



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS (UFG)
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ICB)
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR (PGBM)

MAYCON CARVALHO RIBEIRO

Desenvolvimento e testes *in vivo* de nanopartículas de quitosana
contendo insulina na cicatrização de feridas em ratos diabéticos

GOIÂNIA

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

☐ Dissertação ☒ Tese ☐ Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Maycon Carvalho Ribeiro

3. Título do trabalho

Desenvolvimento e testes in vivo de nanopartículas de quitosana contendo insulina na cicatrização de feridas em ratos diabéticos

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;

- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Maycon Carvalho Ribeiro, Usuário Externo**, em 23/11/2022, às 14:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **André Corrêa Amaral, Professor do Magistério Superior**, em 25/11/2022, às 17:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3353847** e o código CRC **4D5A6A02**.

MAYCON CARVALHO RIBEIRO

Desenvolvimento e testes *in vivo* de nanopartículas de quitosana contendo insulina na cicatrização de feridas em ratos diabéticos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás (UFG), como requisito para obtenção do título de doutor em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular.

Linha de pesquisa: Genômica funcional, estrutural e proteômica.

Orientador: Professor Doutor André Corrêa Amaral.

Coorientadora: Professora Doutora Liliana Borges de Menezes

GOIANIA

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Ribeiro, Maycon Carvalho

Desenvolvimento e Testes in vivo de Nanopartículas de Quitosana
Contendo Insulina na Cicatrização de Feridas em Ratos Diabéticos
[manuscrito] / Maycon Carvalho Ribeiro. - 2019.
86 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. André Corrêa Amaral; co-orientadora Liliana
Borges de Menezes.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Genética e
Biologia Molecular, Goiânia, 2019.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas,
lista de figuras, lista de tabelas.

1. Avaliação histológica. 2. Diabetes. 3. Cicatrização. 4. Gelificação
iônica. I. Amaral, André Corrêa, orient. II. Título.

CDU 575



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE DE Nº 017

Aos dezesseis dias do mês de abril do ano de dois mil e dezenove (16/04/2019), às 09hs00min, no NUTTs – Faculdade de Medicina, reuniram-se os componentes da banca examinadora: Profa. Dra. Liliana Borges de Menezes, coorientadora ; Profa. Dra. Marina Pacheco Miguel; Profa. Dra. Elizabeth Pereira Mendes; Profa. Dra. Taís Andrade Dias de Souza e Prof. Dr. Luís Antônio Dantas Silva, para, em sessão pública presidida pela primeira examinadora citada, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: **"Tratamento cicatricial de feridas usando insulina incorporada em nanopartículas poliméricas no modelo animal diabético"**, em nível de doutorado, área de concentração em **Genética e Biologia Molecular**, de autoria de **Maycon Carvalho Ribeiro**, discente do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela presidente da banca, Profa. Dra. Liliana Borges de Menezes, que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra, a seguir, foi concedida ao autor da tese que, em cerca de 40 minutos, procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu a examinada, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se a avaliação da tese. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº 1294 de 06 de Junho de 2014 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, a tese foi aprovada, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de Doutor (a) em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega da versão definitiva da tese na secretaria do programa, com as devidas correções sugeridas pela banca examinadora, no prazo de trinta dias a



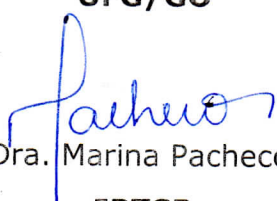
SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR
28 contar da data da defesa. Cumpridas as formalidades de pauta, às 13
29 horas e 00 minutos, encerrou-se a sessão de defesa e, para constar, a
30 presidente da Banca lavrou a presente ata que, após lida e aprovada, será
31 assinada pelos membros da banca examinadora em três vias de igual teor.

32
33
34 
35 Profa. Dra. Lilliana Borges de Menezes

36 **Presidente da Banca**

37 **IPTSP**

38 **UFG/GO**

39
40 
41 Profa. Dra. Marina Pacheco Miguel

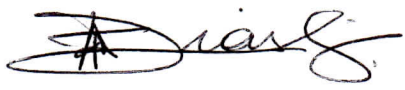
42 **IPTSP**

43 **UFG/GO**

44
45 
46 Profa. Dra. Elizabeth Pereira Mendes

47 **ICB**

48 **UFG/GO**

49
50 
51 Profa. Dra. Taís Andrade Dias de Souza

52 **UFG/GO**

53
54 
55 Prof. Dr. Luís Antônio Dantas Silva

UFG/GO



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE Nº 017

TÍTULO DO TRABALHO: "Tratamento cicatricial de feridas usando insulina incorporada em nanopartículas poliméricas no modelo animal diabético".

AUTOR (A): Maycon Carvalho Ribeiro

TESE Nº 017 DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR, DEFENDIDA E APROVADA EM SESSÃO PÚBLICA, NA DATA DE 16/04/2019, ÀS 09h00min, no NUTTs – Faculdade de Medicina, CUJA BANCA EXAMINADORA ESTEVE CONSTITUÍDA DOS SEGUINTESS PROFESSORES:

..... Profa. Dra. Liliana Borges de Menezes IPTSP UFG/GO	
..... Profa. Dra. Marina Pacheco Miguel IPTSP UFG/GO	 Profa. Dra. Elizabeth Pereira Mendes ICB UFG/GO
..... Profa. Dra. Taís Andrade Dias de Souza UFG/GO	 Prof. Dr. Luís Antônio Dantas Silva UFG/GO

HOUVE MUDANÇA NO TÍTULO? SIM (X) NÃO ()

CASO HAJA MUDANÇA, ESCREVER ABAIXO O NOVO TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

.....
Desenvolvimento e testes in vivo de nanopartículas de quitosana contendo insulina na cicatrização de feridas em rato diabético
.....

OBS: O título na dissertação impressa deve corresponder exatamente ao que se encontra na ata.

GOIÂNIA (GO) 16/04/19

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha família: Juvenal, Meridalva, Daniel, Amanda e Oziane, por todo apoio, incentivo, paciência e carinho durante toda minha caminhada.

AGRADECIMENTOS

Serei eternamente grato aos meus pais, que nunca mediram esforços para que eu tivesse a melhor educação possível. Por seu amor, encorajamento e exemplos de honestidade.

Aos meus irmãos, que sempre me incentivaram a continuar com meus projetos. Estão sempre presentes nas melhores lembranças.

À minha companheira, que está ao meu lado durante os bons e maus momentos. Sempre compreensiva e disposta a ajudar.

Aos amigos, que mesmo distantes continuam guardados no peito.

Ao meu orientador André Corrêa Amaral e à minha coorientadora Liliana Borges, por toda confiança, apoio, ensinamentos e disponibilidade para tirar dúvidas e repassar conhecimentos.

Aos amigos do Laboratório de Patologia do IPTSP, em especial as alunas Angélica, Leiny, Mara e professora Marina Pacheco.

Ao professor José Daniel e a todos os amigos do LAMAB.

Aos técnicos do Multiusuários do IPTSP, Elaine e Alex, por toda ajuda e amizade. Aos técnicos do LCQA e LCQM da Faculdade de Farmácia pelo auxílio na realização de várias análises.

Aos queridos amigos do LANAB, pela convivência e pelo carinho durante toda essa caminhada. Em especial aos amigos Ismail, Francenya, Artur, Ariádine, Raquel, Keili, Anielle, Adelaide, Jacqueline, Paulo Henrique, Viviane e Samuel, pelo companheirismo dentro e fora do laboratório.

Ao CAPES, por me conceder a bolsas para realização do meu projeto de pesquisa em tempo integral. Ao programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade e pela formação.

“Só com o coração conseguimos ver corretamente. O
essencial é invisível aos olhos.”

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

A quitosana tem sido estudada por sua capacidade de acelerar a cicatrização e vem sendo testada na terapia de lesões de difícil cicatrização, como em pacientes diabéticos. A insulina atua estimulando a via de sinalização de cicatrização de feridas. O objetivo deste trabalho foi produzir nanopartículas de quitosana contendo insulina para a avaliação da atividade cicatrizante em ratas diabéticas. Para a formação das nanopartículas, foi utilizado o método de gelificação iônica. As nanopartículas foram analisadas segundo o diâmetro, potencial zeta índice de polidispersão. Determinou-se o grau de desacetilação da quitosana pela potenciometria. Para as nanopartículas associadas à insulina obteve-se diâmetro médio de 245.9 ± 25.46 nm e potencial zeta de 39.3 ± 4.88 mV e PDI de 0.463 ± 0.01 . O grau de desacetilação médio encontrado foi de 72,95%. O ensaio de Bradford revelou que as nanopartículas incorporaram $97,19\% \pm 2,18$ de insulina. Para avaliação da cicatrização foram utilizadas 72 ratas Wistar divididas em quatro grupos: sepi gel (S), sepi gel com insulina (SI), nanopartículas de quitosana vazias (QV) e nanopartículas de quitosana contendo insulina (QI). Os grupos foram subdivididos em três subgrupos (n=6) conforme os tempos de análise histológica da ferida (3º, 7º e 14º dia). A indução do diabetes ocorreu por meio da aplicação intraperitoneal da aloxana (120mg/kg). Após a confirmação do estado de diabetes, os animais foram anestesiados e as feridas confeccionadas com auxílio de um punch de 8,0mm na região dorsal. Foram realizadas análises macroscópicas e microscópicas. Foi possível produzir nanopartículas de quitosana pelo método de gelificação iônica, com diâmetro e potencial zeta e índice de polidispersão desejados. Não encontrou-se diferenças na taxa de retração da ferida entre os quatro grupos. O uso tópico de nanopartículas de quitosana vazias ou contendo insulina na cicatrização de feridas em ratos diabéticos foi capaz de estimular a proliferação de células inflamatórias e angiogênese, seguida de maturação da ferida. Diferenças nos dados de cicatrização de feridas do grupo tratado com nanopartículas contendo insulina e do grupo tratado com insulina livre, podem estar relacionadas à alta estabilidade das nanopartículas.

Palavras-chave: Avaliação histológica, cicatrização, cicatrização e gelificação iônica.

ABSTRACT

Chitosan has been studied for its ability to accelerate healing and has been tested in the therapy of difficult-to-heal lesions, such as in diabetic patients. Insulin acts by stimulating the signaling pathway for wound healing. The objective of this work was to produce chitosan nanoparticles containing insulin for the evaluation of cicatrizing activity in diabetic rats. For the formation of the nanoparticles, the ionic gelation method was used. The nanoparticles were analyzed by diameter, potential zeta polydispersity index. The degree of deacetylation of chitosan by potentiometric was determined. For the insulin-associated nanoparticles, the mean diameter was 245.9 ± 25.46 nm and zeta potential of 39.3 ± 4.88 mV and PDI of 0.463 ± 0.01 . The mean degree of deacetylation found was 72.95%. The Bradford assay revealed that the nanoparticles incorporated $97.19\% \pm 2.18$ of insulin. To evaluate the healing, 72 Wistar rats were divided in four groups: sepiigel (S), sepiigel with insulin (SI), empty chitosan nanoparticles (QV) and chitosan nanoparticles containing insulin (IQ). The groups were subdivided into three subgroups ($n = 6$) according to the histological analysis times of the wound (3rd, 7th and 14th day). The induction of diabetes occurred through the intraperitoneal application of alloxan (120mg / kg). After confirmation of the diabetes state, the animals were anesthetized and the wounds were made with an 8.0 mm punch in the dorsal region. Macroscopic and microscopic analyzes were performed. It was possible to produce chitosan nanoparticles by the ionic gelation method, with desired diameter and zeta potential and polydispersity index. No differences were found in the rate of wound retraction among the four groups. The topical use of empty or insulin-containing chitosan nanoparticles in wound healing in diabetic rats was able to stimulate inflammatory cell proliferation and angiogenesis, followed by wound maturation. Differences in wound healing data from the group treated with insulin-containing nanoparticles and from the group treated with free insulin may be related to the high stability of the nanoparticles.

Keywords: Cicatrization, diabetes, histological evaluation, and ionic gelling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da fases da cicatrização relacionadas ao tempo de lesão e correlacionadas ao tipo celular predominante.....	4
Figura 2: Esquematização básica do receptor de insulina.	131
Figura 3: Representação das nanopartículas poliméricas.	132
Figura 4: Estrutura química da quitina poli (N-acetil- β -D-glucosamina).....	13
Figura 5: Estrutura química da quitosana	13
Figura 6: Representação química do processo de desacetilação da quitina para obtenção da quitosana.....	114
Figura 7: Representação esquemática das propriedades requeridas do material de curativo.....	176
Figura 8: Mecanismo de ação da quitosana em feridas	197
Figura 9: Interação entre quitosana (catiônica) e TPP (aniônico).....	19
Figura 10: Medidas do acompanhamento de nanopartículas de quitosana contendo insulina durante 56 dias de armazenamento	32
Figura 11: Curva Padrão da insulina	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados da triplicata da titulação potenciométrica para determinação do grau de desacetilação da quitosana. 28

Tabela 2: Tamanho, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta das nanopartículas de quitosana vazias e das nanopartículas de quitosana com insulina. 29

LISTA DE SIGLAS

AKT	serina/treonina quinase
ANOVA	análise de variância
DM	diabetes <i>mellitus</i>
DM1	diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
DM2	diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DMDI	diabetes <i>mellitus</i> dependente de insulina
DMNDI	diabetes <i>mellitus</i> não dependente de insulina
DNA	ácido desoxirribonucleico
EPC	células progenitoras endoteliais
ERK	quinases reguladoras de sinalização extracelular
FGF	fator de crescimento de fibroblastos
GFs	Fatores de Crescimento
GlcN	2-amino-2-desoxi- D-glicopirranose
GlcNAc	2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose
IL-1	interleucina 1
NO	óxido nítrico
PI3-K	fosfatidilinositol 3-quinase
RNA	ácido ribonucleico
ROS	espécies reativas de oxigênio
SH2	domínios com homologia a Src
Shc	molécula adaptadora e substrato do receptor de insulina
SHC	molécula adaptadora e substrato do receptor de insulina
TGFα	fator transformante alfa
TNFα	fator de crescimento tumoral α
TPP	trifosfato de sódio
VEGF	fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Cicatrização	4
2.1.1 Fase inflamatória	5
2.1.2 Fase proliferativa	6
2.1.3 Fase de remodelação	7
2.2 Diabetes e insulina	7
2.3 Influência do diabetes no processo de cicatrização	9
2.4 Nanotecnologia e o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas	11
2.5 Características da quitina e quitosana	13
2.6 Propriedades da quitosana	14
2.7 Propriedades cicatrizantes da quitosana	15
2.8 Nanopartículas de quitosana e suas aplicações	17
2.9 Preparo das nanopartículas de quitosana	19
2.10 Sepigel	20
3. OBJETIVO	22
3.1 Objetivo geral	22
3.2 Objetivos específicos	22
CAPÍTULO 2. CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA E DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Grau de desacetilação (GD) da quitosana <i>in natura</i>	23
4.2 Preparo das nanopartículas de quitosana	24
4.3 Eficiência de associação (EA) das nanopartículas de quitosana com insulina	25
4.4 Preparo das formulações	26
4.5 Caracterização das nanopartículas de quitosana	27
4.5.1 Tamanho médio, potencial zeta e índice de polidispersão (PDI) das nanopartículas de quitosana	27
4.5.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MEV)	27
4.5.3 Monitoramento das propriedades físico-químicas das nanopartículas	27
4.5.4 Ensaio de liberação de insulina	28
5.1 Caracterização do grau de desacetilação (GD) da quitosana <i>in natura</i>	28
5.2 Caracterização das nanopartículas de quitosana	29

5.2.1 Diâmetro médio das nanopartículas de quitosana	29
5.2.2 Índice de polidispersão (PDI).....	31
5.2.3 Potencia zeta.....	31
5.2.4 Acompanhamento das propriedades físico-químicas das nanopartículas.....	31
5.2.5 Ensaio de liberação de insulina	32
5.2.6 Eficiência de associação (EA) da insulina nas nanopartículas de quitosana .	33
6. CONCLUSÃO	35
CAPÍTULO 3. ARTIGO 1	36
CAPÍTULO 4. ARTIGO 2	42
CAPÍTULO 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
REFERÊNCIAS	70
ANEXO	82

CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO

A pele, maior órgão do corpo humano, desempenha múltiplas funções fisiológicas, tais como: proteção contra desidratação, percepção sensorial, regulação térmica e proteção a lesões química, física e microbiológica, além de ser um indicador da saúde geral do indivíduo (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2017). Ela, como todos os órgãos, está suscetível a lesões, que podem originar-se de traumas, queimaduras, pressão, estase venosa ou ainda de ulcerações secundárias a múltiplas doenças (CLARK *et al.*, 2007). Uma vez estabelecida a lesão, a pele tem sua função de barreira afetada, podendo servir como porta de entrada para microrganismos oportunistas. Portanto é de extrema importância a reparação tecidual de forma eficaz e mais rápida possível, diminuindo a chance de infecção local e sistêmica (VELNAR *et al.*, 2009).

Estudos clínicos e experimentais mostram que o processo de cicatrização de feridas é prejudicado em pacientes com diabetes (GALKOWKA *et al.*, 2006). Além disso, muitas dessas feridas não serão cicatrizadas devido a deficiências funcionais e proliferação de patógenos, gerando, em alguns casos, a necessidade de amputar o membro afetado, como é comumente observado, por exemplo, em pacientes acometidos por Diabetes *mellitus* (DM) (SHEARMAN e RAWASHDEH, 2016). O DM é uma doença crônica com manifestações de hiperglicemia e intolerância à glicose, que ocorre quando o pâncreas não produz insulina suficiente ou quando a efetividade da ação da insulina está prejudicada nos tecidos, ou ambos (APIKOGLUS-RABUS *et al.*, 2010).

Diabetes Mellitus é um importante e crescente problema de saúde para todos os países, independentemente do seu grau de desenvolvimento. Em 2015, a Federação Internacional de Diabetes (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, IDF) estimou que 8,8% (intervalo de confiança [IC] de 95%: 7,2 a 11,4) da população mundial com 20 a 79 anos de idade (415 milhões de pessoas) vivia com diabetes. Se as tendências atuais persistirem, o número de pessoas com diabetes foi projetado para ser superior a 642 milhões em 2040. Cerca de 75% dos casos são de países em desenvolvimento, nos quais deverá ocorrer o maior aumento dos casos de diabetes nas próximas décadas (SDB, 2017).

No Brasil, dados de revisão sistemática mostraram prevalência de DM por auto-relato de 5,6%, pela glicemia de jejum de 6,6%, e associando a mais de um método diagnóstico de 11,9%. Além disso, houve aumento na prevalência (associação de mais de um método diagnóstico) entre 1980 (7,4%) e 2010 (15,7%), o que pode ter sido resultado de diagnósticos mais frequentes (TELO *et al.*, 2016). Padrões temporais desfavoráveis de estilos de vida observados no país também podem ter aumentado a incidência de DM no período, contribuindo para esse crescimento. A maior parte desses dados não identifica se o indivíduo é portador de DM 1 ou 2, mas sabe-se que aproximadamente 90% destes corresponde a pessoas com DM 2. A variação global na incidência de DM 1 é alta e no Brasil, estima-se que ocorram 25,6 casos por 100,000 pessoas/ano, o que é considerado um índice elevado (NEGRATO *et al.*, 2017).

Tais fatos justificam a crescente preocupação em relação à obtenção de medicamentos que possam acelerar o processo de cicatrização das feridas e motivam a pesquisa por terapias alternativas. Atualmente, pesquisadores apostam em tratamentos à base de biomateriais aliados à fármacos com alto poder cicatrizante e antimicrobiano (NARDI, 2014). O desenvolvimento de novos materiais pela alteração da estrutura química de biopolímeros é uma área da ciência em pleno crescimento (GONSALVES *et al.*, 2011). Tais modificações estruturais visam alcançar novas propriedades nos polímeros ou melhorar as características para aplicações biológicas (MAYOL *et al.*, 2014).

A insulina age estimulando a via metabólica do processo de cicatrização. Os receptores para insulina estão presentes em vertebrados, em quantidades que variam em função do tipo de tecido. Esse hormônio pode estimular o crescimento e a diferenciação celular por meio da modificação da atividade de enzimas e sistema de transporte proteico, como observado pelo aumento nos níveis de expressão de moléculas sinalizadoras nas vias metabólicas de cicatrização (PATEL *et al.*, 2019).

A quitosana apresenta-se como um biopolímero promissor por possuir sítios reativos versáteis para alterações químicas. Seus derivados obtidos por essas transformações exibem aplicações biotecnológicas, biomédicas, farmacêuticas, na agricultura e veterinária, e na indústria alimentícia (YOUNES e RINAUDO, 2015). O desenvolvimento de novas aplicações para este biopolímero é economicamente muito atrativo, já que é obtido de fontes renováveis (SHUKLA *et al.*, 2013).

Outras características importantes da quitosana são sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, mucoadesividade, não-toxicidade e sua propriedade de adsorção que

a torna bastante viável para fabricação de géis, filmes, membranas poliméricas e sistemas de liberação de fármacos, como nanopartículas (JAYAKUMAR, 2011). Além disso, a quitosana pode acelerar a cicatrização de feridas e se mostra hemostática e bactericida (YOUNES e RINAUDO, 2015).

O principal objetivo deste trabalho foi produzir nanopartículas de quitosana sistema carreador da insulina e avaliar a sua capacidade cicatrizante em ratas diabéticas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cicatrização

A pele desempenha importantes funções, tais como, termorregulação corpórea, proteção química e física contra agentes externos, proteção contra a perda de água e transmissão de informações do ambiente para o sistema nervoso central (DIAS, 2012; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2017). Por ser a primeira barreira de proteção do corpo, a pele se encontra suscetível a injúrias ambientais que podem provocar danos à sua integridade. Assim, ferimentos com ou sem perda de tecido podem causar desequilíbrio fisiológico a este órgão e às estruturas protegidas por ele, deixando o organismo vulnerável à micro-organismos patogênicos e oportunistas (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2017).

O processo de restauração da pele é indispensável à vida e quanto mais rápido ocorrer, menor será o tempo de exposição do organismo a uma série de patógenos (DIAS, 2012). A reparação tecidual é um processo que tem sido convenientemente dividido em três fases que se sobrepõem de forma contínua e temporal: inflamação, proliferativa e de remodelamento da matriz extracelular (FRANCIS-GOFORTHET *et al.*, 2010) (Figura 1).

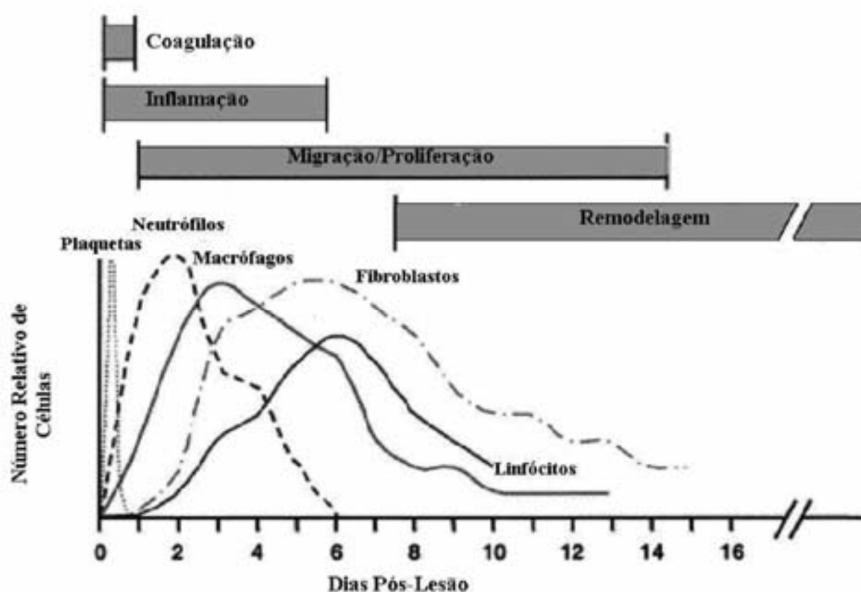


Figura 1: Representação esquemática das fases da cicatrização relacionadas ao tempo de lesão e correlacionadas ao tipo celular predominante. Fonte: Adaptado de MENDONÇA e COUTINHO-NETTO, 2009.

2.1.1 Fase inflamatória

Após o ferimento, o sangue extravasa e preenche a área lesada com plasma e elementos celulares, principalmente plaquetas. A agregação plaquetária e a coagulação sanguínea criam uma espécie de tampão, rico em fibrina, que além de restabelecer a hemostasia e formar uma barreira que impede a entrada de microrganismos, organiza matriz provisória necessária para a migração celular. Essa matriz servirá também, como reservatório de citocinas e fatores de crescimento que serão liberados durante os próximos estágios do processo cicatricial (EMING *et al.*, 2007).

As plaquetas, fundamentais na formação desse tampão hemostático, também secretam diversos mediadores, incluindo fatores de crescimento, liberados na área da lesão. Entre os mediadores liberados estão vários fatores de crescimento, como o derivado de plaquetas (PDGF), o de crescimento transformante- β (TGF- β), o de crescimento epidérmico (EGF), o de crescimento transformante- α (TGF- α) e o fator de crescimento de células endoteliais (VEGF), além de glicoproteínas adesivas como a fibronectina e trombospodina, que são importantes constituintes da matriz extracelular provisória (LI e CHEN, 2007). A ativação da cascata de coagulação e a liberação dos fatores de crescimento produzem numerosos mediadores vasoativos e fatores quimiotáticos que auxiliam o recrutamento das células inflamatórias no local da ferida (SANTORO e GAUDINO, 2005).

Neutrófilos e monócitos, em resposta aos agentes quimiotáticos, migram para o leito da ferida (PERANTEU *et al.*, 2008). Além da função de fagocitose de bactérias, fragmentos celulares e corpos estranhos, essas células inflamatórias produzem fatores de crescimento, que preparam a ferida para a fase proliferativa, quando fibroblastos e células endoteliais também serão recrutados (BALBINO *et al.*, 2005).

Os monócitos do sangue periférico, tanto no início quanto no transcorrer do processo cicatricial, continuam a infiltrar-se no local da ferida em resposta a agentes quimiotáticos para monócitos, como o PDGF, por exemplo. A liberação dos fatores provenientes das plaquetas, assim como a fagocitose dos componentes celulares, como fibronectina ou colágeno, contribuem também para a ativação dos monócitos, transformando-os em macrófagos que são as principais células envolvidas no controle do processo de reparo (HARPER *et al.*, 2014).

O macrófago ativado é a célula principal do processo de reparo tecidual, degradando e removendo componentes do tecido conjuntivo danificado, como colágeno,

elastina e proteoglicanas. Além da fagocitose de fragmentos celulares, os macrófagos também secretam fatores quimiotáticos que atraem outras células inflamatórias ao local da ferida e produzem prostaglandinas, que funcionam como potentes vasodilatadores, afetando a permeabilidade dos microvasos (HARPER *et al.*, 2014). Os macrófagos produzem vários fatores de crescimento, tais como o PDGF, o TGF- β , o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o VEGF, que se destacam como as principais citocinas necessárias para estimular a formação do tecido de granulação (ISAAC *et al.*, 2010).

2.1.2 Fase proliferativa

A fase proliferativa é onde ocorre o fechamento da lesão. Certos eventos caracterizam essa fase, tais como: reepitelização, fibroplasia e angiogênese (LI e CHEN, 2007). A reepitelização, inicia-se horas após a lesão, com a movimentação das células epiteliais oriundas das margens e do leito da lesão. Células da camada basal do tecido epidermal possuem potencial mitótico latente. Em tecidos normais, este se encontra inibido pelo contato existente entre as células pela “inibição por contato”. Com a ocorrência de uma lesão, este mecanismo inibitório desaparece e as células entram imediatamente em processo mitótico (BALBINO *et al.*, 2005). Fibroplasia e angiogênese compõem o chamado tecido de granulação responsável pela ocupação do tecido lesionado cerca de quatro dias após a lesão. Os fibroblastos produzem a nova matriz extracelular necessária ao crescimento celular enquanto os novos vasos sanguíneos levam oxigênio e nutrientes necessários ao metabolismo celular local (GANTWERKER e HOM, 2011).

A fase proliferativa inicia-se por estimulação mitogênica e quimiotática dos queratinócitos pelo TGF- α e EGF (ISAAC *et al.*, 2010). Tão importante quanto a epitelização, que começa nessa fase do processo de reparo, é a formação do chamado tecido de granulação, nome atribuído sobretudo pela característica granular devida a presença de novos capilares neoformados essenciais ao processo de reparo (MENDONÇA e COUTINHO-NETTO, 2009).

A migração das células endoteliais e o desenvolvimento de novos capilares de estrutura tubular dependem não apenas das células e citocinas presentes, mas também de uma produção e organização dos componentes da matriz extracelular, incluindo fibronectina, colágeno, fibronectina, tenascina e laminina, tanto no tecido de granulação quanto na membrana endotelial basal (TAZIMA *et al.*, 2008). A matriz extracelular é

fundamental para o crescimento e manutenção normal dos vasos, pois, além de dar suporte à migração celular, age também como reservatório e modulador da liberação de fatores de crescimento, como o FGF2 e o TGF- β (HARPER *et al.*, 2014).

2.1.3 Fase de remodelação

Nessa fase do processo reparação tecidual ocorre uma tentativa de recuperação da estrutura tecidual normal, que é marcada pela maturação dos elementos e alterações na matriz extracelular, ocorrendo o depósito de proteoglicanas e colágeno (MARTINS *et al.*, 2013). Em fase mais avançada, os fibroblastos do tecido de granulação transformam-se em miofibroblastos comportando-se como um tecido contrátil responsivo aos agonistas que estimulam o músculo liso. Ao mesmo tempo, a matriz extracelular se reorganiza, e se transforma de provisória em definitiva (LAUREANO e RODRIGUES, 2011). Com o transcorrer do processo de maturação e remodelagem, a maioria dos vasos, fibroblastos e células inflamatórias desaparecem do local da ferida mediante processos de emigração, apoptose ou outros mecanismos desconhecidos de morte celular. As principais citocinas envolvidas nessa fase são: fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina (IL-1), PDGF e TGF- β produzidas pelos fibroblastos, além das produzidas pelas células epiteliais como EGF e TGF- β (DEMIDOVA-RICE *et al.*, 2012). A reepitelização, que é o recobrimento da ferida por novo epitélio e consiste tanto na migração quanto na proliferação dos queratinócitos a partir da periferia da lesão, também ocorre durante a fase proliferativa (MENDONÇA e COUTINHO-NETTO, 2009).

2.2 Diabetes e insulina

O pâncreas é uma glândula anficrina, que possui além de funções digestivas, a função de secretar hormônios importantes, que são cruciais para a regulação normal do metabolismo da glicose, lipídeos e proteínas. Ele é formado por dois tipos principais de tecidos: os ácinos, que secretam o suco digestivo no duodeno, e as ilhotas de Langerhans, que secretam a insulina e o glucagon diretamente no sangue. As ilhotas contêm três tipos celulares principais, alfa, beta e delta, sendo aproximadamente 60% delas do tipo beta, responsáveis pela secreção de insulina (GUYTON e HALL, 2017).

A insulina é um hormônio peptídico globular de 51 aminoácidos, formado por duas cadeias, uma com 21 aminoácidos e outra com 30 aminoácidos, unidas por pontes

dissulfeto. É sintetizada nas ilhotas pancreáticas por meio das células β como um pré-hormônio que posteriormente será processado dando origem à uma molécula ativa. Este hormônio então se liga aos seus receptores e ativa os sistemas de transporte de glicose através da membrana celular (GUYTON e HALL, 2017).

Além disso, é um hormônio anabólico com poderosas ações metabólicas e de promoção de crescimento celular. Os efeitos metabólicos são observados na regulação da homeostase da glicose, principalmente em tecidos hepáticos e periféricos (músculo e tecido adiposo), apresentando também ação integrada no metabolismo dos carboidratos, proteínas e lipídeos (KAPOOR, 2008). Também promove o crescimento e a diferenciação celular, que ocorrem por meio da modificação da atividade de uma variedade de enzimas e sistemas de transporte proteico, que levam à síntese de RNA e DNA (ANITHA *et al.*, 2014).

O diabetes é uma doença crônica com manifestações de hiperglicemia e intolerância à glicose, que ocorre quando o pâncreas não produz insulina suficiente ou quando a efetividade da ação da insulina está prejudicada nos tecidos, ou ambos (GALLAGHER *et al.*, 2007). Pode causar complicações agudas (hipoglicemia, cetoacidose e síndrome hiperosmolar hiperglicêmica não cetótica) e crônicas, micro (retinopatia, nefropatia, neuropatia) e macrovasculares (doença arterial coronariana, arterial periférica e cerebrovascular). Com o aumento mundial dos casos do diabetes, suas complicações têm se tornado cada vez mais uma preocupação para a saúde pública (NEGRATO *et al.*, 2017). Há dois tipos de DM conhecidos: Diabetes mellitus dependente de insulina (DMDI) ou diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) e diabetes mellitus não dependente de insulina (DMNDI) ou diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) (DIAS, 2012).

A DM1 é caracterizada pela ausência ou insuficiência de produção de insulina pelas células β pancreática, tornando o paciente insulino-dependente. A perda da capacidade de secreção de insulina é resultado da destruição ou deficiência das células β nas ilhotas de Langerhans (SCHMIDT *et al.*, 2014). A destruição dessas células é geralmente causada por processo autoimune, o qual pode ser detectado pela presença de autoanticorpos circulantes no sangue periférico (antidescarboxilase do ácido glutâmico ou anti-GAD, anti-ilhotas e anti-insulina). Em menor proporção, a causa é desconhecida (idiopático) (TELO *et al.*, 2016). A destruição das células beta geralmente é rapidamente progressiva. O pico de incidência do DM 1 ocorre em crianças e adolescentes, entre 10 e 14 anos, mas pode ocorrer também, menos comumente, em adultos de qualquer idade.

Nos adultos, o DM 1 pode ter desenvolvimento lento e progressivo de acordo com a deficiência de insulina (O'NEILL *et al.*, 2017).

O diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) corresponde a 90 a 95% de todos os casos de DM. Possui etiologia complexa e multifatorial, envolvendo componentes genético e ambiental (SKYLER *et al.*, 2017). Geralmente, o DM2 acomete indivíduos a partir da quarta década de vida, embora se descreva, em alguns países, aumento na sua incidência em crianças e jovens (RAO, 2015). Trata-se de doença poligênica, com forte herança familiar, ainda não completamente esclarecida, cuja ocorrência tem contribuição significativa de fatores ambientais. Dentre eles, hábitos dietéticos e inatividade física, que contribuem para a obesidade, destacam-se como os principais fatores de risco (KEMPPAINEN *et al.*, 2015). O diabetes tipo 2 se desenvolve quando as células β não secretam insulina suficiente para acompanhar a demanda, geralmente no contexto de aumento da resistência à insulina. Uma minoria de pessoas diagnosticadas com diabetes tipo 2 também tem evidência de autoimunidade de ilhotas (SKYLER *et al.*, 2017).

2.3 Influência do diabetes no processo de cicatrização

Fatores sistêmicos e locais como a idade, sedentarismo, estado nutricional, uso contínuo de medicamentos, localização anatômica da ferida, presença de infecção e tecido desvitalizado podem interferir no processo de cicatrização da pele e retardar sua recuperação, representando um desafio clínico a ser superado (GANTWERKER e HOM, 2011). Dentre as doenças, merece destaque por seu comprometimento com a cicatrização, o DM (BALTZIS *et al.*, 2014).

Estudos clínicos e experimentais têm mostrado que o processo de cicatrização de feridas está prejudicado em pacientes com diabetes (SDB, 2017). O surgimento de uma ferida em um organismo desencadeia uma cascata de reações celulares e bioquímicas com o objetivo de reparar o tecido lesionado. Em pacientes diabéticos, este reparo é lentificado e sujeito a complicações, tais como dificuldade de cicatrização levando à infecção por patógenos oportunistas podendo inclusive, levar à amputação do membro afetado (LAUREANO e RODRIGUES, 2011). Alguns mecanismos são apontados como fatores importantes na diminuição do processo de cicatrização nesta patogênese, dentre eles merecem destaque a produção excessiva de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS, do Inglês *Reactive Oxygen Species*), diminuição de Óxido Nítrico (NO, do Inglês *Nitric*

Oxide), diminuição da resposta aos Fatores de Crescimento (GFs, do Inglês *Growth Factors*) e das proteínas da via de sinalização da insulina (LIMA e ARAÚJO, 2013).

As feridas em indivíduos com diabetes apresentam prolongada inflamação, pobre angiogênese e uma menor deposição de matriz, quando comparado com a cicatrização de feridas comuns (DESTA *et al.*, 2010). Essas lesões apresentam na fase inflamatória, atraso na ativação dos macrófagos e leucócitos e consequentemente menor taxa de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e fatores de crescimento como TGF- β , VEGF e IGF, um elevado nível de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 (PELEGRINELLI *et al.*, 2001; MARTINS *et al.*, 2013).

A fase de reepitelização apresenta uma inibição na proliferação e migração dos queratinócitos. A redução na proliferação celular e uma menor contração da ferida são devidas às elevadas taxas de citocinas inflamatórias que estimulam o aumento de níveis de proteases como metaloproteinase-9 (MMP-9), que são capazes de destruir TGF- β e MEC (matriz extracelular), nas feridas de animais com diabetes. Além disso, a fase de remodelamento é marcada por uma reduzida deposição de colágeno em virtude da menor proliferação dos fibroblastos (PELEGRINELLI *et al.*, 2001; APIKOGLUS-RABUS *et al.*, 2010).

Outra via envolvida neste processo é a da sinalização da insulina (figura 2), expressa na pele intacta de animais, sendo que, com o estímulo exógeno de insulina, ocorre a ativação de proteínas. Identificou-se que as proteínas envolvidas na via de sinalização de insulina em ferida cutânea de animais diabéticos estão reduzidas em relação aos animais saudáveis. Proteínas envolvidas no início da cascata de sinalização da insulina, ou seja, Receptor de Insulina (IR), Substrato 1 e 2 do Receptor de Insulina (IRS-1/2), e a Serina/Treonina Quinase AKT, estão aumentadas no tecido cicatricial tratado com creme enriquecido com insulina (LIMA *et al.*, 2012).

A ativação da AKT é fundamental para a liberação de Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) em feridas cutâneas, por meio de um mecanismo pós-transcricional em queratinócitos. O estímulo com a insulina tópica é também capaz de ativar a Proteína Quinase com Atividade Mitogênica (ERK). Através da fosforilação das Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos (MAP quinase), a ERK ativada se transloca para o núcleo onde catalisa a fosforilação de fatores de transcrição, o que leva à proliferação celular ou diferenciação. A ERK é essencial para as vias de sinalização migratórias de queratinócitos. O aumento da liberação dos fatores de crescimento (GF),

como VEGF, indica uma inter-relação da via de sinalização da insulina e os GF (AZEVEDO, 2013).

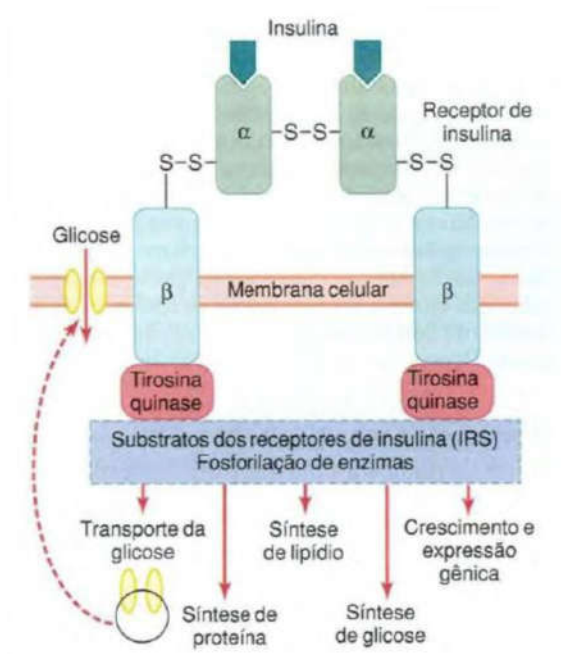


Figura 2: Esquemática básica do receptor de insulina. A insulina liga-se à subunidade *alfa* de seu receptor, o que provoca autofosforilação do receptor da subunidade *beta*, que por sua vez, induz a atividade da tirosina quinase. A atividade da tirosina quinase do receptor inicia uma cascata de fosforilação celular que aumenta ou diminui a atividade das enzimas, incluindo os substratos dos receptores de insulina que medeiam os efeitos da insulina sobre a glicose, lipídeos e metabolismo proteico. Por exemplo, os transportadores de glicose são translocados para a membrana celular para facilitar a entrada da glicose na célula.

2.4 Nanotecnologia e o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas

A nanotecnologia refere-se ao desenvolvimento de estruturas em escala molecular e o controle de materiais em uma escala atômica, ou seja, por volta de dois décimos de um nanômetro. Assim na nanotecnologia realiza-se o estudo e manuseio de estruturas entre 1 e 100 nanômetros, em que um nanômetro equivale a um bilionésimo de um metro (10^{-9} m) (NEVES, 2014). As forças que influenciam o comportamento da matéria em escala nanométrica não são as mesmas que influenciam a matéria em escala macrométrica como, por exemplo: gravidade, solubilidade, condutividade térmica e elétrica, entre

outros. Na escala nanométrica, as partículas têm uma área superficial muito maior em relação ao volume, o que aumenta sua interação química (SAINI *et al.*, 2010). Além disso, as forças eletrostáticas são as que mais influenciam nas características do material na nanoescala (SINGH e LILLARD, 2009).

A nanotecnologia tornou-se um dos principais focos de pesquisa, desenvolvimento e inovação em países industrializados. Atualmente a nanociência está sendo utilizada para criar novos materiais, produtos e processos por meio da manipulação de átomos e moléculas. Assim, a formulação de nanopartículas poliméricas tem papel fundamental na pesquisa aplicada à saúde (YOUNES e RINAUDO, 2015).

Segundo Aouada (2009), as nanopartículas poliméricas são representadas pelas nanocápsulas e nanoesferas, que diferem quanto à composição e organização estrutural. As nanocápsulas, constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, apresentam o fármaco de interesse solubilizado no centro ou presente na parede do polímero. Por outro lado, as nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição. São formadas por uma matriz polimérica (Figura 3), a qual não possui diferenciação de núcleo, tratando-se, portanto, de uma matriz mais homogênea. Nessas nanoesferas, o fármaco pode encontrar-se na superfície, interior ou de forma dispersa na matriz.

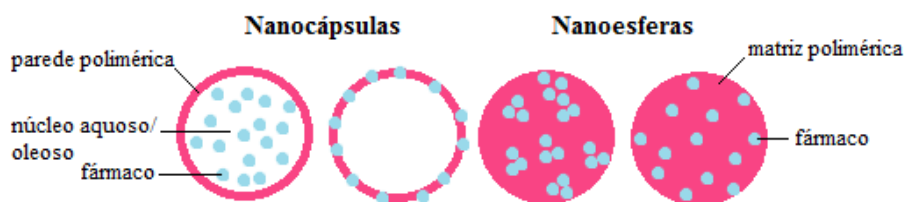


Figura 3: Representação das nanopartículas poliméricas. Fonte: Adaptação de YOUNES e RINAUDO, 2015.

As nanopartículas poliméricas estão sendo cada vez mais estudadas por suas propriedades de liberação sustentada e por alcançar sítios específicos de ação de fármacos. Um material que vem se destacando e sendo largamente utilizado é a quitosana, um polissacarídeo de alto peso molecular obtido através da desacetilação parcial da quitina formado por cadeias de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas com grupos amino disponíveis para reações (ING *et al.*, 2012).

2.5 Características da quitina e quitosana

A quitina é um biopolímero distribuído em grande quantidade na natureza, sendo encontrada como microfibrilas cristalinas dispostas ordenadamente formando os componentes estruturais dos exoesqueletos de insetos, crustáceos e na parede celular de fungos e algumas bactérias (DOUNIGHI *et al.*, 2012). É um polissacárido não ramificado à base de glicose, assim como a celulose. No entanto a celulose apresenta no carbono C-2 um grupo hidroxila, enquanto a quitina apresenta um resíduo acetaminado. A quitina possui estrutura linear formada por monômeros de *N*-acetil-D-glucosamina, unidos por meio de ligações glicosídicas do tipo β -1,4 (Figura 4) (YOUNES e RINAUDO, 2015).

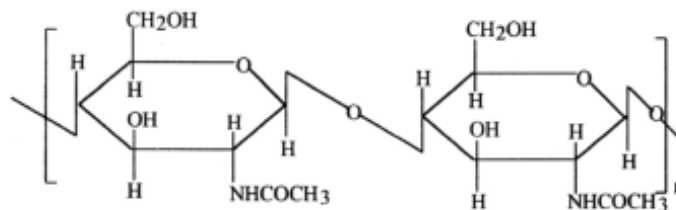


Figura 4: Estrutura química da quitina poli (N-acetil- β -D-glucosamina). Fonte: Adaptado de LIMA e ARAÚJO, 2013.

A quitosana é um biopolímero obtido a partir da N-desacetilação alcalina parcial da quitina e se apresenta na forma de um copolímero formado por unidades estruturais de 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose (*GlcN*) e 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose (*GlcNAc*) unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1 $\rightarrow$ 4) (Figura 5), em que as unidades estruturais de glicosamina (*GlcN*) estão sempre em maior proporção (DEEPTHI *et al.*, 2016).

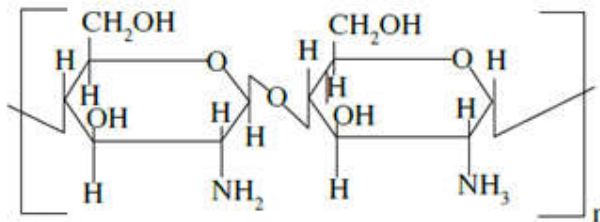


Figura 5: Estrutura química da quitosana. Fonte: Adaptado de LIMA e ARAÚJO, 2013.

Na obtenção da quitosana por meio da N-desacetilação da quitina, os grupos acetamido ($-\text{NHCOCH}_3$) das unidades de N-acetilglicosamina (*Gl-NAc*) remanescentes do precursor são convertidos em grupos amino ($-\text{NH}_2$), em porcentagens variadas, para originar o heteropolissacarídeo com diferentes graus médios de substituição (NEVES *et al.*, 2014). O produto da desacetilação da quitina passa a ser chamado de quitosana apenas quando o grau de desacetilação torna-se igual ou superior a 60% (Figura 6). A partir dessa porcentagem esse biopolímero torna-se solúvel em soluções ácidas (ANITHA *et al.*, 2014). Como resultado das diferentes quantidades de unidades acetiladas, quitina e quitosana apresentam distintos níveis de solubilidade. A quitina é insolúvel na maioria dos solventes, enquanto que a quitosana é solúvel em soluções aquosas de ácidos orgânicos e inorgânicos (DEEPTHI *et al.*, 2016).

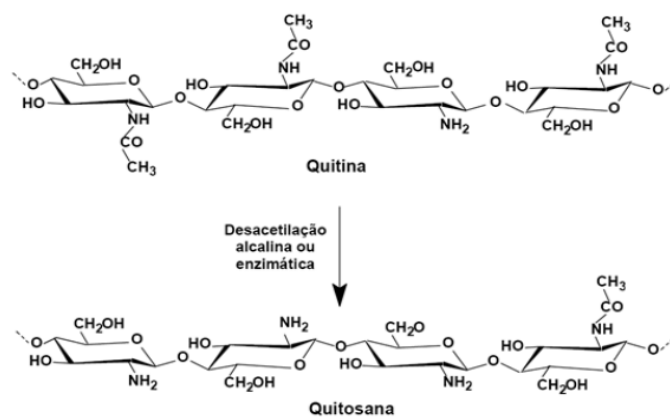


Figura 6: Representação química do processo de desacetilação da quitina para obtenção da quitosana. Fonte: Adaptado de LIMA e ARAÚJO, 2013.

2.6 Propriedades da quitosana

Geralmente a quitosana é insolúvel em soluções aquosas como pH acima de 7. Mas é solúvel na maioria das soluções de ácidos orgânicos com pH inferior a 6,0, como ácido glutâmico, ácido clorídrico, ácidos láctico e acético. Após a dissolução em meio ácido, ocorre a protonação dos grupos amino livres, tornando a molécula carregada positivamente. Assim a quantidade de grupos aminos protonados ($-\text{NH}_3^+$) na cadeia polimérica influencia diretamente a solubilidade da quitosana (FERREIRA *et al.*, 2009).

Quanto maior a presença desses grupos, maior será a repulsão eletrostática entre eles e maior será sua solvatação em água (SHALUMON *et al.*, 2010). Com isso, as diversas aplicações da quitosana dependem do conhecimento da porcentagem de grupos

amina (-NH₂) presentes na cadeia (RODRIGUEZ-VAZQUEZ *et al.*, 2015). O pH do solvente utilizado, assim como a concentração e peso molecular da quitosana interferem diretamente na viscosidade dos biopolímeros obtidos (NEVES *et al.*, 2014). A alta hidrofiliabilidade da quitosana, devida ao elevado número de grupos hidroxila e grupos amino presentes na cadeia polimérica, permite sua utilização como biomaterial na forma de nano e micropartículas, gel e membrana em diversas aplicações, como veículo de liberação de fármacos, bandagens, géis injetáveis, membranas periodontais e nanopartículas (TAMURA *et al.*, 2010).

Há uma gama de estudos relacionados à quitosana, abrangendo diversas áreas, englobando principalmente, aspectos nos âmbitos farmacêuticos e químicos. Além disso, este biopolímero vem se destacando na área de alimentos funcionais, por apresentar segundo, características que ajudam a promover redução do colesterol e perda de peso (SUDHEESH KUMAR *et al.*, 2013). Quitosana pura ou carreando colágeno e FGF também se mostraram eficazes no reparo de lesões de difícil cicatrização. Estas formulações foram avaliadas na forma de esponja e hidrogel em feridas de ratos diabéticos nos quais foram capazes de acelerar o processo de cicatrização e contração da ferida, atuando também como sistemas de liberação controlada do fator de crescimento (JAYAKUMAR *et al.*, 2011; DIAS, 2012).

2.7 Propriedades cicatrizantes da quitosana

Um grande número de grupos de pesquisa dedica-se à produção de novos e melhorados curativos, sintetizados pela modificação de materiais biocompatíveis. As estratégias estão focadas na aceleração do reparo da ferida por materiais curativos sistematicamente projetados (SUDHEESH KUMAR *et al.*, 2013). Especialmente, os esforços estão focados no uso de materiais biologicamente derivados, tais como, quitina e seus derivados, que são capazes de acelerar os processos de cura nos níveis molecular, celular e sistêmico (JAYAKUMAR *et al.*, 2011). A quitina é um material biológico de fácil obtenção e baixo custo obtido a partir do esqueleto dos invertebrados, bem como da parede celular dos fungos. A quitina e seu derivado, a quitosana, são agentes biocompatíveis, biodegradáveis, não tóxicos, antimicrobianos e hidratantes. Por conta destas propriedades, apresentam boa biocompatibilidade e efeitos positivos na cicatrização de feridas (ANITHA *et al.*, 2014). Estudos mostraram que os curativos à base de quitina podem acelerar o reparo de diferentes tecidos, facilitando a contração de

feridas e regulando a secreção dos mediadores inflamatórios, como interleucina 8, prostaglandina E, interleucina 1 β e outros (MAYOL *et al.*, 2014).

Nas feridas, a quitosana fornece uma matriz não proteica para o crescimento de tecido e ativação de macrófagos para atividade tumoricida, além de estimular a proliferação celular e a organização do tecido histoarterial. É um hemostático, que ajuda na coagulação natural do sangue e bloqueia as terminações nervosas, reduzindo a dor (Figura 7). Ela gradualmente se despolimeriza, liberando N-acetil- β -D-glucosamina, que ativa a proliferação de fibroblastos, ajuda na deposição de colágeno e estimula o aumento do nível de síntese de ácido hialurônico natural no local da ferida (DEEPTHI *et al.*, 2016).

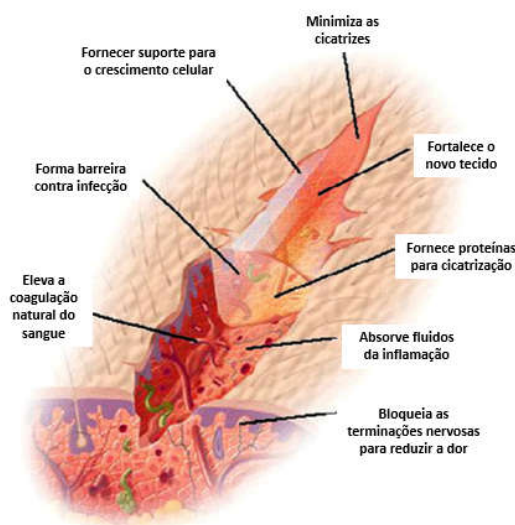


Figura 7: Representação esquemática das propriedades requeridas do material de curativo. Fonte: Adaptado de PAUL e SHARMA, 2004.

A Figura 7 representa o mecanismo de ação da quitosana em feridas. Ela também contribui na cicatrização mais rápida de feridas e na prevenção de cicatrizes (RODRIGUEZ-VAZQUEZ *et al.*, 2015). A quitosana pode ser facilmente processada em hidrogéis (TAMURA *et al.*, 2010), membranas (MADHUMATHI *et al.*, 2009), nanofibras (SHALUMON *et al.*, 2010), beads (JAYAKUMAR *et al.*, 2006), micro e nanopartículas (DEV *et al.*, 2010), scaffolds (PETER *et al.*, 2009), e esponjas (PORTERO *et al.*, 2007) para vários tipos de aplicações biomédicas, como entrega de drogas e genes (JAYAKUMAR *et al.*, 2010a), cicatrização de feridas (TAMURA *et al.*, 2010) e engenharia de tecidos (JAYAKUMAR *et al.*, 2010d; TAMURA *et al.*, 2010).

O processo de biodegradação da quitosana empregada em tratamento de feridas ocorre através da sua despolimerização realizada por lisozimas e N-acetil- β -D-glucosaminidase, uma enzima lisossômica (figura 8). A hidrólise da quitosana resulta em açúcares que são reabsorvidos e na liberação de N-acetilglicosamina, glicosamina e outros oligômeros da quitosana que desencadeiam a ativação de macrófagos, promovem a deposição de colágeno e também são incorporados como componentes da matriz extracelular. A cicatrização resultante da atividade da quitosana se mostra com deposição correta de colágeno e a presença normal de células (DEEPTHI *et al.*, 2016). Segundo Harper *et al.*, (2014), a granulação e organização do tecido cicatricial são provocadas pelo aumento das células inflamatórias devido a ação da quitosana, já que a mesma exerce ação sobre células polimorfonucleares, macrófagos e fibroblastos.

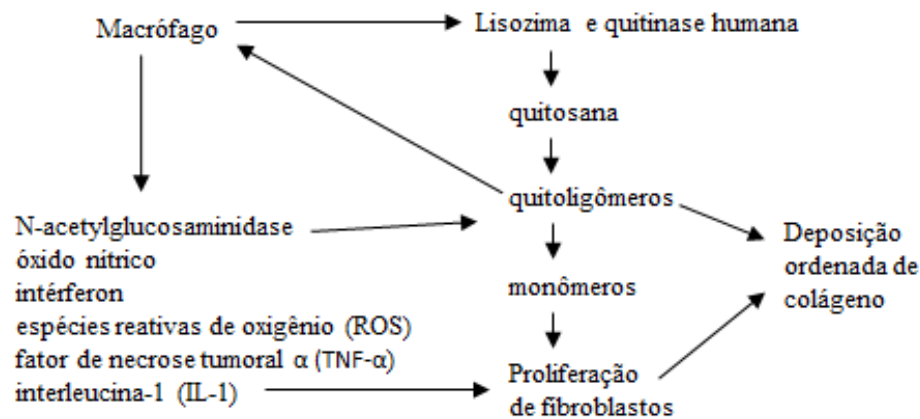


Figura 8: Mecanismo de ação da quitosana em feridas. Lisozimas produzidas por macrófagos e quitinase humana hidrolisam a quitosana em oligômeros de quitosana, os quitoligômeros, que ativam os macrófagos que irão aumentar a produção de N-acetilglucosaminidase, quitinase e lisozima, que catalisam a despolimerização total à monômeros que se tornam disponíveis aos fibroblastos, que irão se proliferar pela ação de IL-1, produzida pelos macrófagos e orientam a deposição de colágeno juntamente com os quitoligômeros. A ativação dos macrófagos pelos quitoligômeros também desencadeia a produção de óxido nítrico, interferon, espécies reativas de oxigênio (ROS) e fator de crescimento tumoral α (TNF α). Fonte: adaptação de MUZZARELLI, 1997.

2.8 Nanopartículas de quitosana e suas aplicações

As nanopartículas de quitosana estão sendo amplamente empregadas para carregamento e liberação de diferentes tipos de fármacos, uma vez que, conferem proteção ao princípio ativo, é atóxica e biocompatível, não causando reações alérgicas e nem rejeições e por propiciar a possibilidade de administração do fármaco por diferentes rotas. Sua degradação ocorre de forma lenta e resulta em produtos açúcares aminados, que são absorvidos pelo próprio organismo (LI *et al.*, 2011).

A liberação do fármaco carregado pela quitosana ocorre através da sua degradação provocada principalmente por lisozimas, o que a torna um polímero biodegradável (DEEPTHI *et al.*, 2016). De acordo com Gonçalves *et al.*, (2011), a taxa de liberação do fármaco a partir de matrizes de quitosana é relacionada com pH do meio em que a mesma se encontra, portanto sofre alterações de acordo com as mudanças do pH. A porosidade da nanopartícula e a solubilidade do fármaco também influenciam na taxa de liberação.

As aplicações das nanopartículas são as mais diversas, principalmente na área biomédica. Mokarram e Alonso (2006) estudaram nanopartículas de quitosana como forma de melhorar a entrega de vacinas pela rota nasal para o toxoide da difteria. Foi demonstrado que as nanopartículas conseguiram se associar de forma eficiente ao toxoide bem como realização do carregamento e entrega pela rota nasal com consequente aumento da resposta imune humoral em modelo murino, quando comparado com a forma tradicional da vacina. Por fim concluíram que as nanopartículas de quitosana são grandes promissoras para entrega de vacinas pela rota nasal.

Outro exemplo se dá por Roy *et al.*, (1999) com a estratégia de entrega oral de DNA carregado por nanopartículas de quitosana. O sistema de entrega foi sintetizado com plasmídeo contendo gene alérgeno ao amendoim e quitosana. A administração em camundongos resultou na expressão do gene no epitélio intestinal, produção de imunoglobulina A (IgA) e imunoglobulina G2 (IgG2), redução na anafilaxia induzida por alérgeno e também na quantidade de Imunoglobulina E (IgE). Demonstraram que as nanopartículas de quitosana carregando DNA são eficientes para modular respostas anafiláticas em murinos e seriam úteis para profilaxia no tratamento de alergias à alimentos.

Lima *et al.*, (2012) utilizaram um creme de insulina com concentração de 0,5 UI/g em um estudo sobre a avaliação da cicatrização de feridas em ratos diabéticos. Verificaram que quando a pele ferida de ratos diabéticos é tratada com um creme de insulina tópico, ocorre uma aceleração da cicatrização de feridas, em associação com uma recuperação nas proteínas das vias de sinalização de insulina.

2.9 Preparo das nanopartículas de quitosana

Diversos métodos podem ser empregados para a construção de nanopartículas de quitosana, como: gelificação iônica, emulsão, síntese com carboximetil celulose, formulações utilizando glutaraldeído, síntese com alginato, coacervação, e a polimerização micelar com poli(metacrilato de hidroxietilo) reversa (PINHO *et al.*, 2014).

A gelificação iônica exibe uma série de vantagens quando comparada a outros métodos: as nanopartículas são obtidas espontaneamente sob brandas condições de controle e sem a necessidade de aumento de temperaturas, solventes orgânicos ou de sonicação (Figura 9). Nesse método, a quitosana precisa passar pelo processo de reticulação (CALVO *et al.*, 1997). O objetivo das reações de reticulação é promover alterações em certas propriedades do biopolímero, como, estabilidade química e térmica, rigidez estrutural, permeabilidade, cor, eficiência em quelação e capacidade de imobilização proteica e celular (PINHO *et al.*, 2014).

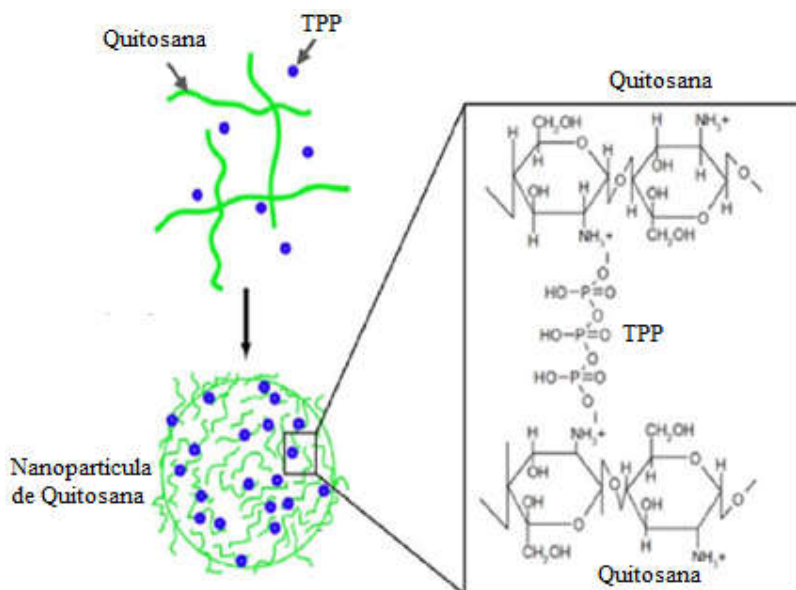


Figura 9: Interação entre quitosana (catiônica) e TPP (aniônico). Reticulação da quitosana por forças eletrostáticas entre a quitosana com cargas positivas e TPP com cargas negativas. Fonte: adaptado de PAZ *et al.*, 2011.

As características físico-químicas da quitosana utilizada, assim como as condições reacionais empregadas influenciam o processo de reticulação. A razão para esse tipo de modificação química da quitosana deve-se à aplicação do produto final (UPPALAPATI

et al., 2016). Por exemplo, a fabricação de adsorventes e de resinas de pré-concentração requer biopolímeros resistentes a meios fortemente ácidos; assim, a reticulação química é capaz de conferir essa propriedade aos polímeros (JAFARINEJAD *et al.*, 2012).

No desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos há a necessidade de matrizes permeáveis à água e capazes de reter, transportar e liberar as substâncias eficientemente, por esse motivo, algumas reticulações são capazes de suprir tais exigências (VAUTHIER e BOUCHEMAL, 2009). Quanto à imobilização de biocomponentes, faz-se necessário manter ao máximo as funções e atividades desses materiais biológicos, fato que a quitosana reticulada também é capaz de proporcionar (UPPALAPATI *et al.*, 2016). O tripolifosfato de sódio (TPP) é um ânion multivalente que tem sido estudado como um agente reticulante alternativo a outros reticuladores devido a sua baixa toxicidade e baixo custo. Apresenta-se na forma de um pó branco, pouco higroscópico e solúvel em água (NASTI *et al.*, 2009).

Na gelificação iônica, a quitosana é dissolvida em solução aquosa ácida (pH 4-6) para se obter uma solução catiônica. Esta solução é adicionada gota a gota sob agitação constante à solução polianiônica de TPP (pH 7-9). Nesse processo, as nanopartículas forma-se imediatamente através de ligações inter e intra moleculares criados entre fosfatos do TPP e as aminas da quitosana (AJUN *et al.*, 2009). Pode-se alterar o tamanho da partícula de quitosana e a carga de sua superfície pela variação nas condições de fabricação, como a proporção entre o TPP e a quitosana, a concentração e pH da dispersão de quitosana (NASTI *et al.*, 2009).

2.10 Sepigel

O gel de Sepigel é um agente espessante, emulsionante e estabilizador para emulsões que possui como vantagens ser fluido, neutro e de fácil incorporação, fornecendo instantaneamente o gel. É capaz de espessar meios aquosos muito ácidos ou muito alcalinos (pH 2 a 12, dependendo da concentração do polímero). A viscosidade das emulsões obtidas não se altera no decorrer do tempo (FERREIRA, 2010). Quando se adiciona água ao sepigel, sua emulsão se inverte, a água promove o inchamento do polímero, formando, instantaneamente, uma rede polimérica que irá promover o espessamento do meio e se estabilizar em poucos segundos. Esse tipo de polímero permite a produção de emulsões a frio com agitação moderada, simplificando o processo de

produção. É um emulsionante e espessante adequado para formulações com condições extremas (CORRÊA, 2012).

É compatível com todos os solventes polares, como álcool, acetona, propilenoglicol, glicerol, e sua viscosidade não é afetada mesmo com exposição prolongada aos raios UV, como ocorre com a grande maioria dos polímeros. O que possibilita a obtenção de emulsões à temperatura ambiente e pode ser usado em altas temperaturas para esterilização sem afetar a estabilidade (FERREIRA, 2010).

Diante de tais fatos, este trabalho apresenta uma abordagem inovadora pela utilização de nanopartículas de quitosana contendo insulina como proposição de uma terapia alternativa para o tratamento de feridas em pacientes diabéticos. Este projeto visa, portanto, contribuir para o desenvolvimento científico e também melhorar a qualidade de vida dos milhares de pacientes diabéticos que apresentam feridas de difícil cicatrização.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Produção e caracterização de nanopartículas de quitosana associadas à insulina para o tratamento de feridas em ratas diabéticas.

3.2 Objetivos específicos

Determinar o grau de desacetilação da quitosana.

Preparar nanopartículas de quitosana contendo ou não insulina.

Caracterizar as nanopartículas quanto ao tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta.

Mensurar o percentual de associação da insulina às nanopartículas de quitosana.

Avaliar a estabilidade das nanopartículas contendo ou não insulina.

Realizar a microscopia eletrônica das nanopartículas.

Induzir o diabetes tipo 1 nos animais.

Induzir as feridas nos animais diabéticos

Realizar testes de eficácia terapêutica em modelo murino para feridas de diabéticos.

Acompanhar a evolução do processo de cicatrização das feridas cutâneas por meio de avaliação macro e microscópica em modelo murino para feridas de diabéticos.

CAPÍTULO 2. CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA E DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Grau de desacetilação (GD) da quitosana *in natura*

Como existem técnicas distintas para quantificar o grau de desacetilação (GD) da quitosana, a escolha deve ser realizada optando-se pelo método mais confiável a que se tem acesso já que frequentemente as diferentes técnicas fornecem resultados distintos. A titulação potenciométrica foi escolhida neste trabalho em função da simplicidade e precisão. A medida do grau de desacetilação da quitosana é muito importante, pois mede o percentual de grupos amino disponíveis nas cadeias da quitosana que influenciam as propriedades físico-químicas do polímero como solubilidade, viscosidade, comportamento polieletrólito, reatividade, estabilidade e, por consequência, a sua aplicabilidade.

Para a determinação do grau de desacetilação da quitosana foi realizada a titulação potenciométrica para a quantificação dos grupamentos aminos presentes na estrutura do polímero. Uma amostra de 0,2g de quitosana foi diluída em 20 mL de ácido clorídrico (HCl) 0,1M e 100mL de água destilada, deixada em repouso durante 12 horas para melhorar a solubilidade da quitosana. Após este período a dispersão de quitosana, sob agitação constante, foi titulada, com o auxílio de uma pipeta, com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1M. A solução titulante foi adicionada por gotejamento e a cada volume de 0,5mL foi registrado o pH da dispersão de quitosana com o auxílio de um pHmetro até alcançar o pH final 12. Para garantir maior confiabilidade dos resultados todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

A curva dos valores de pH em função do volume de titulante deve apresentar dois pontos de inflexão que correspondem a neutralização do excesso de ácido forte e dos grupos amino do polímero. A diferença entre estes dois pontos de equivalência corresponde ao volume de base requerido para neutralizar os grupos amino da quitosana. O GD das amostras foi calculado utilizando-se a equação abaixo.

$$\%GD = \frac{M (V_1 - V_2) 161}{W} \times 100$$

Onde M é a concentração da solução de NaOH em mol L⁻¹, V₁ e V₂ são os volumes de NaOH (mL) utilizados para neutralizar o excesso de HCl na solução e a neutralização dos grupamentos amino presentes no polímero, respectivamente, 161 é a massa molar da unidade monomérica da quitosana e W é a massa de amostra de quitosana em mg utilizada na titulação. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Nano & Biociências (LANAB) do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP/UFG)

4.2 Preparo das nanopartículas de quitosana

As nanopartículas de quitosana foram preparadas pelo método de gelificação iônica com adaptações do protocolo descrito por Calvo *et al.*, 1997. De modo geral, uma solução de tripolifosfato de sódio (TPP) foi adicionada a uma dispersão de quitosana na proporção de 3:0,8, ou seja, 8mL de TPP em 15 mL de solução de quitosana (Sigma-Aldrich).

Para o preparo da dispersão de quitosana, diluiu-se 30mg de quitosana (Sigma-Aldrich) em uma solução contendo 10 mL de água mili-Q com 87 µL de ácido acético 0.1M. O polímero foi dissolvido por 40 minutos com a utilização do Utraturrax. Em seguida o pH da dispersão foi ajustado para o valor de pH 4.4 com adição de solução de NaOH 0.1M e o volume final da dispersão foi ajustado para 15 mL com água mili-Q. Em seguida preparou-se uma solução de tripolifosfato de sódio (TPP) diluindo-se 8mg de TPP 8 mL de água mili-Q.

Para o preparo da solução de insulina (1mg/ml), utilizou-se a Recombinant Human Insulin da marca Sigma-Aldrich. Diluiu-se 10mg de insulina em 10 mL de ácido clorídrico (HCl) 0,01N. Em seguida ajustou-se o pH para 8,0 utilizando hidróxido de sódio (NaOH) 0,1M, seguindo as instruções do fabricante. A concentração de insulina utilizada refere-se ao estudo realizado por Lima *et al.*, (2012) que foi considerado o mais adequado para o tratamento de feridas em ratos diabéticos. Com base nesse estudo, objetivou-se associar às nanopartículas de quitosana uma quantidade de 0,5 Unidade Internacional (UI) de insulina por mL. Para isso, preparou-se uma solução de insulina (Sigma-Aldrich) contendo 0,7 UI/mL, equivalente à 0,026 mg/mL de insulina (1mg de Recombinant Human Insulin equivale à 27,5 UI). Utilizou-se uma solução com

concentração 0,7 UI/mL com objetivo de associar às nanopartículas de quitosana 0,5 UI/mL (0,018 mg/mL). Cada mL da solução apresenta 0,026mg de insulina. Assim, para 23mL de dispersão de nanopartículas (15mL de dispersão de quitosana mais 8mL de solução de TPP), adicionou-se 0,598mL (598 µL) de solução de insulina (1mg/mL).

Para o preparo das nanopartículas de quitosana, adicionou-se 200 µL a cada vez da solução de TPP aos 15 mL da dispersão de quitosana agitação à 150 rpm. Ao término da adição de todo o volume da solução de TPP à toda dispersão de quitosana, a mesma permaneceu sob agitação pelo período de uma hora. Após o preparo das nanopartículas de quitosana, esta foi colocada em uma coluna centricon 30 Kda da Millipore a 3000g por 30 minutos.

Para o preparo das nanopartículas de quitosana contendo insulina, a solução de insulina foi acrescentada aos 8mL de solução de TPP (1mg/mL), e logo em seguida, adicionada, por gotejamento, aos 15 mL de dispersão de quitosana (2mg/mL), sob agitação à 150 rpm. Ao término da adição de todo o volume da solução de TPP à toda dispersão de quitosana, a mesma permaneceu sob agitação pelo período de uma hora. A preparação das nanopartículas com insulina seguiu o mesmo protocolo utilizado para a obtenção das nanopartículas vazias, ou seja, após o preparo das nanopartículas de quitosana com insulina, esta foi colocada em uma coluna centricon 30 Kda da Millipore a 3000g por 40 minutos. A insulina não associada às nanopartículas de quitosana atravessa o filtro centricon e é coletada para o ensaio de eficiência de associação (EA).

4.3 Eficiência de associação (EA) das nanopartículas de quitosana com insulina

Para determinação da eficiência de associação (EA) entre as nanopartículas de quitosana e a insulina foi construída uma curva padrão, com o objetivo de quantificar a insulina não associada às nanopartículas. Para isso, diluiu-se uma solução de insulina em sobrenadante de nanopartículas de quitosana vazias em 10 diferentes concentrações: 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78, 0.39 µg/mL. Colocou-se 160 µL de cada uma das 10 diferentes diluições em uma placa de ELISA de 96 poços e acrescentou-se 40 µL do reagente Bradford. A leitura do espectro foi realizada em leitor de ELISA, no comprimento de onda de 595 nm. O sobrenadante das nanopartículas vazias foi utilizado como o branco nas medições. Com o auxílio do software Excel os valores obtidos no leitor de ELISA foram utilizados para a construção da curva padrão.

Após o preparo das nanopartículas de quitosana com insulina, esta foi colocada em uma coluna centricon 30 Kda da Millipore a 3000g por 40 minutos. O filtrado contendo a insulina livre (não associada à nanopartícula) foi coletado e utilizado no ensaio de eficiência de associação. As medições foram realizadas com 160 µL do filtrado das nanopartículas com insulina, mais 40 µL do reagente de Bradford em placa de ELISA de 96 poços. A leitura do espectro foi realizada em leitor de ELISA, no comprimento de onda de 595 nm. O sobrenadante das nanopartículas vazias foi utilizado como o branco nas medições. A eficiência de associação (EA) foi calculada usando a seguinte equação:

$$EA = \frac{\text{insulina total} - \text{insulina livre}}{\text{insulina total}} \times 100$$

4.4 Preparo das formulações

De acordo com cada grupo um dos quatro grupos experimentais ajustou-se a concentração das formulações que foram aplicadas sobre as feridas. O sepiquel foi utilizado como espessante em todas as formulações, com o objetivo de evitar que as soluções escoassem logo que fossem aplicadas sobre as feridas das ratas. Utilizou-se 100 µL das quatro formulações sobre as feridas.

Para o animal tratado com o veículo puro, preparou-se uma formulação contendo água mili-Q autoclavada e sepiquel. Pesou-se 0,03 g de sepiquel e acrescentou-se 1mL de água mili-Q autoclavada. Para a formulação do animal com ferida e tratado apenas com insulina, ajustou-se a concentração da solução de insulina, de modo que cada 100 µL da solução contenha 0,5 UI de insulina. Pesou-se 0,03 g de sepiquel e acrescentou-se 1mL dessa solução de insulina. Para a formulação do animal tratado com nanopartículas de quitosana vazias, ajustou-se a concentração da dispersão de nanopartículas de quitosana sem insulina de modo que ficasse igual à concentração nanopartículas contendo insulina. Pesou-se 0,03 g de sepiquel e acrescentou-se 1mL da dispersão nanopartículas sem insulina. Quanto à formulação para o animal tratado com nanopartículas de quitosana contendo insulina, utilizou-se como base a eficiência de associação (EA) entre as nanopartículas de quitosana e insulina e ajustou-se a concentração da dispersão de nanopartículas com insulina, de modo que cada 100 µL da solução contenha 0,5 UI de insulina. Pesou-se 0,03 g de sepiquel e acrescentou-se 1mL da dispersão nanopartículas

contendo insulina. Em seguida realizou-se uma mistura leve de modo que a dispersão adquirisse consistência de gel. Para todas as formulações realizou-se uma mistura leve de modo que a dispersão adquirisse consistência de gel.

4.5 Caracterização das nanopartículas de quitosana

4.5.1 Tamanho médio, potencial zeta e índice de polidispersão (PDI) das nanopartículas de quitosana

O tamanho médio das nanopartículas foi determinado pela técnica de espalhamento dinâmico da luz (do inglês, *Dynamic Light Scattering*) a partir do diâmetro hidrodinâmico. O espalhamento de luz foi detectado em um ângulo de 90° e a 25 °C. Determinou-se o índice de polidispersão, que avalia a variância relativa (homogeneidade) dos diâmetros de partículas em dispersão. Ou seja, índice de polidispersão mede a homogeneidade da distribuição do tamanho das nanopartículas na amostra variando de 0 a 1. Estes dados foram coletados simultaneamente, em triplicata, usando o equipamento Zetasizer Nano ZS da marca Malvern Instruments, localizado na Central de Análises Químicas do Instituto de Química da UFG.

4.5.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MEV)

Para analisar o tamanho das nanopartículas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), as soluções foram submetidas à sonicação por dois minutos para melhorar a dispersão das nanopartículas e evitar aglomeração. Em seguida, cada amostra foi gotejada sob uma pequena grade de cobre coberta com carbono e seca durante 24 h a temperatura ambiente. As imagens foram obtidas com o microscópio eletrônico de transmissão, da marca Jeol, modelo JEM-101 e com tensão de aceleração de 100 kV, pertencente ao Instituto de Física da UFG.

4.5.3 Monitoramento das propriedades físico-químicas das nanopartículas

As nanopartículas foram avaliadas quanto à variação de algumas de suas propriedades físico-químicas, tais como do diâmetro, PDI e potencial zeta durante 56 dias de armazenamento em geladeira. Essas propriedades foram determinados pela técnica de

espalhamento dinâmico da luz. Os resultados foram expressos por média e desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA ($p < 0,05$).

4.5.4 Ensaio de liberação de insulina

O ensaio de liberação da insulina foi determinada pela incubação das nanopartículas a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ em 23 mL de solução salina (pH 7.4) em shaker com agitação horizontal. Em tempos determinados (0h, 24h, 48h, 72h, 7 dias e 14 dias), 3 mL das amostras foram coletados e centrifugadas em uma coluna centricon 30 Kda da Millipore a 3000g por 40 minutos. O volume retirado para centrifugação foi repostado por uma nova solução salina. A quantidade de insulina livre foi determinada pelo método de Bradford. A curva de calibração e a equação foram as mesmas utilizadas para o ensaio de eficiência de associação, construída usando-se nanopartículas vazias para corrigir a absorção intrínseca do polímero. Em cada experimento as amostras foram analisadas em triplicata.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do grau de desacetilação (GD) da quitosana *in natura*

Os valores, em volume, das titulações foram utilizados para o cálculo do valor do GD de cada amostra de quitosana e do GD médio. Os dados finais obtidos estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados da triplicata da titulação potenciométrica para determinação do grau de desacetilação da quitosana.

AMOSTRA	GRAU DE DESACETILAÇÃO (%)
1	76%
2	70,4%
3	72,45%
MÉDIA	72,95%

A quitosana utilizada no experimento apresentou 72,95% de grau de desacetilação, o que sugere que a amostra analisada tem 27,05% de grupos acetilados no

substituinte do carbono 2. Conclui-se que 72,95% dos grupos ligados são amino livres e disponíveis para ligações aos mais diversos tipos de compostos como, por exemplo, metais e fármacos. Este resultado também mostra que o polímero utilizado nos experimento é a quitosana, já que seu GD é $\geq 50\%$ (YOUNES e RINAUDO, 2015).

Vários são os métodos utilizados para determinação do grau de desacetilação da quitosana. A quitosana utilizada para fabricação das nanopartículas foi submetida à titulação potenciométrica em meio ácido. Esta técnica foi empregada nesse trabalho por ser um método de fácil execução e eficiente na determinação do GD segundo, (ZANATA e TIERA, 2009; MOURA *et al.*, 2009; OLIVEIRA e NUNES, 2011).

O GD médio encontrado na quitosana utilizada no presente estudo 72,95% é considerado um nível de desacetilação médio e está de acordo com o da maioria das quitosanas comerciais que variam em torno de 70 a 85% como afirma Brant (2008).

De acordo com Barbosa *et al.* (2005), o grau de desacetilação da quitosana está diretamente relacionado com o processo de cicatrização de feridas e determina praticamente todas as suas propriedades físico-químicas como densidade de carga, cristalinidade e solubilidade. Quanto maior o nível de desacetilação da quitosana mais elevada é a densidade de carga positiva, atuando como um polieletrólito que interage com as cargas negativas geralmente presentes no sítio da ferida (KNILL *et al.*, 2004). Segundo Howling *et al.* (2001), essa interação promove ativação e/ou intensificação de fatores de crescimento e outros componentes presentes no meio extracelular, o que estimula indiretamente a proliferação celular e, por consequência, a cicatrização. De acordo com Dias (2012), quanto mais desacetilado a quitosana, maior a área e densidade vascular no local da ferida facilitando a chegada de oxigênio, nutrientes e células inflamatórias.

5.2 Caracterização das nanopartículas de quitosana

5.2.1 Diâmetro médio das nanopartículas de quitosana

O tamanho médio, índice de polidispersão e potencial zeta da nanopartículas vazias e contendo insulina que foram preparadas e medidas no Zetasizer Nano ZS, estão representados na Tabela 2.

Tabela 2. Tamanho, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta das nanopartículas de quitosana vazias e das nanopartículas de quitosana com insulina

	Tamanho (nm)	Índice de Polidispersão (PDI)	Potencial Zeta (mV)
Nanopartículas vazias	183,3 ± 8,32 nm	0.397 ± 0.07	33.7 ± 2,45
Nanopartículas com insulina	245.9 ± 25.46 nm	0.463 ± 0.01	39.3 ± 4,88

A metodologia utilizada para preparação das nanopartículas de quitosana foi a gelificação iônica, que é uma técnica largamente empregada por se tratar de uma técnica de fácil execução (GONSALVES *et al.*, 2011). Tem como base o processo de reticulação da quitosana, que acontece por meio da interação entre cargas opostas (AGNIHOTRI *et al.*, 2004). Sendo as cargas positivas oriundas da quitosana e as cargas negativas do agente reticulante, o TPP, e desta forma favorece o surgimento espontâneo de nanoestruturas, como as nanopartículas, para carregamento de diferentes cargas, assim como a insulina (ING *et al.*, 2012).

Apesar da proporção entre quitosana e TPP comumente utilizada ser de 3:1, o valor de 3:0,8 foi adotado baseando-se no trabalho de Neves *et al.*, (2014) que mostrou que nanopartículas preparadas com essa proporção são significativamente mais estáveis e menos sujeitas à agregação. A razão entre quitosana e TPP controla a distribuição do tamanho das nanopartículas formadas, sendo que esta distribuição influencia na atividade biológica das nanopartículas (PAPADIMITRIOU *et al.*, 2008).

Segundo Cho e Holback (2013), são consideradas nanopartículas aquelas que possuem tamanho entre 10 à 1000 nm. Assim sendo, as partículas de quitosana obtidas neste trabalho, tanto as vazias quanto as contendo insulina, são consideradas nanopartículas, uma vez que, apresentaram tamanho médio de 183.3 ± 8.32 e 245.9 ± 25.46 nm, respectivamente. Este aumento de tamanho indica que houve a incorporação da insulina nas nanopartículas, fato também observado por Urrusuno *et al.*, (1997) e Azevedo *et al.*, (2013). O diâmetro das nanopartículas conseguidas nesse trabalho foram menores que outros já apresentados com a utilização do protocolo de Calvo *et al.*, (1997), à exemplo: Ma *et al.*, (2005), que conseguiram nanopartículas na faixa de 237 a 253 nm e Azevedo *et al.*, (2007) na faixa de 260.86 a 312.80 nm.

5.2.2 Índice de polidispersão (PDI)

Os resultados encontrados para o PDI foram de 0.397 ± 0.07 para as vazias e 0.463 ± 0.01 para as com insulina, evidenciando que a distribuição de tamanho das nanopartículas foi uniforme, uma vez que, foi menor que 0.5 que é um valor recomendado (DOUNIGHI *et al.*, 2012). O índice de polidispersão (PDI) é uma medida que mostra a distribuição dos tamanhos da nanopartículas na dispersão, podendo variar de 0 a 1. Quanto mais próximo de 1,0 mais polidisperso encontra-se o sistema e quanto mais próximo de 0 mais monodisperso. Juntamente com o diâmetro, eles influenciam na capacidade de direcionamento, carregamento e liberação do fármaco e estabilidade das nanopartículas (SINGH e LILLARD, 2009). Segundo Dounighi *et al.*, (2012), para que uma dispersão de nanopartículas seja considerada uniforme, recomenda-se que o valor do PDI esteja abaixo de 0.5.

5.2.3 Potencia zeta

O potencial zeta é um parâmetro que representa a carga de superfície das nanopartículas e foi positivo para os dois preparos, com o valor de 33.7 ± 2.45 para as nanopartículas vazias e 39.3 ± 4.88 mV para as nanopartículas com insulina. O valor positivo deve-se à presença das cargas positivas referentes aos amino livres da quitosana que não foram totalmente neutralizadas, indicando que somente parte desses grupos sofreram neutralização (SOPPIMATH *et al.*, 2001) e também foram maiores que ± 30 mV, valor recomendado por demonstrar que as nanopartículas são estáveis em suspensão e evita a agregação das mesmas (SINGH e LILLARD, 2009). Além disso, o potencial zeta interfere na adesão das nanopartículas em superfícies biológicas e outros compostos (NEVES *et al.*, 2014). De acordo com Ing *et al.*, (2012), nanopartículas com carga superficial superior a 30 mV se mostram mais estáveis e menos sujeitas a agregação.

5.2.4 Acompanhamento das propriedades físico-químicas das nanopartículas

As nanopartículas com quitosana obtidas nesse trabalho mostraram-se estáveis quanto ao seu diâmetro, PDI e potencial zeta após 56 dias de armazenamento em geladeira (figura 10). As análises estatísticas não indicaram diferenças para os parâmetros avaliados ao longo do tempo determinado. Com o tempo as partículas podem se agregar, resultando

em sua sedimentação. Vários fatores influenciam a estabilidade das suspensões coloidais como, por exemplo, a adsorção de moléculas ativas à superfície das nanopartículas e a presença de tensoativos adsorvidos. Por isso, a avaliação da estabilidade química dos polímeros formadores dos coloides, sob diferentes condições de armazenagem, é de fundamental importância (NEVES *et al.*, 2014). Parâmetros como o diâmetro da nanopartícula, o potencial zeta, a dispersão e o teor do fármaco são geralmente os parâmetros físico-químicos utilizados para monitorar a estabilidade das suspensões coloidais poliméricas (GUTERRES *et al.*, 2007). Este resultado indica que não houve alterações consideráveis na estrutura físico-química das nanopartículas estudadas.

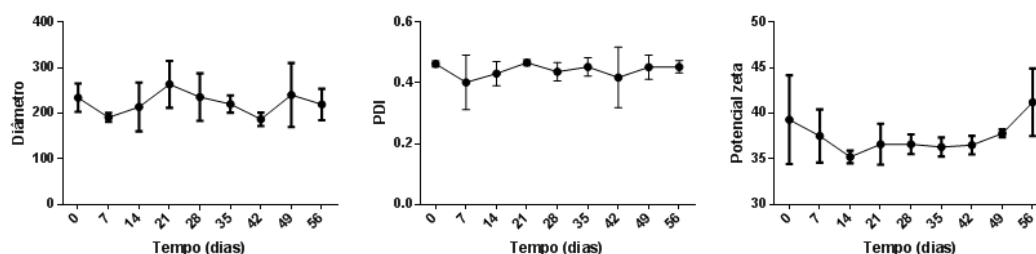


Figura 10. Medidas do acompanhamento de nanopartículas de quitosana contendo insulina durante 56 dias de armazenagem. Os gráficos indicam o diâmetro, índice de polidispersão e potencial zeta.

5.2.5 Ensaio de liberação de insulina

Observou-se que a quantidade de insulina liberada ao longo do tempo foi muito baixa, não sendo possível sua determinação pelo método de Bradford. A baixa quantidade de insulina liberada pode estar associada à elevada conservação das propriedades físico-químicas dos sistemas nanoparticulados. Estudos mostram que a liberação de fármacos a partir de sistemas nanoparticulados depende de alterações na estrutura físico-química do polímero, como a erosão da matriz polimérica, a difusão do fármaco através da matriz ou pela combinação de processos de difusão e erosão (AMINABHAVI *et al.*, 2004). O controle da liberação de fármacos para atuação em locais específicos, por meio do uso de vetores, capazes de melhorar a velocidade do regime de dosagem de substâncias, tem sido uma área de intensa pesquisa. Porém, durante o tempo de armazenagem, pode ocorrer a agregação das nanopartículas no meio, resultando na formação de precipitados

(SOPPIMATH *et al.*, 2001). A consequência de uma estabilidade físico-química limitada, em função do tempo, constitui um obstáculo para a aplicabilidade industrial das suspensões aquosas de nanopartículas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

5.2.6 Eficiência de associação (EA) da insulina nas nanopartículas de quitosana

Para a análise da eficiência de associação, foi utilizado o método de Bradford, que consiste na mudança de coloração do principal reagente da metodologia, o Azul de comassie, quando complexado com proteína (BRADFORD, 1976), como mostra a Figura 10. Vários autores também utilizam esta metodologia para a quantificação da insulina no sobrenadante de nanopartículas de quitosana, dentre eles: Ma *et al.*, (2005) e Sarmiento *et al.*, (2006), Zhang *et al.*, (2007).

Por apresentar características como economia, rapidez e reprodutibilidade, o método de Bradford é amplamente aplicado em diferentes áreas de estudo para determinação do teor de proteína (MARTINS *et al.*, 2007). Nesse método, ocorre ligação do corante azul de Coomassie BG-250 com grupos funcionais básicos ou aromáticos das proteínas. Para isto ocorrer, a proteína deve ter estrutura macromolecular, ou seja, de 8 a 9 ligações peptídicas, no mínimo. A ligação ocorre em dois minutos e esta dura aproximadamente duas horas (BRADFORD, 1976). Segundo Zaia *et al.*, (1998), no pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm.

A equação da curva obtida foi $y = 0,0139x + 0,1357$ e $R^2 = 0,981$ (Figura 11). Esse resultado apresentou uma linearidade considerada de boa qualidade, com o $R^2 > 0,95$, evidenciando forte correlação entre as duas variáveis utilizadas, a absorbância e concentração de proteína. Com a curva padrão foi possível mensurar a eficiência de associação (EA) da insulina, onde o valor encontrado foi de $97.19\% \pm 2.18$, que podem estar localizadas tanto em seu núcleo, na parede ou na matriz polimérica. Esse valor da eficiência de associação equivale à 0,022 mg/mL de insulina ou 0,6 UI.

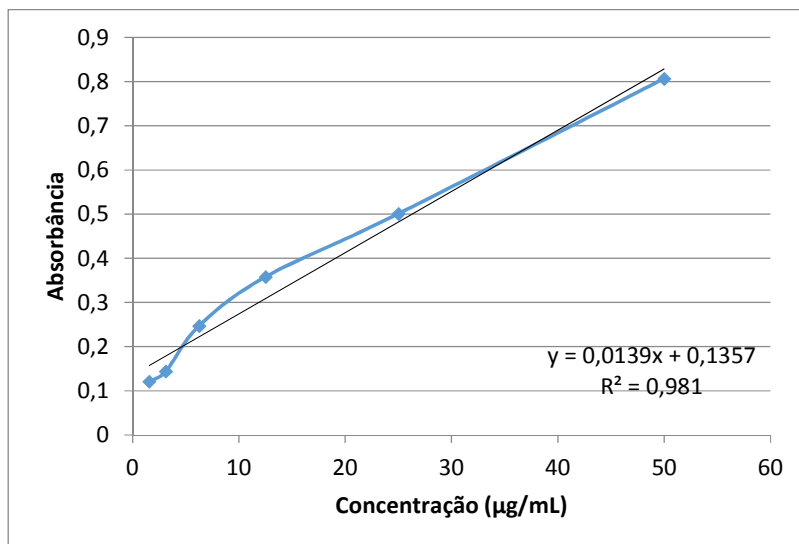


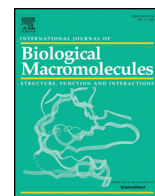
Figura 11. Curva Padrão da insulina.

6. CONCLUSÃO

O estudo apresentado nesse trabalho permite concluir que foi possível preparar nanopartículas de quitosana, de forma eficiente, pelo método de gelificação iônica. A metodologia empregada levou à formação de nanopartículas de quitosana com parâmetros desejados.

A titulação potenciométrica permitiu verificar que a quitosana utilizada apresenta 72,95% de desacetilação. As nanopartículas vazias apresentaram valores de diâmetro em torno de $183,3 \pm 8,32$ nm, enquanto que as nanopartículas de quitosana contendo insulina ficaram em torno de $245,9 \pm 25,46$ nm. O PDI obtido para as nanopartículas de quitosana vazias foi de $0,397 \pm 0,07$ e para as nanopartículas contendo insulina foi de $0,463 \pm 0,01$. O potencial zeta para as nanoestruturas vazias foi de $33,7 \pm 2,45$ e para aquelas contendo insulina foi de $39,3 \pm 4,88$. Esses valores são adequados para o uso na cicatrização de feridas, confirmando que a metodologia empregada foi satisfatória para a preparação e caracterização de nanopartículas com insulina.

CAPÍTULO 3. ARTIGO 1



Improving peptide quantification in chitosan nanoparticles

Maycon Carvalho Ribeiro^a, Viviane Lopes Rocha Corrêa^a, Francenya Kelley Lopes da Silva^a,
Jerônimo Raimundo de Oliveira Neto^b, Ariádine Amorim Casas^a,
Liliana Borges de Menezes^c, André Corrêa Amaral^{a,*}

^a Laboratory of Nano & Biotechnology, Institute of Tropical Pathology and Public Health, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO 74605-050, Brazil

^b Laboratory of Quality Control of Medicine, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO 74605-220, Brazil

^c Pathology, Institute of Tropical Pathology and Public Health, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO 74605-050, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 June 2018

Received in revised form 18 July 2018

Accepted 19 July 2018

Available online 20 July 2018

Keywords:

Chitosan

Biomolecules quantification

Nanoparticles

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate different methodologies for peptide quantification in the supernatant of chitosan nanoparticles by removing the unlinked polymer in the suspension. The ionic gelation method was used to prepare the chitosan nanoparticles encapsulating a 5.3 kDa peptide. Three different methodologies for the processing of the solutions were compared before subjecting the samples to the Bradford protocol or Qubit® kit for protein detection. For the quantification, it was necessary to create a standard peptide curve using different peptide concentrations. The suitable standard curve would be one in which the peptide was diluted in the empty chitosan supernatant (obtained after nanoparticles centrifugation) or in the filtrate of the empty chitosan supernatant. Our results indicated the safest methodology tested for peptide quantification in the supernatant chitosan nanoparticles was filtering the solution before subjecting the sample to the Bradford assay.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Today, nanotechnology is found in a wide range of applications [1–4] and allows the manipulation of material creating structures in a small dimension. Nanoparticles around 300 nm are suitable to incorporate drugs or bioactive molecules improving drug delivery formulation, which allows a diverse range of applications in the pharmaceutical field [5]. Polymeric nanoparticles are promising to achieve this goal due to its capacity to promote drug sustained release and the possibility to direct the drug to reach specific sites in the body [6,7]. Chitosan is a good example of a natural polymer used to prepare these nanoparticles since it presents characteristics such as hydrophilicity, biocompatibility, biodegradability and low toxicity [8].

Chitosan is formed by monosaccharide chains linked by glycosidic bonds with polymer amino groups, enabling the formation of chemical complexes with both drugs and biological tissues [9]. The chemical properties of chitosan [α (1 → 4) 2-amino 2-deoxy β -D glucan] are determined by the molecular weight, degree of deacetylation and viscosity [10]. The molecular weight of this polymer can be low (70 kDa), medium (190–310 kDa) or high (500 kDa) [11].

This cationic polymer is soluble in weak acids which presents protonated amino groups in its polymeric chain [12]. In pharmaceutical applications, chitosan nanoparticles play an important role by carrying negatively charged molecules, such as peptides and proteins, and providing a significant protection against their biodegradation by enzymes in physiological fluids [13].

The ionotropic gelation method, containing sodium tripolyphosphate (TPP) as a cross-linker agent, is commonly used to prepare chitosan nanoparticles [14,15]. Usually, during the cross-linking process, the TPP solution, including the negatively charged biomolecule, is slowly added to a chitosan solution resulting in the spontaneous formation of nanoparticles. This simple and mild method of preparation and the advantages of chitosan become these nanoparticles carriers of interest to peptides and other molecules like antibiotics. In this way, chitosan nanoparticles have become the target of studies in the treatment of important pathologies such as cancer and diabetes [16–19].

After the nanoparticle production, it is important to determine the amount of the molecule of interest (drug or a biomolecule) that is linked to or encapsulated in the nanoparticles. The mechanism by which the peptide and protein, like insulin, lipase and others, interacts with chitosan-TPP nanoparticles is, probably, through hydrophobic interactions and H-bonding [20,21].

The physical-chemical characteristics of the compound must be taken into consideration when choosing the quantification method.

* Corresponding author at: Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Rua 235, s/n, Setor Universitário, Goiânia, GO 74605-050, Brazil.

E-mail address: amaral.nanobiotech@gmail.com (A.C. Amaral).

Table 1

Physicochemical properties of chitosan nanoparticles containing the 5.3 kDa peptide.

Formulation	Size (nm) ^a	PdI ^a	Z-potential (mV) ^a
Empty chitosan nanoparticles	183,3 ± 8,32	0.397 ± 0.07	33,7 ± 2,45
Peptide within chitosan nanoparticles	245,9 ± 25,4	0.463 ± 0.01	39,3 ± 4,88

^a These results comprise the average of three independent preparations (± standard deviation).

Considering several groups aiming to incorporate peptides and proteins within chitosan nanoparticles, the Bradford method for protein quantification could be employed. Since our goal was the incorporation of the peptide in the chitosan nanoparticles, the Bradford method for protein quantification was employed [22]. Medical applications of organic-inorganic hybrid materials within the field of silica-based bioceramics.

In the Bradford protein assay, the Coomassie blue dye BG-250 binds to a basic or aromatic chemical group of proteins [23]. After this interaction, the dye changes to its anionic form and its absorbance is detected in the blue color [24]. However, inspite of the practicality of the method, the dye may react with the chitosan or other polymer that did not bind with the TPP and interfere with the protein quantification [25].

To determine the association efficiency of the peptide to the chitosan nanoparticles, the amount of peptide that was not linked to the nanoparticles present in the supernatant is subtracted from the total amount of peptide added in the preparation. However, some of the peptide, TPP and chitosan that were not linked are also found in the supernatant suspension in different proportions and may also link to the dye, interfering in the Bradford reaction, which leads to false experimental values [26].

Therefore, the present work evaluated different methods for peptide quantification present in the supernatant of chitosan nanoparticles suspension, aiming to remove compounds not associated to the nanoparticles, especially chitosan, which could interfere with the association efficiency results.

2. Methodology

2.1. Chitosan nanoparticles preparation

Chitosan was purchased from Sigma-Aldrich (degree of deacetylation ≥75% and viscosity 20–300 cps where $c = 1\%$ in 1% acetic acid) with low molecular weight (as specified by manufacturer). Chitosan nanoparticles were prepared according to the protocol described by Calvo et al. [14] and modified according to Neves et al. [7]. In brief, a chitosan solution was prepared dissolving the polymer in 1% acetic acid (w/v) for 40 min homogenization at 15500 rpm in the Ultra-Turrax equipment.

Peptide-chitosan nanoparticles (PC) were formed by slowly adding dropwise of TPP solution containing peptide (5.3 kDa) in a chitosan solution under gentle magnetic stirring. The TPP was purchased from

Sigma-Aldrich and is technical grade (as specified by manufacturer). The final solution was kept under stirring for 1 h. The empty chitosan nanoparticles (EC) were obtained using the same methodology, but instead of adding peptide to the TPP solution, ultrapure water was added. The EC was used as a blank in the association efficiency reaction of the peptide to the chitosan nanoparticles. The mean diameter, given as Z-average, and size distribution, given as polydispersity index (PdI), of the nanoparticle formulations were assessed by dynamic light scattering performed in a Zetasizer Nano ZS ZEN3600 (Malvern Instruments, UK). All the preparations were made in triplicate.

2.2. Scanning Electron Microscopy

The chitosan nanoparticles images were obtained by Scanning Electron Microscopy (SEM). To this purpose, the chitosan or peptide within nanoparticles solution was homogenized for 2 min to avoid agglomeration and then a drop of the sample was put in a copper grid with carbon and dried for 24 h at room temperature. Images were acquired using an electron microscope (Jeol, model JEM-1011) with accelerating voltage of 100 kV.

2.3. Sample processing to evaluate peptide association to chitosan nanoparticles

The association efficiency (AE) of chitosan nanoparticles within the peptide was determined indirectly from the detection of free peptide in the solution. For this purpose, three different methodologies for the processment of the solutions were compared before being submitted to the quantification tests and are described next.

2.4. Methodology 1

1.5 mL of the PC or EC nanoparticles solutions were placed into tubes and centrifuged for 1 h at 16100 g and 4 °C to collect the supernatant. For the PC, it was expected that part of the peptide which did not bind to the chitosan would be free in the supernatant. The supernatant from the EC was used as a blank for the efficiency association calculations.

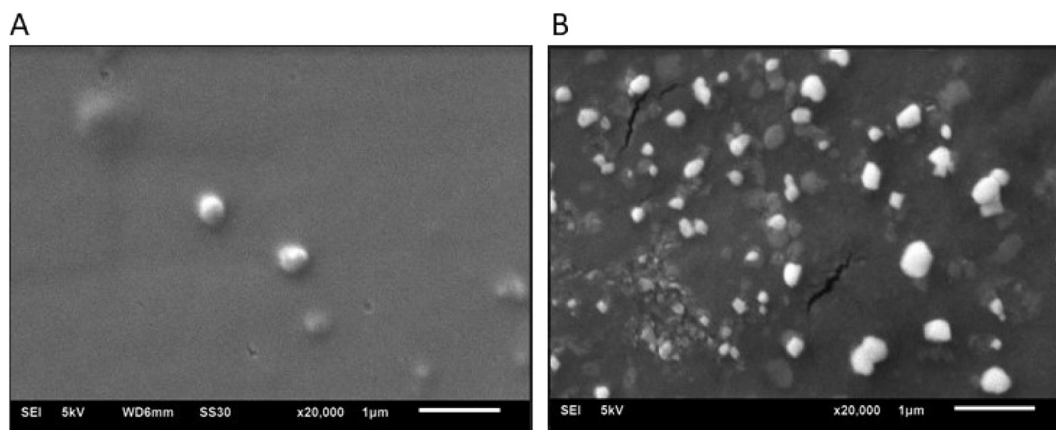


Fig. 1. Scanning electron microscopy of chitosan nanoparticles. (A) Chitosan nanoparticles. (B) Peptide incorporated within chitosan nanoparticles.

Table 2

Absorbance values obtained after reading the peptide solutions at 595 nm according with Methodologies 1, 2, and 3.

Peptide (μg/mL)	Methodology 1		Methodology 2		Methodology 3	
	Absorbance	SD ^b	Absorbance	SD ^b	Absorbance	SD ^b
50	0,221	0,049	0,248	0,004	0,871	0,046
25	0,058	0,048	0,180	0,038	0,613	0,101
12,50	0,006	0,039	0,070	0,011	0,400	0,030
6,25	−0,024	^a	−0,016	^a	0,272	0,022
3125	−0,040	^a	−0,044	^a	0,138	0,005
1,56	−0,023	^a	−0,075	^a	0,097	0,048
0,78	−0,048	^a	−0,050	^a	–	–
0,039	–	–	−0,058	^a	–	–

^a Negative values.

^b SD: standard deviation.

2.5. Methodology 2

The early steps of this methodology were the same as presented for Methodology 1. After collecting the supernatant of either the PC or EC chitosan nanoparticles, the pH was adjusted to a range between 7 and 9 using 0.1 M NaOH as proposed by Su and collaborators [26] until it was possible to see the chitosan aggregate in the medium. Next, the resulted solutions were centrifuged at 9300 g, 4 °C for 10 min. The supernatants were collected and used for the association efficiency assays.

2.6. Methodology 3

For this Methodology, the PC or EC nanoparticles solutions were placed into Amicon Ultra-15 filters 30 kDa (Millipore®) and centrifuged at 3000 g, 4 °C by 40 min. The PC or EC nanoparticles and free chitosan were held in the column while the remaining components (water, free peptide and TPP) passed through the filter named here as a filtrate of the PC solution (FPC) or filtrate of the EC solution (FEC). In the FPC, the remaining peptide that did not bind to the chitosan nanoparticles is expected to be seen. Both the FEC and FPC were stored at 20 °C for use in the association efficiency assays.

2.7. Peptide quantification

The resulted supernatants obtained, according to Methodologies 1 and 2, and the filtrates obtained in Methodology 3, were submitted to the same analysis for quantification of free peptide in the chitosan nanoparticles solution: Bradford protocol and Qubit® kit for the detection of proteins. The Coomassie Protein Assay Reagent used in the Bradford assay was purchased from Sigma-Aldrich (Product Number 27813).

2.7.1. Bradford protocol

The standard peptide curve was created using peptide concentrations of 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, and 50 μg/mL. For preparing these

solutions, the peptide was diluted in the supernatants or in the filtrate of the EC, according to the methodology analyzed. For the Bradford assay, 40 μL of Bradford's reagent (Sigma-Aldrich) was added to 160 μL of the supernatant or filtrate from each solution and placed into a 96-well microplate. The absorbance was read at 595 nm wavelength. The experiments were performed in triplicate.

2.7.2. Qubit® protocol

The Qubit® 2.0 Fluorometer and the Qubit Protein Assay Kit were used according to the manufacturer's recommendation. As in the Bradford protocol, the peptide was quantified in the supernatants or in the filtrate of the PC. The Qubit Protein Assay Kit contains three standard solutions with concentrations of 0, 10, and 20 μg/ml used to create the calibration curve. From each sample in the test, 20 μL was used. The analyses were performed in triplicate.

2.8. Association efficiency calculation of peptide to chitosan nanoparticles

The amount of non-linked peptide to chitosan detected in each methodology was subtracted from the total peptide amount used to prepare the PC solutions.

3. Results

3.1. Characterization of chitosan nanoparticles

The physicochemical properties of chitosan nanoparticles encapsulating the 5.3 kDa peptide are shown in Table 1. The polydispersity indexes were in the range of 0.3 to 0.4., indicating homogeneity of the preparations. The Scanning Electron Microscopy images of chitosan or peptide within chitosan nanoparticles presented a near-spherical morphology in the nanometer scale for the particles (Fig. 1). In addition, it was possible to visualize no apparent aggregation of the nanoparticles.

3.2. Peptide quantification according to Methodology 1

According to Methodology 1, it was necessary to create a standard curve to detect the peptide in the PC supernatant. As can be noted in Table 2, the absorbance readings for the peptide concentrations below 6.25 μg/mL presented negative values, thus, making it impossible to create a curve using the Bradford method. Although it was not possible to construct the standard curve, the peptide amount was investigated by reading the samples at 595 nm and using the Qubit® kit for the detection of proteins. The results showed mean values for absorbance of 0.342 and it was not possible to estimate the peptide concentration in the sample.

For peptide quantification using the Qubit® kit, the mean peptide concentration in the PC supernatant was 270 μg/ml, while the EC supernatant (blank), which was supposed to have a lower value than the PC, presented a concentration of 286 μg/ml.

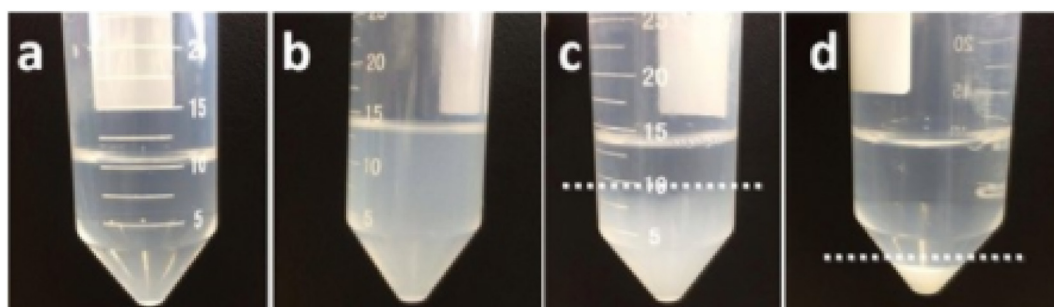


Fig. 2. Chitosan precipitation. (A) Crystalline chitosan solution at pH 6.4. (B) Turbidity chitosan solution immediately after changing for pH 7.5. (C) Chitosan solution at pH 7.5 after 20 min indicating two distinct liquid phases. (D) Chitosan solution at pH 7.5 after centrifuged indicating chitosan sediment. The trace lines determine the phases separations.

3.3. Peptide quantification according to Methodology 2

After changing the pH value to 7.5, the chitosan that did not associate to nanoparticles was precipitated in the supernatant by spontaneous formation of polymeric aggregate as can be seen in Fig. 2.

The peptide concentrations used to create the standard curve were the same as reported in Methodology 1. However, in this case, the peptide was diluted in the EC supernatant obtained after chitosan precipitation with NaOH. The PC or EC supernatants were submitted to the Bradford protocol and values for absorbance at 595 nm are shown in Table 2.

The absorbance values for peptide concentrations obtained by Methodology 2 were also not acceptable for composing the standard curve. As can be seen in Table 2, the absorbance at concentrations below 6.25 µg/mL presented negative values. Despite this, the samples were submitted to the Bradford method in an attempt to quantify the remaining peptide in the PC supernatant after chitosan precipitation. The mean absorbance value obtained in this test was 0.242, also close to the one pointed out in Table 2 for the concentration of 50 µg/mL peptide, and higher than the total peptide amount added for preparing nanoparticles (26 µg/mL).

The Qubit® kit for protein detection was also used to investigate the peptide concentration in the nanoparticles, in which EC presented a supposed protein concentration of 20 µg/mL while the mean peptide concentration in the supernatant of PC was 40.8 µg/mL. Although in this assay, the peptide concentration in the PC supernatant was lower than the result above, it still exceeds the total peptide amount added in the beginning of nanoparticles preparation. In addition, high absorbance values were detected even in the EC, where peptide had not been added.

3.4. Peptide quantification according to Methodology 3

For Methodology 3, the chitosan nanoparticles containing peptide was initially centrifuged using Amicon Ultra-15 filters 30 kDa (Millipore®) and the filtrates (FEC and FPC) were submitted to the Bradford method and Qubit® kit in order to quantify the peptide not linked to the chitosan.

In the Bradford method, the standard curve for peptide quantification was constructed using the FEC with the same concentrations applied in Methodologies 1 and 2. The absorbance values for the samples at 595 nm are presented in Table 2.

As shown in Table 2, all values were positive, creating the standard curve (Fig. 3), in contrast with those observed in the others methodologies tested.

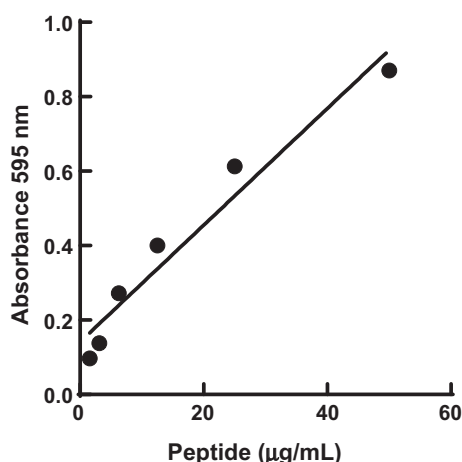


Fig. 3. Standard curve for peptide. $y = 0,0157x + 0,1413$. $R^2 = 0,95$.

Table 3

Association efficiency (AE) for peptide determined by Bradford method or using Qubit® kit.

Sample	Bradford		Qubit®		
	Value ^a	µg/mL	AE%	µg/mL	AE%
Q1	0,197	3,55	87,7	28,2	83,4
Q2	0,148	0,42	98,30	25,6	86,15
Q3	0,200	3,70	85,70	28,2	76,15

^a Average values of three absorbance detections.

After constructing the standard curve, the FPC was submitted to the Bradford methodology. For each preparation, the absorbance detections were also performed in triplicate and the results were inserted in the equation referring to the calibration curve obtained previously. From these results, it was possible to find out the association efficiency of peptide within the chitosan nanoparticles (Table 3). The results signaled that the peptide AE was >85% in all triplicates by using the Centricom® column to remove free chitosan.

The FPC from the three different nanoparticles preparations resultant of this methodology were also submitted to the Qubit® kit and the FEC was used as a reaction blank. The peptide concentration was determined in the FPC as well as the AE of all the preparations by using the mean absorbance values of each triplicate and subtracting it from the reading obtained in the FEC (Table 3).

4. Discussion

Nanotechnology can contribute as a promising way to formulate increasingly efficient drug delivery systems [27]. However, the correct characterization of the formulation is necessary to evaluate, among other physicochemical parameters, whether the amount of the drug or the bioactive principle was encapsulated in a satisfactory amount for the therapeutic effect. In the case of proteins and peptides, the Bradford method is commonly employed [28,29].

The methodology used for the preparation of the chitosan nanoparticles was the ionic gelation, which consist in the spontaneously formation of nanoparticles by crosslinking of chitosan and TPP [15]. The chitosan nanoparticles incorporating the peptide showed an increase in size in relation to the empty nanoparticles, suggesting, by the method used, the incorporation of the peptide [14]. The resulted nanoparticles presented a nanometer size confirmed by dynamic light scattering and SEM images analyses.

Despite the wide application of the Bradford method for the quantification of biomolecules in polymeric formulations, any polymer fragments can interact with the dye and promote light dispersity, interfering with absorbance detection. Carlsson and collaborators [25] explained that chitosan interacts with Coomassie BG-250 and presents absorbance values at all wavelengths, resulting in inaccurate value for protein quantification. In the present work, different methodologies were evaluated to avoid false results for peptide quantification using the Bradford method in the chitosan nanoparticles within the peptide.

For the analysis of free peptide using the Bradford method, it was necessary to create a standard curve. The suitable standard curve would be one in which the peptide was diluted in the EC supernatant (for Methodologies 1 and 2) or FEC (for Methodology 3). However, as can be seen in Table 2, it was not even possible to construct such a curve using Methodologies 1 and 2, since peptide in a concentration equal to or below 6.25 µg/mL presented negative values. Despite knowing that without the standard curve it is not possible to determine a peptide concentration, the PC supernatants were submitted to the Bradford assay. It is possible to assume, by comparing the absorbance values showed in Table 2, that none of these two methodologies would be acceptable since the resultant absorbance value would be higher than the early peptide concentration added in the preparation.

The principle of Methodology 3, which consisted in filtering the suspension of chitosan nanoparticles in an Amicon® filter, was based on the experiments of Hosseinzadeh and collaborators [30]. The hypothesis for using the filter to remove free chitosan, was that peptide is a 5.3 kDa polypeptide and therefore would pass through the filter membrane while both the nanoparticles and free chitosan (molecular mass > 130 kDa) would be retained in the filter membrane. Using this methodology, positive values for absorbance were detected, even at concentrations below 6.25 µg/mL, and, in this way, it was possible to construct the standard curve (Fig. 3). The filtrate resulted from the nanoparticles produced according to Methodology 3 was submitted to the Bradford method and, using the standard curve, it was possible to estimate the concentration of peptide that was associated within the nanoparticles.

The association efficiencies of peptide to chitosan nanoparticles were 87.7%, 98.3%, and 85.7% for three different nanoparticles preparations: Q1, Q2 and Q3, respectively (Table 3). Although, the data obtained after analyzing samples by the Qubit® kit (Table 3) did not exactly present the same values, it showed similar concentrations and preserved the increasing order of the peptide concentration found in the filtrate obtained by the Bradford method (Q2 > Q1 > Q3).

Despite other similar works with chitosan nanoparticles make use of Bradford method to protein quantification [29], it is safe to say that the results obtained may be not the most accurate due the link between chitosan and the Coomassie blue dye [30].

Because of this, some mathematical theories have already been proposed to correct some interferences caused by polymers when using the Bradford method to estimate the protein concentration in solutions containing traces of polymers [25]. However, there is still no mathematical formula for this correction for chitosan. Therefore, it is consistent to say the safest way to obtain accurate results using the Bradford method in solutions containing chitosan is by cutting out as much as possible the presence of this polymer in the test solution.

One way found to remove efficiently chitosan from solution of interest was using Amicon® Ultra-15 filters. Hu et al., 2013 [31] also used this strategy in their work, however for peptide quantification it was used High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), which consist in a method more expensive than Bradford and also requires qualified and experienced personnel to handle the equipment, unlike the method here presented. Besides removing chitosan residues for association efficiency analysis as shown here, Millipore® filters has also been applied to isolate the produced nanoparticles from the entire solution, as demonstrated by Jayaraman et al. [32].

5. Conclusion

In this way, the results indicated that Methodology 3, based in the separation of free polymers from the rest of the formulation using filter membranes showed better results than previous methodologies. Here, the Amicon filter 30 kDa was suitable to be used with peptides and components smaller than the molecular size of the chitosan nanoparticles. This strategy is efficient for prior processing samples for analysis with the Bradford test since it removes the chitosan interference with the dye, which was the main problem found for detection of peptides in the chitosan nanoparticles using this protein quantification protocol.

Acknowledgements

The authors thank CAPES (1614425/2016) and CNPq (459678/2014-0) for their financial support, the Laboratory of Ambiental Microbiology and Biotechnology (LAMAB) for some equipment sharing, the Multiuser Laboratory at Institute of Tropical Pathology and Public Health for Qubit® Fluorometer and the Laboratory of Immunology at Institute of Tropical Pathology and Public Health for Microplate Spectrophotometer.

References

- [1] S. Pandey, S.B. Mishra, Bioceramics: silica-based organic-inorganic hybrid materials for medical applications, *Nanomod. Drug Deliv. Ther.* (5) (2013) 135–161.
- [2] S. Pandey, Highly Sensitive and Selective Chemiresistor Gas/vapor Sensors Based on Polyaniline Nanocomposite: A Comprehensive Review, 1, JS: AMD, 2016 431–453.
- [3] S. Pandey, K.K. Nanda, Au nanocomposite based chemiresistive ammonia sensor for health monitoring, *ACS Sens.* 1 (2016) 55–62.
- [4] S. Pandey, A comprehensive review on recent developments in bentonitebased materials used as adsorbents for wastewater treatment, *J. Mol. Liq.* 241 (2017) 1091–1113.
- [5] A.C. Souza, A.C. Amaral, Antifungal therapy for systemic mycosis and the nanobiotechnology era: improving efficacy, biodistribution and toxicity, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 1–13.
- [6] A.C. Amaral, A.L. Bocca, A.M. Ribeiro, J. Nunes, D.L. Peixoto, A.R. Simioni, F.L. Primo, Z.G. Lacava, R. Bentes, R. Titze-de-Almeida, A.C. Tedesco, P.C. Moraes, M.S. Felipe, Amphotericin B in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and dimercaptosuccinic acid (DMSA) nanoparticles against *Paracoccidioidomycosis*, *J. Antimicrob. Chemother.* 63 (3) (2009) 526–533.
- [7] A.L.P. Neves, C.C. Milioli, L. Müller, H.G. Riella, N.C. Kuhn, H.K. Stulzer, Factorial design as tool in chitosan nanoparticles development by ionic gelation technique, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 445 (2014) 34–39.
- [8] K.G.H. Desai, Chitosan nanoparticles prepared by ionotropic gelation: an overview of recent advances, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 33 (2016) 107–158.
- [9] M. Amidi, E. Mastrobattista, W. Jiskoot, W.E. Hennink, Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62 (1) (2010) 59–82.
- [10] I.M. van der Lubben, J.C. Verhoef, G. Borchard, H.E. Junginger, Chitosan and its derivatives in mucosal drug and vaccine delivery, *Eur. J. Pharm. Sci.* 14 (2001) 201–207.
- [11] J.D. Schiffman, C.L. Schauer, One-step electrospinning of crosslinked chitosan fibers, *Biomacromolecules* 8 (2007) 2665–2667.
- [12] M. Rinaudo, Chitin and chitosan: properties and applications, *Prog. Polym. Sci.* 31 (7) (2006) 603–632.
- [13] K.A. Jones, M.J. Alonso, Depolymerized chitosan nanoparticles for protein delivery: preparation and characterization, *J. Appl. Polym. Sci.* 88 (2003) 2769–2776.
- [14] P. Calvo, C. Remuñan-Lopez, J.L. Vila-Jato, M.J. Alonso, Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers, *J. Appl. Polym. Sci.* 63 (1997) 125–132.
- [15] S.A. Agnihotri, N.N. Mallikarjuna, T.M. Aminabhavi, Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery, *J. Control. Release* 100 (1) (2004) 5–28.
- [16] N.M. Zaki, M.M. Hafez, Enhanced antibacterial effect of ceftriaxone sodium-loaded chitosan nanoparticles against intracellular *Salmonella typhimurium*, *AAPS PharmSciTech* 13 (2) (2012) 411–421.
- [17] M. Prabaharan, Chitosan-based nanoparticles for tumor-targeted drug delivery, *Int. J. Biol. Macromol.* 72 (2015) 1313–1322.
- [18] G. Kalantarina, N. Ziamajidia, R. Mahjoub, M.T. Goodarzi, M. Saidijam, S.S. Asle, R. Abbasipourkabar, Effect of insulin-coated trimethyl chitosan nanoparticles on IGF-1, IGF-2, and apoptosis in the hippocampus of diabetic male rats, *Restor. Neurol. Neurosci.* 6 (2018) 1–11.
- [19] M. Shokrzadeh, N. Ghassemi-Barghi, Melatonin loading chitosan-tripolyphosphate nanoparticles: application in attenuating etoposide-induced genotoxicity in HepG2 cells, *Pharmacology* 102 (2018) 74–80.
- [20] Z. Ma, H.H. Yeoh, L. Lim, Formulation pH modulates the interaction of insulin with chitosan nanoparticles, *J. Pharm. Sci.* 91 (6) (2002) 1396–1404.
- [21] L. Zhao, L. Shi, Z. Zhang, J. Chen, D. Shi, J. Yang, Z. Tang, Preparation and application of chitosan nanoparticles and nanofibers, *Braz. J. Chem. Eng.* 28 (3) (2011) 353–362.
- [22] X. Zhang, H. Zhang, Z. Wu, H. Niu, C. Li, Nasal absorption enhancement of insulin using PEG-grafted chitosan nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68 (3) (2008) 526–534.
- [23] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1–2) (1976) 248–254.
- [24] S.J. Compton, C.G. Jones, Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay, *Anal. Biochem.* 151 (2) (1985) 369–374.
- [25] N. Carlsson, A. Borde, S. Wölfl, B. Kerman, A. Larsson, Quantification of protein concentration by the Bradford method in the presence of pharmaceutical polymers, *Anal. Biochem.* 411 (1) (2011) 116–121.
- [26] Z.Q. Su, S.H. Wu, H.L. Zhang, Y.F. Feng, Development and validation of an improved Bradford method for determination of insulin from chitosan nanoparticulate systems, *Pharm. Biol.* 48 (9) (2010) 966–973.
- [27] A.C. Amaral, M.S. Felipe, Nanobiotechnology: an efficient approach to drug delivery of unstable biomolecules, *Curr. Protein Pept. Sci.* 14 (7) (2013) 588–594.
- [28] N.M. Dounighi, R. Eskandari, M.R. Avadi, H. Zolfagharian, A.M.M. Sadeghi, M. Rezaayat, Preparation and in vitro characterization of chitosan nanoparticles containing *Mesobuthus eupeus* scorpion venom as an antigen delivery system, *J. Venomous Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 18 (2012) 44–52.
- [29] H. Katas, M.A.G. Raja, K.L. Lam, Development of chitosan nanoparticles as a stable drug delivery system for protein/siRNA, *Int. J. Biomater.* 2013 (2013) 146320.
- [30] H. Hosseinzadeh, F. Atyabi, R. Dinarvand, S. Ostad, Chitosan-Pluronic nanoparticles as oral delivery of anticancer gemcitabine: preparation and *in vitro* study, *Int. J. Nanomedicine* 7 (2012) 1851–1863.
- [31] B. Hu, Y. Ting, X. Zeng, Q. Huang, Bioactive peptides/chitosan nanoparticles enhance cellular antioxidant activity of (–)-Epigallocatechin-3-gallate, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 875–881.
- [32] M.S. Jayaraman, D.J. Bharali, T. Sudha, S.A. Mousa, Nano chitosan peptide as a potential therapeutic carrier for retinal delivery to treat age-related macular degeneration, *Mol. Vis.* 18 (2012) 2300–2308.

CAPÍTULO 4. ARTIGO 2

O presente artigo foi submetido à revista International Wound Journal
(ISSN: 1742-481X)

Wound healing treatment using insulin incorporated within polymeric nanoparticles in the diabetes animal model.

Maycon Carvalho Ribeiro¹, Viviane Lopes Rocha Correa¹, Francenya Kelley Lopes da Silva¹, Ariadine Amorim Casas¹, Angelica de Lima das Chagas⁴, Leiny Paula de Oliveira⁴, Marina Pacheco Miguel^{2,4}, Danielle Guimaraes Almeida Diniz³, Andre Correa Amaral¹, Liliana Borges de Menezes^{#2}

¹Laboratory of Nano & Biotechnology, Institute of Tropical Pathology and Public Health, Universidade Federal de Goias, Goiania, GO 74605-050, Brazil

²Pathology, Institute of Tropical Pathology and Public Health, Universidade Federal de Goias, Goiania, GO 74605-050, Brazil

³Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Goias, Goiania, GO 74605-220, Brazil

⁴Graduate Program in Animal Science, School of Veterinary and Zootecnics, Universidade Federal de Goias, Goiania, GO 74001-970, Brazil

#Correspondence address:

Universidade Federal de Goiás

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública

Rua 235, s/ n, Setor Universitário, Goiânia, GO, Brazil

Telephone: +5562981248496

E-mail: lilianabmleite@gmail.com

ABSTRACT

Chitosan nanoparticles has been studied for its ability to accelerate healing and has been tested in the therapy of difficult-to-heal lesions, such as in diabetic patients. Insulin acts by stimulating the signaling pathway for wound healing. The objective of this work was to produce chitosan nanoparticles containing insulin for the evaluation of cicatrizant activity in diabetic rats. To evaluate the healing, 72 Wistar rats were divided in four

groups: sepigel (S), sepigel with insulin (SI), empty chitosan nanoparticles (QV) and chitosan nanoparticles containing insulin (IQ). The groups were subdivided in three subgroups (n = 6) according to the histological analysis times of the wound (3rd, 7th and 14th day). It was possible to produce chitosan nanoparticles by the ionic gelation method, with desired diameter and zeta potential and polydispersity index. No differences were found in the rate of wound retraction among the four groups. The topical use of empty or insulin-containing chitosan nanoparticles in wound healing in diabetic rats was able to stimulate inflammatory cell proliferation and angiogenesis, followed by wound maturation. Differences in wound healing data from the group treated with insulin-containing nanoparticles and from the group treated with free insulin may be related to the high stability of the nanoparticles.

Keywords: nanoparticles, chitosan, insulin, diabetes, healing

1. INTRODUCTION

The wound healing impairment is one of the major health concerns in Diabetes mellitus (DM) patients and a diversity of factors contribute to this disorder, including neuropathy and vascular injuries.^{1,2} Also, a persistent hyperglycaemia state is observed because of the deficiency in insulin production or by its incapacity to act in the cells.³ According to the International Diabetes Federation, the projections for the diabetes prevalence in 18-99 years old population are estimated to rise from 8.4% in 2017 to 9.9% in 2045.⁴

In DM patients, the wound healing process is a complicated and a risk health problem. In non-diabetic individuals, the healing process triggers biochemical reactions involving the homeostasis, inflammation, proliferation and tissue remodelling.^{5,6} On the other hand, in DM patient's metabolic impairment on these steps are retarded⁶, which

may evolved for the development of chronicle wounds. Once not adequately treated, they can be infected by opportunistic pathogens, which very often culminate in the amputation of the infected limb.^{6,7,8}

Insulin acts stimulating the metabolic pathway for healing process. The receptors for insulin are present in vertebrate, in amount varying in function of the tissue type.⁷ This hormone can stimulate growth and cellular differentiation as observed by the increase on the expression levels of signalling molecules in the healing metabolic pathways, such as vasoactive endothelial growth factor (VEGF) and protein kinase B (known as Akt).⁹ Topical administration of insulin in diabetics' rats reduced the time needed for the wound epithelialization resulting in a thick epidermal layer.⁷ This faster wound resolution could be associated with the macrophages infiltration, as observed by inflammatory mediators secreted *in vivo*.¹⁰

However, the use of insulin in topical administration could be a concern because of its easy degradation. Nanoparticulate drug delivery systems have been showed to be a great strategy to overcome this problem. Poly (lactide-*co*-glycolide, PLGA) polymeric nanoparticles demonstrated to be efficient to protect the insulin and improved the wound healing in diabetics rats.⁹

Polymeric nanoparticles can be prepared by a variety of polymers, both natural and synthetic. Chitosan is a cationic biopolymer obtained by chitin deacetylation which presenting protonated amino groups when dissolved in weak acids. Chitosan presents the highest cationic character among all natural biopolymers.¹¹ In this view, chitosan nanoparticles are widely used as drug delivery systems, conferring protection for different nature of compounds. It is non-toxic and biocompatible and its slow degradation generates amino sugar products, which are absorbed by the body.^{11,12}

The alterations in the peripheral vascular circulation that affect the diabetic patient make the occurrence of infection more frequent and the healing slower.¹³ When chitosan is in nanoparticles form, exhibits higher antibacterial activity because the polycationic nano-chitosan has higher surface area and charge density and can interact to a greater degree with the negatively charged surface of the bacterial cell¹⁴ and promoting re-epithelialization and granulation tissue formation by modulation of keratinocytes proliferation and migration.¹⁵

Considering the benefits of topical administration of insulin, in this study we examined its role when incorporated within chitosan nanoparticles on the cutaneous wound healing process in acute diabetic rats.

2. METHODS

2.1 Preparation of insulin-chitosan-based nanoparticles

The insulin (Recombinant Human Insulin, Sigma-Aldrich, soluble at 10 mg/mL in pH 2.0-2.5) entrapped within chitosan nanoparticles were prepared according to modification on the ionotropic gelation method described by Calvo et al.¹² Initially, chitosan (Sigma-Aldrich), low molecular weight, degree of deacetylation $\geq 75\%$ and viscosity 20-300 cps ($c = 1\%$ in 1% acetic acid) was dissolved in acetic acid 0.1M for 40 min homogenization at 15500 rpm in the Ultra-Turrax equipment. Insulin-chitosan nanoparticles (IC) were formed by slowly adding dropwise of 8mL pentasodium tripolyphosphate (TPP, Sigma-Aldrich) solution (1mg/mL) containing 0.598mL of the Recombinant Human Insulin (1mg/mL) in 15mL of the chitosan aqueous solution (2mg/mL) under gently magnetic stirrer. Next, the solution was kept under stirring for 1 hour. The final concentration of the insulin in the preparation was 0.5UI (Unit International), as previous described as effective in the wound healing.¹⁶ The empty

chitosan nanoparticles (EC) were obtained by the same process described for the IC, but adding ultrapure water instead insulin. The IC or EC nanoparticles were washed using Amicon Ultra-15 filters 30 kDa (Millipore®) and centrifuged at 3000g, 4 °C by 40 min as described before.¹⁷ A triplicate was made for all formulations. All the nanoparticles dispersions were incorporated within hydrogel (Sepigel®) 30mg/mL (Polyacrylamide, C13-14 Isoparaffin and C13-14 Laureth-7).

2.2 Nanoparticles characterization

2.2.1 Insulin association efficiency

The amount of insulin entrapped within chitosan nanoparticles (association efficiency, AE) was determined indirectly by subtracting the total insulin amount used to prepare the IC solutions from the non-linked insulin detected in the filtrated of IC by Bradford assay (Sigma-Aldrich), according to the Eq. (1).

$$AE = [(total\ insulin - insulin\ in\ filtrated) / (total\ insulin)] \times 100 \text{ (Eq. 1)}$$

2.2.2 Photon correlation spectroscopy analyses and monitoring of nanoparticle characteristics physicochemical of chitosan with insulin

The mean diameter (given as Z-average) and size distribution (given as polydispersity index, PDI) of the nanoparticle formulations in ultrapure water were assessed by dynamic light scattering and the zeta potential analysis were all performed in a Zetasizer Nano ZS ZEN3600 (Malvern Instruments, UK). The scattered light was measured at an angle of 90° at 25 °C.

The same criteria were used to investigate some of their variations physicochemical properties, such as diameter, PDI and zeta potential during 56 days of

storage at 4 °C. The results were expressed as mean and standard deviation. Statistical analysis was performed using ANOVA ($p < 0.05$).

2.2.3 Scanning electron microscopy

The nanoparticles images were obtained by Scanning Electron Microscopy (SEM). The chitosan or insulin within nanoparticles dispersion were stirred for 2 min to avoid agglomeration. One drop of each sample was put in a copper grid with carbon and dried for 24 h at room temperature. Images were acquired using an electron microscope (Jeol, model JEM-1011) with accelerating voltage of 100kV.

2.2.4 Nanoparticles release measurements

The release of the insulin from nanoparticles was investigated by incubating the samples at 37 ± 0.5 °C in 23 mL saline buffer (pH 7.4) in a rotatory shaker. 3mL of the samples were collected at times 0h, 24h, 48h, 72h, 7 days and 14 days and centrifuged in the Amicon Ultra-15 filters 30 kDa (Millipore®), 3000g, 40 min. The insulin in the filtered was quantified by the Bradford method as described in the preparation of nanoparticles section. 3ml of the saline buffer was reset at every collect time. A triplicate was made for all samples analysis.

2.3 In vivo wound-healing activity of insulin-chitosan based nanoparticles

2.3.1 Ethical committee clearance

All animal handling and experimental procedures carried in this study were approved by the Committee for Animal Care and Use of the Federal University of Goias, Goiania/ GO, under registration #062/ 2015.

2.3.2 *Animals groups*

72 female Wistar rats aging four months weighing from 200 to 250g were housed in polypropylene cages under controlled settings of temperature (25 ± 2 °C) and luminosity (12 hours in dark or in light cycles), provided with food and water *ad libitum*. The diabetic animals were separated in four main groups according to the treatment received: Sepigel® (S), free insulin incorporated into Sepigel® (FI), empty chitosan nanoparticles incorporated into Sepigel® (EC) and insulin-chitosan nanoparticles incorporated into Sepigel® (IC). The treatment was investigated at 3, 7 and 14 days post wound creation using six animals ($n= 6$) for each period used.

2.3.3 *Induction of diabetes*

Diabetes was induced by a single intraperitoneally injection of alloxan at 120mg/kg body weight after 10 hours of food starvation before the injection which was followed by 4 hours of food starvation after the injection. 72 hours after alloxan injection, blood samples from caudal vein were collected to monitor the level of glucose in blood (commercial kit BioCheck®). Animals were considered diabetic if presenting glucose level $\geq 200\text{mg/dL}$. The glucose levels were investigated every 72 hours along all the experiment.

2.3.4 *Wound creation*

The wounds were created in the diabetic verified animals. The anaesthetic used was a combination of xylazine (1mg/ kg) and ketamine (90mg/ kg) were administered by intraperitoneal injection. After removing of the dorsal hair and aseptically cleaned the region, a biopsy punch 8.0mm was used to remove the skin and the subcutaneous tissue, expounding the muscular fascia. Just after the wound creation, the treatment protocols

started by application of 24 hours interval of 100µL for the respective treatment protocol for each group. Tramadol hydrochloride (1mg/ kg) associated with the anaesthetic was given in the water during the creation of the wound and throughout 48 hours (40mg/ kg).

At the end of treatment for each group and subgroups, the euthanasia of the animals were conducted in CO₂ chamber and 1cm of the tissue near wound were removed for analysis.

2.3.5 Wound healing evaluation

To evaluate the wound healing progress, photographic images were obtained by using a digital camera Samsung Smart Camera ST150F[®] fixed at 15cm distant of the animal dorsal region each one day interval. The images were analysed using the Image J[®] software, allowing the determination of the area of the wounds in cm². And the rate of wound closure (WC) was obtained by the following Eq. (2).

$$WC = [(W_{Ai} - W_{Af}) / (W_{Ai})] \times 100 \text{ (Eq. 2)}$$

Where, W_{Ai} corresponds to the initial area of the wound and W_{Af} to the final area at the time of evaluation.

2.3.6 Histopathological analysis

The skin tissue samples were aseptically removed and fixed in 10% formalin solution followed by paraffin embedding routine. The 4µm tissue sections, obtained using a semi-automatic rotating microtome, were stained with haematoxylin and eosin (H&E) and evaluated in 10 fields at 400× by light microscopy.¹⁸ The presence or absence of the following parameters were analysed using light microscopy: epidermis reepithelization, polymorphonuclear cells (PMN), mononuclear cells (MN), fibroplasia, level of maturation of the scar.

The following criteria were used for the aspects observed: presence or absence of necrosis and hyperplasia; absence, partial or complete presence of epidermis reepithelization; loose or dense for the connective tissue. For the other parameters, four criteria were used: absence (0), discreet (1 to 25% of the image field), moderate (25 to 50% of the image field) or accentuated (51 to 100% of the image field). To evaluate the degree of maturation of the scar, the following parameters were used:

Degree of maturation of Scar			
0 - Absent	1 - Discreet	2 - Moderate	3 - Accentuated
Absence of blood vessels and collagenization	Loose fibrovascular tissue (delicate collagen fibers in small amount, amid proliferated fibroblasts and numerous dispersed blood vessels)	Dense fibrovascular tissue (collagen fibers in the form of thick fibers, with areas of dense connective tissue and amid proliferated fibroblasts and numerous dispersed blood vessels)	Fibrosis (collagen fibers constituting thick and compactly arranged bundles, in the middle of fibrocytes, with rare presence of blood vessels)

2.4 Statistical analysis

For the wound healing evaluation two-way ANOVA and Tukey test were used. For the microscopy evaluation, the frequencies of the parameters investigated were analysed by Fisher's Exact test. For the dermis parameters the Kruskal-Wallis test was used. For all analysis the significance level was 5% ($p \leq 0.05$). The results are expressed as mean $\pm$ standard deviation of the mean.

3. Results

3.1 Characterization of insulin encapsulated within chitosan-based nanoparticles

The physicochemical characteristics of insulin-chitosan nanoparticles (IC) are shown in Table 1. The polydispersity index was 0.4 ± 0.01 , indicating homogeneity of the dispersion which presenting size of $245.9 \pm 25.46\text{nm}$ and positive Zeta potential of

$39.3 \pm 4.88\text{mV}$. The concentration of insulin within chitosan nanoparticles was $22\mu\text{g/ mL}$ (0.6 UI) corresponding to $97.19\% \pm 2.18$ of the association efficiency.

Table 1 Physicochemical characteristic of insulin-chitosan nanoparticles.

Formulation	Size (nm)	PdI*	Z-potential (mV)
Insulin-chitosan nanoparticles	245.9 ± 25.46	0.463 ± 0.01	39.3 ± 4.88
Empty-chitosan nanoparticles	183.3 ± 8.32	0.397 ± 0.07	33.7 ± 2.45

The results express the average of three independent preparations $\pm$ standard deviation.

*PdI: polydispersity index

3.2 Nanoparticles transmission electron microscopy

The transmission electron microscopy images also confirmed the nanometer size of the nanoparticles (Figure 1). It is possible to note the spherical or near-spherical morphology and no nanoparticles aggregation.

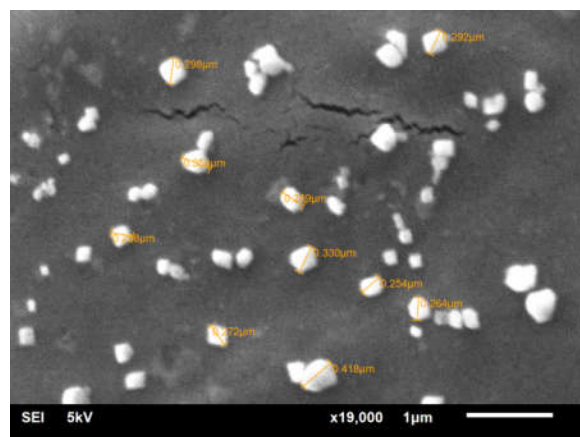


Figure 1 Scanning electron microscopy of the insulin within chitosan nanoparticles. The nanoparticles presented a spherical or near-spherical morphology. Expansion of 19.000x.

3.3 Nanoparticles release and monitoring of nanoparticle characteristics physicochemical of chitosan with insulin

The insulin-chitosan nanoparticles presented stability during 56 days of storage under refrigeration at 4 °C as observed in the parameters in Figure 2. Considering the very small insulin amount release from the nanoparticles, it was not possible to quantify using the Bradford assay.

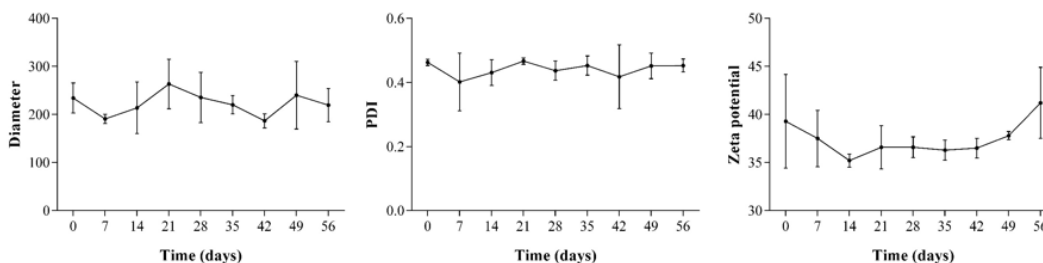


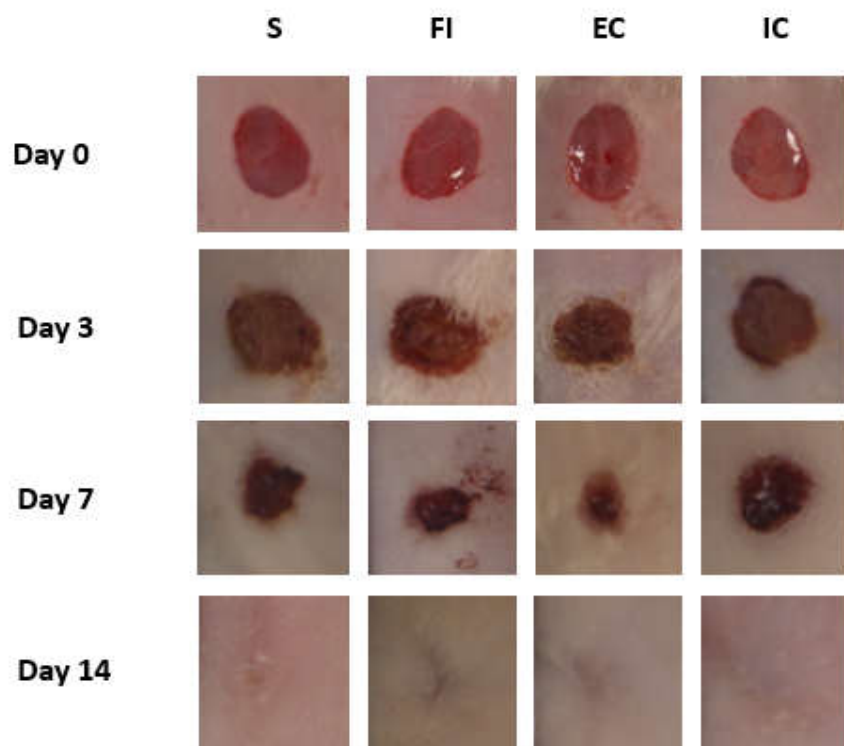
Figure 2 Nanoparticles stability measurements after 56 days storage of the insulin-chitosan nanoparticles. The graphics indicate the diameter, polydispersity index (PDI) and zeta potential. The results express the average of three independent preparations $\pm$ standard deviation

3.2 Wound healing evaluation

3.2.1 Gross evaluation of healing

The wound area diminished throughout the healing process for all groups (Figure 3a). The crusts formations begin on the third day for all groups and were observed in all animals at day seven from injury. The complete wound closure occurred in the fourteenth day (Figure 3a and 3b). Although no statistical differences were observed between groups, the insulin-chitosan nanoparticles treated group presented a better wound scar aspect and homogeneity in index of wound retraction for all animals.

(A)



(B)

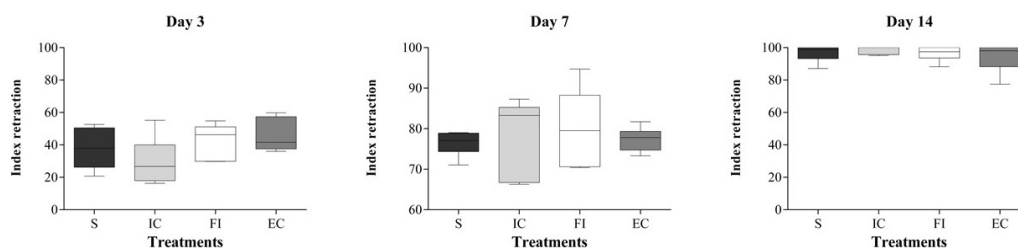


Figure 3 Gross wound evaluation. (A) The wound area of each group was treated with sepigel (S), free insulin (FI), insulin-chitosan nanoparticles (IC) or empty chitosan nanoparticles (EC). Treatments were performed daily for three, seven, and 14 days. (B) Wound retraction measurements are in accordance with physical appearance showed in the images. No statistical differences were observed.

3.2.2 Microscopic evaluation of wound healing

The histological evaluation was performed during days three, seven, and 14 on tissue wound samples from diabetic and treated animals (Figure 4). After three days of treatment, the insulin-chitosan nanoparticles (IC) and empty chitosan nanoparticles (EC) presented accentuated presence of polymorphonuclear infiltration while in the sepigel (S) and free insulin (FI) groups this characteristic was moderate. A higher intensity of this infiltrate was noted in insulin-chitosan nanoparticles ($p < 0.0001$) or empty chitosan nanoparticles ($p = 0.0162$) when compared to the sepigel group.

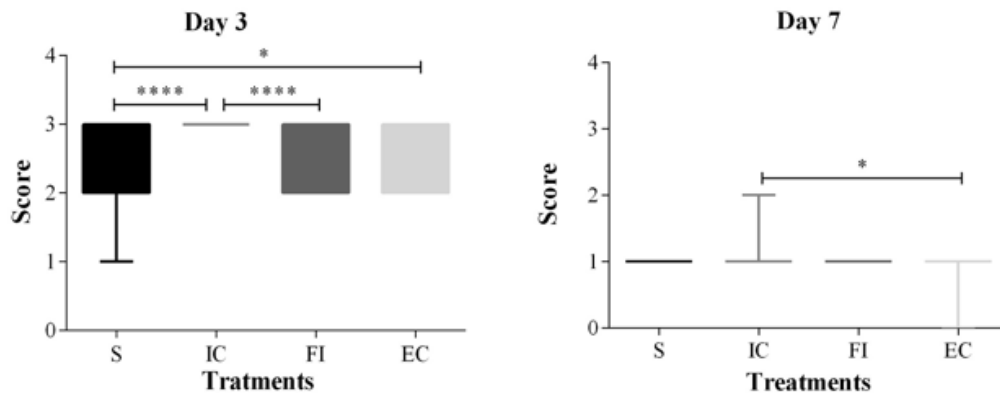


Figure 4. Presence of polymorphonuclear infiltration after three and seven days of treatments with S: sepigel, IC: insulin-chitosan nanoparticles, FI: insulin free, EC: empty chitosan nanoparticles. In the third day statistical differences were observed for groups S and IC ($p < 0.0001$), S and EC ($p = 0.0162$), and IC and FI ($p < 0.0001$). In the seventh day significant differences were detected for groups S and EC with FI ($p = 0.0392$). * $p < 0.05$ Kruskal-Wallis test.

A presence of moderate intensity of mononuclear cells were observed in the third day from the treatments using free insulin comparing to the sepigel, and insulin-chitosan

or empty chitosan nanoparticles. At day seven, a higher presence of mononuclear cells were observed in the insulin-chitosan nanoparticles group. After 14 days from the beginning of treatment, discrete mononuclear cells intensity was observed for all groups (Figure 5).

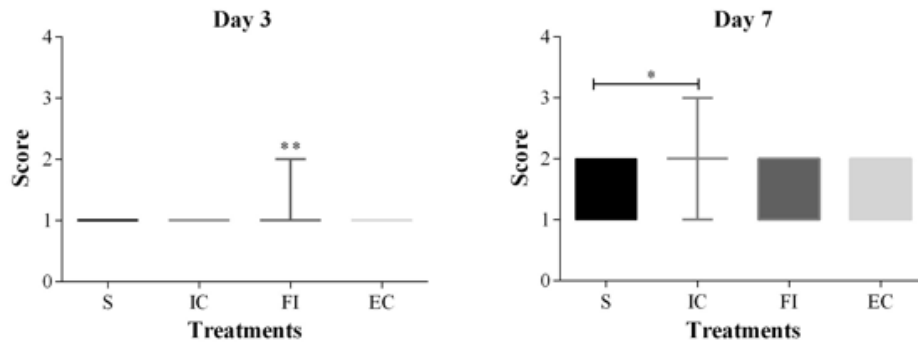


Figure 5 Presence of mononuclear cell infiltration after three and seven days of treatments with S: sepigel, IC: insulin-chitosan nanoparticles, FI: insulin free, EC: empty chitosan nanoparticles. After three days of treatment statistical differences were observed for groups S and FI ($p = 0.0078$), IC and FI ($p = 0.0078$), FI and EC ($p = 0.0078$). After seven days the differences were observed for groups S and IC ($p = 0.0312$). * $p < 0,05$ Kruskal-Wallis test.

A discrete presence of fibroplasia was observed after three days of treatment with insulin-chitosan and the controls sepigel and empty chitosan nanoparticles. On the other hand, in the insulin free group its presence was moderate (Figure 6). After seven days, the fibroplasia was intense for the groups treated with insulin-chitosan nanoparticles and free insulin. At the end of the treatment, a decrease on the fibroplasia intensity was more evident for the free insulin treatment group (Figure 6).

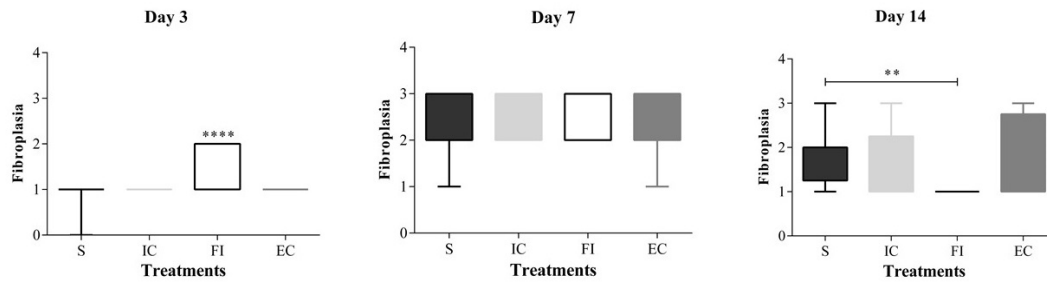


Figure 6. Presence of mononuclear cell infiltration after three and seven days of treatments with S: sepigel, IC: insulin-chitosan nanoparticles, FI: insulin free, EC: empty chitosan nanoparticles. Statistical differences were observed after three days for groups S and FI ($p < 0.0001$), IC and FI ($p < 0.0001$), and FI and EC ($p < 0.0001$). No statistical differences were detected between the groups on the seventh day. After 14 days from treatments, statistical difference were detected for S and FI groups ($p = 0.0033$). * $p < 0.05$ Kruskal-Wallis.

The wound healing maturation parameters were evaluated by the presence of the fibrovascular loose or dense tissue and were detected only after 14 days from the beginning of treatment for all groups. The presence of this characteristic was more accentuated in the free insulin treated group (Figure 7), in which the wound healing maturation was more apparent.

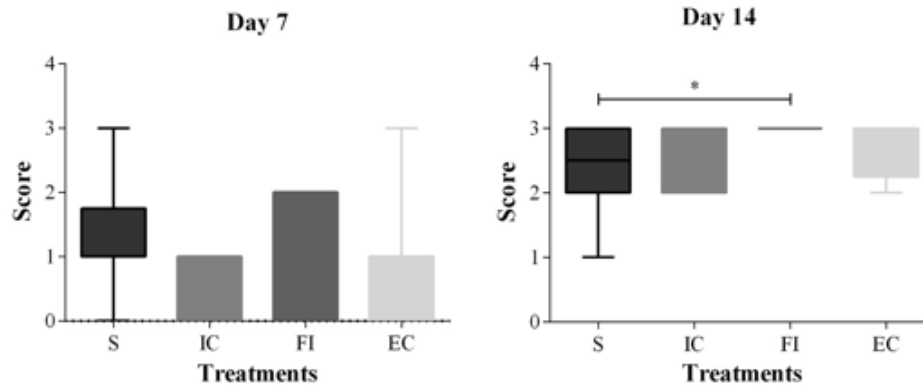


Figure 7. Wound healing maturation after seven and fourteen days of treatments with S: sepigel, IC: insulin-chitosan nanoparticles, FI: insulin free, EC: empty chitosan nanoparticles. * $p < 0.05$ Kruskal-Wallis.

The presence of blood vessels was higher in the insulin-chitosan group (Figure 8). After 14 days, a reduction on the blood vessels was observed, mainly in the free insulin group.

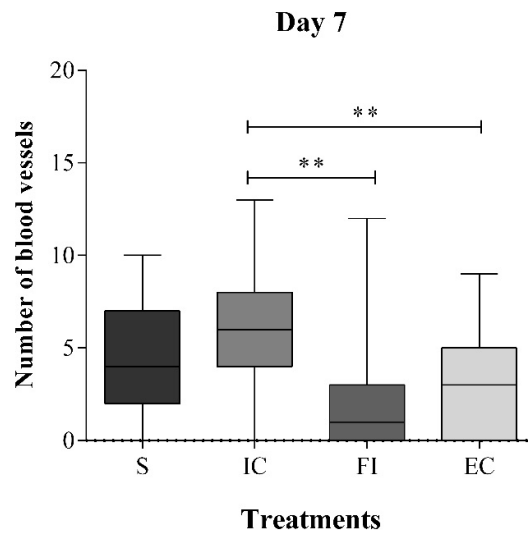


Figure 8. Blood vessels in the wound after seven and fourteen days of treatments with S: sepiel, IC: insulin-chitosan nanoparticles, FI: insulin free, EC: empty chitosan nanoparticles. Statistical differences were detected at day seven for groups insulin-chitosan nanoparticles and free insulin ($p= 0.0013$) and empty and insulin-chitosan nanoparticles ($p= 0.0074$). $*p < 0.05$ (ANOVA).

The histopathological images indicate the presence of polymorphonuclear cells was discrete in the sepiel (Figure 9-A1), empty chitosan nanoparticles (Figure 9-A3), insulin-chitosan nanoparticles (Figure 9-A4) and fibrin and polymorphonuclear in the free insulin group (Figure 9-A2). A moderate presence of fibroblasts was observed in the sepiel (Figure 9-B1) and accentuated in the free insulin (Figure 9-B2), empty- (Figure 9-B3) and insulin- chitosan nanoparticles (Figure 9-B4) treated groups. After 14 days of treatment, a dense fibrovascular tissue and collagen was verified in the sepiel (Figure 9-C1) group, and presence of fibroses and collagen in the free insulin (Figure 9-C2), presence of collagen and fibrocyte in empty chitosan (Figure 9-C3) and insulin-chitosan (Figure 9-C4) nanoparticles treated groups.

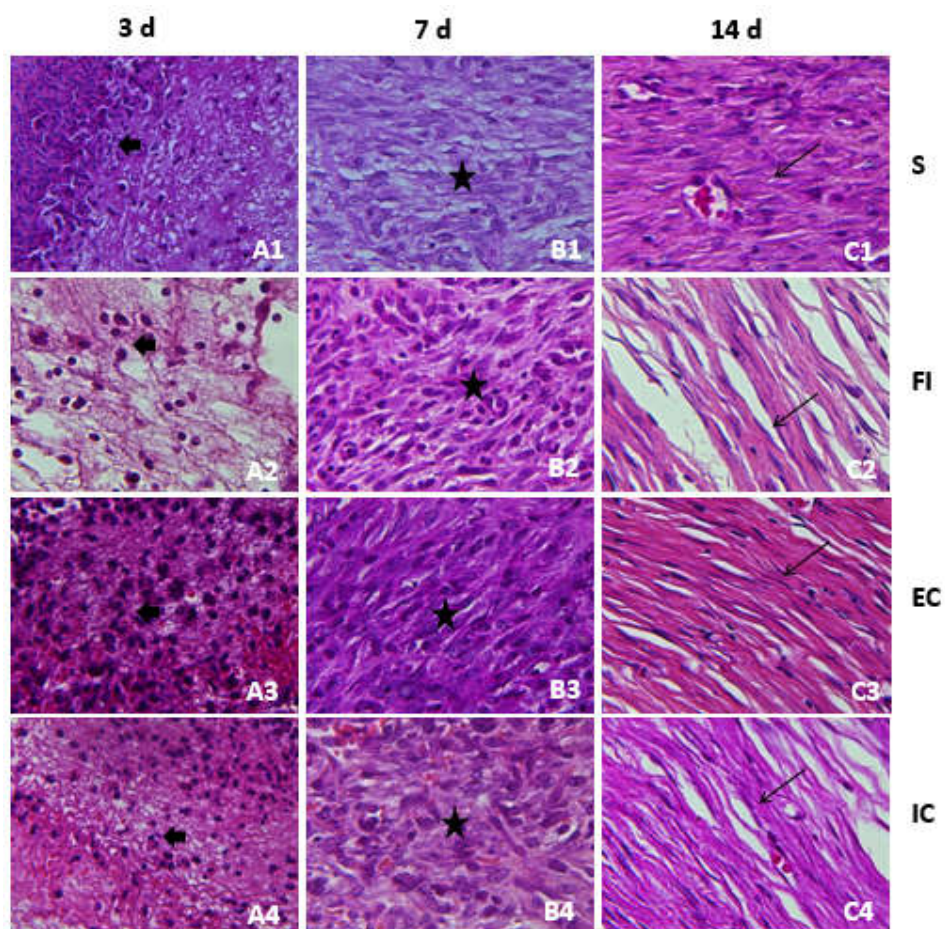


Figure 9. Histological sections indicating the polymorphonuclear cells (short arrow), fibroplasia (star) and wound healing maturation (long arrow) after three, seven and fourteen days of treatments. S: sepiigel, IC: insulin-chitosan nanoparticles, FI: insulin free, EC: empty chitosan nanoparticles. Haematoxylin and eosin stained 40 $\times$. The images were captured using a Leica DMC2900 camera in the Leica DMLS microscope. Scale of 20 μ m.

4. Discussion

Diabetes affects the normal course for wound healing. The healing process in diabetic patients is characterized by a delay in the cellular infiltration and granulomatous tissue formation. Also the wounds presented a prolonged epithelization time.¹⁹ The lack

of insulin biological activity is considered a hallmark in diabetes, in which the defective action of this peptide on the skin has been proposed as an important mechanism that contributes to the healing defects in this disease.²⁰

Topical insulin exerts an important metabolic and mitogen effect, mediated through the insulin receptor, which is present in vertebrate tissues at different concentrations and varies according to tissue type.¹⁶ Chitosan nanoparticles are widely used in drug delivery systems to carry on and releasing different types of compounds, since they confer protection to the active principle, being non-toxic and biocompatible.²¹ Insulin associated with chitosan nanoparticles make possible, because of the mucoadhesive properties of this polymer, interact with the surface of the cell membranes, stimulating cell multiplication at the site of the wound and activating the healing pathways signalling.¹⁶

In this work, chitosan nanoparticles were prepared and tested in the wound healing diabetic rat model. The average size for insulin-chitosan nanoparticles was 245.9 ± 25.46 , which are in accordance with previous studies using the same strategy, but for insulin oral administration.^{22, 23} The positive high for zeta potential of ± 30 mV, as a result of the chitosan free amino groups cationic charges²⁴, associated with the narrow polydispersity index indicates homogeneity in size and in nanoparticles dispersion stability.^{24, 25}

The high zeta potential affects the nanoparticles adhesion to biological surfaces, but also affects the nanoparticles stability, culminating in the low insulin release from nanoparticles. The stability is important for storage and transport of pharmaceutical formulation, since it avoid insulin degradation.²⁶ On the other hand, the high stability could have been caused a delay in the insulin bioavailability, resulting in difference patterns of wound healing observed in the animals treated with the free insulin or with the insulin-chitosan nanoparticles.²⁷ However, the insulin-chitosan nanoparticles

generated homogeneity in the healing process at the end of the treatment, while all the animals presented almost the same aspect for wound.

The histological evaluation of the wound on the third day confirmed the inflammatory pattern of the healing process, where activated platelets secrete chemical mediators that stimulate vasodilation, cellular proliferation, leukocyte chemotaxis, mainly neutrophils, monocytes and macrophages.^{28, 29} All the groups showed a predominance of polymorphonuclear cells, which is the main characteristic of the inflammatory phase.

The presence of polymorphonuclear infiltrate were more evident for the empty- and insulin- chitosan nanoparticles. The chitosan exerted chemotaxis of these cells, by stimulating its migration to the wound in the early stages of the healing process.^{30, 31} Studies evaluated the applicability of chitosan hydrogel as a bandage, showing the chitosan hydrogel was able to promote cell adhesion and proliferation.^{32, 33} Chitosan membranes covering wound presented haemostatic effect accelerating the healing, confirmed by the increase on the epithelisation and organized deposition of collagen in the dermis.³⁴

The stimulation of inflammatory cells and VEGF migration during the beginning of the healing, promote angiogenesis and early migration of fibroblasts.³⁵ This property may have influenced the chemotactic performance of the insulin-chitosan nanoparticles, as observed by the presence of moderate mononuclear infiltrate at the seventh day of treatment.

The insulin accelerates the growth of different cell types, affecting the proliferation, migration and production of keratinocytes, endothelial cells and fibroblast.^{36, 37} In our results, seven days from the beginning of the treatment, the intensity of fibroplasia was predominant in the insulin-chitosan nanoparticles and in the free insulin

treated animals. After 14 days, a decrease in the intensity of fibroplasia was detected while increasing the fibrosis presence was observed for these groups, highlighting the importance of insulin on the acceleration of the healing process. Topical insulin for wound healing tested in diabetic rats, indicates when the normal insulin signalling is restored to the skin, the healing process can be corrected.¹⁶

The angiogenesis was more evident in the insulin-chitosan nanoparticles group when compared to the free insulin or empty chitosan nanoparticles after seven days from start the treatment. Chitosan stimulates the proliferation of fibroblasts, blood vessels and collagen deposition in the wound site, characterized by the formation of granulomatous tissue.³⁸ Treatment of cutaneous wounds in murine diabetic model using chitosan-based membranes has been shown to result in increase in the rate of wound closure correlated with an impressive increase in angiogenesis.³⁹ The reduction in the number of vessels in all groups is related to the earlier stage of the healing process, indicating the final stage of the degree of scar maturation, was observed here, especially in the free insulin and empty chitosan nanoparticles treated groups.

5. Conclusion

Topical administration of empty- or insulin- chitosan nanoparticles in the wound healing in diabetic rats was able to stimulate the proliferation of inflammatory cells and angiogenesis followed by maturation of the wound. However, the differences in the wound healing data from insulin-chitosan nanoparticles and the free insulin treated group, could be related to the high nanoparticles stability.

Acknowledgments

The authors thank Capes for M.C. Ribeiro scholarship (1500635), to Funtec by the Notice of Promotion to the Actions of Innovation in Goiás nº 001/2015 and Fapeg by the Public Project 3/2015-FIRST PROGRAM PROJECTS. Also the Laboratory of Ambiental Microbiology and Biotechnology (LAMAB) for some equipment sharing, the Multiuser Laboratory at Institute of Tropical Pathology and Public Health and the Laboratory of Immunology at Institute of Tropical Pathology and Public Health for Microplate Spectrophotometer, and High Resolution Microscopy Multiuser Laboratory (LabMic/ UFG) by microscopy analyses. The authors declare non conflict of interest.

6. References

1. Hossein NA, Hossein KM, Leila J, Vahid Z, Hossein E. Adapting life to the reality of diabetes. *East Mediterr Health J.* 2018; 24(8): 729-735.
2. Liu X, Xu Y, An M et al. The risk factors for diabetic peripheral neuropathy: A meta-analysis. *PLoS One.* 2019; 14(2):e0212574.
3. Skyler JS. Diabetes mellitus: pathogenesis and treatment strategies. *J Med Chem.* 2004; 47(17):4113-7.
4. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract.* 2018; 138:271-281.
5. Baltzis D, Eleftheriadou I, Veves A. Pathogenesis and treatment of impaired wound healing in diabetes mellitus: new insights. *Adv Ther.* 2014; 31(8):817-36.
6. Patel S, Srivastava S, Singh MR et al. Mechanistic insight into diabetic wounds: Pathogenesis, molecular targets and treatment strategies to pace wound healing. *Biomed Pharmacother.* 2019; 112:108615.
7. Apikoglu-Rabus S, Izzettin FV, Turan P et al. Effect of topical insulin on cutaneous wound healing in rats with or without acute diabetes. *Clin Exp Dermatol.* 2010; 35(2):180-5.
8. Aijaz A, Faulknor R, Berthiaume F et al. Hydrogel Microencapsulated Insulin-Secreting Cells Increase Keratinocyte Migration, Epidermal Thickness, Collagen Fiber Density, and

- Wound Closure in a Diabetic Mouse Model of Wound Healing. *Tissue Eng Part A*. 2015; 21(21-22):2723-32.
9. Abdelkader DH, Tambuwala MM, Mitchell CA et al. Enhanced cutaneous wound healing in rats following topical delivery of insulin-loaded nanoparticles embedded in poly(vinyl alcohol)-borate hydrogels. *Drug Deliv Transl Res*. 2018; 8(5):1053-1065.
 10. Chen X, Liu Y, Zhang X. Topical insulin application improves healing by regulating the wound inflammatory response. *Wound Repair Regen*. 2012; 20(3):425-34.
 11. Tharanathan RN, Kittur FS. Chitin--the undisputed biomolecule of great potential. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2003; 43(1):61-87.
 12. Calvo P, Remunan-Lopez C, Vila-Jato JL, et al. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J Applied Polymer Sci*. 1997; 63(1): 125-132.
 13. Skyler J S, Barkris G L, Bonifacio E, Darsow T, Eckel R H, Groop L. Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis. *Diabetes*. 2017; 66 (2): 241-55.
 14. Chueh-Pin C, Chin-Tin C, Tsuimin T. Chitosan Nanoparticles for Antimicrobial Photodynamic Inactivation: Characterization and In Vitro Investigation. *Photochemistry and Photobiology*, 2012, 88: 570–576.
 15. Nakisa K D et al. Nanocrystalline cellulose–hyaluronic acid composite enriched with GMCSF loaded chitosan nanoparticles for enhanced wound healing *Biomed. Mater*. 2019. In press <https://doi.org/10.1088/1748-605X/ab026c>.
 16. Lima MHM, Caricilli AM, de Abreu LL, et al. Topical insulin accelerates wound healing in diabetes by enhancing the AKT and ERK pathways: a double-blind placebo-controlled clinical trial. *Plos One*. 2012; 7(5):e36974.
 17. Ribeiro MC, Corrêa VLR, da Silva FKL et al. Improving peptide quantification in chitosan nanoparticles. *Int J Biol Macromol*. 2018; 119:32-36.
 18. Garros IC, Campos ACL, Tâmbara EM, Tenório SB, Torres OJM, Agulham MA, Araújo ACF, Santis-Isolan PMB, Oliveira RM, Arruda ECM. Extract from *Passiflora edulis* on the healing of open wounds in rats: morphometric and histological study. *Acta Cir. Bras*. [online]. 2006, vol.21, suppl.3, pp.55-65. ISSN 0102-8650. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502006000900009>.

19. Sharma A, Singh AK, Warren J et al. Differential regulation of angiogenic genes in diabetic wound healing. *J Invest Dermatol*. 2006; 126: 2323–31.
20. Rezvani O, Shabbak E, Aslani A, Bidar R, Jafari M, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial to determine the effects of topical insulin on wound healing. *Ostomy Wound Manage*. 2009; 55: 22–28.
21. Ing LY, Zin NM, Sarwar A, Katas H. Antifungal Activity of Chitosan Nanoparticles and Correlation with Their Physical Properties. *International Journal of Biomaterials*. 2012; 1-9.
22. Ma Z, Lim TM, Lim LY. Pharmacological activity of peroral chitosan–insulin nanoparticles in diabetic rats. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005; 293(2): 271–280.
23. Cui F, Zhang L, Zheng J, Kawashima Y. A study of insulin-chitosan complex nanoparticles used for oral administration. *J. Drug Del Sci Tech*. 2004; 14(6): 435-439.
24. Singh R, Lillard JW. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol*. 2009; 86: 215–223.
25. Dounighi NM, Eskandari R, Avadi MR, Zolfagharian H, Sadeghi AMM, Rezayat M. Preparation and in vitro characterization of chitosan nanoparticles containing *Mesobuthus eupeus* scorpion venom as an antigen delivery system. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2012; 18: 44-52.
26. Aminabhavi TM, Agnihotri SA, Nadagouda NM. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2004; 100(1): 5 –28.
27. Guterres SS, Alves MP, Pohlmann AR. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules for Cutaneous Applications. *Journal Drug Target Insights*. 2007; 2: 147-157
28. Francis-Goforth KN, Harken AH, Saba JD. Normalization of diabetic wound healing. *Surgery*. 2010;147(3):446-9.
29. Pelegrinelli FF, Thirone AC, Gasparetti AL et al. Early steps of insulin action in the skin of intact rats. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 971–6.
30. Ueno H, Murakami M, Okumura M *et al*. Chitosan accelerates the production of osteopontin from polymorphonuclear leukocytes. *Biomaterials*. 2001; 22(12): 1667– 1673.
31. Broughton G, Janis JE, Attinger CE. The Basic Science of Wound Healing: *Plast Reconstr Surg*. 2006; 117:12S–34S.

32. Lee DW, Lim H, Chong HN, Shim WS. Advances in chitosan material and its hybrid derivatives: a review. *Open Biomater J* 2009;1:10–20.
33. Ribeiro MP, Espiga A, Silva D, Baptista P, Henriques J, Ferreira C, et al. Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing. *Wound Repair Regen*. 2009;17:817–24.
34. Mi FL, Shyu SS, Wu YB, Lee ST, Shyong JY, Huang RN. Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. *Biomaterials*. 2001;22:165–73.
35. Inan ZDS, Saraydin SU. Investigation of The Wound Healing Effects of Chitosan on FGFR3 and VEGF Immunolocalization in Experimentally Diabetic Rats. *International Journal of Biomedical Materials Research*. 2013; 1(1): 1-8
36. Madibally SV, Solomon V, Mitchell RN, Van De Water L, Yarmush ML, et al. Influence of insulin therapy on burn wound healing in rats. *J Surg Res*. 2003; 109: 92–100.
37. Gallagher KA, Liu ZJ, Xiao M, Chen H, Goldstein LJ, et al. Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 alpha. *J Clin Invest*. 2007; 117: 1249–1259.
38. Wang T, Zhu XK, Xue XT, Wu DY. Hydrogel sheets of chitosan, honey and gelatin as burn wound dressings. *Carbohydr Polym*. 2012;88(1):75–83.
39. Pietramaggiore G, Yang HJ, Scherer SS, Kaipainen A, Chan RK, Alperovich M, et al. Effects of poly-N-acetyl glucosamine (pGlcNAc) patch on wound healing in db/db mouse. *J Trauma* 2008;64:803–8

CAPÍTULO 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O processo cicatricial compreende uma sequência de eventos moleculares e celulares que interagem para que ocorra a restauração do tecido lesado. O processo de restauração da pele é indispensável à vida e quanto mais rápido ocorrer, menor será o tempo de exposição do organismo a uma série de patógenos. Estudos clínicos e experimentais têm mostrado que o processo de cicatrização de feridas está prejudicado em pacientes com diabetes. Com o aumento mundial dos casos do diabetes, suas complicações têm se tornado cada vez mais uma preocupação para a saúde pública.

Nanopartículas poliméricas estão sendo cada vez mais estudadas por suas propriedades de liberação sustentada e por alcançar sítios específicos de ação de fármacos. Dentre os polímeros naturais, a quitosana tem sido muito utilizada na produção de nanopartículas por ser um polissacarídeo hidrofílico, biocompatível, biodegradável e de baixa toxicidade. A quitosana tem sido estudada quanto a sua capacidade de acelerar a cicatrização e vem sendo testada na terapia de lesões de difícil cicatrização.

A insulina exerce um importante efeito metabólico e mitogênico celular, mediado através do receptor de insulina, que está presente em tecidos de vertebrados em diferentes concentrações e variando de acordo com o tipo de tecido.

Este trabalho apresentou uma abordagem inovadora pela utilização de nanopartículas de quitosana contendo insulina como proposição de uma terapia alternativa para o tratamento de feridas em pacientes diabéticos. E visou, portanto, contribuir para o desenvolvimento científico e também melhorar a qualidade de vida dos milhares de pacientes diabéticos que apresentam feridas de difícil cicatrização.

Com o protocolo utilizado foi possível preparar nanopartículas de quitosana, de forma eficiente, pelo método de gelificação iônica, onde a formação aconteceu de forma espontânea por meio das interações entre cargas opostas, positivas da quitosana e negativas do TPP. A metodologia empregada levou à formação de nanopartículas de quitosana com diâmetro, PDI, potencial zeta, que são valores adequados para o uso na cicatrização de feridas. A eficiência de associação foi de $97.19\% \pm 2.18$, confirmando que a metodologia empregada foi satisfatória para a preparação e caracterização de nanopartículas com insulina.

O uso tópico de nanopartículas de quitosana vazias ou contendo insulina na cicatrização de feridas em ratos diabéticos foi capaz de estimular a proliferação de células inflamatórias e angiogênese, seguida de maturação da ferida. No entanto, as diferenças

nos dados de cicatrização de feridas do grupo tratado com nanopartículas contendo insulina e do grupo tratado com insulina livre, podem estar relacionadas à alta estabilidade das nanopartículas.

REFERÊNCIAS

AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan based micro and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 10, n. 1, p. 5-28, 2004.

AJUN, W.; YAN, S.; LI, G.; HUILI, L. Preparation of aspirin and probucol in combinationloaded chitosan nanoparticles and in vitro release study. *Carbohydr. Polym.* 75 566–574, 2009.

AMINABHAVI, T. M.; AGNIHOTRI, S. A.; NADAGOUDA, N. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release* 100: 5 –28, 2004.

ANITHA, A.; SOWMYA, S.; KUMAR, P.T.S.; DEEPTHI, S.; CHENNAZHI, K.P.; EHRLICH, H. Chitin and chitosan in selected biomedical applications, *Progress in Polymer Science*. 39: 1644-1667, 2014.

AOUADA, M. R. M. Aplicação de nanopartículas em filmes utilizados em embalagens para alimentos. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos - SP, 2009.

APIKOGLUS-RABUS, S.; IZZETTIN, F. V.; TURAN, P.; ERCAN, F. Effect of topical insulin on cutaneous wound healing in rats with or without acute diabetes. *Clin Exp Dermatol*, 35(2):180-5, 2010.

AZEVEDO, F. F. Effect of topical insulin on cutaneouswound healing in diabetic rats. Campinas [Dissertação de Mestrado em Enfermagem - FMC/ UNICAMP], 2013.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA, F. M. V.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. *Rev Elet Mat Proc* 2(3): 27-34, 2007.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 41:42, 2005.

BALTZIS, D.; ELEFTHERIADOU, I.; VEVES, A. Pathogenesis and treatment of impaired wound healing in diabetes mellitus: new insights. *Adv Ther*. 31(8):817-36, 2014.

BARBOSA, M.A.; GRANJA, P.L.; BARRIAS, C.C.; AMARAL, I.F. Polysaccharides as scaffolds for bone regeneration. *ITBM-RBM*, v.26, n.3, p.212-217, 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248, 1976.

BRANT, A. J. C. Preparação e caracterização de hidrogéis a partir de misturas de soluções de quitosana e poli (N-vinil-2-pirrolidona). 170f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

CALVO, P.; REMUNAN-LOPEZ, C.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J Applied Polymer Sci* 63(1): 125-132, 1997.

CHO, E. J.; HOLBACK, H. Nanoparticle characterization: state of the art, challenges, and emerging technologies. *Molecular pharmaceutics*, v. 10, n. 6, p. 2093–110, 2013.

CLARK, R. A. F.; GHOSH, K.; TONNESEN, M. G. Tissue Engineering for Cutaneous Wounds. *J Invest Dermatol*. 127: 1018-1029, 2007.

CORRÊA, M. A. Cosmetologia: Ciência e técnica. Livraria e Editora Medfarma. São Paulo, 2012.

DEEPTHI, S. J.; VENKATESAN, S.K.; KIM, J. D.; BUMGARDNER, R.; JAYAKUMAR, R. An overview of chitin or chitosan/nano ceramic composite scaffolds for bone tissue engineering, *Int. J. Biol. Macromol*. 93: 1338-1353, 2016.

DEMIDOVA-RICE, T. N.; HAMBLIN, M. R.; HERMAN, I. M. Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care. *Adv Skin Wound Care*. 25 (7): 304-14, 2012.

DESTA, T.; LI, J.; CHINO, T.; GRAVES, D. Altered Fibroblast Proliferation and Apoptosis in Diabetic Gingival Wounds. *J Dent Res*. 89 (6): 609–14, 2010.

DEV, A.; MOHAN, J. C.; SREEJA, V.; TAMURA, H.; PATZKE, G. R.; NAIR, S. V. Novel carboxymethyl chitin nanoparticles for cancer drug delivery applications. *Carbohydr Polym*. 79: 273-9, 2010.

DIAS, T. A. Gel de quitosana à 2% na cicatrização de feridas cutâneas em ratas diabéticas. Goiânia [Dissertação de Mestrado em Ciência Animal – EVZ/ UFG], 2012.

DOUNIGHI, N. M.; ESKANDARI, R.; AVADI, M. R.; ZOLFAGHARIAN, H.; SADEGHI, A. M. M.; REZAYAT, M. Preparation and in vitro characterization of chitosan nanoparticles containing *Mesobuthus eupeus* scorpion venom as an antigen delivery system. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 18: 44-52, 2012.

DOUNIGHI, N. M.; ESKANDARI, R.; AVADI, M. R.; ZOLFAGHARIAN, H.; SADEGHI, A. M. M.; REZAYAT, M. Preparation and in vitro characterization of chitosan nanoparticles containing *Mesobuthus eupeus* scorpion venom as an antigen delivery system. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 18: 44-52, 2012.

EMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Gene therapy and wound healing. *Clin Dermatol*. 25:79-92, 2007.

FERREIRA, A. O. Guia Prático da Farmácia Magistral. 4. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2010.

FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R.; SILVA, F. C. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. *Química Nova*. Vol. 32, Nº. 3, pp. 623-638, 2009.

FRANCIS-GOFORTH, K. N.; HARKEN, A. H.; SABA, J. D. Normalization of diabetic wound healing. *Surgery*. 147(3): 446-9, 2010.

GALKOWSKA, H.; WOJEWODZKA, U.; OLSZEWSKI, W. L.; Chemokines, cytokines, and growth factors in keratinocytes and dermal endothelial cells in the margin of chronic diabetic foot ulcers. *Wound Repair Regen*. 14(5): 558-65, 2006.

GALLAGHER, K. A.; LIU, Z. J.; XIAO, M.; CHEN, H.; GOLDSTEIN, L. J. Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 alpha. *J Clin Invest*. 117: 1249–1259, 2007.

GANTWERKER, E. A.; HOM, D. B. Skin: histology and physiology of wound healing. *Facial Plast Surg Clin North Am*. 19 (3):441-53, 2011.

GONÇALVES, A. A; ARAÚJO, C. R.M.; SOARES, N. A.; GOULART, M. O. F; ABREU, F. C. Diferentes estratégias para reticulação da quitosana. *Química Nova*. 34, p. 1215-1223, 2011.

GONÇALVES, A. A; ARAÚJO, C. R.M.; SOARES, N. A.; GOULART, M. O. F; ABREU, F. C. Diferentes estratégias para reticulação da quitosana. *Química Nova*, v. 34, p. 1215-1223, 2011.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules for Cutaneous Applications. *Journal Drug Target Insights*. 2: 147-157, 2007.

GUYTON, A.; HALL, J. E.. *Tratado de Fisiologia Médica*. 13.ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2017

HARPER, D.; YOUNG, A.; McNAUGHT, C. E. The physiology of wound healing. *Surgery*. 32(9):445-50, 2014..

HOWLING, G.I.; DETTMAR, P.W.; GODDARD, P.A.; HAMPSON, F.C.; DORNISH, M.; WOOD, E.J. The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. *Biomaterials*, Surry, v.22, n.22, p.2959-2966, 2001.

ING, L. Y.; ZIN, N. M.; SARWAR, A.; KATAS, H. Antifungal Activity of Chitosan Nanoparticles and Correlation with Their Physical Properties. *Int J Biomater* 2012: 1-9, 2012.

ISAAC, C.; LADEIRA, P. R. S.; RÊGO, F. M. P.; ALDUNATE, J. C. B.; FERREIRA, M. C. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. *Rev Med.* 89 (3/4): 125-31, 2010.

JAFARINEJAD, S.; GILANI, K.; MOAZENI, E.; GHAZI-KHANSARI, M.; NAJFABADI, A. R.; MOHAJEL, N. Development of chitosan-based nanoparticles for pulmonary delivery of itraconazole as dry powder formulation, *Powder Technol.* 2012; 222 65–70, 2012.

JAYAKUMAR, R.; PRABAHARAN, M.; SUDHEESH KUMAR, T.; NAIR, S. V.; TAMURA, H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances.* 29: 322–337, 2011.

JAYAKUMAR, R.; CHENNAZHI, K. P.; MUZZARELLI, R. A. A.; TAMURA, H.; NAIR, S. V.; SELVAMURUGAN, N. Chitosan conjugated DNA nanoparticles in gene therapy. *Carbohydr Polym.* 79:1-8, 2010a.

JAYAKUMAR, R.; PRABAHARAN, M.; NAIR, S. V.; TOKURA, S.; TAMURA, H.; SELVAMURUGAN, N. Novel carboxymethyl derivatives of chitin and chitosan materials and their biomedical applications. *Prog Mater Sci.* 55:675–709, 2010d.

JAYAKUMAR, R.; REIS, R. L.; MANO, J. F. Phosphorous containing chitosan beads for controlled oral drug delivery. *J Bioact Compat Polym.* 21:327-40, 2006.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica: Texto e Atlas.* Guanabara Koogan, 13^a ed. Rio de Janeiro, 2017.

KAPOOR, V.; CHANDALIA, H. B.; SINGH, D.; CHANDALIA, S. H.; LAMBA, P. S. Footwear and foot care knowledge as risk factors for foot problems in Indian diabetics. *Int J Diabetes Dev Ctries*. 28 (4): 109-13, 2008.

KEMPPAINEN, K. M.; ARDISSONE, A. N.; DAVIS-RICHARDSON, A. G.; FAGEN, J. R.; GANO, K. A.; LEON-NOVELO, L. G. Early childhood gut microbiomes show strong geographic differences among subjects at high risk for type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 38(2):329-32, 2015.

KNILL, C.J.; KENNEDY, J.F.; MISTRY, J.; MIRAFATAB, M.; SMART, G.; GROOCCOCK, M.R.; WILLIAMS, H.J. Alginate fibres modified with unhydrolysed and hydrolysed chitosans for wound dressings. *Carbohydrate Polymers*, Barking, v.55, n.1, p.65-76, 2004.

LAUREANO, A.; RODRIGUES, A. M. Cicatrização de Feridas. *Rev Soc Port Dermatol Venereol*. 355–67, 2011.

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin. Dermatol*. 25(1): 9-18, 2007.

LI, P.; WANG, Y.; PENG, Z.; SHE, F.; KONG, L. Development of chitosan nanoparticles as drug delivery systems for 5-fluorouracil and leucovorin blends. *Carbohydr. Polym*. 85: 698-704, 2011.

LIMA, M. H. M.; ARAÚJO, E. P. Diabetes mellitus e o processo de cicatrização cutânea. *Cogitare Enferm* 08: 170-172, 2013.

LIMA, M. H. M.; CARICILLI, A. M.; ABREU, L. L.; ARAÚJO, E. P.; PELEGRINELLI, F. F.; THIRONE, A. C. P.; TSUKUMO, D. M.; PESSOA, A. F. M.; SANTOS, M. F.; MORAES, M. A.; CARVALHEIRA, J. B. C.; VELLOSO, L. A.; SAAD, M. J. A. Topical Insulin Accelerates Wound Healing in Diabetes by Enhancing the AKT and ERK Pathways: A Double-Blind Placebo-Controlled Clinical Trial. *Plos One* 7(5), 2012.

MA, Z.; LIM, T. M.; LIM L. Y. Pharmacological activity of peroral chitosan–insulin nanoparticles in diabetic rats. *International Journal of Pharmaceutics* 293 271–280, 2005.

MADHUMATHI, K.; BINULAL, N. S.; NAGAHAMA, H.; TAMURA, H.; SHALUMON, K. T.; SELVAMURUGAN, N. Preparation and characterization of novel α -chitin-hydroxyapatite composite membranes for tissue engineering applications. *Int J Biol Macromol.* 44: 1-5, 2009.

MARTINS, S.; SARMENTO, B.; SOUTO, E. B.; FERREIRA, D. C. Insulin-loaded alginate microspheres for oral delivery—effect of polysaccharide reinforcement on physicochemical properties and release profile. *Carbohydr Polym* 69: 725–731, 2007.

MARTINS, V. L.; CALEY, M.; O'TOOLE, E. A. Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. *Cell Tissue Res.* 351 (2): 255-68, 2013.

MARTINS, V. L.; CALEY, M.; O'TOOLE, E. A. Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. *Cell Tissue Res.* 351(2): 255-68, 2013.

MAYOL, L.; De STEFANO, D.; CAMPANI, V.; De FALCO, F.; FERRARI, E.; CENCETTI, C.; MATRICARDI, P.; MAIURI, L.; CARNUCCIO, R.; GALLO, A.; MAIURI, M. C.; De ROSA, G. Design and characterization of a chitosan physical gel promoting wound healing in mice. *J Mater Sci Mater Med.* 25(6): 1483-93, 2014.

MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. *An Bras Dermatol.* 84(3): 257–62, 2009.

MOKARRAN, A. R.; ALONSO, M. J. Preparation and evaluation of chitosan nanoparticles containing Diphtheria toxoid as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. *Arch. Razi Inst.*, v. 61, n.1, p.13-25, 2006.

MOURA, C. M.; MOURA, J. M.; PINTO, L. A. A. Secagem de pasta de quitosana em camada delgada: avaliação do efeito da secagem sobre o grau de desacetilação e a massa molecular viscosimétrica. *Ciências Exatas e da Terra, Ponta Grossa*, v.15, n.2, p.89-86, 2009.

MUZZARELI, R. A. Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. *Cell Mol Life Sci*, 53(2):131-40, 1997.

NARDI, R. P. R. D. Estudo da cinética de liberação de gentamicina a partir de membranas de quitosana. Poços de Caldas [Trabalho de Conclusão de Curso em/UNIFAL], 2014.

NASTI, A.; ZAKI, N. M.; DE LEONARDIS, P.; UNGPHAIBOON, S.; SANSONGSAK, P.; RIMOLI, M. G.; TIRELLI, N. Chitosan/TPP and chitosan/TPP-hyaluronic acid nanoparticles: systematic optimization of the preparative process and preliminary biological evaluation, *Pharm. Res.* 1918–1930, 2009.

NEGRATO, C. A.; LAURIS, J. R. P.; SAGGIORO, I. B.; CORRADINI, M. C. M.; BORGES, P. R.; CRÊS, M. C. Increasing incidence of type 1 diabetes between 1986 and 2015 in Bauru, Brazil. *Diabetes Res Clin Pract.* 2017;127:198-204.

NEVES, A. L. P.; MILIOLI, C. C.; MÜLLER, L.; RIELLA, H. G.; KUHNEN, N. C.; STULZER, H. K. Factorial design as tools in chitosan nanoparticles development by ionic gelation technique. *Colloids Surf.* 445: 34–39, 2014.

OLIVEIRA, B. S.; NUNES, L. M. Avaliação de quitosana de caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*) como biofilme protetor em caju. *Scientia Plena, Aracaju*, v.7, n.4, p.1-6, 2011.

O'NEILL, S. M.; KENNY, L. C.; KHASHAN, A. S.; WEST, H. M.; SMYTH, R. M.; KEARNEY, P. M. Different insulin types and regimens for pregnant women with pre-existing diabetes. *Cochrane Database Syst Rev.* 2: 2017.

PAPADIMITRIOU, S.; BIKIARIS, D.; AVGOUSTAKIS, K.; KARAVAS, E.; GEORGARAKIS, M. Chitosan nanoparticles loaded with dorzolamide and pramipexole. *Carbohydrate Polymers*, v. 73, n. 1, p. 44-54, 2008.

PATEL, S.; SRIVASTAVA, S.; SINGH, M. R. Mechanistic insight into diabetic wounds: Pathogenesis, molecular targets and treatment strategies to pace wound healing. *Biomed Pharmacother.* 112, 2019.

PAZ, L. E. C.; RESIN, A.; HOWARD, K. A.; SUTHERLAND, D. S.; WEJSE, P. L. Antimicrobial effect of chitosan nanoparticles on *Streptococcus mutans* biofilms. *Appl Environ. Microbiol* 77: 3892–3895, 2011.

PELEGRINELLI, F. F.; THIRONE, A. C.; GASPARETTI, A. L. Early steps of insulin action in the skin of intact rats. *J Invest Dermatol*. 117: 971-6, 2001.

PERANTEAU, W.H.; ZHANG, L.; MUVARAK, N.; BADDILO, A.T.; RADU, A.; ZOLTICK, P.W.; LIECHTY, K.W. IL-10 overexpression decreases inflammatory mediators and promotes regenerative healing in an adult model of scar formation. *Journal of Investigative Dermatology*. Baltimore. 128(7): 1852-1860, 2008.

PETER, M.; SUDHEESH KUMAR, P. T.; BINULAL, N. S.; NAIR, S. V.; TAMURA, H.; JAYAKUMAR, R. Development of novel chitin/nano bioactive glass ceramic nanocomposite scaffolds for tissue engineering applications. *Carbohydr Polym*. 78:926-31, 2009.

PINHO, N. A. L; MILIOLI, C. C.; MÜLLER, L.; KUHNEN, N. C.; STULZER, H. K. Factorial design as tool in chitosan nanoparticles development by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 445 34–39, 2014. protein complexes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. V. 10, p. 52–78, 2014.

PORTERO, A.; TEIJEIRO-OSORIO, D.; ALONSO, M. J.; REMUNAN-LOPEZ, C. Development of chitosan sponges for buccal administration of insulin. *Carbohydr Polym*. 68: 617-25, 2007.

RAO, P. V. Type 2 diabetes in children: clinical aspects and risk factors. *J Endocrinol Metab*. 19 (Suppl 1): S47-50, 2015.

RODRIGUEZ-VAZQUEZ, M.; VEGA-RUIZ, B.; RAMOS-ZUNIGA, R.; D.A. SALDANA-KOPPEL, D. A.; QUINONES-OLVERA, L.F. Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine, *Biomed. Res. Int*. 2015.

ROY, K.; MAO, H. -Q.; HUANG, S. -K.; LEONG, K. W. Oral gene delivery with chitosan-dna nanoparticles generates immunological protection in a murine model of peanut allergy. *Nat. Med.* v. 5, p. 387-391, 1999.

SANTORO, M. M.; GAUDINO, G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Exp Cell Res.* 304: 274-86, 2005.

SARMENTO, B.; RIBEIRO, F.; VEIGA, F.; SAMPAIO, P.; NEUFELD, R.; FERREIRA, D. Alginate/chitosan nanoparticles are effective for oral insulin delivery. *Pharmaceutical Research.* 24: 2198- 2206, 2007.

SCHFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim Nova* 26(5): 726-737, 2003.

SCHMIDT, S.; SCHELDE, B.; NORGAARD, K. Effects of advanced carbohydrate counting in patients with type 1 diabetes: a systematic review. *Diabet Med.* 31(8):886-96, 2014.

SHALUMON, K. T.; ANULEKHA, K. H.; GIRISH, C. M.; NAIR, S. V.; JAYAKUMAR, R. Single step electrospinning of chitosan/poly(caprolactone) nanofibers using formic acid/acetone solvent mixture. *Carbohydr polym.* 80:413-9, 2010.

SHEARMAN, C. P.; RAWASHDEH, M. Foot complications in patients with diabetes. *Surgery.* 34 (4): 192-197, 2016.

SHUKLA, S. K.; MISHRA, A. K.; AROTIBA, O. A.; MAMBA, B. B. Chitosan-based nanomaterials: a state-of-the-art review. *Int J Biol Macromol.* 59(1): 46-58, 2013.

SINGH, R.; LILLARD, J. W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol* 86: 215–223, 2009.

SKYLER, J. S.; BARKRIS, G. L.; BONIFACIO, E.; DARSOW, T.; ECKEL, R. H.; GROOP, L. Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis. *Diabetes*. 66 (2): 241-55, 2017.

Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD). Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2017-2018. São Paulo: Editora Clannad, 2017.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Controlled Release*. 70(2): 1-20, 2001.

SUDHEESH KUMAR, P. T.; RAJ, N.M.; PRAVEEN, G.; CHENNAZHI, K.P.; NAIR, S.V.; JAYAKUMAR, R. In vitro and in vivo evaluation of microporous chitosan hydrogel/nanofibrin composite bandage for skin tissue regeneration, *Tissue Eng. Part A*. 19: 380-392, 2013.

TAMURA, H.; FURUIKE, T.; NAIR, S. V.; JAYAKUMAR, R. Biomedical applications of chitin hydrogel membranes and scaffolds. *Carbohydr Polym*. 2010.

TAZIMA, M. F. G. S.; VICENTE, Y. A. M. V. A.; MORIYA, T. Biologia da ferida e cicatrização. *Medicina*. 41 (3): 259-64, 2008.

TELO, G. H.; CUREAU, F. V.; De SOUZA, M. S.; ANDRADE, T. S.; COPÊS, F.; SCHAAN, B. D. Prevalence of diabetes in Brazil over time: a systematic review with meta-analysis. *Diabetol Metab Syndr*. 8(1): 65, 2016.

UPPALAPATI, D.; BOYD, B. J.; GARG, S.; TRAVAS-SEJDIC, J.; SVIRSKIS, D. Conducting polymers with defined micro- or nanostructures for drug delivery. *Biomater* 111: 149-162, 2016.

URRUSUNO, F. R. E.; FATTAL, J.; FÉGER, P.; COUVREUR, P.; THÉRON, P. Evaluation of hepatic antioxidant systems after intravenous administration of polymeric nanoparticles. *Biomaterials*. 511–517, 1997.

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharm Res* 26: 1025-1058, 2009.

VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOLJ, V. The wound healing process: an Overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res.* 37: 1528-1542, 2009.

YOUNES, I.; RINAUDO, M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Mar Drugs*.13(3):1133-74, 2015.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Quim. Nova*, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

ZANATTA, E. T.; TIERA, M. J. Estudo físico-químico de nanopartículas obtidas pela interação de DNA com quitosanas de baixa massa molecular e diferentes graus de acetilação. In: XXXVI COLÓQUIO DE INCENTIVO À PESQUISA, 2009.

ZHANG, X. G.; ZHANG, H. J.; WU, Z. M.; WANG, Z.; NIU, H. M.; LI, C. X. Nasal absorption enhancement of insulin using PEG-grafted chitosan nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 68: 526–534, 2007.

ANEXO – Normas da Revista *International Wound Journal*

Author Guidelines

The International Wound Journal (IWJ) is a journal focused on providing the best quality information, research data and education on all aspects of wounds and wound healing. It provides the single best resource of information for all professional disciplines involved in the care of patients with wounds.

SUBMISSION INFORMATION

From now on all submissions to the journal must be submitted online at <http://mc.manuscriptcentral.com/iwj>.

There is no word limit for manuscripts in the International Wound Journal

UK authors should note that publication in IWJ is fully compliant with HEFCE's post-2014 Research Excellence Framework.

Full instructions and support are available on the site and a user ID and password can be obtained on the first visit. If you require assistance then click the Get Help Now link which appears at the top right of every ScholarOne Manuscripts page.

The Editor requires that with each submission, the authors provide written assurance that the paper has not been previously published and that no other submission or publication will be made. Abstracts of oral or poster presentation are not considered to constitute prior publication.

Please ensure that a Title Page is submitted together with your manuscript, listing the following:

- Article title
- Authors' names
- Authors' affiliation
- Correspondence address
- Keywords
- Key messages [please note that these are separate from Keywords]
- Abstract
- 3 Reviewers' names (please refer to instructions above)

Title page

The title page will carry (a) the title of the article, which should be concise but informative; (b) first name, middle initial, and last name of each author, with highest academic degree(s) and institutional affiliation; (c) name of department(s) and institution(s) to which the work should be attributed; (d) name, address, telephone, fax number, and email address of author responsible for correspondence about the manuscript; (e) name and address of author to whom requests for reprints should be addressed.

Authorship

All persons designated as authors must qualify for authorship. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for the content. Participation solely in the acquisition of funding or the collection of data does not justify authorship. General supervision of the research group is also not sufficient for authorship.

Abstract and Keywords

Your title page will carry an abstract of no more than 200 words. The abstract should state the purposes of the investigation, basic procedures, main findings, BE SPECIFIC, and the principal conclusions. Emphasize new or unique aspects of the investigation. Abbreviations may not be used in the abstract. This should be followed by not more than 5 keywords in alphabetical order. **Keywords are NOT Key Messages.**

Key Messages

Key Messages must include:

- A general statement briefly describing the paper (e.g. “successful wound healing depends on tightly regulated haemostasis....”)
- The aim or goal of your manuscript What was used in your study (e.g. “26 mice were used for this study. XX software was used for XX.”)
- 1 to 2 sentences briefly summarizing the Results section

General instructions for manuscript style

Use double-spacing throughout, including title page, abstract, text, acknowledgments, references, footnotes, tables, and legends for illustrations. Begin each of the following sections on separate pages: title page, abstract and key words, text, acknowledgments, references, footnotes, figure legends, and individual tables.

Number pages consecutively, beginning with the title page. Once a manuscript is accepted, the final version of the manuscript should be submitted electronically. Guidelines for electronic submission of accepted manuscripts will be sent to the author by the editorial office.

Text

The text of the original research manuscript should be divided into the following sections with headings: Introduction, Methods, Results, Discussion. Longer articles may be further divided with appropriate subheadings. Review Articles should be suitably divided with appropriate subheadings.

Introduction

State the purpose of the article. Summarize the rationale for the study, giving only pertinent references, and do not review the subject extensively. Do not include data or conclusions from the work to be reported.

Materials and methods

Identify the methods, apparatus (include manufacturer's name and address in parentheses), and procedures in sufficient detail to allow other workers to reproduce the results. Give references to established methods; provide references and brief descriptions for methods that have been published but are not well known; and describe in greater

detail new or substantially modified methods. Identify precisely all drugs and chemicals used, including generic name(s), dose(s), and route(s) of administration.

Ethical considerations

Human investigations. Manuscripts reporting data obtained from research conducted in human subjects must include assurance that informed consent was obtained from each patient. In addition, the manuscript must include assurance that the study protocol conformed to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki as reflected in approval by the institution's human research review committee. A statement to this effect must be provided within the Methods section.

Animal investigations. Manuscripts reporting data obtained from research using animals must include a statement of assurance that all animals received humane care. Study protocols must be in compliance with the institution's guidelines or the National Research Council's criteria for humane care as outlined in 'Guide for the Care and Use of Laboratory Animals' prepared by the Institute of Laboratory Animal Resources and published by the National Institutes of Health (NIH Publication No. 86-23, Revised 1985). A statement to this effect must be provided within the Methods section.

Statistics

Statistical methods must be described in sufficient detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. Whenever possible, quantify findings and present them with appropriate indicators of measurement error or uncertainty. Statistical probability (p) should be reported in tables, figures, and figure legends at only one of the following levels p

Results

Present the results in a logical sequence in the tables and illustrations. DO NOT repeat in the text all the data in the tables or illustrations; emphasize or summarize only important observations.

Discussion

Emphasize the new and important aspects of the study and the conclusions that follow from them. DO NOT repeat in detail data or other material given in the Introduction or Results section. Include in the Discussion section the implications of the findings and their limitations, including implications for future research. Link the conclusions with the goals of the study, avoid unqualified statements and conclusions not supported by the data. State the hypotheses when warranted, but clearly label them as such.

Acknowledgments

This section contains one or more statements that specify (a) contributions that need acknowledgment but do not justify authorship; (b) acknowledgment of technical help; (c) acknowledgments of financial and material support (specify the nature of the support); (d) financial relationships that may pose a conflict of interest (including the involvement of sponsors in writing or reviewing material).

References

We recommend the use of a tool such as Reference Manager for reference management and formatting.

Reference Manager reference styles can be searched for here:

<http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>

Number references consecutively in the order in which they are mentioned in the text. Identify references in text, tables, and figure legends by Arabic numerals in parentheses. References cited only in tables or figure legends should be numbered last. Use the style of the following examples, which are based with slight modification on the formats set forth in 'Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals,' also known as the 'Vancouver' style for biomedical journals (JAMA 1993;269:22282-6).