.; VAN DE WEERT, M.; NIELSEN, H.M.; FROKJAER, S. Preparing and evaluating delivery systems for proteins. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, n. 3-4, p. 174-182, 2006.

KAUFMAN, F. R. et al. Nocturnal Hypoglycemia Detected with the Continuous Glucose Monitoring System in Pediatric Patients with Type 1 Diabetes. **The Journal of pediatrics**, p. 626-30, 2002.

KHAN, S. A.; SCHNEIDER, M. Improvement of Nanoprecipitation Technique for Preparation of Gelatin Nanoparticles and Potential Macromolecular Drug Loading. **Macromolecular Bioscience**, v. 13, p. 455-463, 2013.

KRISTO, E.; KONSTANTINOS, P. K.; BILIADERIS, C. G. Thermal, Mechanical and Water Vapor Barrier Properties of Sodium Caseinate Films Containing Antimicrobials and Their Inhibitory Action on *Listeria Monocytogenes*. **Food Hydrocolloids**, n. 22, p. 373–386, 2008.

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.

LIN, C.; METTERS, A. T. Hydrogels in Controlled Release Formulations: Network Design and Mathematical Modeling. **Advanced drug delivery reviews**, n. 58, p. 1379–1408, 2006.

LIU, B-S. et al. A novel use of genipin-fixed gelatin as extracellular matrix for peripheral nerve regeneration. **Biomaterials Applications**, v. 19, jul. 2004.

LIU, Y.; LIU, X.; WANG, X. Biomimetic synthesis of gelatin polypeptide-assisted noble-metal nanoparticles and their interaction study. **Nanoscale Res Lett**, v. 6, n. 22, p. 1-11, 2011.

MACEDO, J. A.; SATO, H. H. **Propriedades e aplicações da transglutaminase microbiana em alimentos.** Tese de Doutorado – UNICAMP. SP, 2005.

MAIA, F. F. R.; ARAÚJO, L. R. Acurácia, utilidade e complicações da monitorização subcutânea contínua da glicose (CGMS) em pacientes pediátricos com diabetes tipo 1. **Jornal de Pediatria**, Porto Alegre, v. 81, n. 4, Jul./Ago. 2005.

MALIS, S.; GROSSMANN, M. V. E.; GARCÍA, M. A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. **Carbohydrate Polymers**, Elsevier, n. 56, p. 129-135, 2004.

MATALANIS, A.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Inhibition of Lipid Oxidation by Encapsulation of Emulsion Droplets within Hydrogel Microspheres. **Food Chemistry**. Elsevier, n. 132, p. 766–772, 2012.

MENDES, T. A. B.; GOLDBAUM, M.; SEGRI, N. J.; BARROS, M. B. A.; CESAR, C. L. G.; CARANDINA, L.; ALVES, M. C.G. P. diabetes mellitus: fatores associados à prevalência em idosos, medidas e práticas de controle e uso dos serviços de saúde em São Paulo, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 6, p. 1233-1243, 2011.

OMS. **Diabetes**, n. 312, 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/>>. 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.

PAL, K.; BANTHIA, A. K.; MAJUMDAR, D. K. Preparation and characterization of polyvinyl alcohol-gelatin hydrogel membranes for biomedical applications. **AAPS PharmSciTech**, v. 8, n. 21, 2007.

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.

PORTER, P. A. et al. Incidence and Predictive Criteria of Nocturnal Hypoglycemia in Young Children with Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. **The Journal of pediatrics**. Perth, v. 130, n. 3, p. 366–72, 1997.

PUTTIPIPAKHACHORN, 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.

REHM, H. J. Microbial production of glycerol and other polyols. **Biotechnology**, v. 6, p. 51-59, 1988.

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.

RIVERO, S.; GARCÍA, M. A.; PINOTTI, A. Crosslinking Capacity of Tannic Acid in Plasticized Chitosan Films. **Carbohydrate Polymers**. La Plata: Elsevier, n. 82, p. 270–276, 2010.

RODRIGUES, I. R. **Avaliação do glicerol proveniente da fabricação do biodiesel como substrato para produção de endotoxinas por *Bacillus thuringiensis* var. *israelenses***. 2006. 88 f. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais - PPGEM) – Escola de Engenharia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SAID, O.; KHALIL, K.; FULDER, S.; AZAIZEH, H. Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank Region. **J. Ethnopharmacol.**, v. 83, p. 251-265, 2002.

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.

TRAN, K. T.; BANERJEE, S.; LI, H.; CIMON, K.; DANEMAN, D.; SIMPSON, S. H.; CAMPBELL, K. Long-acting insulin analogues for diabetes mellitus: meta-analysis of clinical outcomes and assessment of cost-effectiveness. **Technology Report**, p. 1-48, 2007.

WANG, T. et al. Hydrogel Sheets of Chitosan, Honey and Gelatin as Burn Wound Dressings. **Carbohydrate Polymers**, n. 88, p. 75–83, 2012.

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